



Universidad de Valladolid

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA

TESIS DOCTORAL:

**MÉTODOS AVANZADOS PARA EL ANÁLISIS,
CONSERVACIÓN Y EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS
FENÓLICOS EN ALIMENTOS**

Presentada por Noelia Manchón Diez para optar al grado de doctora por la Universidad de Valladolid

Dirigida por:

Mauricio Ariel Rostagno
Laura Mateo Vivaracho
María Isabel Estrella Pedrola
Matilde D'Arrigo Huapaya

Ponente:

María Teresa Martín Gómez



Universidad de Valladolid

Impreso 1T

**AUTORIZACIÓN DEL DEPARTAMENTO O COMISIÓN ACADÉMICA RESPONSABLE DEL
PROGRAMA DE DOCTORADO A LA PRESENTACIÓN DE TESIS DOCTORAL**

(Art. 2.1. c de la Normativa para la presentación y defensa de la Tesis Doctoral en la UVa)

El departamento de (1) QUÍMICA ANALÍTICA o
(2) La Comisión Académica del Doctorado en QUÍMICA ANALÍTICA APLICADA. CONTAMINACIÓN
Y MEDIO AMBIENTE en su reunión de fecha 13 de Octubre de 2015, acordó autorizar la
presentación de la siguiente Tesis Doctoral, al considerar que cumple todos los requisitos
establecidos en la legislación vigente:

**Título: MÉTODOS AVANZADOS PARA EL ANÁLISIS, CONSERVACIÓN Y EXTRACCIÓN DE
COMPUESTOS FENÓLICOS EN ALIMENTOS**

Autora: D^a NOELIA MANCHÓN DÍEZ, con DNI nº 71940321R

Director/es: Dr. Mauricio Ariel Rostagno, con NIE nº X4173768-G;

Dra. Laura Mateo Vivaracho, con DNI nº 72885427Z;

Dra. María Isabel Estrella Pedrola, con DNI nº 27143733;

Dra. Matilde D'Arrigo Huapaya, con DNI nº 50331573Y.

Valladolid, 13 de octubre de 2015

El Director del Departamento/Presidente Comisión Académica

Fdo.: Rafael Pardo Almudí

SRA. PRESIDENTA DE LA COMISIÓN DE DOCTORADO

(1) para los programas regulados por el R.D. 185/1985, R.D. 778/1998

(2) para los regulados por el R.D. 56/2005, R.D. 1393/2007 y R.D. 99/2011.



Universidad de Valladolid

Impreso 2T

AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR DE TESIS

(Art. 2.1. c de la Normativa para la presentación y defensa de la Tesis Doctoral en la UVa)

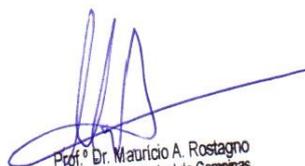
D. Mauricio Ariel Rostagno, con D.N.I. (NIE) X4173768-G, Profesor Doctor contratado de la Universidad Estadual de Campinas (UNICAMP) en la Facultad de Ciencias Aplicadas (FCA), y con correo electrónico mauricio.rostagno@fca.unicamp.br, como Director de la Tesis Doctoral titulada:

MÉTODOS AVANZADOS PARA EL ANÁLISIS, CONSERVACIÓN Y EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN ALIMENTOS

presentada por **Dña. NOELIA MANCHÓN DÍEZ**, alumna del programa de DOCTORADO EN QUÍMICA ANALÍTICA APLICADA. CONTAMINACIÓN Y MEDIO AMBIENTE impartido por el departamento de Química Analítica de la Universidad de Valladolid, autoriza la presentación de la misma, considerando que el candidato cumple todos los requisitos establecidos en la legislación vigente.

Campinas, 21 de Octubre de 2015

El Director de la Tesis,



Prof.º Dr. Mauricio A. Rostagno
Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Ciências Aplicadas
Matrícula 308164

Fdo.: Mauricio Ariel Rostagno.

SRA. PRESIDENTA DE LA COMISIÓN DE DOCTORADO



Universidad de Valladolid

Impreso 2T

AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR DE TESIS

(Art. 2.1. c de la Normativa para la presentación y defensa de la Tesis Doctoral en la UVa)

Dña. LAURA MATEO VIVARACHO, con D.N.I. 72885427 Z, investigadora contratada del Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias y Alimentarias (INIA), en el Centro para la Calidad de los Alimentos del INIA en Soria, y con correo electrónico mateo.vivaracho@inia.es, como Directora de la Tesis Doctoral titulada:

MÉTODOS AVANZADOS PARA EL ANÁLISIS, CONSERVACIÓN Y EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN ALIMENTOS

presentada por Dña. NOELIA MANCHÓN DÍEZ, alumna del programa de DOCTORADO EN QUÍMICA ANALÍTICA APLICADA. CONTAMINACIÓN Y MEDIO AMBIENTE impartido por el departamento de Química Analítica de la Universidad de Valladolid, autoriza la presentación de la misma, considerando que el candidato cumple todos los requisitos establecidos en la legislación vigente.

Soria, 21 de Octubre de 2015

A handwritten signature in blue ink, appearing to be "Laura Mateo Vivaracho", written over a horizontal line.

El Director de la Tesis,

Fdo.: Laura Mateo Vivaracho.

SRA. PRESIDENTA DE LA COMISIÓN DE DOCTORADO



Universidad de Valladolid

Impreso 2T

AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR DE TESIS

(Art. 2.1. c de la Normativa para la presentación y defensa de la Tesis Doctoral en la UVa)

Dña. María Isabel Estrella Pedrola, con D.N.I. 27143733-F, Investigador científico (jubilada) del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, y con correo electrónico mepedrola@gmail.com, como Directora de la Tesis Doctoral titulada:

MÉTODOS AVANZADOS PARA EL ANÁLISIS, CONSERVACIÓN Y EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN ALIMENTOS

presentada por Dña. **NOELIA MANCHÓN DÍEZ**, alumna del programa de DOCTORADO EN QUÍMICA ANALÍTICA APLICADA. CONTAMINACIÓN Y MEDIO AMBIENTE impartido por el departamento de Química Analítica de la Universidad de Valladolid, autoriza la presentación de la misma, considerando que el candidato cumple todos los requisitos establecidos en la legislación vigente.

Madrid, 21 de Octubre de 2015

El Director de la Tesis,

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'M. Estrella', written over a faint rectangular stamp.

Fdo.: María Isabel Estrella Pedrola.

SRA. PRESIDENTA DE LA COMISIÓN DE DOCTORADO



Universidad de Valladolid

Impreso 2T

AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR DE TESIS

(Art. 2.1. c de la Normativa para la presentación y defensa de la Tesis Doctoral en la UVa)

Dña. Matilde Honorina D'Arrigo Huapaya, con D.N.I50331573Y, investigadora contratada del Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias y Alimentarias (INIA), en el Centro para la Calidad de los Alimentos del INIA en Soria, y con correo electrónico darrigo.matilde@inia.es, como Directora de la Tesis Doctoral titulada:

MÉTODOS AVANZADOS PARA EL ANÁLISIS, CONSERVACIÓN Y EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN ALIMENTOS

presentada por Dña. NOELIA MANCHÓN DÍEZ, alumna del programa de DOCTORADO EN QUÍMICA ANALÍTICA APLICADA. CONTAMINACIÓN Y MEDIO AMBIENTE impartido por el departamento de Química Analítica de la Universidad de Valladolid, autoriza la presentación de la misma, considerando que el candidato cumple todos los requisitos establecidos en la legislación vigente.

Soria, 21 de Octubre de 2015

El Director de la Tesis,

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Matilde Honorina D'Arrigo Huapaya', written over a horizontal line.

Fdo.: Matilde Honorina D'Arrigo Huapaya.

SRA. PRESIDENTA DE LA COMISIÓN DE DOCTORADO

Este trabajo ha sido realizado gracias a la beca de Formación de Personal Investigador del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (FPI-INIA) concedida a Dña. Noelia Manchón Díez durante 2008-2012.

Durante el desarrollo de la presente Tesis Doctoral han sido publicados los siguientes trabajos:

- M. A. Rostagno, N. MANCHÓN, E. Guillamón, A. García-Lafuente, A. Villares, J. A. Martínez, Methods and techniques for the analysis of isoflavones in foods. In: Chromatography: Types, Techniques and Methods, Toma J. Quintin (Ed.), Nova Science Publishers, Inc., Hauppauge, NY, ISBN: 978-1-60876-316-0, 2010, pp. 157-198
- M. A. Rostagno, N. MANCHÓN, M. D'Arrigo, A. García-Lafuente, A. Villares, E. Guillamón, J. A. Martínez, A. Ramos, Prevention of Cardiovascular Diseases by Soy Protein and Isoflavones. In: Isoflavones: Biosynthesis, Occurrence and Health Effects, Nova Science Publishers, Inc., Hauppauge, NY, 2010, pp. 83-110
- M.A. Rostagno, N. MANCHÓN, Trends in sample preparation for the determination of phytochemicals in natural products, The Column (LG-GC Europe digital publication), 12 (2010) 3-6
- N. MANCHÓN, M. D'Arrigo, A. García-Lafuente, E. Guillamón, A. Villares, A. Ramos, J.A. Martínez, M.A. Rostagno, Fast analysis of isoflavones by high-performance liquid chromatography using a column packed with fused-core particles, Talanta, 82 (2010) 1984-1996
- M.A. Rostagno, N. MANCHÓN, M. D'Arrigo, E. Guillamón, A. Villares, A. García-Lafuente, A. Ramos, J.A. Martínez, Fast and simultaneous determination of phenolic compounds and caffeine in different samples by high-performance liquid chromatography using a fused-core particle column, Analytica Chimica Acta, 685 (2011) 204–211
- N. MANCHÓN, M. D'Arrigo, A. García-Lafuente, E. Guillamón, A. Villares, J. A. Martínez, A. Ramos, M. A. Rostagno, Comparison of different types of stationary phases for the analysis of soy isoflavones by HPLC, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 400 (2011), 1251–1261
- N. MANCHÓN, L. Mateo-Vivaracho, M. D'Arrigo, A. García-Lafuente, E. Guillamón, A. Villares, M. A. Rostagno, Distribution patterns of polyphenols and alkaloids in instant coffee, soft and energy drinks and tea, Czech Journal of Food Sciences, 31 (2013) 483-500
- A. García-Lafuente, C. Moro, N. MANCHÓN, A. Gonzalo-Ruiz, A. Villares, E. Guillamón, M.A. Rostagno, L. Mateo-Vivaracho, In vitro anti-inflammatory activity of phenolic rich extracts from white and red common beans, Food Chemistry, 161 (2014) 216-223

"No entiendes realmente algo a menos que seas capaz de explicárselo a tu abuela."

Albert Einstein

"La frase mas excitante que se puede oír en ciencia, la que anuncia nuevos descubrimientos, no es "¡Eureka!" (¡Lo encontré!) sino "Es extraño..." "

Isaac Asimov

AGRADECIMIENTOS

Esta es la parte de la escritura de la tesis que más me ha costado y llevo madurando más días (semanas), los que me conocéis bien sabéis que no me gustan mucho las palabras para decir algo que siento, que escribiendo no me expreso todo lo bien que debo, soy más de hechos, pero lo intentaré.

Agradecer en primer lugar a todos mis directores de tesis, porque ellos tienen la culpa de que haya llegado este día y nunca se lo agradeceré lo suficiente. Ver como os esforzasteis, cada uno en su momento, a que no tirara la toalla en las distintas etapas que he vivido durante el desarrollo de esta tesis ha hecho que por fin la pueda presentar.

A Mauricio, muchas gracias por aguantarme, sé que es complicado trabajar con mi testardez y “mala leche” pero supiste llevarme y confiaste en que podría sacar algo de todo esto. Eras el que me picaba a ver si podía seguir más allá y mírame, ¡lo conseguiste! Hasta hiciste que fuera a Brasil contigo, aquella chica que la primera vez que iba de congreso sola se agobió. He aprendido mucho de tu confianza en ti mismo y tu forma de enfocar el trabajo. Sé que no sólo tengo un director de tesis sino también un buen amigo.

Y a Laura, ¡qué decir! Si no hubiese sido por ti en gran parte esta tesis no sería la que es (y no estaríamos en este momento). Gracias por confiar en que podía hacerlo, por enseñarme otro enfoque al trabajo, tu paciencia, por estar pendiente de mí en esta última etapa, si no hubiesen sido por tus emails con tus frases de presión yo no hubiera llegado a este día. Eres la que me ha dado el empujón necesario para que la terminara y la que lo ha hecho posible. ¡Muchas gracias!

A la gente del Centro para la Calidad de los Alimentos quisiera agradecerles hacer del trabajo una diversión. Gracias a todos, Ana, Eva, Ana, Laura, José Manuel, Félix... y en especial a los becarios (Miguel, Carlos e Irene), ¡qué hubiera sido de nosotros sin nosotros mismos! Gracias chicos por esas tardes de desconexión, esas fiestas y ese apoyo en el trabajo. A Matilde, por estar ahí cuando me sentía sola, escucharme cuando necesitaba desahogarme, por esas cañas compartidas y tus ricas comidas peruanas. Gracias de corazón.

A mi Chus, mi madre de Soria, fuiste el gran apoyo sentimental que necesité durante muchos días en mi vida en Soria. La que me enseñó el arte de la micología y con la que reía hasta llorar. Gracias por acogerme en tu familia como una más.

Y por supuesto a Charo, desde el primer día sabía que no sólo iba a tener una gran compañera de trabajo sino una gran amiga, gracias Charini por ser cómo eres y ¡nunca dejes de serlo!

A toda la gente del CSIC, MariCarmen, Maribel, Pepe y en especial a Maribel y a Teresa porque me acogisteis cuando me quedé un poco desamparada en este mundo de la investigación y nunca me hicisteis sentir extraña en la que era “vuestra casa”. Muchas gracias por todo, igual no considerais que hicierais nada pero en ese momento que vivía me disteis las ganas de seguir y no rendirme. Nunca olvidaré los cafés a media mañana en el laboratorio.

A todo el mundo que compartió mis estancias tanto en República Checa como en Brasil. Al Dr. Klejdus y a la Dra. Meireles, por aceptar mi colaboración en vuestros grupos de trabajo. A Marie, Eva, Pavel y Miguel por acompañarme en la experiencia y hacerla más grande aún, por esas cervezas y esas comidas checas, no sólo me traje muchos kilos de más de Brno, sino buena amistad. A Angela, Sylvia, Fiorella, Tània y a todo el mundo del laboratorio del LASEFI por descubrirme Brasil y hacerme sentir como en casa.

A Maite de la UVA por el apoyo, la atención y aceptar mi tesis.

Un especial agradecimiento a mi gran amigo mexicano, Enrique Navarro, por confiar en mí, animarme a seguir adelante y acordarse de mí desde aquella semana en Soria. Nunca olvidaré mis días en México.

Gracias a los amigos más pesados que tengo, por insistir en preguntar por mi tesis, por estar ahí durante su elaboración y su postproducción que se ha alargado más de la cuenta. A Alicia, Rocío, Sergio, Delia, Pili, Sara, Raquel, Diego... y muchos más. Gracias por estar ahí y aguantar que no llame, escriba o no de señales de vida. Y en especial a Ana, por esas llamadas mientras estaba sola a altas horas en el laboratorio, por

apoyarme en todo, escucharme pacientemente y decirme las cosas claras, siempre has estado ahí y siempre lo estarás,

En la última etapa del proceso debo agradecer mucho a mis NormoMonguers, gracias chicos por evadirme y ver el mundo de otra manera.

Por supuesto a mi familia, por apoyarme, ayudarme y darme ánimos durante todo el proceso de tesis y durante toda mi vida. En especial a mis padres, que siempre han estado allí y nunca me han dejado sola, me enseñasteis lo que era el trabajo duro y el sacrificio, os lo debo todo a vosotros.

Y por último a una persona que se ha librado de más de la mitad de mi tiempo de tesis pero que ha sufrido la etapa más estresante y desmotivante del proceso muy de cerca, a ti Miguel, por tu paciencia y por comprenderme en mis altos y bajos. Gracias.

Y por si me dejo a alguien... ¡¡¡Gracias!!!

*“Sólo hay una cosa que hace
que un sueño sea imposible:
el miedo a fracasar”*

El Alquimista (Paulo Coelho)

A mis padres,
hermanas,
Ana y Miguel

ÍNDICE DE LA TESIS

Prefacio.....1

INTRODUCCIÓN

1 ALIMENTOS FUNCIONALES.....7

**2 COMPUESTOS PRESENTES EN LOS ALIMENTOS FUNCIONALES:
FITOQUÍMICOS.....11**

2.1 TERPENOS11

2.2 TIOLES12

2.3 FENOLES13

3 COMPUESTOS FENÓLICOS14

3.1 CLASIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS14

3.2 BIOSÍNTESIS DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS.....19

3.3 CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS Y REACTIVIDAD DE LOS
COMPUESTOS FENÓLICOS21

3.4 DISTRIBUCIÓN DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS EN
ALIMENTOS27

3.5 IMPORTANCIA EN LA SALUD DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS31

3.6 DETERMINACIÓN ANALÍTICA DE COMPUESTOS FENÓLICOS33

3.6.1 Extracción de compuestos fenólicos.....36

3.6.2 Análisis cromatográfico de compuestos fenólicos.....44

4 BIBLIOGRAFÍA57

CAPÍTULO 1: ESTABILIDAD DE EXTRACTOS DE ISOFLAVONAS DE SOJA

1 INTRODUCCIÓN69

1.1 LA SOJA71

1.2 SOJA Y SALUD72

1.3 LAS ISOFLAVONAS.....73

1.4 ESTABILIDAD DE LAS ISOFLAVONAS.....75

1.4.1 Degradación e interconversión75

1.4.2 Estabilidad en el procesado de la soja y sus derivados78

1.4.3 Estabilidad del almacenamiento de soja.....80

1.4.4 Estabilidad de los extractos de isoflavonas de soja81

2 OBJETIVOS.....85

3	EXPERIMENTAL	89
3.1	MATERIALES Y REACTIVOS	91
3.1.1	Reactivos y disolventes.....	91
3.1.2	Sustancias patrón.....	91
3.1.3	Muestras	92
3.2	INSTRUMENTACIÓN.....	92
3.2.1	Baño de ultrasonidos.....	92
3.2.2	Liofilizador.....	93
3.2.3	Cromatógrafo de líquidos de alta resolución (HPLC)	93
3.3	PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS DE ISOFLAVONAS.....	94
3.3.1	Extractos líquidos	94
3.3.2	Extractos liofilizados	95
3.4	ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO DE LAS ISOFLAVONAS	96
3.5	ESTUDIO DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS	102
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	105
4.1	EXTRACTOS LÍQUIDOS ETANÓLICOS DE SOJA	107
4.1.1	Composición del extracto líquido etanólico de soja.....	107
4.1.2	Estudio de la estabilidad de extractos líquidos etanólicos de soja	108
4.1.3	Efecto de la temperatura	113
4.1.4	Efecto de la adición de un inhibidor de β -glucosidasa	116
4.1.5	Efecto de la adición de un antioxidante	119
4.1.6	Efecto de la adición conjunta del inhibidor de β -glucosidasa y el antioxidante BHT	123
4.1.7	Conservación de los extractos líquidos etanólicos de soja	126
4.1.8	Conclusión del estudio realizado sobre el almacenamiento de los extractos líquidos etanólicos de soja	127
4.2	EXTRACTOS LÍQUIDOS ETANÓLICOS DE PROTEÍNA DE SOJA	129
4.2.1	Composición del extracto líquido etanólico de proteína de soja	129
4.2.2	Estudio de la estabilidad de extractos líquidos etanólicos de proteína de soja.....	131

4.2.3	Efecto de la temperatura	136
4.2.4	Efecto de la adición de un inhibidor de β -glucosidasa	140
4.2.5	Efecto de la adición de un antioxidante	145
4.2.6	Efecto de la adición conjunta del inhibidor de β -glucosidasa y el antioxidante BHT	149
4.2.7	Conservación de los extractos líquidos etanólicos de proteína de soja.....	153
4.2.8	Conclusión del estudio realizado sobre el almacenamiento de los extractos líquidos etanólicos de proteína de soja.....	154
4.3	EXTRACTOS LIOFILIZADOS ETANÓLICOS DE PROTEÍNA DE SOJA	157
4.3.1	Composición del extracto liofilizado de proteína de soja	157
4.3.2	Estudio de la estabilidad de extractos liofilizados de proteína de soja	161
4.3.3	Efecto de la temperatura	167
4.3.4	Efecto de la adición de un inhibidor de β -glucosidasa	172
4.3.5	Efecto de la adición de un antioxidante	175
4.3.6	Efecto de la adición conjunta del inhibidor de β -glucosidasa y el antioxidante BHT	179
4.3.7	Conservación de los extractos liofilizados de proteína de soja	183
4.3.8	Conclusión del estudio realizado sobre el almacenamiento de los extractos liofilizados de proteína de soja	186
4.4	COMPARACIÓN ENTRE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS DE PROTEÍNA DE SOJA LÍQUIDOS Y LIOFILIZADOS.....	189
5	CONCLUSIONES	191
6	BIBLIOGRAFÍA	195
CAPÍTULO 2: DESARROLLO DE MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS RÁPIDOS PARA EL ANÁLISIS DE COMPUESTOS FENÓLICOS		
1	INTRODUCCIÓN	203
1.1	COMPUESTOS FENÓLICOS Y SU IMPORTANCIA	205
1.2	ANÁLISIS CUANTITATIVO DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS	205
1.2.1	Cromatografía líquida.....	206

1.3	NUEVAS TENDENCIAS EN EL ANÁLISIS RÁPIDO POR CROMATOGRAFÍA DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS	207
1.3.1	Columnas monolíticas (CM)	208
1.3.2	Columnas de partículas recubiertas (CPR) o de partículas <i>fused-core</i>	211
1.3.3	Resumen de las tendencias en cromatografía líquida	214
2	OBJETIVOS	215
3	EXPERIMENTAL	219
3.1	MATERIALES Y REACTIVOS	221
3.1.1	Reactivos y disolventes.....	221
3.1.2	Sustancias patrón.....	221
3.1.3	Muestras	224
3.2	INSTRUMENTACIÓN.....	225
3.2.1	Baño de ultrasonidos.....	225
3.2.2	Centrífuga	225
3.2.3	Liofilizador.....	225
3.2.4	Cromatógrafo líquido de alta resolución	225
3.3	PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS	226
3.3.1	Muestras de soja y alimentos derivados.....	226
3.3.2	Resto de muestras	228
3.4	ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO	228
3.4.1	Análisis cromatográfico de las isoflavonas	228
3.4.2	Análisis cromatográfico de otros compuestos fenólicos.....	231
3.5	ESTUDIO DE LA EFICACIA CROMATOGRÁFICA	235
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	239
4.1	COMPARACIÓN DE DIFERENTES TIPOS DE FASES ESTACIONARIAS PARA EL ANÁLISIS DE ISOFLAVONAS DE SOJA MEDIANTE HPLC.....	241
4.1.1	Métodos cromatográficos iniciales	241
4.1.2	Presión de trabajo	245
4.1.3	Columna particulada convencional (CPC).....	249
4.1.4	Columna monolítica (CM).....	253

4.1.5	Columna de partículas recubiertas (CPR)	258
4.1.6	Efecto del disolvente de la muestra	263
4.1.7	Metanol vs. acetonitrilo como fases móviles	265
4.1.8	Conclusiones	266
4.2	DESARROLLO DE MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS RÁPIDOS PARA EL ANÁLISIS DE ISOFLAVONAS DE SOJA USANDO UNA COLUMNA MONOLÍTICA	269
4.2.1	Modo isocrático vs. modo gradiente	269
4.2.2	Acidificación de la fase móvil	277
4.2.3	La temperatura, el flujo de trabajo y el tiempo de gradiente	286
4.2.4	Tiempo de re-equilibrado	292
4.2.5	Método optimizado y reproducibilidad	294
4.2.6	Conclusiones	298
4.3	DESARROLLO DE UN MÉTODO DE ANÁLISIS RÁPIDO DE ISOFLAVONAS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICACIA USANDO UNA COLUMNA DE PARTÍCULAS RECUBIERTAS, O FUSED-CORE	301
4.3.1	Condiciones iniciales	301
4.3.2	Temperatura de la columna	302
4.3.3	Flujo	308
4.3.4	Tiempo de re-equilibrado	310
4.3.5	Método optimizado	312
4.3.6	Aplicación del método optimizado a muestras reales	315
4.3.7	Distribución de concentración y perfil de isoflavonas en alimentos derivados de soja	319
4.3.8	Conclusiones	329
4.4	DESARROLLO DE UN MÉTODO DE ANÁLISIS RÁPIDO Y SIMULTÁNEO DE COMPUESTOS FENÓLICOS Y CAFEÍNA EN MUESTRAS DE TÉ, MATE, CAFÉ SOLUBLE, REFRESCOS Y BEBIDAS ENERGÉTICAS mediante CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICACIA USANDO UNA COLUMNA DE PARTÍCULAS RECUBIERTAS, <i>FUSED-CORE</i>	331
4.4.1	Desarrollo del método cromatográfico	331

4.4.2	Características del método.....	335
4.4.3	Aplicación del método optimizado a muestras reales	339
4.4.4	Patrones de distribución de polifenoles y alcaloides en cafés solubles, refrescos, bebidas energéticas y té.....	352
4.4.5	Conclusiones	371
5	CONCLUSIONES	373
6	BIBLIOGRAFÍA	377
CAPÍTULO 3: EXTRACCIÓN DE ISOFLAVONAS POR DISPERSIÓN DE MATRIZ EN FASE SÓLIDA (MSPD)		
1	INTRODUCCIÓN	387
1.1	FUNDAMENTOS DE LA TÉCNICA DE EXTRACCIÓN	389
1.2	ETAPAS DE LA EXTRACCIÓN POR DISPERSIÓN DE MATRIZ EN FASE SÓLIDA	390
1.2.1	Paso 1: etapa de disrupción y dispersión.	390
1.2.2	Paso 2: etapa de empaquetado.....	392
1.2.3	Paso 3: etapa de elución.....	392
1.2.4	Paso 4: etapa de tratamiento y análisis del eluato.....	393
1.3	FACTORES QUE AFECTAN A LA EXTRACCIÓN	393
1.3.1	La naturaleza del agente dispersante (sólido+fase orgánica unida).....	394
1.3.2	La naturaleza de la muestra.....	396
1.3.3	La naturaleza del disolvente de elución.....	397
1.4	APLICACIÓN DE LA MSPD A LA EXTRACCIÓN DE ISOFLAVONAS Y COMPUESTOS FENÓLICOS.....	398
2	OBJETIVOS.....	403
3	EXPERIMENTAL	407
3.1	MATERIALES Y REACTIVOS	409
3.1.1	Reactivos y disolventes.....	409
3.1.2	Sustancias patrón.....	409
3.1.3	Muestras	411
3.2	INSTRUMENTACIÓN.....	411
3.2.1	Sistema de mezclado	411

3.2.2	Columnas de MSPD y fritas	412
3.2.3	Sistema de evaporación de muestras por corriente de nitrógeno.....	412
3.2.4	Liofilizador.....	413
3.2.5	Cromatógrafo líquido de alta resolución	413
3.3	EXTRACCIÓN DE ISOFLAVONAS MEDIANTE MSPD.....	413
3.4	ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO DE ISOFLAVONAS	414
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	417
4.1	EXPERIMENTOS INICIALES	419
4.2	ELECCIÓN DEL SÓLIDO DISPERSANTE.....	421
4.3	ELECCIÓN DE LA RELACIÓN <i>MUESTRA:SÓLIDO</i>	423
4.4	REPRODUCIBILIDAD DEL MÉTODO OPTIMIZADO	425
5	CONCLUSIONES	429
6	BIBLIOGRAFÍA	433

Prefacio

Según el reglamento de la comunidad económica europea N° 178/2002 del parlamento europeo y del consejo de 28 de enero de 2002 [1] se define alimento (o producto alimenticio) como cualquier sustancia o producto destinado a ser ingerido por los seres humanos, o con probabilidad razonable de serlo, tanto si ha sido transformado entera o parcialmente como si no. Dentro de alimento se incluyen las bebidas, la goma de mascar y cualquier sustancia, incluida el agua, incorporada voluntariamente al alimento durante su fabricación, preparación o tratamiento.

Desde un punto de vista biológico se pueden definir los alimentos como aquellos que proporcionan los nutrientes necesarios para el funcionamiento de nuestro organismo. Los nutrientes están relacionados con el metabolismo primario de los organismos vivos y son todas aquellas sustancias que bioquímicamente son esenciales para su mantenimiento, proporcionando energía y compuestos para la formación de las estructuras corporales. Estos nutrientes son las proteínas, los hidratos de carbono, los lípidos, la fibra, los minerales, las vitaminas y el agua. Además de esta función nutricional, el alimento también puede proporcionar satisfacción al ser consumido.

A parte de esas funciones conocidas se ha observado que algunos alimentos son capaces de aportar compuestos no nutricionales derivados del metabolismo secundario (no esenciales para el mantenimiento de los organismos), que presentan beneficios en las funciones fisiológicas del organismo. Existe una interrelación entre alimentos y beneficios en la salud y es una evidencia científica que ha conducido a la industria alimentaria, a la comunidad científica, a las organizaciones de consumidores y a las autoridades sanitarias a interesarse por las posibilidades de utilizar los alimentos para conseguir un buen estado de salud y bienestar, y mantenerlo. Para conseguir esto una dieta equilibrada es esencial, pero no es suficiente, siendo evidente la utilidad de ciertos compuestos no nutritivos presentes en los alimentos para este fin.

Por todo ello nació el término de alimento funcional, que se puede definir como aquel que posee una serie de beneficios más allá de su valor nutricional [2]. La prioridad es identificar estos alimentos y demostrar con fundamentos científicos la alegación (o alegaciones) de salud que se le otorgue. Esas alegaciones pueden ser propuestas en base a que mejore el estado de salud y bienestar o a que reduzca el riesgo de padecer alguna enfermedad. El efecto sobre la salud debe ser concreto y cuantitativamente demostrable, y por lo tanto este efecto se debe poder atribuir a un compuesto o compuestos pertenecientes al alimento en concreto.

En base a ello las investigaciones han pasado a centrarse más en la identificación de compuestos biológicamente activos en los alimentos. Se ha descubierto que muchos de los “alimentos tradicionales” que se consumen, como frutas, verduras y legumbres, entre otros, contienen estos componentes que pueden resultar beneficiosos para la salud. Pero además de estos se están desarrollando

nuevos alimentos en los que se añaden o se aumentan las concentraciones de estos “compuestos funcionales”, y así generar el valor añadido de las ventajas para la salud.

Por lo tanto, el interés de esos alimentos y compuestos funcionales va desde la investigación de sus posibles efectos beneficiosos en la salud, como en la detección de las sustancias objeto de interés y su cuantificación, e incluso extracción para otros posibles usos.

Entre los compuestos funcionales que más interés han suscitado en los últimos años, tanto en la comunidad científica como entre los consumidores, se encuentran los llamados compuestos fenólicos, o polifenoles, debido a sus propiedades antioxidantes, que han demostrado su capacidad para prevenir o interrumpir las reacciones en cadena que producen los radicales libres; es decir, reducen el estrés oxidativo, que está relacionado con diversas dolencias y enfermedades (cardiovasculares, neurodegenerativas, cáncer...).

A la vista de la actualidad descrita, en esta tesis se ha planteado el uso de nuevas tecnologías tanto en la extracción de compuestos fenólicos, como en el estudio de su estabilidad y en la cuantificación precisa y rápida de los mismos en diversos alimentos de origen vegetal.

Los objetivos planteados durante el desarrollo de esta tesis fueron:

- a) Estudiar la estabilidad de ciertos compuestos fenólicos presentes en extractos concentrados, para su posible análisis posterior o para su uso como aditivo, a lo largo de un año y en distintas condiciones de almacenamiento.
- b) Estudiar las distintas fases estacionarias de nuevo desarrollo en el análisis por cromatografía líquida de alta resolución para la obtención de métodos de análisis cromatográficos rápidos y precisos para la determinación de la concentración de diversas clases de compuestos fenólicos en diferentes tipos de alimentos.
- c) Estudiar el uso de un método de extracción rápido, novedoso y sencillo para el análisis de compuestos fenólicos en alimentos.

Introducción

1 ALIMENTOS FUNCIONALES

Fue en Japón en la década de los 80 donde se introdujo un nuevo concepto de alimento, derivado de la evidencia de que para controlar los gastos sanitarios generados por la mayor esperanza de vida de la población era necesario garantizar una mejor calidad de vida. Se comprendió que ciertos alimentos no servían sólo para aportar los nutrientes necesarios, sino que también podían servir para mejorar la salud y reducir el riesgo de contraer enfermedades. Así fue como nació el concepto de alimento funcional [3]. Por ello en 1991 Japón estableció el concepto de “Alimentos para Uso Específico en la Salud” FOSHU (Foods for Specified Health Use). Dentro de este concepto se incluían alimentos autorizados por el Ministro de Salud tras la presentación de pruebas exhaustivas con fundamento científico que apoyasen la alegación (o declaración) relativa a las propiedades de dichos alimentos relacionadas con la mejora de la salud cuando son consumidos como parte de una dieta ordinaria.

El interés de los consumidores de todo el mundo por conocer la relación que existe entre la dieta y la salud ha aumentado considerablemente en los últimos años. Los consumidores reconocemos en mayor medida que un estilo de vida sano, incluida la dieta, contribuye a reducir el riesgo de padecer enfermedades y dolencias, manteniendo el estado de salud y bienestar. Tanto el apoyo que se da a alimentos como frutas, verduras y cereales integrales en relación a su posible contribución en la prevención de ciertas enfermedades, como las evidencias científicas que relacionan dieta y salud contribuyen a impulsar el mercado de los alimentos funcionales. Además debido a los cambios socioeconómicos y demográficos que se dan en la población, aumentando la esperanza de vida, y por lo tanto el incremento de la población anciana, hacen que se desee gozar de una mejor calidad de vida y de que aumenten los costes sanitarios, lo que hace que gobiernos, investigadores, profesionales de la salud y la industria alimentaria busquen la manera de controlar estos cambios de la forma más eficaz [2-4].

Ya se han estudiado muchos alimentos y su relación con los posibles efectos beneficiosos en la salud (tabla 1 y figura 1), pero es necesario tener control sobre las declaraciones sobre salud que se hagan de ellos, protegiendo al consumidor de posibles falsedades o confusiones y que pueda apoyar a la industria en el desarrollo de nuevos productos. Por ello la Unión Europea creó una Comisión Europea de Acción Concertada sobre Bromatología Funcional en Europa (Functional Food Science in Europe, FUFOSE), coordinada por el Instituto Internacional de Ciencias Biológicas (International Life Sciences Institute, ILSI), cuyo objetivo era desarrollar y establecer un enfoque científico sobre las pruebas que se necesitan para respaldar el desarrollo de productos alimenticios que puedan tener un efecto beneficioso en la salud, o reducir el riesgo de que se desarrolle una enfermedad [2, 5].

Tabla 1. Tipos de alimentos funcionales en España y posibles efectos beneficiosos en la salud [6].

ALIMENTO FUNCIONAL	COMPONENTE FUNCIONAL	POSIBLES EFECTOS EN LA SALUD
Leches enriquecidas	Con ácidos grasos omega-3	Contribuyen a reducir el riesgo de enfermedad cardiovascular, de ciertos tipos de cáncer y mejoran el desarrollo del tejido nervioso y las funciones visuales. Pueden reducir los procesos inflamatorios.
	Con ácido oleico	Ayudan a reducir la concentración de colesterol en sangre y el riesgo de enfermedad cardiovascular.
	Con ácido fólico	Pueden disminuir malformaciones en el tubo neural y ayudan a reducir el riesgo de enfermedad cardiovascular.
	Con calcio	Ayudan al desarrollo de huesos y dientes. Intervienen en la transmisión nerviosa y los movimientos musculares. Pueden prevenir la osteoporosis.
	Con vitaminas A y D	Favorecen la función visual y la absorción del calcio, respectivamente.
	Con fósforo y cinc	Ayudan al desarrollo de los huesos y mejoran el sistema inmunológico
Yogures enriquecidos	Con calcio	Ayudan al desarrollo de huesos y dientes. Intervienen en la transmisión nerviosa y los movimientos musculares. Pueden prevenir la osteoporosis.
	Con vitaminas A y D	Favorecen la función visual y la absorción del calcio, respectivamente
Leches fermentadas	Con ácidos grasos omega-3 y ácido oleico	Contribuyen a reducir el riesgo de enfermedad cardiovascular, el riesgo de ciertos tipos de cáncer y mejoran el desarrollo del tejido nervioso y las funciones visuales. Pueden reducir los procesos inflamatorios.
	Con bacterias probióticas específicas	Favorecen el funcionamiento del sistema gastrointestinal y reducen la incidencia y la duración de las diarreas. Mejoran la calidad de la microflora intestinal.
Zumos enriquecidos	Con vitaminas y minerales	<i>Vitaminas A y D:</i> favorecen la función visual y la absorción del calcio, respectivamente. <i>Calcio:</i> ayuda al desarrollo de huesos y dientes. Interviene en la transmisión nerviosa y los movimientos musculares. Puede prevenir la osteoporosis. <i>Hierro:</i> facilita el transporte de oxígeno en la sangre. Puede prevenir la aparición de anemias.
Cereales fortificados	Con fibra y minerales	<i>Fibra:</i> Ayuda a reducir el riesgo de cáncer de colon y de mama. Mejoran la calidad de la microflora intestinal. <i>Hierro:</i> Facilita el transporte de oxígeno en la sangre. Puede prevenir la aparición de anemias.
Pan enriquecido	Con ácido fólico	Puede disminuir malformaciones en el tubo neural y ayuda a reducir el riesgo de enfermedad cardiovascular.
Margarinas enriquecidas	Con fitoesteroles	Ayudan a disminuir la concentración de colesterol en sangre y el riesgo de enfermedad cardiovascular.
Sal yodada	Con yodo	Facilita la fabricación de hormonas tiroideas, imprescindibles para un desarrollo físico y psíquico normal y evitar disfunciones tiroideas.



Figura 1. Ejemplo de algunos alimentos funcionales vendidos en España actualmente.

El proyecto FUFOSSE se centró en seis áreas de la ciencia y de la salud: el crecimiento, el desarrollo y la diferenciación; el metabolismo de los sustratos; la defensa contra especies oxidativas reactivas; los alimentos funcionales y el sistema cardiovascular; la fisiología y función gastrointestinal; y los efectos de los alimentos en el comportamiento y el rendimiento psicológico. El documento final fue publicado en el British Journal of Nutrition [5]. En él se estableció el concepto de alimento funcional y se elaboró por primera vez un marco global a fin de justificar las alegaciones que incluyó una estrategia para la identificación y desarrollo de los alimentos funcionales y para la fundamentación científica de sus efectos. En especial, se establecieron dos tipos de alegaciones para caracterizar a los alimentos funcionales, de mejora de función y de disminución del riesgo de enfermedad.

Según la FUFOSSE, un alimento puede considerarse funcional cuando se demuestra adecuadamente que, además de sus efectos nutritivos, afecta beneficiosamente a una o más funciones del organismo de forma que mejora su estado de salud y bienestar o reduce el riesgo de enfermedad. Los alimentos funcionales deben seguir siendo alimentos y deben producir sus efectos en las cantidades en que normalmente se consumen en la dieta. Pueden ser tanto alimentos naturales como un alimento al que se le ha añadido o quitado un componente mediante procesos tecnológicos o biológicos, o se ha modificado la biodisponibilidad de uno o más componentes, o ambas situaciones [4].

Con el fin de evaluar el fundamento científico de las alegaciones se elaboró otro proyecto presentado por la Comisión a mediados del año 2003, conocido como el Proyecto PASSCLAIM - Process for the Assessment of Scientific Support for Claims on Foods-, para crear un etiquetado adecuado de los productos alimentarios con alegaciones de “propiedades saludables” [7].

La Comunidad Europea elaboró en diciembre de 2006 el Reglamento 19/24 [8] en el que se regula la comercialización de productos que tienen algún beneficio, es decir, los alimentos funcionales, exigiendo que la comercialización de los mismos esté avalada por estudios científicos que justifiquen las declaraciones nutricionales o de salud (*health claim*). Se definen estas declaraciones como todo mensaje o reclamo publicitario que afirme, sugiera o dé a entender que un alimento posee unas determinadas ventajas nutricionales, saludables o de reducción del riesgo de enfermedad. Para cualquier declaración es necesario un fundamento científico, es decir, deberán basarse en pruebas científicas sobre cuál es el agente, o componente, beneficioso y qué efectos produce [2, 4, 9].

Por ello es necesario el conocimiento de los posibles compuestos e interacciones que convierten a un alimento en un alimento funcional, y cómo actúan a favor de las declaraciones que se puedan alegar. Además, una vez se dispone de la evidencia científica sobre el efecto beneficioso de un determinado componente, aunque no es obligatorio realizar por parte de la empresa productora nuevos estudios, sí que se debe demostrar que ese componente está contenido en el alimento en la cantidad suficiente para producir el efecto declarado, así como su biodisponibilidad [4]. Por lo tanto el conocimiento de esos “compuestos funcionales”, su química, biodisponibilidad, extracción y cuantificación es prioritario en el estudio y desarrollo de nuevos alimentos funcionales, así como en el de los ya conocidos.

2 COMPUESTOS PRESENTES EN LOS ALIMENTOS FUNCIONALES: FITOQUÍMICOS

Entre los compuestos de los alimentos funcionales con posibles efectos beneficiosos en la salud más destacables se encuentran los denominados fitoquímicos. Se trata de sustancias que aparecen en las plantas que están relacionados principalmente con la defensa de la planta/semilla contra agresiones externas (luz UV, insectos, hongos, bacterias, daño físico, etc...). También están relacionados con la atracción de polinizadores o dispersores de frutos, y muchas veces también influyen las propiedades sensoriales (color, olor, sabor...) de las mismas como alimento. Este término generalmente se utiliza para referirse a aquellos compuestos derivados del metabolismo secundario de plantas que son biológicamente activos y que proporcionan ciertos beneficios en la salud, pero no son nutrientes esenciales para la vida, al menos a corto plazo. Se estima que puede haber unos 10.000 fitoquímicos diferentes en la naturaleza que pueden intervenir en la prevención de enfermedades como cáncer, infartos...[10, 11]

Se les puede clasificar en base a su función y sus características en tres grandes grupos: terpenos, tioles y fenoles.

2.1 TERPENOS

Se trata de compuestos hidrocarbonados derivados de la polimerización del isopreno, un compuesto de 5 átomos de carbono con dobles enlaces conjugados (figura 2).

Entre los compuestos obtenidos tras la polimerización del isopreno algunos de los más relevantes son:

- *Carotenoides*: son los pigmentos responsables del color rojo amarillo y anaranjado de las frutas y vegetales. El más conocido es el β -caroteno, que se encuentra en casi todas las frutas y hortalizas de color anaranjado, así como en las verduras de hojas verdes, siendo un precursor de la vitamina A. Los efectos sobre la salud van desde su actuación como provitamínicos y antioxidantes, hasta su efecto protector frente a la fotosensibilización, frente a ciertos cánceres y enfermedades cardiovasculares [12-16].
- *Saponinas*: se encuentran sobre todo en las legumbres. Al principio se les consideraba nocivas para la salud porque pueden atacar a los glóbulos rojos de la sangre, pero actualmente destacan por sus propiedades beneficiosas para la salud tales como su efecto antiinflamatorio, frente a ciertos cánceres, reduce el colesterol en sangre y poseen actividad antiviral [17-19].

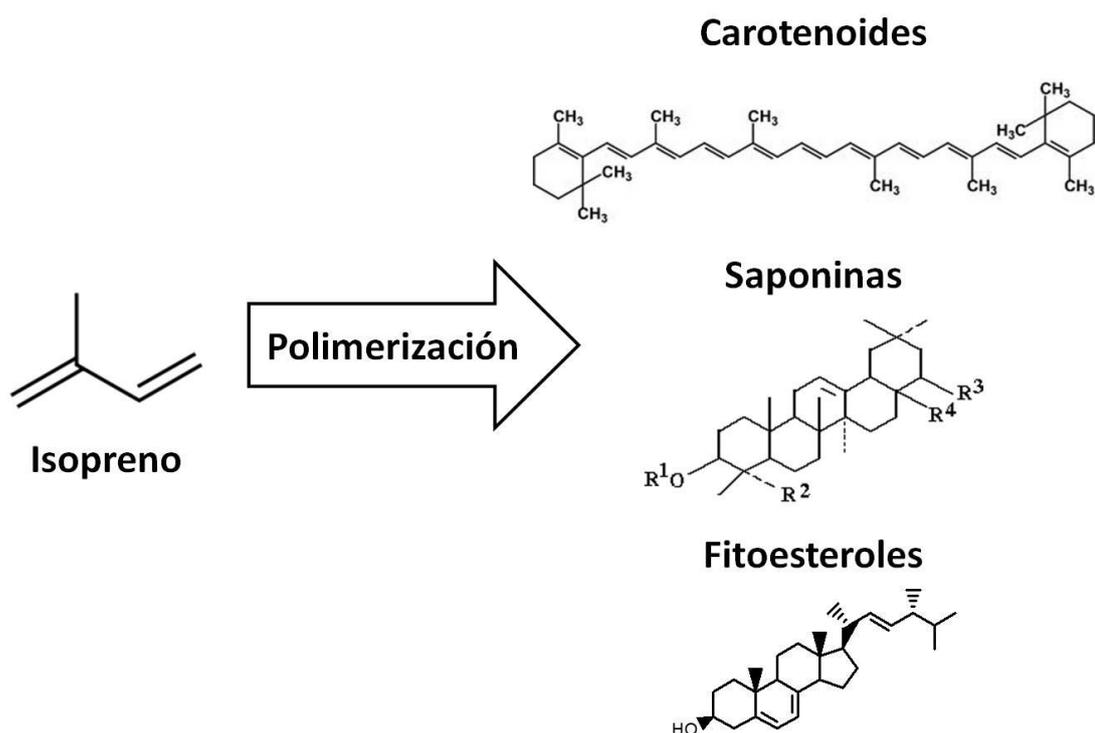


Figura 2. Estructura simplificada del compuesto isopreno y estructuras de algunos carotenoides, saponinas y fitoesteroles derivados de la polimerización del isopreno.

- **Fitoesteroles:** Se encuentran principalmente en las semillas oleaginosas como las de girasol, sésamo y soja. Su estructura química es bastante parecida a la del colesterol, pero su efecto es el contrario, puesto que puede disminuir el nivel de colesterol en sangre. Además muestran un efecto protector frente a enfermedades cardiovasculares [20-22].

2.2 TIOLES

Se trata de compuestos organosulfurados, como los indoles, ditioltiones, isotiocianatos y sulfuros de alilo. Se encuentran en los vegetales de la familia de los crucíferos (brócoli, coliflor, repollo, berros, col de Bruselas, berza), en el ajo, la cebolla, la mostaza y ciertas frutas cítricas.

Se les relaciona con una menor incidencia de ciertos cánceres, como el de pulmón, estómago, colon y recto, puesto que parecen prevenir la activación de los carcinógenos [23-26].

2.3 FENOLES

Son compuestos que poseen uno o más grupos hidroxilo unidos directamente a un anillo aromático. El fenol, donde el anillo aromático es un anillo de benceno con un grupo hidroxilo unido (*figura 3*), es la estructura en la que se basa este grupo heterogéneo que consta con más de 10.000 compuestos diferentes.

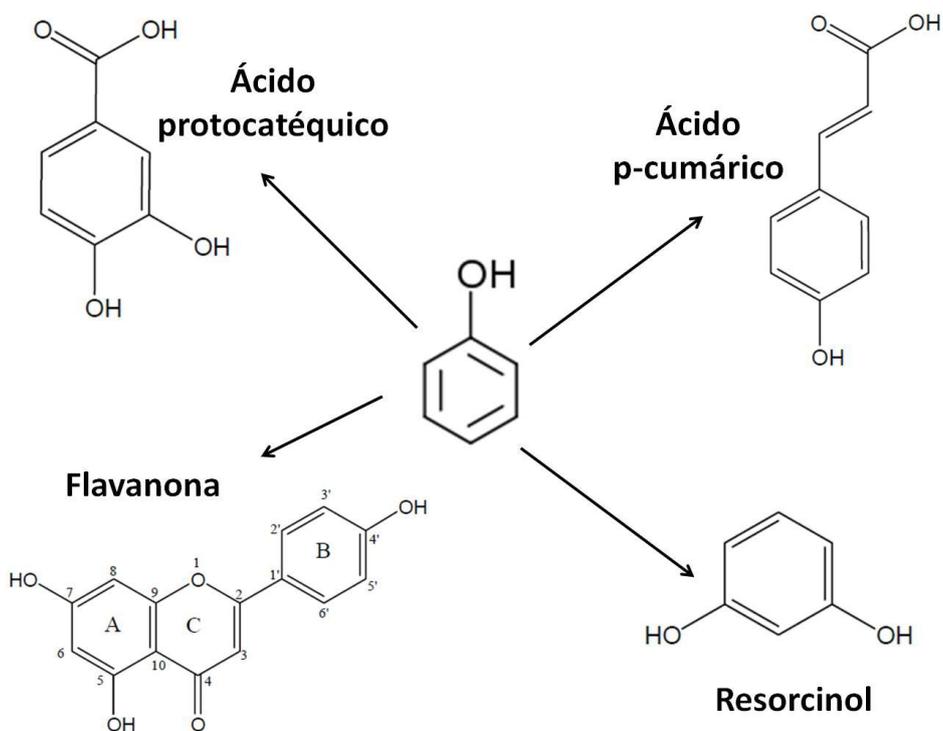


Figura 3. Estructura del fenol (en el centro) y de algunos ejemplos de compuestos fenólicos.

Se encuentran en una gran variedad de frutas, verduras y legumbres.

Los efectos beneficiosos para la salud se les atribuyen por sus propiedades antioxidantes que previenen enfermedades cardiovasculares, ciertos cánceres y algunas enfermedades neurodegenerativas. Además algunos tienen propiedades fitoestrogénicas y actividad frente a toxinas y patógenos [27-32].

A lo largo de esta introducción se va a ahondar en el estudio de estos compuestos fenólicos, en concreto aquellos que van a ser objeto de estudio de esta tesis.

3 COMPUESTOS FENÓLICOS

3.1 CLASIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS

Como se ha expuesto anteriormente los compuestos fenólicos son aquellos que poseen un grupo hidroxilo unido a un anillo aromático; existen numerosos compuestos de este tipo en las plantas, en las que se encuentran incluso moléculas de esta familia con varios anillos aromáticos unidos a grupos hidroxilo, denominados polifenoles. En la naturaleza estos compuestos se encuentran como compuestos libres o, más habitualmente como ésteres o glucósidos de los mismos. Por lo tanto para clasificar esta extensa y variada familia de compuestos existen numerosas acepciones. En este caso se van a clasificar en base al número de carbonos en la molécula según Harborne y Simmonds [33-35] como se puede observar en la *tabla 2*. Ejemplos de las estructuras de cada compuesto fenólico se muestran en la *tabla 3*.

Los compuestos fenólicos son los principales responsables de las características sensoriales de los alimentos vegetales. Algunos aparecen en la mayoría de los vegetales y otros son específicos de algunos de ellos [27]. Dentro de los compuestos fenólicos dos de los grupos más importantes son los ácidos fenólicos y los flavonoides, tanto por su gran número de compuestos como por su disponibilidad en diferentes alimentos.

En las paredes celulares primarias de las plantas el contenido de fenoles es bajo aunque ciertos ácidos fenólicos se han detectado en ellas asociados a los polisacáridos estructurales y a la estructura de la lignina [36]. Es muy frecuente encontrar los ácidos cinámicos en las plantas como ésteres del ácido quínico o tartárico; un ejemplo es el ácido clorogénico, un éster entre el ácido cafeico y el ácido quínico, abundante en el café. Los fenoles, también aparecen en diversas plantas, como las de la familia de la *Brassicaceae*, o en distintas raíces como ésteres formados con azúcares [33, 37].

Los flavanoides son una de las familias más extensas dentro del grupo de los fenoles objeto de estudio. En la piel de ciertas frutas se han detectado flavonas, también en el apio y el perejil. En las frutas cítricas podemos encontrar flavanonas. Los flavonoles se pueden detectar en frutas como la manzana, los cítricos y la uva, entre otros; también en la cebolla, ya sea como aglucona o como derivado glucósido, y en el té. Los antocianos son los pigmentos de las frutas rojas, y también abundantes en el vino. Las isoflavonas son abundantes en la soja y en el trébol rojo [38].

Tabla 2. Clasificación de los compuestos fenólicos en base a su número de carbonos en la estructura.

Número de carbonos	Clase de compuesto
C6	Fenólicos simples.
C6 - C1	Ácidos fenólicos y derivados.
C6 - C2	Acetofenonas y ácidos fenilacéticos.
C6 - C3	Ácidos cinámicos y sus derivados aldehído y alcohólicos.
C6 - C3	Cumarinas e isocumarinas.
C15	Chalconas, auronas y dihidrochalconas.
C15	Flavonoides. Flavona Flavanona Flavanoles Flavanoles Flavonol Isoflavona Antocianidinas
C30	Biflavona
C6-C1-C6, C6-C2-C6	Benzofenonas, xantonas y estilbenos.
C6, C10, C14	Quinonas.
C18	Betacianinas.
Lignan, neolignan	Dímeros u oligómeros.
Lignina	Polímeros.
Taninos	Oligoméros o polímeros.
Flobafenos	Polímeros.

Tabla 3. Clasificación de los compuestos fenólicos y algunos ejemplos de cada uno y su estructura.

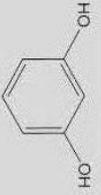
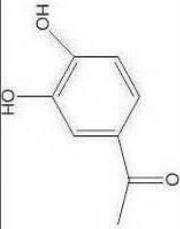
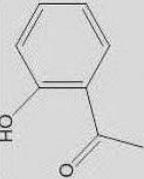
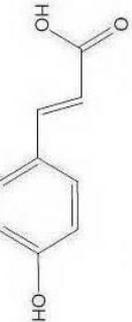
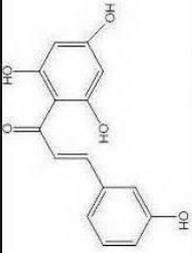
Número de carbonos	Clase de compuesto	Ejemplos	Estructura
C6	Fenólicos simples.	Resorcinol	
C6 - C1	Ácidos fenólicos y derivados.	Ácido protocatequico	
C6 - C2	Acetofenonas y ácidos fenilacéticos.	2-hidroxiacetofenona	
C6 - C3	Ácidos cinámicos y sus derivados aldehído y alcohólicos.	Ácido p-cumárico	
C6 - C3	Cumarinas e isocumarinas.	Umbelliferona	
C15	Chalconas, auronas y dihidrochalconas.	Buteína	

Tabla 3.Cont. Clasificación de los compuestos fenólicos y algunos ejemplos de cada uno y su estructura.

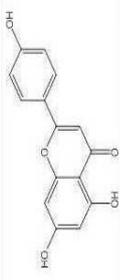
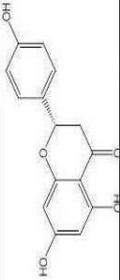
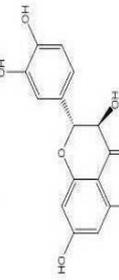
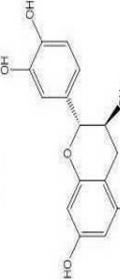
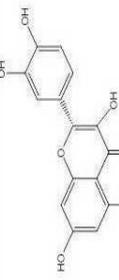
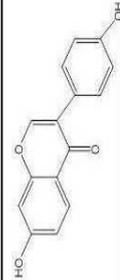
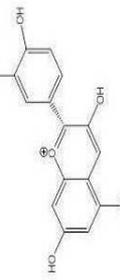
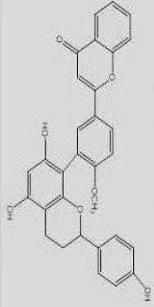
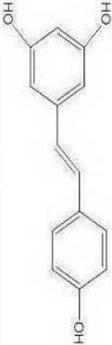
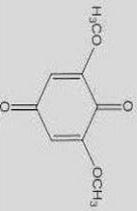
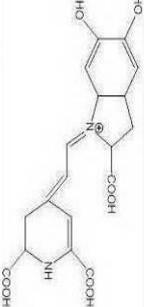
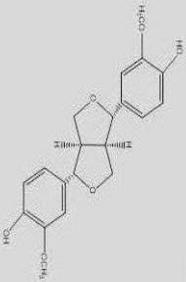
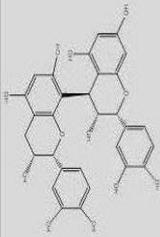
Número de carbonos	Clase de compuesto	Ejemplos	Estructura
C15	Flavonoides		
	Flavona	Apigenina	
	Flavanonas	Naringenina	
	Flavanonoles	Taxifolina	
	Flavanoles	(+)-Catequina	
	Flavonol	Quercetin	
	Isoflavonas	Daidzeina	
	Antocianidinas	Cianidina	

Tabla 3. Cont. Clasificación de los compuestos fenólicos y algunos ejemplos de cada uno y su estructura.

Número de carbonos	Clase de compuesto	Ejemplos	Estructura
C30	Biflavona	Ginkgetin	
C6-C1-C6, C6-C2-C6	Benzofenonas, xantonas y estilbenos.	Resveratrol	
C6, C10, C14	Quinonas.	2,6-dimetoxibenzoquinona	
C18	Betacianinas.	Betanidina	
Lignan, neolignan	Dimeros u oligómeros.	(+)-pinoresinol	
Lignina	Polímeros.	-	-
Taninos	Oligoméros o polímeros.	Procianidina B ₂	
Flobafenos	Polímeros.		

3.2 BIOSÍNTESIS DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS

Los compuestos fenólicos se sintetizan en las plantas a partir de la fenilalanina que se sintetiza a través de la vía del ácido siquímico, el cual es un precursor de la biosíntesis de varios aminoácidos a través del ácido corísmico [33, 34, 37, 39, 40]. Un esquema de la biosíntesis de los principales compuestos fenólicos se muestra en la *figura 4*.

Las enzimas involucradas en esta síntesis se muestran abreviadas en azul en la *figura 4* y son, por orden alfabético:

- ACTs: acetil transferasas.
- ANR: antocianidina reductasa.
- ANS: antocianidina sintasa.
- C4H: cinamato-4-hidroxilasa.
- CHI: chalcona isomerasa.
- CHR: chalcona reductasa.
- CHS: chalcona sintasa.
- 4CL: 4-cumaroil-CoA ligasa.
- DFR: dihidroxiflavonol 4-reductasa.
- DMID: 7,2'-dihidroxi-4'-metoxiflavanol deshidratasa.
- F3H: flavanona 3-hidroxilasa.
- FNSI y FNSII: flavona sintasa I y II.
- F3'H y F3'5'H: flavonoide 3' y 3'5' hidroxilasa.
- IOMT: isoflavona-O-metiltransferasa.
- IFR: isoflavona reductasa.
- I2'H: isoflavona 2'-hidroxilasa.
- IFS: isoflavona sintasa.
- LAR: leucoantocianidina reductasa.
- OMTs: O-metiltransferasa.
- PAL: fenilalanina amonía liasa:
- GTs: glucosil transferesas
- VR: vestitona reductasa.

3.3 CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS Y REACTIVIDAD DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS

Tal y como se ha descrito anteriormente la estructura principal de los compuestos fenólicos es el fenol (*figura 5*), que está compuesto por un anillo aromático de benceno unido a un grupo hidroxilo.

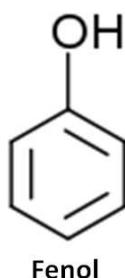


Figura 5. Fenol, la estructura principal de los compuestos fenólicos.

El anillo aromático de benceno está compuesto por 6 átomos de carbono. Cada carbono posee seis electrones de valencia que pueden incorporarse a los orbitales atómicos como $1s^2 2s^2 2p^2$, pero esta configuración electrónica no explica la longitud y orientación de los enlaces entre los carbonos.

Lo que explica tanto el ángulo como la longitud de enlace es la hibridación de orbitales s y p . Si entre los carbonos se diese una hibridación sp^3 el ángulo de enlace sería de $109,5^\circ$ y la longitud de enlace de $1,54 \text{ \AA}$, en cambio si se diese una hibridación sp^2 el ángulo sería de 120° y la longitud de $1,34 \text{ \AA}$. Sin embargo, en el anillo aromático de benceno la longitud del enlace carbono-carbono es de $1,39 \text{ \AA}$ para los seis enlaces que hay, lo que supone una longitud intermedia entre la hibridación sp^2 y sp^3 . Su ángulo es de 120° , lo que concuerda con la hibridación sp^2 . Estos valores se explican considerando que todos los carbonos tienen una hibridación sp^2 y un orbital p donde reside un electrón que es el encargado de formar los dobles enlaces (*figura 6*) y el que hace que por su presencia la longitud de enlace se distorsione de la esperada en una hibridación sp^2 convencional. [33]

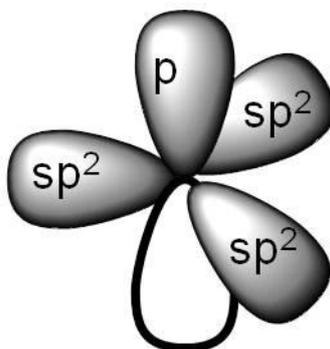


Figura 6. Orbitales del carbono en un anillo de benceno. Tres orbitales sp^2 y un orbital p .

Dichos orbitales p están por encima y por debajo del plano horizontal formado por los enlaces sencillos entre los orbitales sp^2 (figura 6 y 7) y se pueden dar las dos posibilidades de dobles enlaces que se muestran en la figura 7. Ambas posibilidades son válidas y como no pueden darse las dos a la vez lo que ocurre es que los electrones de los orbitales p (seis en total) forman conjuntamente un sistema π (de doble enlace) que adquiere la forma de un anillo con dos regiones, una por encima y la otra por debajo del plano de los enlaces sigma (enlace sencillo), tal y como se muestra en la figura 7. [33]

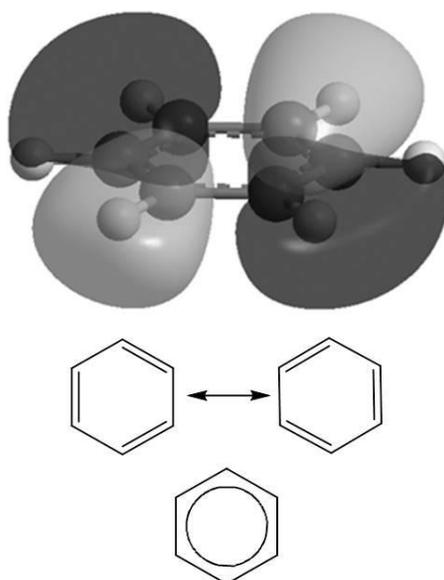


Figura 7. Imagen esquemática de la posición de los electrones que ocupan los orbitales p de los carbonos en el anillo de benceno. Las dos posibles estructuras del anillo de benceno y su forma resonante.

Por lo tanto existe una deslocalización de los electrones en los carbonos del benceno siendo la estructura real del mismo aquella donde se muestra un círculo para representar esta deslocalización, es lo que se denomina *aromaticidad*. Aunque para la explicación de las distintas reacciones que se pueden dar no es posible usar este diagrama, se suelen usar cualquiera de las dos estructuras mesómeras que la componen.

Esta deslocalización de electrones es energéticamente favorable por lo que siempre que se produce cualquier reacción, la molécula tiende a volver a la aromaticidad. Por lo tanto la aromaticidad es lo que afecta a la reactividad de estos compuestos. En los compuestos aromáticos no son fáciles las reacciones de adición donde el doble enlace se transforma en un enlace sencillo. Las reacciones más comunes en los compuestos aromáticos son las de sustitución [33].

Otro aspecto a tener en cuenta en estos compuestos es la estructura tridimensional de la misma, ya que esto afecta tanto a la reactividad química como a la

biológica. El anillo de benceno es plano, pero en los flavonoides hemos visto que hay dos tipos de moléculas según se encuentre los anillos aromáticos unidos a un heterociclo con doble enlace o no. Esta diferencia se observa con las moléculas de flavanonol y flavona que se muestran en la figura 8 [33].

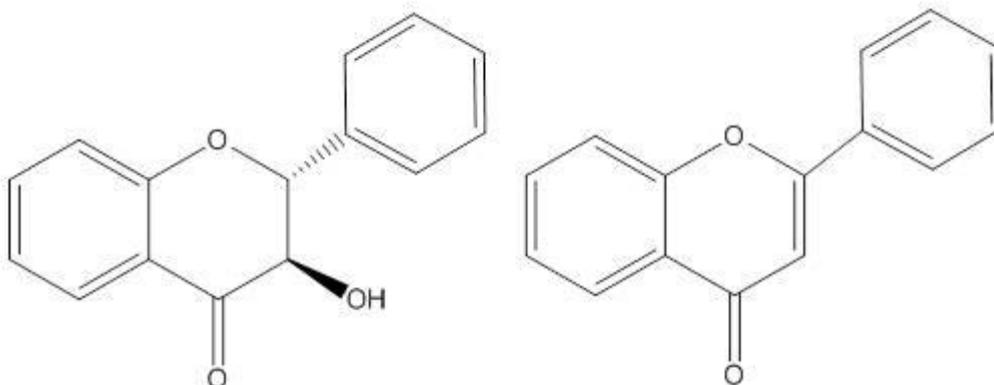


Figura 8. Estructuras del flavanonol, a la izquierda, y la flavona, a la derecha.

En el caso del flavanonol el anillo central no es plano, siendo los ángulos entre sus enlaces de $109,5^\circ$, correspondientes a una hibridación sp^3 , lo que hace que la molécula sea tridimensional. En cambio en la molécula de flavona el doble enlace del anillo central hace que los ángulos de enlace sean de 120° , hibridación sp^2 , y toda la molécula sea plana.

Sin embargo, los compuestos fenólicos deben su reactividad también al grupo hidroxilo unido al anillo bencénico. Ese grupo hidroxilo tiene la capacidad de ceder su hidrógeno como protón en disolución, por lo que se trata de un ácido [33]. La acidez de los compuestos fenólicos en general es débil, pero mayor que la de los compuestos con grupos hidroxilo unidos a una cadena alifática. La razón de esta acidez es que al capturar el protón se forma un anión que se estabiliza por diversas formas mesómeras como se observa en la figura 9.

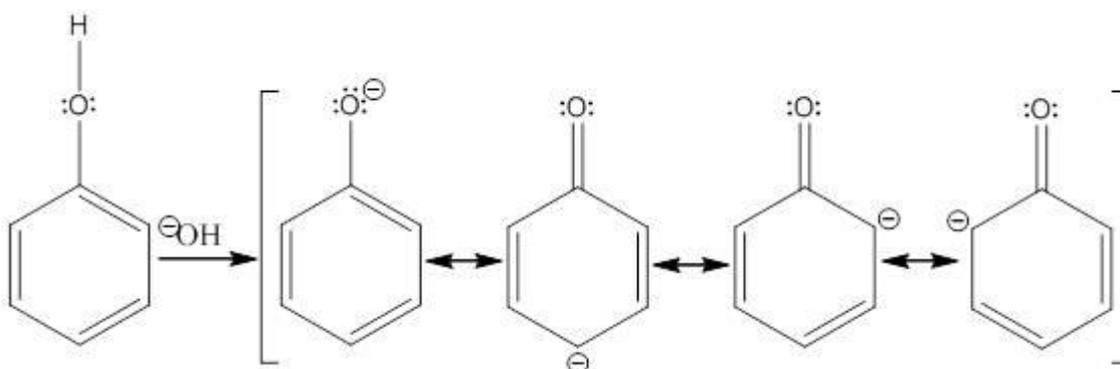


Figura 9. Reacción ácido-base del fenol. Se muestran las diferentes formas mesoméricas del anión formado.

La acidez del fenol es de un pKa de 10, un valor intermedio entre la acidez del ácido carboxílico (pKa = 4-5) y la del alcohol alifático (pKa = 16-19) [33]. Esta acidez se

ve influenciada por los sustituyentes del anillo aromático, entre los que se pueden encontrar glucósidos, hidrógenos, hidroxilos, maloniles, metilos y grupos sulfurados [39], los cuales cambian la acidez del compuesto fenólico según estabilicen o desestabilicen el anión resultante.

Que cambien la acidez significa un cambio en la hidrofilia de la molécula y con ello sus propiedades biológicas y sus propiedades de solubilidad, algo importante a la hora de realizar extracciones de compuestos fenólicos, ya que las diferencias en la acidez e hidrofilia nos permiten extracciones selectivas de ciertos compuestos fenólicos frente a otros.

Los flavonoides no se suelen encontrar en la naturaleza como agluconas, sin sustituyentes, tan sólo los flavanoles aparecen como tal en proporciones considerables [39]. Lo más frecuente es encontrar los compuestos fenólicos como glucósidos. La glucosilación aumenta la polaridad de las moléculas de flavonoides, por lo que se almacenan en las vacuolas de las células vegetales, y se suelen encontrar en las hojas, flores y partes externas de las plantas como la piel o la cáscara. Lo más frecuente es una glucosa unida al flavonoide, aunque también se da la unión con la arabinosa, galactosa, lignano, ramnosa y xilosa [39]. En la *figura 10* se muestran los puntos más frecuentes de formación de enlaces C- y/o O-glucosilación y también los más frecuentes de hidroxilación [40].

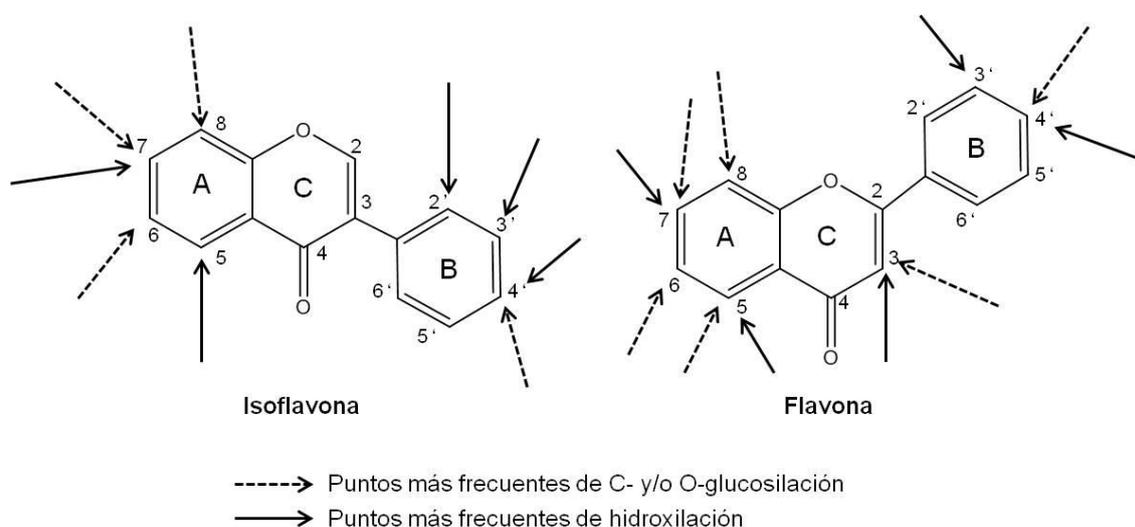


Figura 10. Esquema de los puntos más frecuentes de glucosilación e hidroxilación para los flavonoides.

Pero además de lo visto hasta ahora en los compuestos fenólicos también se pueden dar otro tipo de interacciones por su estructura tales como:

- Enlaces de hidrógeno.

Se producen tanto intermoleculares como intramoleculares. Los puentes de hidrógeno son debidos a que un elemento electronegativo está unido a un elemento más electropositivo, aumentando su reactividad y provocando que se

una con una unión más débil que un enlace a otro elemento electronegativo (figura 11). Estos enlaces de hidrógeno provocan que la molécula se estabilice, disminuyendo la reactividad. Además aumenta la solubilidad en disolventes alcohólicos y fomenta la formación de ésteres y éteres [33].

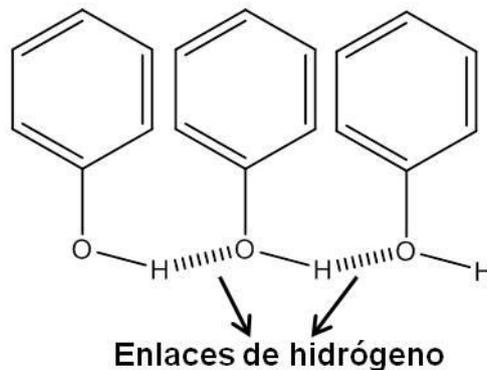


Figura 11. Formación de enlaces de hidrógeno entre fenoles.

- Complejos con metales.

Los compuestos fenólicos pueden formar complejos con ciertos metales. Esto resulta de gran importancia en la naturaleza ya que dan lugar a compuestos responsables de diferentes colores. Además, es de gran utilidad la diferente unión con metales para la identificación de ciertos compuestos fenólicos, ya que proporciona diferentes absorciones en el espectro visible [33].

- Esterificación.

El grupo hidroxilo del fenol puede participar en la formación de ésteres. Se dan entre un grupo carboxílico de un compuesto y el grupo hidroxilo de otro compuesto. En la naturaleza, los ésteres más comunes son con el ácido gálico o el elágico. Uno de los más comunes es la formación de ésteres entre el ácido cafeico y el ácido quínico, que son los conocidos como ácidos clorogénicos [33].

- Éteres y glucósidos.

Los éteres, que es la unión de dos compuestos por un enlace de oxígeno, se encuentran muy a menudo en la naturaleza. El más común es el formado por el metanol y un grupo con alcohol dando lugar al metiléter. El metiléter es muy estable y poco reactivo. Uno de los éteres más comunes, a parte del metiléter, es el formado por glucósidos, y al contrario que el anterior, son susceptibles a la hidrólisis ácida [33].

- Oxidación del grupo hidroxilo del fenol.

La oxidación del grupo hidroxilo del fenol es uno de los aspectos más importantes de estos tipos de compuestos en biología. El grupo hidroxilo se oxida por medio de distintas reacciones entre las que se encuentran la auto-oxidación o la oxidación enzimática. Esta oxidación es una de los motivos del oscurecimiento de

los tejidos y del observado en las frutas después de cortarlas. También provoca la formación de metabolitos que pueden ser tóxicos para animales y plantas, aunque esos metabolitos también inhiben los microorganismos patógenos. Otra utilidad de esta oxidación es la utilización de los fenoles como retardantes o antioxidantes para la prevención de la oxidación de los ácidos grasos [33].

- Captura de radicales, especies reactivas del oxígeno (ROS) y antioxidante.

Los radicales son especies que poseen un electrón libre, desapareado, que es altamente reactivo. Se forman en las reacciones de oxidación que forman parte del metabolismo, pero bajo ciertas circunstancias como estrés medioambiental, heridas o ataque de un patógeno, la concentración de esos radicales libres puede aumentar por encima de los niveles normales, lo cual es peligroso porque pueden dañar el ADN y las membranas por medio de la reacción con lípidos y proteínas, además de iniciar otras reacciones en cadena desencadenando nuevos radicales libres.

Las especies reactivas del oxígeno (reactive oxygen species, ROS) son moléculas que contienen un átomo de oxígeno y que son altamente reactivas por la presencia de un radical libre, o por una configuración electrónica del átomo de oxígeno con más electrones de lo normal, como el radical superóxido. Estas especies reactivas del oxígeno tienen tendencia a convertirse en radicales libres de hidroxilo. El radical hidroxilo se considera uno de los más reactivos por su capacidad de reaccionar con un amplio rango de moléculas y biomoléculas. Estas moléculas son las responsables de la peroxidación de lípidos que afecta a la fluidez de las membranas y a los receptores de las mismas, pudiendo colapsarlas.

Existen varios mecanismos para inactivar los radicales libres y los ROS, uno de ellos es a través del uso de antioxidantes. Un antioxidante puede reaccionar con un radical libre, pero no se transforma en otra molécula reactiva al darse la reacción ya que estos compuestos son estables en presencia del radical electrón. Como consecuencia de ello, estos antioxidantes capturan los radicales libres, sofocan la reacción en cadena y evitan los daños. La estabilidad de los antioxidantes en presencia del electrón libre es debido a que la molécula tiene enlaces conjugados donde el electrón se puede deslocalizar. Los compuestos aromáticos en general, y los compuestos fenólicos en particular, son efectivos antioxidantes [33].

3.4 DISTRIBUCIÓN DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS EN ALIMENTOS

Los compuestos fenólicos son característicos de las plantas en general, y por ello la ingesta de los mismos puede provenir de diversas fuentes de alimentación. De los compuestos fenólicos ingeridos casi dos tercios son flavonoides y el tercio restante son ácidos fenólicos [37]. Se ha estimado que la media de ingesta diaria de flavonoides es de 1 gramo por día en los Estados Unidos [33] y la de ácidos fenólicos es de 25 mg a 1 gramo al día [37]. Algunos ejemplos de la diversidad en compuestos fenólicos encontrados en ciertos alimentos se presentan en la *tabla 4* [27, 33, 37-41].

Tabla 4. Presencia de compuestos fenólicos en diferentes alimentos. EGC: epigalocatequina; EGCG: epigalocatequina galato; ECG: epicatequina galato; GC: galocatequina.

ALIMENTO	Tipo de Compuesto	Compuestos detectados
FRUTAS		
Manzana Roja	Ácidos fenólicos	Ácido cafeico
	Flavonoles	Quercetina, kaempferol y sus derivados glucósidos
	Procianidinas	Dímero de procianidina: B ₁₋₄
	Flavanoles	Catequina, epicatequina, ECG
	Antocianos	Cianidina y sus derivados glucósidos
Albaricoque	Flavonoles	Quercetina y sus derivados glucósidos
	Flavanoles	Catequina, epicatequina
	Antocianos	Cianidina y sus derivados glucósidos
Arándano	Ácidos fenólicos	Ácido clorogénico
	Flavonoles	Quercetina, kaempferol, miricetina y sus derivados glucósidos
	Flavanoles	EGC, catequina, epicatequina
	Flavanones	Naringenina, herperitina y sus derivados glucósidos
	Antocianos	Malvidina, delphinidina, cianidina, petunidina, peonidina y sus derivados glucósidos
Mora	Ácidos fenólicos	Ácido gálico, ácido protocatéquico
	Flavonoles	Quercetina, miricetina y sus derivados glucósidos
	Antocianos	Cianidina, pelargonidina y sus derivados glucósidos
Cereza	Flavonoles	Quercetina y sus derivados glucósidos
	Antocianos	Cianidina, peonidina y sus derivados glucósidos
Uva negra	Flavonoles	Quercetina, miricetina y sus derivados glucósidos
	Procianidinas	Dímero de procianidina: B ₁₋₄
	Flavanoles	EGC, catequina, epicatequina, ECG
	Antocianos	Malvidina, delphinidina, petunidina, peonidina, cianidina y sus derivados glucósidos
Uva verde	Flavonoles	Quercetina y sus derivados glucósidos
	Procianidinas	Dímeros de procianidina: B ₁₋₄
	Flavanoles	EGC, catequina, epicatequina, GC
	Antocianos	Malvidina, delphinidina, petunidina, peonidina, cianidina y sus derivados glucósidos
Aceituna	Flavonoles	Quercetin y sus derivados glucósidos
	Flavonas	Luteolina, apigenina y sus derivados glucósidos
	Antocianos	Cianidina y sus derivados glucósidos

Tabla 4 (cont.). Presencia de compuestos fenólicos en diferentes alimentos. EGC: epigalocatequina; EGCG: epigalocatequina galato; ECG: epicatequina galato; GC: galocatequina.

ALIMENTO	Tipo de Compuesto	Compuestos detectados
FRUTAS		
Naranja de sangre	Antocianos	Cianidina, delphinidina y sus derivados glucósidos
Naranja	Flavonoles	Quercetina y sus derivados glucósidos
	Flavanonas	Naringenina, herperidina y sus derivados glucósidos
Melocotón	Procianidinas	Dímeros de procianidina: B ₁₋₄
	Flavonoles	Catequina, epicatequina, ECG
	Antocianos	Cianidina y sus derivados glucósidos
Pera	Antocianos	Cianidina, peonidina y sus derivados glucósidos
Granada	Antocianos	Delfinidina, cianidina, pelargonidina y sus derivados glucósidos
Frambuesa	Procianidinas	Dímeros de procianidina: B ₁₋₄
	Flavonoles	EGC, catequina, epicatequina
	Antocianos	Malvidina, delphinidina, cianidina, pelargonidina y sus derivados glucósidos
Fresa	Flavonoles	Quercetin, kaempferol y sus derivados glucósidos
	Procianidinas	Dímeros de procianidina: B ₁₋₄
	Flavonoles	EGC, catequina
	Antocianos	Cianidina, pelargonidina y sus derivados glucósidos
Limón	Flavonas	Luteolina y sus derivados glucósidos
	Flavanonas	Naringenina, hesperidina y sus derivados glucósidos
VEGETALES		
Haba	Flavonoles	Quercetina, kaempferol, miricetina y sus derivados glucósidos
	Procianidinas	Dímeros de procianidina: B ₁₋₄
	Flavonoles	EGC, catequina, epicatequina, GC
Espárrago	Antocianos	Cianidina, peonidina y sus derivados glucósidos
Lechuga roja	Flavonoles	Quercetina y sus derivados glucósidos
	Flavona	Luteolina y sus derivados glucósidos
	Antocianos	Cianidina y sus derivados glucósidos
Lechuga	Flavonoles	Quercetina y sus derivados glucósidos
	Flavonas	Luteolina y sus derivados glucósidos
Cebolla roja	Flavonoles	Quercetina, kaempferol y sus derivados glucósidos
	Antocianos	Cianidina, pelargonidina y sus derivados glucósidos
Rábano rojo	Antocianos	Cianidina, peonidina y sus derivados glucósidos
Pimiento chili verde	Flavonoles	Quercetina y sus derivados glucósidos
	Flavonas	Luteolina y sus derivados glucósidos
Pimiento chili rojo	Flavonoles	Quercetina y sus derivados glucósidos
	Flavonas	Luteolina y sus derivados glucósidos
Tomate	Flavonoles	Quercetina, kaempferol y sus derivados glucósidos
	Flavanonas	Naringenina y sus derivados glucósidos
Judía verde	Flavonoles	Quercetina, kaempferol y sus derivados glucósidos
	Flavonoles	EGCG, ECG
Soja	Isoflavonas	Daidzeína, gliciteína, genisteína y sus derivados
Grano de cacao	Antocianos	Cianidina y sus derivados glucósidos

Tabla 4 (cont.). Presencia de compuestos fenólicos en diferentes alimentos. EGC: epigalocatequina; EGCG: epigalocatequina galato; ECG: epicatequina galato; GC: galocatequina.

ALIMENTO	Tipo de Compuesto	Compuestos detectados
BEBIDAS		
Zum de manzana	Flavonoles	Quercetina y sus derivados glucósidos
	Procianidinas	Dímeros de procianidina: B ₁₋₄
	Flavonoles	Catequina, epicatequina
	Flavanonas	Naringenina, hesperidina y sus derivados glucósidos
Zum de uva blanca	Flavonoles	Quercetina, kaempferol y sus derivados glucósidos
	Procianidina	Dímeros de procianidina: B ₁₋₄
	Flavonolas	EGC, catequina
Zumo de uva negra	Flavonoles	Quercetina, kaempferol y sus derivados glucósidos
Zum de naranja	Flavonoles	Quercetina y sus derivados glucósidos
	Flavanonas	Naringenina, herperidina y sus derivados glucósidos
Té negro	Flavonoles	Quercetina, kaempferol, miricetina y sus derivados glucósidos
	Procianidinas	Dímeros de procianidina: B ₁₋₄
	Flavonoles	EGC, catequina, epicatequina, EGCG, ECG, GC
Té descafeinado	Flavonoles	Quercetina, kaempferol, miricetina y sus derivados glucósidos
Té verde	Flavonoles	Quercetina, kaempferol, miricetina y sus derivados glucósidos
	Procianidinas	Dímeros de procianidina: B ₁₋₄
	Flavonoles	EGC, catequina, epicatequina, EGCG, ECG, GC
Cerveza	Flavonoles	Quercetina, kaempferol y sus derivados glucósidos
	Procianidinas	Dímeros de procianidina: B ₁₋₄
	Flavonoles	Catequina, epicatequina, GC
Vino rojo	Flavonoles	Quercetina, kaempferol, miricetina y sus derivados glucósidos
	Procianidinas	Dímeros de procianidina: B ₁₋₄
	Flavonoles	EGC, catequina, epicatequina, GC
	Flavanonas	Naringenina, hesperidina y sus derivados glucósidos
Café	Ácidos fenólicos	Ácidos clorogénicos, ácido p-cumárico
OTROS		
Chocolate negro	Procianidinas	Dímeros de procianidina: B ₁₋₄
	Flavonoles	Catequina, epicatequina
Chocolate con leche	Procianidinas	Dímeros de procianidina: B ₁₋₄
	Flavonoles	Catequina, epicatequina

En la *tabla 4* aunque no se encuentran todos los alimentos que el ser humano ingiere queda patente la diversidad de fuentes de compuestos fenólicos presentes en la dieta diaria. Además hay que tener en cuenta que la ingesta de compuestos fenólicos es diferente según el país de origen, ya que por ejemplo el té verde es la principal fuente de flavonoides en Japón, mientras que en Finlandia son las frutas y verduras [39].

Los ácidos fenólicos son abundantes en todos los alimentos, y no están distribuidos homogéneamente en las plantas ya que aparecen asociados a otros

compuestos, como por ejemplo el ácido ferúlico que suele estar asociado a la fibra dietética, el ácido cafeico que suele formar ésteres con el ácido clorogénico, o el ácido gálico formando ésteres con otros compuestos fenólicos como los flavanoles [37, 38].

En las frutas en general los flavonoides más abundantes son los flavanoles, flavonoles y procianidinas. En los cítricos las predominantes son las flavanonas y las flavonas. Los flavonoles se encuentran sobre todo en la piel de las frutas, y el más abundante de ellos es la quercetina. De todos los compuestos detectados y cuantificados en frutas los más abundantes son los flavanoles, ya sean como galatos o como agluconas. Los antocianos se encuentran en la mayoría, siendo los pigmentos naturales de las mismas [33, 38].

Las verduras, como las de la familia *allium* (cebolla), *brassica* (brócoli) y *lactuce* (lechuga) y el tomate, también son las principales fuentes de flavonoles como la quercetina y el kaempferol. También se han detectado en las verduras cantidades importantes de flavonas. Además el tomate es una fuente de flavanonas como la naringenina y hesperidina [33, 38]. Las legumbres, en cambio, son fuentes ricas en flavanoles y procianidinas, mientras que la soja es rica en isoflavonas.

Otra fuente rica de compuestos fenólicos son las bebidas como los zumos de frutas, el té, el café y el vino. Una taza de café (200 mL) puede aportar de 50 a 100 mg de ácido clorogénico [38]. Los flavanoles son los flavonoides más comunes en estas bebidas, en concreto en el té. La principal fuente de procianidinas en las bebidas es el vino [33, 38].

Como se puede observar ingerimos compuestos fenólicos con muchos de los alimentos básicos en nuestra dieta, y es algo fundamental conocer con exactitud y precisión qué compuestos ingerimos diariamente para poder conocer sus efectos en nuestra calidad de vida. Otra circunstancia muy importante a tener en cuenta es que es posible incorporar ciertos alimentos a nuestra dieta para conseguir los beneficios en la salud que se les atribuye por los estudios realizados en otros países, como se va a describir a continuación.

3.5 IMPORTANCIA EN LA SALUD DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS

Existen evidencias científicas de cómo el estilo de vida, el país de origen y, en concreto, la dieta puede influir beneficiosamente en la salud.

Un estudio sobre el consumo de vino en Francia lo relaciona directamente con un bajo índice de mortalidad por enfermedades cardiovasculares, similar al encontrado en Japón y China, países donde se ha observado un bajo índice de enfermedades cardiovasculares e incluso de ciertos cánceres. Existen evidencias de la baja incidencia del cáncer de mama en la población asiática, en comparación con las poblaciones occidentales, y también hay estudios que relacionan el consumo de frutas y verduras con la prevención del cáncer de mama [28, 33, 42, 43]. Se podría pensar que estos estudios pueden estar relacionados más con factores genéticos que con la dieta, pero hay otros estudios donde se pone de manifiesto que la dieta influye en la regulación de los genes [44]; o donde se comprueba en un grupo heterogéneo de individuos que el consumo de algún producto produce un beneficio, como es el caso del estudio de un grupo de individuos bebedores de café entre los que se comprobó que la incidencia de cáncer de colon era menor que en la población no consumidora de café [28].

Todos estos estudios se pueden relacionar con la dieta diaria, en concreto con los compuestos ingeridos en la misma.

Como se ha comentado anteriormente una de las principales características de los compuestos fenólicos son sus propiedades antioxidantes. Estos capturan los radicales libres, los cuales inducen estrés oxidativo que se cree que es un mecanismo fundamental en varios desórdenes cardiovasculares, neurológicos, diabetes, artritis reumatoide, desórdenes pulmonares, ciertos cánceres, envejecimiento...[30, 40].

Pero además de estos efectos sobre las enfermedades descritas tienen efectos antiulcerales, antivirales, antiinflamatorios, antiartríticos, anti diarréicos, antiaterosclerosis, antiagregación plaquetaria y antitrombótica [30].

Además, los compuestos fenólicos también se relacionan con ciertos beneficios para la salud derivados de otras propiedades diferentes a su carácter antioxidante. Entre estos beneficios se encuentra la inhibición de la carcinogénesis en estudios *in vitro* e *in vivo*, en el caso de estudios con el flavonol quercetina, resulta beneficioso en el tratamiento de cánceres de boca, mama, pulmón y digestivos; las isoflavonas se relacionan con cánceres hormono dependientes y no hormono dependientes de mama; ciertos antocianos se relacionan con cánceres de colon y algunos flavanoles encontrados en el té con cánceres de piel, digestivos y algunas metástasis [28, 40, 42, 43].

Los mecanismos de acción de los compuestos fenólicos en la prevención de ciertos cánceres pueden ser la captura de radicales, la regulación de la expresión de

genes en la proliferación celular, la regulación de oncogenes y genes de supresión de tumores, la inducción de la detención del ciclo celular y la apoptosis, la modulación de la actividad enzimática en detoxificación, oxidación y reducción, la estimulación del sistema inmune y la regulación del organismo hormonal...[40]

Además de la prevención o tratamiento de ciertos tipos de cáncer, tal y como se ha visto anteriormente, los polifenoles han demostrado tener beneficios en otras enfermedades. Entre ellas se encuentran las enfermedades relacionadas con la inflamación, ejerciendo este tipo de compuestos un efecto antiinflamatorio *in vitro* e *in vivo*, pudiendo así prevenir e intervenir beneficiosamente también en la obesidad, la diabetes tipo II, algunas enfermedades cardiovasculares [32], neurodegenerativas y el envejecimiento [31].

Algunas de las enfermedades que se han relacionado tanto en estudios *in vitro* como *in vivo* con compuestos fenólicos concretos, se recogen en la *tabla 5*.

Tabla 5. Resumen de ciertos efectos en la salud de compuestos fenólicos concretos.

Compuesto Fenólico	Efectos en la salud	Referencia
Ácido cafeico	Actividad beneficiosa en las enfermedades de inmunoregulación, asma y reacciones alérgicas.	[37]
	Actividad antitumoral contra la carcinogénesis del cáncer de colon.	[37]
	Actividad antiviral frente al virus VIH-1.	[37]
Ácidos benzoico, cafeico, ferrúlico y vainillínico	Actividad contra las micotoxinas.	[33]
Quercetina	Evita el daño en células neuronales en enfermedades como el Alzheimer.	[40]
	Beneficios sobre enfermedades cardiovasculares, por la mejora de la función endotelial.	[45]
Epicatequina	Beneficios sobre enfermedades cardiovasculares, por la mejora de la función endotelial.	[45]
Flavona, flavonol y flavanol	Proporcionan menores índices de masa corporal. Efectos antiobesidad.	[46]
Isoflavonas	Efecto protector del cáncer de mama, enfermedades neurodegenerativas y mitigación de los síntomas de la menopausia.	[43]

3.6 DETERMINACIÓN ANALÍTICA DE COMPUESTOS FENÓLICOS

En los últimos años se han realizado enormes esfuerzos para evaluar la concentración de compuestos fenólicos en el más amplio rango de alimentos para intentar relacionar su ingesta con los posibles efectos sobre la salud provocados por el consumo de los mismos. Por ello es de máxima importancia el desarrollo de métodos confiables y precisos para la cuantificación de los mismos.

Como se ha visto anteriormente, el gran número de alimentos naturales y desarrollados con posibles alegaciones para la salud es muy amplio y complejo, lo cual implica grandes desafíos para la obtención de datos confiables sobre la concentración de los compuestos fenólicos en los mismos. A lo largo de los años se han usado métodos para su cuantificación sin la adecuada optimización y validación del procedimiento, lo que puede conducir a estimaciones erróneas que a su vez pueden inducir a error en relación con sus efectos en la salud. La utilización de métodos optimizados puede ahorrar tiempo y recursos además de ofrecer resultados fiables.

La determinación analítica, no sólo de los compuestos fenólicos en alimentos sino de cualquier analito de interés en cualquier matriz, se puede dividir en cuatro etapas: la toma de muestra, la conservación de la muestra, la preparación de la misma y el análisis [47], como se puede observar en la figura 12.

Una vez tomada una muestra homogénea y representativa del alimento en cuestión se debe tener en cuenta el tratamiento previo de las muestras, ya que habitualmente los compuestos interactúan con la matriz y no están fácilmente accesibles al disolvente de extracción. De esta forma se hace necesario adecuar la matriz de la muestra para poder posteriormente aislar (es decir, extraer) y separar los compuestos presentes de forma que puedan ser analizados.

Los objetivos principales de este tratamiento previo son: incrementar la eficacia del análisis, eliminar o reducir los potenciales compuestos interferentes; mejorar la sensibilidad del procedimiento analítico aumentando la concentración del analito de interés en la alícuota a analizar; y algunas veces transformar el compuesto a analizar en otro con una forma química que facilite su extracción, detección o cuantificación (derivatización). Para ello existen múltiples estrategias que pueden ser aplicadas en este pretratamiento de muestras [47].

Los compuestos fenólicos presentes en los alimentos tienen una gran diversidad de estructuras y además aparecen unidos a otros compuestos como azúcares. Las enzimas endógenas de los propios alimentos pueden degradar estos compuestos, por ello se debe evitar su actividad y para ello se deben almacenar las muestras a bajas temperaturas (congeladas) o se debe eliminar el agua de las mismas [48]. A la hora de secar las muestras, las altas temperaturas no son aconsejables ya

que la mayoría de los compuestos fenólicos son lábiles en esas condiciones, y se degradarían térmicamente antes del análisis dando lugar a errores en la cuantificación [47, 49]. Por ello el método más aconsejable es la liofilización o el secado con aire de las muestras para eliminar el agua.

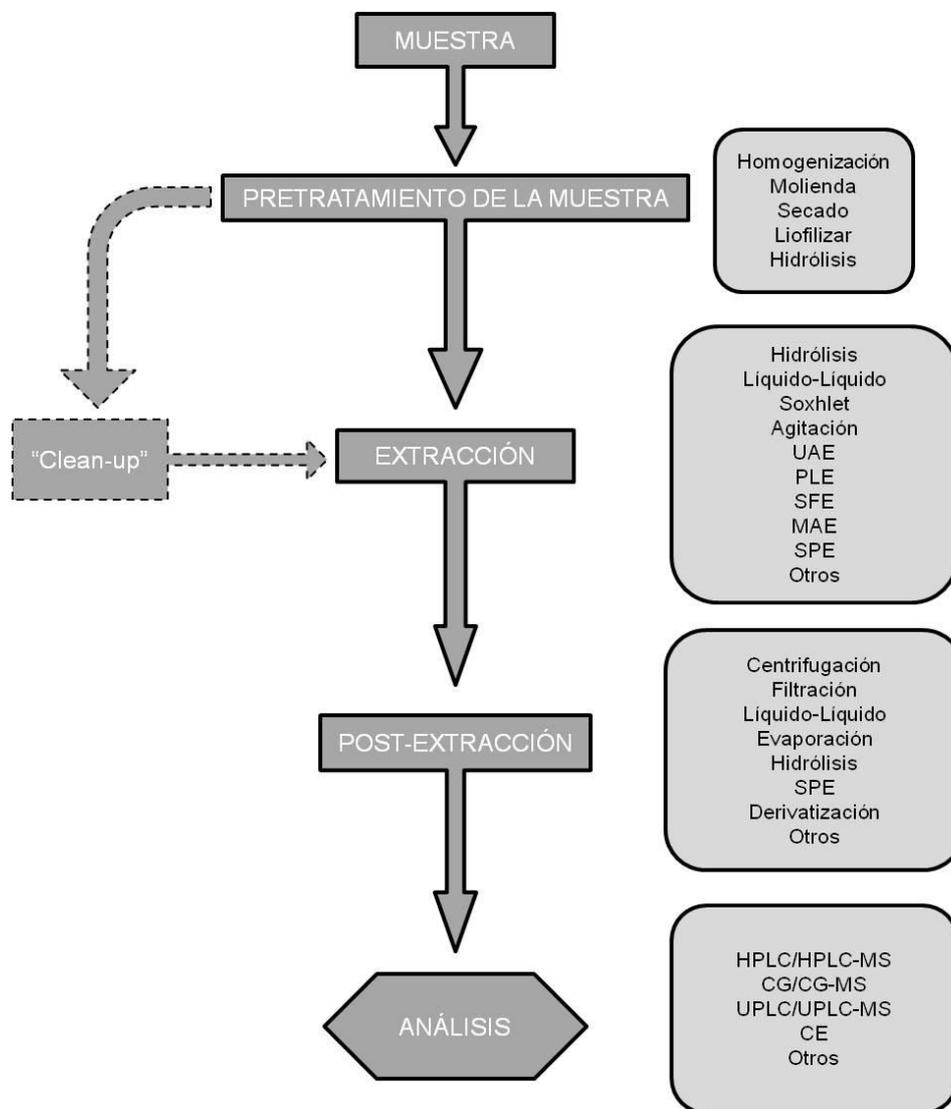


Figura 12. Diagrama representativo de las etapas más comunes en la determinación analítica de analitos en muestras.

Una vez secas las muestras sólidas, se procede a su molienda y homogenización adecuada para así trabajar con un polvo de muestra, que es más sencillo de manejar y almacenar. Además, la reducción del tamaño de las partículas de la muestra permite aumentar la superficie de contacto y la penetración del disolvente en la matriz de la muestra, facilitando así el proceso de extracción.

En el caso de muestras líquidas es posible proceder directamente a su análisis, realizando la dilución adecuada en otro disolvente en el que sean solubles; también se pueden liofilizar y tratarlas como muestras sólidas. Aquellas muestras líquidas alcohólicas se suelen tratar en un evaporador rotatorio para la eliminación del

alcohol y el residuo sólido se redisuelve en un disolvente adecuado, como es el caso de los vinos y ciertas bebidas alcohólicas [37].

Otro pre-tratamiento utilizado en el análisis de compuestos fenólicos es la hidrólisis de las muestras. Se utiliza para simplificar la detección de los distintos compuestos fenólicos de forma que se simplifica la elucidación estructural y la caracterización de los glucósidos, además de que se minimizan las interferencias en la detección, sobre todo en términos de disponibilidad de los patrones apropiados ya que puede que ciertos compuestos glucosilados no se encuentren como patrones comerciales y en cambio sí están disponibles sus correspondientes agluconas [47, 50]. Por lo tanto, si no interesa conocer cuál es el compuesto fenólico concreto y sólo nos interesa su aglucona, o su contenido total, se puede realizar una hidrólisis previa al análisis que puede ser realizada antes, durante o después de la etapa de extracción. Esta hidrólisis puede ser ácida, básica o enzimática según el enlace que se quiere romper. La hidrólisis básica se utiliza para romper los enlaces éster, mientras que la ácida se suele utilizar para romper los enlaces entre las agluconas y las moléculas de azúcar. La hidrólisis enzimática es la menos utilizada, a pesar de que permite una ruptura específica de los enlaces [47, 49, 50].

La etapa de la extracción es de las más importantes y el proceso global depende de la liberación del analito de la matriz, lo cual permite determinaciones cuantitativas de los compuestos a analizar. Además los extractos deberían contener una concentración y perfil de las distintas formas químicas de los compuestos a analizar, lo más similar posible a la encontrada en el alimento original, ya que sólo de este modo se puede relacionar su presencia con el efecto en la salud que la ingesta de ese alimento proporciona. Un método de extracción no apropiado, que varíe el perfil del compuesto fenólico a analizar o no consiga extracciones cuantitativas del mismo, conlleva errores en la relación entre la ingesta y los posibles beneficios para la salud.

La elección del método de análisis de los extractos obtenidos también influye en los resultados pudiendo dar lugar a errores en la correcta identificación y cuantificación de los compuestos fenólicos presentes en el alimento. El uso de métodos de análisis no validados de forma adecuada para los extractos objeto de estudio puede proporcionar resultados poco fiables y reproducibles con los que poder aportar conclusiones a los hechos estudiados. Se deben optimizar los métodos de análisis de forma que no interfieran entre sí los compuestos a analizar y su detección sea la apropiada.

Por ello, tanto la obtención de los extractos como su análisis son pasos críticos para la obtención de resultados apropiados en los estudios de evaluación de la composición fenólica de los alimentos y la relación entre su ingesta y los diferentes beneficios en la salud del individuo.

3.6.1 Extracción de compuestos fenólicos

La extracción es uno de los pasos más importantes en la purificación, identificación y obtención de compuestos fenólicos. No existe un método simple y único de extracción debido a la presencia de estos compuestos en distintas partes de la fisionomía de las plantas y en los alimentos, unidos a distintas estructuras. Además, coexiste una gran diversidad de compuestos con diferentes características químicas, que suponen diferencias en la solubilidad de los compuestos en el extractante e interacciones entre compuestos y componentes. Por lo tanto, en la extracción de compuestos fenólicos siempre se dan mezclas de distintas clases de los mismos según sean más o menos solubles en el sistema de disolventes utilizado para la extracción.

El método más común es la extracción con un disolvente orgánico o mezclas acuosas de disolventes alcohólicos, que se basa en la transferencia de masa desde la muestra al disolvente de extracción según la solubilidad del analito en dicho disolvente. Para la optimización del mismo se varían diferentes parámetros que afectan a esa solubilidad.

Para este tipo de extracción se utilizan diferentes técnicas desde la maceración, a la utilización de diversas técnicas de extracción que agilizan esa transferencia de masa desde la muestra al disolvente. Entre las distintas técnicas de extracción utilizadas se encuentran técnicas convencionales, como el soxhlet o la agitación magnética.

En la *tabla 6* se resumen algunos ejemplos de métodos de extracción convencional donde la transferencia de masa se realiza entre la muestra y el disolvente de extracción, el cual puede ser mezcla acuosa de etanol, metanol o cloroformo entre otros. En estas extracciones los parámetros que condicionan el rendimiento del proceso son desde el disolvente utilizado hasta el tiempo de extracción, la ratio muestra-disolvente, el tamaño de partícula de la muestra...[34, 51, 52]. Todos estos parámetros influyen en la solubilidad del analito en el disolvente de extracción que es la característica que rige el rendimiento del proceso.

Tabla 6. Resumen de algunos métodos convencionales de extracción de compuestos fenólicos. Ref.: referencia.

Compuesto fenólico	Muestras	Método	Disolvente y condiciones	Ref.
Rutin, ácido clorogénico	Trigo sarraceno	Maceración	Etanol acuoso al 30% a 60 °C durante 2 horas.	[53]
Compuestos fenólicos (flavanoles y procianidinas)	Semillas de mocán (<i>Visnea mocanera</i> L.f.)	Maceración	Metanol a temperatura ambiente por triplicado durante 9 horas.	[54]
Ácidos hidroxicinámicos	Trigo, arroz, centeno, cebada, maíz, aceite de palma	Soxhlet	Hidrólisis básica con NaOH a 170 °C durante 2 horas y posterior extracción con cloroformo por triplicado.	[55]
Varios flavonoides	Menta, ortiga, hierba de San Juan	Soxhlet	Metanol a su temperatura de ebullición durante 12 horas.	[56]
Daidzeína, genisteína	Alimentos de soja	Soxhlet	Metanol acuoso al 90% a una temperatura mayor de 130 °C durante 1 hora.	[57]
Flavanona	Pomelo	Agitación	n-pentano por triplicado.	[58]
Isoflavonas y derivados glucósidos	Alimentos de soja	Agitación	Acetonitrilo acuoso al 50%.	[59]
Isoflavonas y derivados maloníles	Leguminosas	Agitación	Metanol acuoso al 90% durante 1 minuto por duplicado.	[60]
Ácido ascórbico, ácido gálico	Fresa y frambuesa	Utra Turrax (agitación)	Metanol caliente en ratio 1:2 durante 2 minutos.	[61]
Antocianos	Fresa y frambuesa	Utra Turrax (agitación)	Metanol 0,01% HCl caliente en ratio 1:10 durante 2 minutos.	[61]
Varios ácidos fenólicos	Aceite de oliva	Utra Turrax (agitación)	Metanol acuoso al 80% a temperatura ambiente durante 1 minuto y posterior centrifugación durante 10 minutos.	[62]

Como se puede observar los tiempos de extracción varían desde 1 a 12 horas utilizando soxhlet como método, pudiéndolo reducir hasta 1 ó 2 minutos con el uso de agitación utilizando instrumentos que permiten la ultra-agitación, que favorece la ruptura de las células de la muestra, de modo que se liberan los compuestos de interés, lo cual hace que la extracción se consiga en menor tiempo y en condiciones menos agresivas (temperaturas más bajas, disolventes no acidificados...)

Los disolventes más utilizados son los disolventes alcohólicos puros o mezclas acuosas de los mismos. En el caso de los antocianos se suelen utilizar pequeñas cantidades de ácido que permiten aumentar la solubilidad de los compuestos en el disolvente de extracción [34, 51]. Para el resto de compuestos fenólicos, tal y como se comentó anteriormente, se pueden realizar hidrólisis para favorecer la ruptura de las uniones entre los compuestos fenólicos y las diferentes estructuras presentes en la planta.

En la mayoría de los casos consultados, después de la extracción con métodos convencionales se procede a la concentración del extracto por medio de la eliminación del disolvente al vacío, bajo corriente de nitrógeno o utilizando el evaporador rotatorio, y la posterior disolución del extracto seco en el disolvente adecuado para su análisis. De esta manera reducimos los límites de detección y cuantificación de los compuestos de interés y se evita la posible distorsión por la presencia del disolvente de extracción [47].

Además de este proceso de post-extracción muchos trabajos incorporan un proceso de purificación de los extractos, ya que en la mayoría de las extracciones se produce la co-extracción de otros compuestos que pueden interferir en el análisis de los analitos de interés. El más común de los procesos de purificación es la extracción en fase sólida -SPE (Solid Phase Extraction)-, en la que normalmente se utilizan sorbentes de fase reversa, C18, y pHs ligeramente ácidos para aumentar la selectividad y retención de los compuestos en el sorbente, eluyéndose al final con el disolvente adecuado. De esta manera se consigue además de la purificación de los extractos la concentración de los mismos [47, 50, 63, 64]. Se trata de una técnica rápida y sensible que puede llegar a reemplazar a los métodos tediosos de extracción en el caso de muestras líquidas [50]. Además de los clásicos cartuchos de extracción C18, se han desarrollado nuevos sorbentes con materiales poliméricos que permiten mayor reproducibilidad en el proceso, puesto que presentan mejores propiedades físicas y son estables en presencia de disolventes orgánicos [65].

Sin embargo, los procesos de extracción convencionales presentan una serie de inconvenientes como son el alto consumo de disolventes, los largos tiempos de extracción, la baja eficacia y selectividad del proceso y la degradación de los compuestos de interés. Esto ha llevado a la búsqueda y desarrollo de nuevas técnicas de extracción, como la extracción asistida por ultrasonidos o microondas y la extracción con líquidos presurizados o con fluidos supercríticos, entre otras. Cuando se utilizan estas técnicas se deben tener en cuenta otras características del disolvente además de la solubilidad del analito en él, tales como su capacidad de propagación de ultrasonidos, de absorción de energía de microondas, o sus cambios químico-físicos al utilizar altas temperaturas o presiones. Estos aspectos se han de tener en cuenta a la hora de optimizar el proceso, lo que complica más la extracción, pero también permite hacerla más selectiva y eficaz [47].

Ejemplos de estas técnicas de extracción, aplicadas a los compuestos fenólicos se muestran en la *tabla 7*.

Tabla 7. Resumen de algunos métodos para las extracción de compuestos fenólicos no convencionales. UAE: extracción asistida por ultrasonidos; MAE: extracción asistida por microondas; PLE: extracción con líquidos presurizados; SWE: extracción con agua subcrítica; SFE: extracción con fluidos supercríticos. Ref.: referencia.

Compuesto Fenólico	Muestras	Método	Disolvente y condiciones	Ref.
Ácidos fenólicos, flavanoles, isoflavonas, flavonoles, flavonas	Manzana y pera	UAE	Metanol 1% BHT, en ausencia de luz, a temperatura ambiente, por triplicado (1 hora, 30 minutos y 30 minutos).	[66]
Ácidos fenólicos, flavanoles, isoflavonas, flavonoles, flavonas	Judía verde y lenteja	UAE	Metanol acuoso 80% con 1% BHT, en ausencia de luz, a temperatura ambiente, por triplicado (1 hora, 30 minutos y 30 minutos).	[66]
Ácidos fenólicos	<i>Echinacea purpurea</i>	UAE	Metanol acuoso 70% a temperatura ambiente durante 5 minutos por triplicado.	[67]
Flavanoles galato, flavonoles y flavonas	Hojas de <i>ginkgo bibloba</i>	UAE	Metanol durante 30 minutos.	[68]
Isoflavonas y sus derivados malonil	Soja	UAE	Etanol acuoso 50%, a 60 °C durante 20 minutos.	[69]
Ácidos fenólicos	<i>Echinacea purpurea</i>	MAE	Metanol acuoso 70% con un gradiente de temperatura de 50°C a 100°C en 5 minutos con una isoterma de 100°C durante 5 minutos. Pulso de microondas de 200 W.	[67]
Isoflavonas y derivados glucósidos, malonil y acetil	Soja	MAE	Etanol acuoso 50% a 50 °C durante 20 minutos. Potencia de microondas de 500 W.	[70]
Isoflavonas y sus derivados malonil	Soja	PLE	Etanol acuoso 70%, 100 °C, con 3 ciclos estáticos de 7 minutos.	[71]
Flavanoles	Semilla y piel de uva y hojas de té	PLE	Metanol a 100°C con dos ciclos de 5 minutos cada uno.	[72]
Ácidos fenólicos, flavanoles, flavonoles, antocianos y flavonas	Alubias negras	PLE	Metanol acuoso 80% a 80 °C con 3 ciclos de 8 minutos.	[73]
Ácidos fenólicos y flavonoides	Hojas de romero	SWE	Agua a diferentes temperaturas entre 25 °C y 200 °C a una presión de 15 bar.	[74]
Derivados glucósidos de isoflavonas	Soja	SFE	Flujo de CO ₂ de 1 mL/min. Metanol como modificador en concentración 10 mol% de la masa de CO ₂ que pasa a través del sistema durante la extracción dinámica. .-Para el derivado de daidzeína: 50 °C, 360 bar. .-Para los derivados de gliciteína y genisteína: 70 °C, 200 bar.	[75]
Ácidos fenólicos y quercetina	Bagazo de uva	SFE	CO ₂ y como modificador etanol al 10% a 50 °C y 20-35 MPa.	[76]

Entre estas “nuevas” técnicas de extracción se encuentra la extracción asistida por ultrasonidos, (UAE - Ultrasound Assisted Extraction), donde se utiliza el disolvente sometido a ultrasonidos para la extracción de los compuestos de interés de las muestras.

La eficacia de la extracción utilizando ultrasonidos se le atribuye al fenómeno de cavitación que ocurre en el disolvente al atravesarlo una onda ultrasónica. Durante la aplicación del ultrasonido se forman y se comprimen burbujas cavitatorias; debido al acúmulo de energía se produce un colapso de las burbujas que provoca la generación localizada de grandes cantidades de presión y temperatura y de una “onda de choque” que pasa a través del medio, que no es otro que la mezcla disolvente-muestra (*figura 13*).

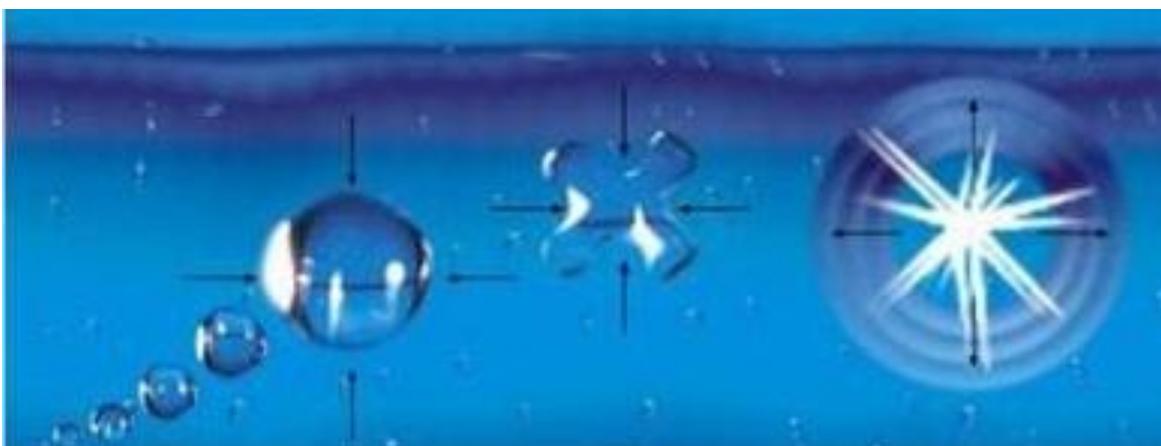


Figura 13. Dibujo explicativo de la formación, compresión y colapso de las burbujas generadas en el disolvente de extracción debido a la cavitación.

Además de este efecto de mezcla por la onda de choque, hay un efecto mecánico que se produce al implosionar una burbuja cerca de la superficie de la muestra, dando lugar a una implosión asimétrica que provoca un “disparo” de disolvente a alta velocidad que interacciona con las paredes celulares de la muestra, provocando la erosión de la matriz de la muestra, lo que supone un aumento en la penetración del disolvente en la muestra y de la superficie de contacto entre la muestra y el disolvente de extracción [47, 69].

Este efecto mecánico, sumado al aumento de la transferencia de masa desde la muestra al disolvente por la agitación del ultrasonido, provoca un aumento de la liberación de los compuestos de interés al disolvente de extracción. Además, el uso de ultrasonidos introduce energía en el medio que es utilizada para romper los enlaces entre los compuestos y la matriz de la muestra. El uso de temperaturas más altas puede aumentar la eficacia de la extracción aumentando el número de las burbujas de cavitación formadas. En este tipo de extracción se deben optimizar los mismos parámetros que en las extracciones convencionales, como son el tipo de disolvente, la temperatura, el tiempo de extracción y el volumen entre otros, pero además hay que tener en cuenta los parámetros que se deben optimizar debidos a la fuente de

ultrasonidos, tales como son la frecuencia y la intensidad, así como el número de impulsos aplicados [47, 69].

Otro tipo de extracción utilizada para los compuestos fenólicos aunque en menor medida, es la extracción asistida por microondas, MAE (Microwave Assisted Extraction). Las microondas son ondas electromagnéticas de frecuencias entre 300 MHz y 300 GHz. Las extracciones en las que se utilizan las microondas se basan en la absorción de la energía de las microondas por las moléculas de compuestos polares, ya que la energía es proporcional a la constante dieléctrica de la molécula, por lo que produce la rotación de los dipolos en el campo magnético lo que provoca la generación de calor. Por lo tanto estas extracciones utilizan el calor generado por el uso de las microondas [47, 70].

La eficacia de la extracción por microondas depende de varios factores como las propiedades del disolvente utilizado para la extracción, la muestra, los compuestos a extraer, y más concretamente sus constantes dieléctricas. En la mayoría de los casos se utiliza la alta constante dieléctrica del disolvente para que éste absorba la energía de las microondas y se produzca su calentamiento, lo que hace que mejore la extracción. Las microondas, también se pueden utilizar para promover un calentamiento selectivo y rápido del agua de la muestra, lo cual produce un aumento de presión dentro de las células de la muestra que provoca una rápida transferencia de los compuestos de interés al disolvente de extracción. Si se utilizan recipientes cerrados es posible utilizar temperaturas por encima del punto de ebullición del disolvente y acelerar así la transferencia de masa de los compuestos de interés de la muestra al disolvente de extracción [47, 70].

Pero además de estas técnicas que utilizan ondas para aumentar la eficacia de extracción, se está incrementando el uso de otras técnicas de extracción en las que se provocan cambios tanto físicos como químicos del disolvente por la aplicación de altas temperaturas y presiones, que afectan a la solubilidad de los analitos de interés en el disolvente de extracción.

Entre estas técnicas se encuentra la extracción con líquidos presurizados, PLE (Pressurized Liquid Extraction). En esta extracción se combinan altas temperaturas (50-200 °C) y altas presiones (100-140 atm) con disolventes líquidos, sin alcanzar el punto crítico de los mismos, es decir, se trabaja por encima de la temperatura de ebullición del disolvente, pero éste se mantiene líquido por medio de las altas presiones (*figura 14*). De esta forma se consiguen extracciones más rápidas y eficaces de muestras sólidas y semisólidas. Cuando en esta técnica se utiliza agua como disolvente, se denomina extracción con agua subcrítica (SWE).

Al aumentar la temperatura se aumenta la capacidad del disolvente para solubilizar el analito, se provocan rupturas de los enlaces entre analito y matriz por la agitación molecular debida a la temperatura, se disminuye la viscosidad del disolvente y se modifica su constante dieléctrica variando así sus propiedades físico-químicas.

Pero además de aumentar la temperatura, se produce un aumento de presión que permite que se mantenga el disolvente en estado líquido, que aumente la velocidad de difusión del disolvente en los poros de la matriz y se facilite así la transferencia de masas del analito de la matriz al disolvente de extracción.

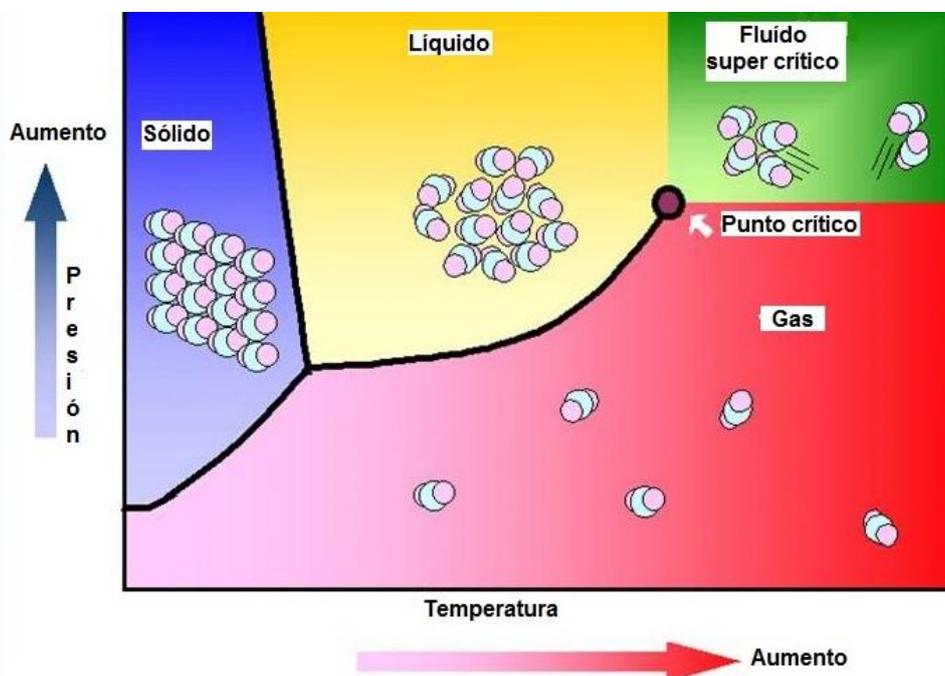


Figura 14. Diagrama de fases esquemático para el disolvente de extracción en función de la presión y la temperatura.

El punto crítico de estas extracciones es la temperatura ya que muchos compuestos fenólicos son lábiles a altas temperaturas, por lo tanto es lo que limita el uso de este método de extracción.

Otro método de extracción que utiliza cambios en la temperatura y presión para obtener diferentes características del disolvente de extracción es la extracción con fluidos supercríticos, SFE (Supercritical Fluid Extraction). Este tipo de extracción utiliza fluidos supercríticos como disolvente de extracción. Un fluido supercrítico es una sustancia a una temperatura y presión por encima de su punto crítico termodinámico (figura 14).

Al encontrarse por encima de su punto crítico termodinámico posee características de un gas, con un alto coeficiente de difusión y baja viscosidad, y puede penetrar en la muestra al igual que los gases; pero además posee un poder de disolución similar al de los líquidos. Hay que tener en cuenta que al encontrarse cerca del punto crítico los pequeños cambios de presión o temperatura ocasionan grandes cambios en la densidad, como se observa en la figura 15 (la zona delimitada en rojo), por lo tanto es posible su variación para la obtención de una extracción más efectiva [47, 75].

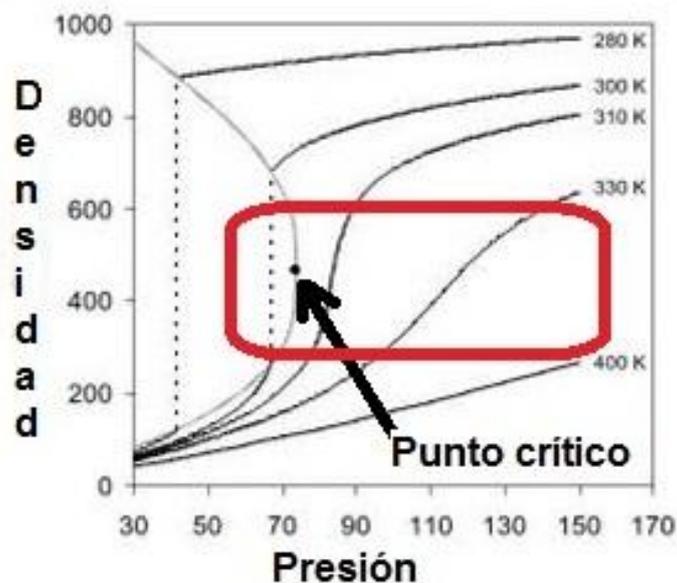


Figura 15. Representación de la variación de la densidad al variar la presión en diferentes isothermas para el CO₂. En rojo se representan la zona de las posibles variaciones alrededor del punto crítico y los cambios físico-químicos que provocan. La presión se da en bares y la densidad en Kg/m³.

De los fluidos supercríticos posibles el más utilizado es el dióxido de carbono, CO₂, debido a su bajo coste y a que sus parámetros críticos son fáciles de conseguir, 31,1 °C y 74,8 atm. Además es inodoro, no es tóxico, no es inflamable, es transparente a la radiación ultravioleta y es apolar por lo que puede disolver a una gran variedad de moléculas orgánicas. Debido a su carácter apolar no ha sido ampliamente utilizado en la extracción de compuestos fenólicos, ya que es baja su selectividad para compuestos relativamente polares [48]. Pero la adición de un modificador de polaridad, en este caso para hacerlo más polar, como el metanol o el etanol, permite modificar la polaridad del CO₂ supercrítico (SC-CO₂) y así aumentar la solubilidad de analitos como los compuestos fenólicos [47, 75]. La mayor ventaja de la extracción con fluidos supercríticos es que al finalizar la extracción y volver a las condiciones de presión atmosférica, el disolvente se evapora y el extracto obtenido es un extracto más concentrado, por lo que se puede evitar el uso de una etapa post-extracción de eliminación de disolvente.

Las últimas tendencias en extracción consisten en la combinación de varias técnicas, de modo que aumente la eficacia de las extracciones e incluso se puedan eliminar etapas de post-extracción como la purificación o eliminación del disolvente. Pueden combinarse al mismo tiempo (*in-line*), secuencialmente sin intervención del analista (*on-line*) o secuencialmente con intervención del analista, esto último es lo más común y es lo que se suele hacer a la hora de utilizar la extracción en fase sólida como etapa de purificación.

Huang y col. 2008 [77] combinan el ultrasonidos y las microondas en la purificación de quercetina obtenida a partir de la planta *Anoectochilu roxburghii Lindl* (familia de las orquídeas), obteniendo un extracto con mayor rendimiento y mejor recuperación que el obtenido con la extracción soxhlet, además de más rápido. El uso de las microondas para calentar el disolvente produce la interacción de las ondas con las moléculas de agua que se encuentran en la planta, lo cual produce la ruptura del tejido de la planta y la liberación de la quercetina al disolvente. Además el uso de ultrasonidos incrementa también ese efecto.

Otro ejemplo de la aplicación combinada y simultánea es la extracción de ácidos fenólicos de micro algas realiza por Klejdus y col. 2009 [78] utilizando un cartucho de extracción en fase sólida (SPE) en el interior de la cápsula de extracción del extractor de fluidos supercríticos, realizando una extracción SPE/SFE, usando la adición cíclica del sistema binario de disolventes de extracción que son metanol acuoso al 50% y una disolución de metanol y amonio al 50%; se trabaja a 80 °C y 40 MPa con SC-CO₂ utilizado para la limpieza de los cartuchos y para extraer todos los compuestos retenidos en el cartucho.

3.6.2 Análisis cromatográfico de compuestos fenólicos

Las técnicas utilizadas para el análisis de compuestos fenólicos en muestras de manera más específica e individual son las diferentes técnicas cromatográficas, tanto de gases como de líquidos, así como la cromatografía en capa fina y la electroforesis.

Pero la técnica más utilizada en el caso de los compuestos fenólicos es la cromatografía líquida de alta eficacia, HPLC (High Performance Liquid Chromatography).

3.6.2.1 Cromatografía líquida de alta eficacia, HPLC

La técnica de HPLC fue utilizada por primera vez en la determinación de flavonoides en 1976 por Fisher and Wheaton [52].

Las columnas cromatográficas más utilizadas son las que contienen como fase estacionaria un relleno apolar, C8 o C18, comúnmente denominadas columnas de fase reversa, RP (Reverse Phase); las longitudes de las columnas oscilan entre 100 y 300 mm, un diámetro interno de 4,6 mm y un tamaño de partícula de 5 μm .

Como sistema de elución, denominado fase móvil, lo más común es el uso de fases binarias en gradiente, compuestas por un disolvente acuoso acidificado con ácido acético, fórmico o fosfórico y un disolvente menos polar orgánico como metanol o acetonitrilo que también puede ser acidificado [34, 37, 47, 49, 52, 63]. Sin embargo, en análisis específicos, como puede ser el caso de los flavanoles, se utilizan otros tipos de ácidos, como el ácido trifluoroacético, que mejora la separación y elimina la cola que presentan los picos cromatográficos utilizando otros ácidos [83]. Es menos común el uso de sistemas ternarios o cuaternarios, o el modo isocrático como fase móvil.

La duración del análisis oscila entre 30 y 120 minutos, con equilibrado entre las inyecciones, flujos entre 1 y 1,5 mL/min y utilizando volúmenes de inyección entre 1 y 100 μL [52, 63]. En muchos análisis se trabaja a temperatura ambiente, pero el uso de la columna termostatizada, con temperatura superior a 40°C, permite aumentar el flujo, acortar el tiempo de análisis y conseguir una mayor repetitividad [63].

Algunos ejemplos del análisis de compuestos fenólicos mediante HPLC se muestran en la *tabla 8*. En ella también se reflejan algunos ejemplos de métodos rápidos de determinación de compuestos fenólicos utilizando nuevas técnicas cromatográficas, como la UPLC -Ultra-high Performance Liquid Chromatography-, o nuevos materiales para el relleno de las columnas cromatográficas, como ocurre en las columnas monolíticas.

Como sistemas de detección los más utilizados son la espectrofotometría UV-Visible y la espectrometría de masas, aunque según el compuesto fenólico a analizar y la finalidad del análisis, es posible el uso de otro tipo de detecciones como la fluorescencia, la resonancia magnética nuclear o la espectrometría infrarroja [37].

Tabla 8. Ejemplos de análisis de compuestos fenólicos mediante HPLC.

Compuestos Fenólicos	Muestra	Método de análisis	Columna	Disolventes y condiciones	Ref.
Ácidos fenólicos	Hojas de orégano	HPLC–NMR	RPC ₁₈ 250x4,6 mm, 10 μm	Fase A: agua 2% ácido acético. Fase B: metanol 2% ácido acético. Gradiente. 130 minutos.	[84]
Ácidos fenólicos	Aceitunas y aceites	HPLC-API-MS/MS Modo MRM	Nucleosil ODS 250x2,1 mm, 5 μm	Fase A: metanol 0,045% ácido fórmico. Fase B: agua 0,045% ácido fórmico. Gradiente.	[85]
Ácidos fenólicos	Trigo, centeno, arroz y cebada	HPLC-UV 320 nm	Hichrom H5ODS 250x4,6 mm	Fase A: agua/metanol/acético (89:10:1, v/v/v). Fase B: agua/metanol/acético (90:9:1, v/v/v). Gradiente. 31 minutos.	[55]
Ácidos fenólicos	Mijo	HPLC-DAD 280 nm	Shimpak C ₁₈ 250x4,6 mm	Agua/ácido acético/acetoniitrilo (80:15:5, v/v/v). Isocrático.	[86]
Flavanonas	Zumo de naranja	HPLC-DAD 210-400 nm	Novapack RP-18 150x3,9 mm, 5 μm	Fase A: tampón fosfato en agua. Fase B: tampón fosfato en agua/acetoniitrilo. Gradiente. 58 minutos.	[87]
Flavanoles	Té verde	HPLC-DAD 280 nm 500 nm	Lichrosorb RP-18 250x10 mm, 7 μm	Agua/acetoniitrilo/metanol/ ácido acético (79,5:18:2:0,5, v/v/v/v) Isocrático.	[88]
Flavanoles	Té verde	HPLC-DAD 278 nm HPLC-FT-NIR	C ₁₈ 250x4,6 mm, 5 μm	Fase A: agua/acetoniitrilo/ácido acético (83:15:2, v/v/v). Fase B: agua/acetoniitrilo/ácido acético (18:80:2, v/v/v). Gradiente.	[89]
Flavanoles	Té verde	HPLC-UV 210 nm	Zorbax Eclipse XDB-C ₁₈	Método 1. Fase A: agua 0,05% ácido trifluoroacético. Fase B: acetoniitrilo 0,05% ácido acético. Gradiente. 35 minutos. Método 2. Fase A: agua 0,05% ácido trifluoroacético. Fase B: acetoniitrilo/metanol (40/60) 0,05% ácido acético. Gradiente. 50 minutos.	[83]
Flavonoles	Brócoli	HPLC-UV-ESI-MS/MS 240-400 nm	C ₁₈	Fase A: agua 0,1% ácido fórmico. Fase B: metanol. Gradiente. 52 minutos.	[90]

Tabla 8 (cont.). Ejemplos de análisis de compuestos fenólicos por HPLC.

Compuestos Fenólicos	Muestra	Método de análisis	Columna	Disolventes y condiciones	Ref.
Isoflavonas	Fórmulas infantiles	HPLC-DAD 200-350 nm	YMC-Pack ODS-AM-303 250x4,6 mm, 5 μ m	Fase A: agua 0,1% ácido acético. Fase B: acetonitrilo 0,1% ácido acético. Gradiente. 45 minutos.	[91]
Isoflavonas	Trébol rojo	HPLC-ESI-cuadrupolo MS	C ₁₈ 150x2 mm, 3 μ m	Fase A: agua 0,2% ácido acético. Fase B: acetonitrilo. Gradiente. 60 minutos.	[92]
Isoflavonas	Soja	HPLC-DAD 200-400 nm	Chromolith RP-18e	Fase A: agua 0,1% ácido acético. Fase B: metanol 0,1% ácido acético. Gradiente. 10 minutos.	[93]
Isoflavonas	Trébol rojo y aperitivos de soja	UPLC-DAD-ESI-MS 200-400 nm	Zorbax SB C18 1,8 μ m	Fase A: agua 0,2% ácido acético. Fase B: metanol. Gradiente. 1 minuto.	[94]
Antocianidinas /Antocianinas	Uvas rojas	HPLC-DAD 520 nm	C18 Hypersil ODS 5 μ m	Fase A: agua 0,3% ácido perclórico. Fase B: metanol. Gradiente. 26 minutos.	[95]
Antocianidinas /Antocianinas	Alubias negras	HPLC-DAD 520 nm	ODS/B 250x4,6 mm, 5 μ m, 100 Å	Fase A: agua 10% ácido fórmico. Fase B: agua/metanol/ ácido fórmico (40:50:10, v/v/v). Gradiente. 50 minutos.	[96, 97]
Antocianidinas /Antocianinas	Frambuesa negra, roja y arándano	HPLC-DAD-ESI/MS/MS 200-600 nm	Symmetry C18 75x4,6 mm, 3,5 μ m	Fase A: agua 10% ácido fórmico. Fase B: acetonitrilo. Gradiente. 25 minutos.	[98]
Procianidinas	Bebidas	HPLC-MS HPLC-UV-Fluorescencia 280 nm 276 nm (ex) 316 nm (em)	Phenomenex Luna Silica 250x4,6 mm, 5 μ m	Fase A: diclorometano. Fase B: metanol. Fase C: 50% ácido acético. Gradiente. 70 minutos.	[99]
Ácidos fenólicos, flavonas, flavononas y flavonoles	Própolis	HPLC-DAD 280 nm 310 nm	Lichrosorb RP18 200x3 mm, 7 μ m	Fase A: agua a pH 2,6 ajustado con ácido fosfórico. Fase B: acetonitrilo. Gradiente. 85 minutos.	[100]
Flavanoles y procianidinas	Té verde	HPLC-UV 280 nm	μ Bondapack C ₁₈ 300x3,9 mm	Acetonitrilo/ etilacetato/ agua 0,05% ácido fosfórico (12:2:86, v/v/v). Isocrático.	[101]
Ácidos fenólicos e isoflavonas	Soja y trébol rojo	UPLC-DAD 270 nm	Zorbax SB-CN 50x2,1 mm, 1,8 μ m	Fase A: agua 0,3% ácido acético. Fase B: metanol 0,3% ácido acético. Gradiente. 2 minutos.	[102]

En el caso de la detección por espectrofotometría UV-Visible, debido a la diferencia en la absorción de los distintos compuestos fenólicos a diferentes longitudes de onda, es posible diferenciar las distintas familias de compuestos fenólicos presentes en la muestra a analizar en base a su espectro de absorción UV-Visible. Pero para la detección inequívoca de un compuesto concreto frente a otros de su misma familia es necesario la confirmación de la identificación por diferentes medios, incluyendo el uso de patrones, la comparación del tiempo de retención del posible compuesto en la muestra con el del patrón correspondiente, la co-elución del patrón en la muestra, y la comparación de los espectros de absorción UV-Visible y de masas. Aún así, todavía puede ser necesario realizar análisis utilizando diferentes condiciones de gradiente para asegurar que no hay co-elución de compuestos. Sin embargo, la identificación a través del espectro de absorción UV-Visible es reconocida como bastante fiable y es la forma más ampliamente utilizada para la identificación de compuestos fenólicos.

En general, los ácidos fenólicos absorben entre 190 y 380 nm. Lo más habitual es que los derivados del ácido benzoico presenten una banda de absorción que tiene el máximo entre 200 y 290 nm; en cambio, los derivados del ácido cinámico, debido a la conjugación de electrones adicional que se produce entre los electrones del anillo bencénico y del doble enlace, se desplaza ese máximo a valores entre 270 y 360 nm. Estas diferencias se observan en la *figura 16*.

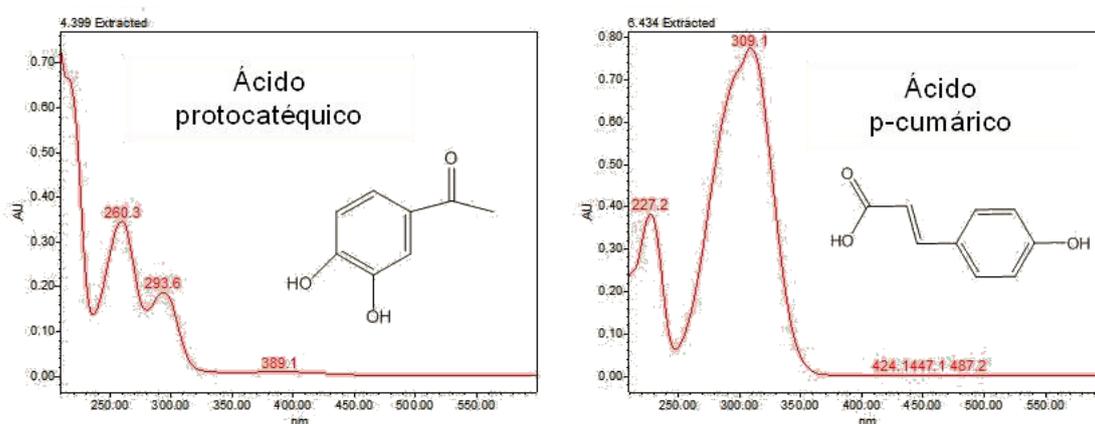


Figura 16. Espectros UV-Visible de un ácido fenólico derivado del ácido benzoico (ácido protocatéquico) y un ácido fenólico derivado del ácido cinámico (ácido p-cumárico).

En general se utiliza una longitud de onda de 254 nm ó 280 nm para la detección de ácidos fenólicos.

Los flavonoides también presentan espectros de UV-Visible característicos con dos bandas de absorción, *figura 16*:

- Banda II: con un máximo de absorbancia entre 240-285 nm debido a la resonancia en el anillo A.

- Banda I: con un máximo de absorbancia entre 300-550 nm por la resonancia en el anillo B.

Estas bandas dependen del tipo de compuesto fenólico debido a las diferencias entre sustituyentes que se dan entre ellos, los cuales proporcionan diferentes movimientos de electrones que estabilizan la molécula y absorben a diferentes longitudes de onda, como se puede observar en la *figura 17*.

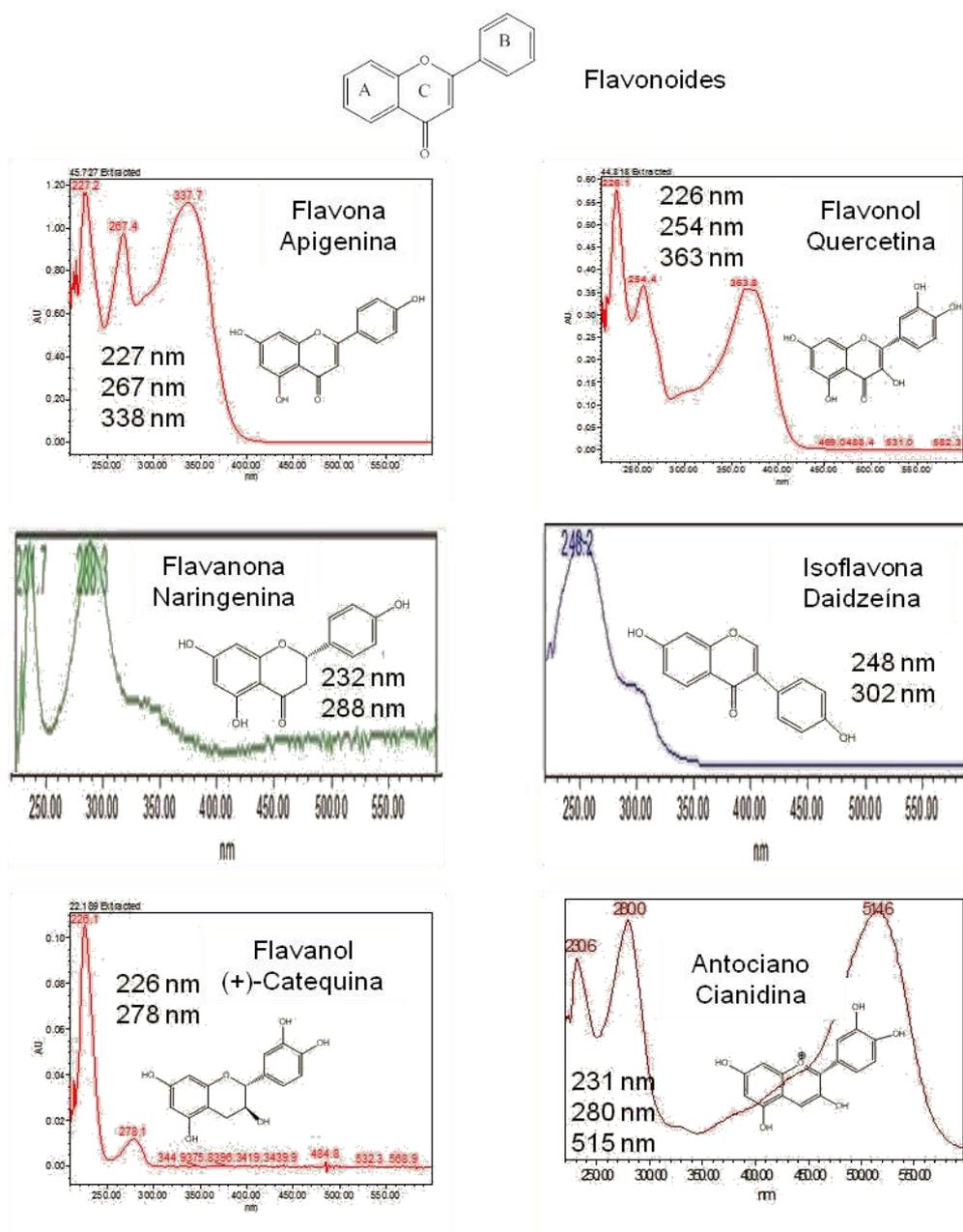


Figura 17. Ejemplos de espectros UV-Visible para ciertos flavonoides y estructura general y específica de los mismos.

En el caso de flavonas y flavonoles la banda II tiene su máximo de absorbancia entre 240 y 280 nm y la banda I entre 300 y 380 nm [52]. En cambio, flavanonas e isoflavonas debido a que la conjugación entre el anillo A y B es ligera o

inexistente hace que la banda II sea intensa pero que la banda I sea pequeña. Lo mismo ocurre para el caso de flavanoles, donde en general sólo se observa su banda II a 278 nm. En cambio los antocianos poseen una banda I, por la resonancia del anillo B, en longitudes de onda mayores, entre 465 y 560 nm.

Por lo tanto, según el compuesto fenólico a analizar se fija una longitud de onda para su detección y cuantificación por UV-Visible. Para los antocianos y sus derivados se utilizan más frecuentemente 502, 510, 520 o 525 nm; para las flavonas, flavonoles y sus derivados 270, 280, 350 y 370 nm; para las flavanonas y sus derivados 280 nm. En el caso de los flavanoles las longitudes de onda de detección y cuantificación más comunes son 210 y 280 nm; y para las isoflavonas son 236, 254, 260, 262 y 280 nm. Un tipo de detección también espectrofotométrica es la de la reacción de los flavonoles con el *p*-dimetilaminocianamaldehído siendo la detección a 640 nm [52].

El problema de la detección mediante espectrofotometría UV-Visible es que muchos derivados glucósidos y acetiles de los flavonoides son cromóforos débiles y no es posible distinguir entre sus espectros, siendo similares dentro de la misma familia sin poder distinguir el derivado concreto [63].

Otro tipo de detección más sensible a ciertos compuestos fenólicos es la fluorescencia. Este tipo de detección sólo se usa ocasionalmente ya que el número de compuestos fenólicos sensibles a la fluorescencia es limitado. Los límites de detección obtenidos con esta detección son menores que los obtenidos con la detección por UV-Visible. Entre los compuestos fenólicos que son fluorescentes se encuentran las isoflavonas, los flavanoles y las flavonas metoxiladas.

La intensidad detectada mediante fluorescencia viene dada por la naturaleza del grupo funcional y su patrón de sustitución, obteniendo distintas intensidades en la misma familia de flavonoides [63]. En el caso de los flavanoles las longitudes de onda de excitación y emisión son 280 y 310 nm, respectivamente; para las isoflavonas también se ha utilizado la fluorescencia trabajando a una longitud de onda de excitación de 365 nm y 418 nm de longitud de onda de emisión [52]. En algunos casos al utilizar la derivatización con iones metálicos como el Aluminio (III) se extiende la aplicación de la detección mediante fluorescencia a otros compuestos que no son fluorescentes de forma natural [63].

Muchos compuestos fenólicos son electroactivos debido al grupo fenol que les caracteriza, por lo que es posible la detección electroquímica coulombimétrica, aunque este tipo de detección no es tan sensible como la fluorescencia [63].

La detección por espectrometría de masas (MS) es ampliamente utilizada con HPLC y se combina con otros detectores para facilitar la identificación de los compuestos fenólicos [34, 37, 40, 49, 52, 63].

Las fuentes de ionización utilizadas tienen una doble función, eliminar el disolvente en el que se encuentra la muestra y vaporizar e ionizar los compuestos a analizar. Entre las más utilizadas en HPLC se encuentran la ionización por electro-spray (ESI) y la ionización química a presión atmosférica (APCI); ambas se usan tanto en modo negativo como positivo. El modo negativo proporciona mayor sensibilidad, aunque el modo positivo se utiliza la mayor parte de las veces de forma complementaria para el análisis estructural de los compuestos.

También se utilizan, aunque son menos frecuentes, fuentes como la ionización por termo-nebulización o termo-spray (TSP) y la ionización por bombardeo rápido de átomos (FAB) [40, 49, 52, 63].

El analizador es la parte del equipo donde se produce la separación de los fragmentos iónicos generados en función de su relación masa/carga utilizando campos magnéticos y eléctricos. Como analizadores más comunes está el de tiempo de vuelo (TOF) para alta resolución y el de cuadrupolo (Q) o trampa de iones (IT) para baja resolución [40].

Actualmente para la determinación de compuestos o derivados desconocidos se utilizan los equipos en tándem MS/MS utilizando el triple cuadrupolo (QqQ) y la disociación inducida por colisiones (CID) o la monitorización de reacciones múltiples (MRM).

Para la determinación estructural también se utilizan otros detectores como la resonancia magnética nuclear (RMN) ya sea acoplada al HPLC o combinada con el HPLC-MS [103].

3.6.2.2 Otras técnicas de análisis utilizadas

Aunque la cromatografía HPLC es la técnica más ampliamente utilizada en el análisis de compuestos fenólicos, otras técnicas se han utilizado para el mismo fin.

La cromatografía en capa fina (Thin Layer Chromatography, TLC) se ha usado desde principios de 1960 para el análisis de flavonoides [63]; debido a que permite el análisis simultáneo de varias muestras se usa como análisis rápido previo a su análisis con otra técnica, como puede ser la cromatografía líquida. En la *tabla 9* se muestran algunos ejemplos del análisis de compuestos fenólicos mediante TLC.

Como fase estacionaria se utiliza un adsorbente adherido sobre una placa. Como adsorbentes se utiliza gel de sílice, derivados de poliamida o cloruro de aluminio. Como fase móvil se utilizan los mismos solventes que en HPLC. La detección se realiza por espectroscopía UV a 350-365 nm o 250-260 nm; o por densitometría a las mismas longitudes de onda que la UV [63].

Tabla 9. Ejemplos del análisis de compuestos fenólicos por TLC.

Compuestos Fenólicos	Muestra	Método de análisis	Adsorbente	Disolventes	Ref.
Ácidos fenólicos, flavonas y flavanonas	Hojas de menta	HPTLC-UV 366 nm IR	2 métodos con adsorbentes en fase reversa: A) Aminopropil. B) Octadecil.	2 métodos con disolventes en fase reversa: A) Agua:metanol (60:40 v/v). B) Acetona:ácido acético (85:15 v/v).	[104]
Ácidos fenólicos, flavanonas, flavonoles y aminoácidos	Diversas plantas	TLC-UV 365 nm	Sílica.	Acetato de etilo:ácido fórmico:ácido acético:agua 100:11:11:26 (v/v/v/v)	[105]
Derivados glucósidos de flavonas, flavanonas y flavonoles	Patrones	TLC- densitometría 254 nm	Sílica	Acetato de etilo:ácido fórmico:agua 8:1:1 (v/v/v)	[106]

La TLC no se trata de un método cuantitativo fiable para muestras complejas, aunque por medio de la detección por densitometría es posible la cuantificación de ciertos polifenoles en vinos, por ejemplo [80]. Cuando se automatizan algunos pasos del análisis, incrementando la resolución y precisión del mismo, se obtiene la técnica denominada HPTLC (High Performance Thin Layer Chromatography).

Desde la década de los 60 se utiliza la cromatografía de gases, GC, para el análisis de flavonoides. Es una técnica que ofrece buena eficiencia en la separación, así como elevada resolución entre los compuestos y bajos límites de detección, pero se trata de un proceso laborioso porque la gran mayoría de compuestos fenólicos no son volátiles por lo que es necesario el proceso de derivatización previo a su análisis [37, 49, 63].

Las columnas generalmente utilizadas para el análisis de compuestos fenólicos suelen ser columnas empaquetadas de sílice en vez de columnas empaquetadas de vidrio [63]. Como detección se utiliza la detección por ionización en llama (FID) y por espectrometría de masas (MS); esta última permite la elucidación estructural de los compuestos fenólicos [37].

Un análisis típico de flavonoides por cromatografía de gases es la derivatización previa del extracto para la obtención de sus derivados trimeilsililados, los cuales son inyectados en una columna no polar y separados por un programa de temperatura lineal de 30 a 50 minutos a temperaturas superiores a 300°C. Como detección se utiliza la espectrometría de masas con ionización por impacto de electrones con una fuente de temperatura superior a 250°C [63]. Algunos ejemplos del análisis mediante cromatografía de gases con detección de espectrometría de masas se muestran en la *tabla 10*.

Tabla 10. Ejemplos de análisis de compuestos fenólicos mediante GC.

Compuestos Fenólicos	Muestra	Método de análisis	Derivatización	Columna y Condiciones de temperatura	Ref.
Ácidos fenólicos	Cereales	GC-FID GC-MS	Sililación con N,O-bis(trimetilsilil) trifluoroacetamida (BSTFA)	GC-FID: columna de vidrio empaquetada con 3% OV-1 sobre una malla de chromosorb W. 2 metros y 2 mm de diámetro interno. 120-300°C a 4°C/min. GC-MS: columna capilar WCOT de sílice fundida recubierta de OV-101. 24 metros y 0,2 mm de diámetro interno. 40-150°C a 40°C/min, 150-300°C a 4°C/min, mantener a 300°C durante 10 minutos.	[107, 108]
Ácidos fenólicos	Trigo	GC-MS/MS	Sililación con N-metil-N-trimetilsilil trifluoroacetamida (MSTFA)	Columna DB-5 MS. 30 metros y 0,25 mm de diámetro interno. 80°C mantenido 1 minuto, 80-160°C a 10°C/min, 160-235°C a 5°C/min, 235°C mantenido durante 5 minutos.	[109]
Flavonoles	<i>Ginkgo biloba</i>	GC-MS	Sililación con N,O-bis(trimetilsilil) trifluoroacetamida (BSTFA)	Columna de sílice fundida cubierta por metilsiloxano. 25 metros y 0,20 mm. 80°C mantenido 0,1 minutos, 80-245°C a 25°C/min, 245°C mantenido 25,5 minutos, 245-270°C a 60°C/min, 270°C mantenido durante 8 minutos.	[110]
Isoflavonas	Frutas y nueces	GC-MS	Sililación con N-(terc-butildimetilsilil)-N-metil trifluoroacetamida (TBDMS)	Columna capilar DB1 de sílice fundida. 25 metros. Isotérmico a 320°C.	[111]

Los procesos de derivatización se basan en la obtención de derivados volátiles y térmicamente estables de los compuestos objeto de análisis. Los más utilizados son la metilación, la trifluoroacetilación, la trimetilsililación o la derivatización con N-(tert-butildimetilsilil)-N-metiltrifluoroacetamida [34].

Pero todos estos procesos de derivatización tienen sus limitaciones. Se ha comprobado que al usar compuestos sililados para la derivatización y el análisis por cromatografía gaseosa con detección por espectrometría de masas aparecen en el espectro de masas compuestos sililados derivados de la eliminación de los grupos sililo, lo cual proporciona poca información estructural de los compuestos analizados.

Cuando el compuesto a analizar tiene más de un grupo hidroxilo reactivo se producen distintos derivados que dificultan la cuantificación. Además durante la reacción de derivatización se pueden producir ciertas reorganizaciones de átomos y enlaces en las moléculas a analizar y se detecten nuevos compuestos derivados de las reacciones de derivatización. Esta reorganización se produce sobre todo en las flavanonas que por reorganización de sus átomos y enlaces durante las condiciones de reacción de derivatización se transforman en chalconas [49]. En cambio, flavonoles, flavonas e isoflavonas no sufren esas reorganizaciones y el análisis por cromatografía gaseosa con detección por espectrometría de masas permite la obtención de buena información estructural de sus isómeros.

El uso de un tipo de derivado volátil o de otro puede mejorar la separación entre compuestos; la separación de derivados trisililo de isoflavonas es mejor que la de los derivados trimetilados, pero el uso de estos últimos proporcionan mayor información estructural por su análisis por cromatografía de gases con detección por espectrometría de masas (GC-MS) [49].

El análisis por cromatografía gaseosa no es un análisis que sustituya la cromatografía líquida debido a su complejidad por el proceso de derivatización, aunque éste se realice en vial, lo cual proporciona bajos límites de detección en la detección mediante espectrometría de masas en modo de monitorización selectiva de iones (GC-MS SIM) [63], pero al tener más etapas de análisis existen mayores errores inherentes al tratamiento de muestra [29, 37, 63, 79, 80].

Otro método de análisis que a diferencia de la cromatografía gaseosa no necesita reacciones de derivatización y es muy utilizado actualmente para el análisis de compuestos fenólicos es la electroforesis capilar (CE).

Esta técnica muestra altas eficacias de separación, tiempos de separación cortos, volúmenes de muestra y disolventes pequeños, ya que utilizan capilares estrechos, e incluso en algunos análisis se consigue mayor eficacia que utilizando HPLC [47, 52, 63, 80, 112].

Entre las técnicas electroforéticas más utilizadas están la electroforesis capilar de zona (CZE) y la cromatografía micelar electrocinética (MEKC). Las disoluciones tampón más utilizadas son las fosfato o borato, capilares de sílice fundida de diámetro interno entre 50 y 100 μm , voltajes entre 10 y 30 KV y como volumen de inyección de 10 a 50 nL. Las técnicas de detección utilizadas son la espectroscopía UV, la fluorescencia, la detección electroquímica y la espectrometría de masas.

Algunos ejemplos de la aplicación de esta técnica al análisis de los compuestos fenólicos se muestran en la *tabla 11*.

Tabla 11. Ejemplos de análisis de compuestos fenólicos mediante CE.

Compuestos Fenólicos	Muestra	Método de análisis	Eluyentes	Ref.
Flavanoles, flavonas y flavonoles	<i>Ginkgo biloba</i>	CE-ED	Solución tampón borato ($\text{H}_3\text{BO}_3\text{-Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$) en concentración 50 mmol/L a pH 9,0. 22 minutos.	[68]
Flavonoles	Propóleo	CE-UV 270 nm	Solución tampón borato ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7/\text{HCl}$) en concentración 30 mmol/L a pH 9,00 con 40% (v/v) metanol.	[113]
Antocianos	Vino	CZE-DAD 599 nm	Tampón a pH 8,4 de tetraborato de sodio a una concentración 50 mM y 15% (v/v) metanol.	[114]
Flavanoles y procianidinas	Té y uva	MEKC-UV 200 nm	Tampón fosfato a pH 2,0 a una concentración 5 mM, 2% (v/v) metanol y 2,89% SDS.	[115]
Flavonoles e isoflavonas	Alubias y soja	CZE-DAD 214 nm	Tampón de acetato de amonio a una concentración 50mM a pH 10,5 y 20% (v/v) metanol.	[116]
Isoflavonas	Trébol rojo	MEKC-UV 254 nm	Tampón borato a una concentración 30mM a pH 10,1, 5% (v/v) etanol y 20 mM SDS.	[117]

La mayor ventaja de esta técnica es el uso de pequeños volúmenes de muestras y eluyentes. Además permite distinguir entre moléculas neutras y cargadas. En el caso de las moléculas neutras la separación se basa en la hidrofobicidad de los compuestos. Mientras que las moléculas cargadas se separan en base al grado de ionización e hidrofobicidad de la misma. En los compuestos fenólicos la magnitud de la carga negativa se determina por la posición y el número de grupos hidroxilo e ionizables que poseen y del pH del tampón utilizado [63].

No se reflejan grandes diferencias en su uso comparado con la cromatografía líquida, pero en ciertos casos puede proporcionar mejores resultados de repetibilidad en el tiempo de retención y migración, aportando mayor resolución, eficacia y rapidez, además de un mínimo gasto de reactivo y muestra [47, 63, 112].

Una técnica relativamente reciente que se ha comenzado a utilizar para la separación y el análisis de compuestos fenólicos, es la cromatografía de fluidos supercríticos (SFC).

Lo que diferencia esta técnica de todas las anteriormente revisadas es el uso de un fluido supercrítico como fase móvil. Se trata de una cromatografía más versátil, más rentable, fácil de usar, con mayor rendimiento, mejor resolución y tiempos de análisis más rápidos que la cromatografía HPLC. Su instrumentación permite el uso de

varios detectores. Además debido a la naturaleza de su fase móvil es posible la obtención de compuestos puros al finalizar el análisis.

Como fase móvil se utiliza dióxido de carbono supercrítico, pero debido a su carácter apolar es necesario el uso de modificadores orgánicos para poder realizar el análisis de compuestos polares como los compuestos fenólicos.

Un ejemplo de la utilización de esta cromatografía para ciertos compuestos fenólicos en extractos de semilla de uva se muestra en el trabajo de Kamngerpour y col. 2002 [118] donde se utiliza como fase móvil dióxido de carbono modificado con metanol, que contiene menos de un 1% (p/p) de ácido cítrico como aditivo secundario; en este caso la identificación se realiza por comparación del tiempo de retención y los espectros ultravioletas de los analitos, con los obtenidos al analizar una mezcla de patrones.

4 BIBLIOGRAFÍA

1. Europeas, D.O.d.I.C., *Reglamento (CE) Nº 178/2002, del Parlamento Europeo y del Consejo de 28 de enero de 2002, por el que se establecen los principios y los requisitos generales de la legislación alimentaria, se crea la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria y se fijan procedimientos relativos a la seguridad alimentaria.*, P.E.y.d.C.d.I.U. Europea, Editor. 2002. p. L31/1-L31/24.
2. Anchía, I.A. *Alimentos funcionales y legislación*. 4as Jornadas de Actualización en Nutrición Alimentos Funcionales y Actividad Física en la Promoción de la Salud 2010 01 de junio de 2010 [cited 2013 17 de abril de 2013]; Available from: <http://www.institutotomasaspascal.es/reportajes/muestra.asp?id=3012>.
3. (EUFIC), E.F.I.C. *Alimentos funcionales*. 2006 Junio de 2006 [cited 17 de abril de 2013]; Available from: <http://www.eufic.org/article/es/nutricion/alimentos-funcionales/expid/basics-alimentos-funcionales/>.
4. Franch, M.A., P.R.d. Río, and C.C. Romero, *Los alimentos funcionales a la luz de la normativa europea*. Boletín de Pediatría, 2009. **49**(210): p. 348 - 354.
5. Diplock, A., et al., *Scientific concepts of functional foods in Europe. Consensus document*. Br J Nutr, 1999. **81 Suppl 1**: p. S1-27.
6. Aranceta, J. and L. Serra. *Guía de Alimentos Funcionales*. 2003 [cited 18 de abril de 2003]; Available from: http://www.pulevasalud.com/ps/subcategoria.jsp?ID_CATEGORIA=102295&RUTA=1-2-2253-2923-100529-102295.
7. Aggett, P., et al., *Passclaim**. European Journal of Nutrition, 2005. **44**(1): p. i5-i30.
8. Europeas, D.O.d.I.C., *Reglamento (CE) No 1924/2006 del parlamento europeo y del consejo de 20 de diciembre de 2006 relativo a las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables en los alimentos*, P.E.y.d.C.d.I.U. Europea, Editor. 2006. p. L404/9-L404/25.
9. Díaz, S., I. Baiges, and L. Arola, *Nutrigenómica y alimentos*, in *Genética, nutrición y enfermedad*, S.A. EDIMSA Editores Médicos, Editor. 2008: Madrid. p. 235-246.
10. *Wikipedia: Phytochemical*. 2013 20 de marzo de 2013 [cited 18 de abril de 2013; Available from: <http://en.wikipedia.org/wiki/Phytochemical>.
11. Kushi, L.H., et al., *American Cancer Society guidelines on nutrition and physical activity for cancer prevention*. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2012. **62**(1): p. 30-67.
12. Baker, R. and C. Günther, *The role of carotenoids in consumer choice and the likely benefits from their inclusion into products for human consumption*. Trends in Food Science & Technology, 2004. **15**(10): p. 484-488.
13. Fernández-García, E., et al., *Carotenoids bioavailability from foods: From plant pigments to efficient biological activities*. Food Research International, 2012. **46**(2): p. 438-450.
14. Rodríguez-Amaya, D.B., *Status of carotenoid analytical methods and in vitro assays for the assessment of food quality and health effects*. Current Opinion in Food Science, 2015. **1**: p. 56-63.
15. Rodríguez-Amaya, D.B., *Quantitative analysis, in vitro assessment of bioavailability and antioxidant activity of food carotenoids—A review*. Journal of Food Composition and Analysis, 2010. **23**(7): p. 726-740.

16. Saini, R.K., S.H. Nile, and S.W. Park, *Carotenoids from Fruits and Vegetables: Chemistry, Analysis, Occurrence, Bioavailability and Biological Activities*. Food Research International, 2015. **In Press**.
17. Gee, J.M., et al., *Effect of saponin on the transmucosal passage of β -lactoglobulin across the proximal small intestine of normal and β -lactoglobulin-sensitized rats*. Toxicology, 1997. **117**(2-3): p. 219-228.
18. Gee, J.M., et al., *Effects of saponins and glycoalkaloids on the permeability and viability of mammalian intestinal cells and on the integrity of tissue preparations in vitro*. Toxicology in Vitro, 1996. **10**(2): p. 117-128.
19. Oakenfull, D., *Saponins in food: A review*. Food Chemistry, 1981. **7**(1): p. 19-40.
20. Chen, D.-L., et al., *Phytosterols increase circulating endothelial progenitor cells and insulin-like growth factor-1 levels in patients with nonalcoholic fatty liver disease: A randomized crossover study*. Journal of Functional Foods, 2015. **13**: p. 148-157.
21. Shortt, C. and M.J. Sadler, *2 - Authorised EU health claims for phytosterols, in Foods, Nutrients and Food Ingredients with Authorised EU Health Claims: Volume 2*. 2015, Woodhead Publishing: Oxford. p. 31-47.
22. Wong, A., *Chemical and microbiological considerations of phytosterols and their relative efficacies in functional foods for the lowering of serum cholesterol levels in humans: A review*. Journal of Functional Foods, 2014. **6**: p. 60-72.
23. Pivato, M., M. Fabrega-Prats, and A. Masi, *Low-molecular-weight thiols in plants: Functional and analytical implications*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2014. **560**: p. 83-99.
24. Poole, L.B., *The basics of thiols and cysteines in redox biology and chemistry*. Free Radical Biology and Medicine, 2015. **80**: p. 148-157.
25. Kausar, H., et al., *Cucurbitacin B potently suppresses non-small-cell lung cancer growth: Identification of intracellular thiols as critical targets*. Cancer Letters, 2013. **332**(1): p. 35-45.
26. Manda, K.R., C. Adams, and N. Ercal, *Biologically important thiols in aqueous extracts of spices and evaluation of their in vitro antioxidant properties*. Food Chemistry, 2010. **118**(3): p. 589-593.
27. Cheynier, V., *Polyphenols in foods are more complex than often thought*. The American Journal of Clinical Nutrition, 2005. **81**(Suppl): p. 223S-229S.
28. Huang, M.-T., C.-T. Ho, and C.Y. Lee, *Phenolic compounds in food and their effects on health II. Antioxidants & cancer prevention*. ACS Symposium Series 507. 1992, Washington D.C., EEUU: American Chemical Society.
29. Naczki, M. and F. Shahidi, *Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 2006. **41**: p. 1523-1542.
30. Saikat, S. and C. Raja, *The Role of Antioxidants in Human Health*, in *Oxidative Stress: Diagnostics, Prevention, and Therapy*, S. Andreescu and M. Hepel, Editors. 2011, American Chemical Society. p. 1-37.
31. Santangelo, C., et al., *Polyphenols, intracellular signalling and inflammation*. Ann Ist Super Sanita, 2007. **43**(4): p. 394-405.
32. Sies, H., *Polyphenols and health: Update and perspectives*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2010. **501**(1): p. 2-5.

33. Vermerris, W. and R. Nicholson, *Phenolic Compound Biochemistry*. 2006, The Netherlands: Springer.
34. Naczki, M. and F. Shahidi, *Extraction and analysis of phenolics in food*. Journal of Chromatography A, 2004. **1054**(1-2): p. 95-111.
35. Harborne, J.B. and N.W. Simmonds, *Biochemistry of phenolic compounds*. , ed. A. Press. 1964, New York.
36. Coll, J.B., et al., *Fisiología vegetal*. 1992: Ediciones Pirámide, S.A.
37. Robbins, R.J., *Phenolic Acids in Foods: An Overview of Analytical Methodology*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003. **51**(10): p. 2866-2887.
38. Scalbert, A. and G. Williamson, *Dietary intake and bioavailability of polyphenols*. Journal of Nutrition, 2000. **130**: p. 2073S-2085S.
39. Aherne, S.A. and N.M. O'Brien, *Dietary flavonoids: chemistry, food content, and metabolism*. Nutrition, 2002. **18**: p. 75-81.
40. Grotewold, E., *The Science of Flavonoids*, ed. I. Springer Science + Business Media. 2006, NY, USA.
41. Kivilompolo, M., *Development of Sample Pretreatment and Liquid Chromatographic Techniques for Antioxidative Compounds*, in *Faculty of Science, Department of Chemistry, Laboratory of Analytical Chemistry*. 2009, University of Helsinki: Helsinki, Finlandia.
42. Michels, K.B., et al., *Diet and breast cancer: a review of the prospective observational studies*. Cancer, 2007. **109**(12 Suppl): p. 2712-49.
43. Rochfort, S. and J. Panozzo, *Phytochemicals for health, the role of pulses*. J Agric Food Chem, 2007. **55**(20): p. 7981-94.
44. Moriguchi, E.H., Y. Moriguchi, and Y. Yamori, *Impact of diet on the cardiovascular risk profile of Japanese immigrants living in Brazil: contributions of World Health Organization CARDIAC and MONALISA studies*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2004. **31 Suppl 2**: p. S5-7.
45. Loke, W.M., et al., *Pure dietary flavonoids quercetin and (-)-epicatechin augment nitric oxide products and reduce endothelin-1 acutely in healthy men*. Am J Clin Nutr, 2008. **88**(4): p. 1018-25.
46. Hughes, L.A., et al., *Higher dietary flavone, flavonol, and catechin intakes are associated with less of an increase in BMI over time in women: a longitudinal analysis from the Netherlands Cohort Study*. Am J Clin Nutr, 2008. **88**(5): p. 1341-52.
47. Rostagno, M.A., et al., *Sample preparation for the analysis of isoflavones from soybeans and soy foods*. Journal of Chromatography A, 2009. **1216**(1): p. 2-29.
48. Marston, A. and K. Hostettmann, *Chapter 1: Separation and quantification of flavonoids*, in *Flavonoids. Chemistry, Biochemistry and Applications*. Edited by Ø.M. Andersen and K.R. Markham, Editors. 2006, CRC Press Taylor and Francis Group: Boca Raton, FL, USA. p. 1-36.
49. Grotewold, E., M. Stobiecki, and P. Kachlicki, *Isolation and Identification of Flavonoids*, in *The Science of Flavonoids*. 2006, Springer New York. p. 47-69.
50. Tura, D. and K. Robards, *Sample handling strategies for the determination of biophenols in food and plants*. Journal of Chromatography A, 2002. **975**(1): p. 71-93.

51. Castañeda-Ovando, A., et al., *Chemical studies of anthocyanins: A review*. Food Chemistry, 2009. **113**: p. 859-871.
52. Merken, H.M. and G.R. Beecher, *Measurement of Food Flavonoids by High-Performance Liquid Chromatography: A Review*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2000. **48**(3): p. 577-599.
53. Hinneburg, I. and R.H.H. Neubert, *Influence of Extraction Parameters on the Phytochemical Characteristics of Extracts from Buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) Herb*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004. **53**(1): p. 3-7.
54. Dueñas, M., et al., *Phenolic composition and antioxidant activity of mocan seeds (*Visnea mocanera* L.f.)*. Food Chemistry, 2003. **82** p. 373-379.
55. Sun, R.-C., X.-F. Sun, and S.-H. Zhang, *Quantitative Determination of Hydroxycinnamic Acids in Wheat, Rice, Rye, and Barley Straws, Maize Stems, Oil Palm Frond Fiber, and Fast-Growing Poplar Wood*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2001. **49**(11): p. 5122-5129.
56. Fiamegos, Y.C., et al., *Analytical procedure for the in-vial derivatization-extraction of phenolic acids and flavonoids in methanolic and aqueous plant extracts followed by gas chromatography with mass-selective detection*. Journal of Chromatography A, 2004. **1041**(1-2): p. 11-18.
57. Klejdus, B.i., et al., *Determination of isoflavones in soybean food and human urine using liquid chromatography with electrochemical detection*. Journal of Chromatography B, 2004. **806**(2): p. 101-111.
58. Ortuno, A., et al., *Flavanone and Nootkatone Levels in Different Varieties of Grapefruit and Pummelo*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1995. **43**(1): p. 1-5.
59. Griffith, A.P. and M.W. Collison, *Improved methods for the extraction and analysis of isoflavones from soy-containing foods and nutritional supplements by reversed-phase high-performance liquid chromatography and liquid chromatography-mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 2001. **913**(1-2): p. 397-413.
60. Rijke, E., et al., *Flavonoids in Leguminosae: Analysis of extracts of *T. pratense* L., *T. dubium* L., *T. repens* L., and *L. corniculatus* L. leaves using liquid chromatography with UV, mass spectrometric and fluorescence detection*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2004. **378**(4): p. 995-1006.
61. Kalt, W., et al., *Antioxidant Capacity, Vitamin C, Phenolics, and Anthocyanins after Fresh Storage of Small Fruits*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1999. **47**(11): p. 4638-4644.
62. Montedoro, G., et al., *Simple and hydrolyzable phenolic compounds in virgin olive oil. 1. Their extraction, separation, and quantitative and semiquantitative evaluation by HPLC*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1992. **40**(9): p. 1571-1576.
63. Rijke, E.d., et al., *Analytical separation and detection methods for flavonoids*. Journal of Chromatography A, 2006. **1112**: p. 31-63.
64. Antolovich, M., et al., *Sample preparation in the determination of phenolic compounds in fruits*. Analyst, 2000. **125**(5): p. 989-1009.
65. Rostagno, M.A., M. Palma, and C.G. Barroso, *Solid-phase extraction of soy isoflavones*. Journal of Chromatography A, 2005. **1076**(1-2): p. 110-117.

66. Escarpa, A. and M.C. González, *Approach to the content of total extractable phenolic compounds from different food samples by comparison of chromatographic and spectrophotometric methods*. *Analytica Chimica Acta*, 2001. **427**(1): p. 119-127.
67. Pomponio, R., et al., *Analysis of phenolic acids by micellar electrokinetic chromatography: application to Echinacea purpurea plant extracts*. *Journal of Chromatography A*, 2002. **945**(1): p. 239-247.
68. Cao, Y., et al., *Analysis of flavonoids in Ginkgo biloba L. and its phytopharmaceuticals by capillary electrophoresis with electrochemical detection*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2002. **374**(2): p. 294-299.
69. Rostagno, M.A., M. Palma, and C.G. Barroso, *Ultrasound-assisted extraction of soy isoflavones*. *Journal of Chromatography A*, 2003. **1012**(2): p. 119-128.
70. Rostagno, M.A., M. Palma, and C.G. Barroso, *Microwave assisted extraction of soy isoflavones*. *Analytica Chimica Acta*, 2007. **588**(2): p. 274-282.
71. Rostagno, M.A., M. Palma, and C.G. Barroso, *Pressurized liquid extraction of isoflavones from soybeans*. *Analytica Chimica Acta*, 2004. **522**(2): p. 169-177.
72. Piñeiro, Z., M. Palma, and C.G. Barroso, *Determination of catechins by means of extraction with pressurized liquids*. *Journal of Chromatography A*, 2004. **1026**(1): p. 19-23.
73. López, A., et al., *Effect of cooking and germination on phenolic composition and biological properties of dark beans (Phaseolus vulgaris L.)*. *Food Chemistry*, 2013. **138**(1): p. 547-555.
74. Ibañez, E., et al., *Subcritical Water Extraction of Antioxidant Compounds from Rosemary Plants*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002. **51**(2): p. 375-382.
75. Rostagno, M.Ì.c.A., J.I.M.A. Araújo, and D. Sandi, *Supercritical fluid extraction of isoflavones from soybean flour*. *Food Chemistry*, 2002. **78**(1): p. 111-117.
76. Farías-Campomanes, A.M., M.A. Rostagno, and M.A.A. Meireles, *Production of polyphenol extracts from grape bagasse using supercritical fluids: Yield, extract composition and economic evaluation*. *The Journal of Supercritical Fluids*, 2013. **77**(0): p. 70-78.
77. Huang, L., Y. Cao, and G. Chen, *Purification of quercetin in Anoectochilus roxburghii (wall) Lindl using UMAE by high-speed counter-current chromatography and subsequent structure identification*. *Separation and Purification Technology*, 2008. **64**(1): p. 101-107.
78. Klejdus, B., et al., *Solid-phase/supercritical-fluid extraction for liquid chromatography of phenolic compounds in freshwater microalgae and selected cyanobacterial species*. *Journal of Chromatography A*, 2009. **1216**(5): p. 763-771.
79. Bernal, J., et al., *Advanced analysis of nutraceuticals*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2011. **55**(4): p. 758-774.
80. Ignat, I., I. Volf, and V.I. Popa, *A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables*. *Food Chemistry*, 2011. **126**: p. 1821-1835.
81. Goldstein, J.L. and T. Swain, *Changes in tannins in ripening fruits*. *Phytochemistry*, 1963. **2**(4): p. 371-383.

82. Zhishen, J., T. Mengcheng, and W. Jianming, *The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals*. Food Chemistry, 1999. **64**(4): p. 555-559.
83. Dalluge, J.J., et al., *Selection of column and gradient elution system for the separation of catechins in green tea using high-performance liquid chromatography*. Journal of Chromatography A, 1998. **793**(2): p. 265-274.
84. Gerothanassis, I.P., et al., *Methodology for Identification of Phenolic Acids in Complex Phenolic Mixtures by High-Resolution Two-Dimensional Nuclear Magnetic Resonance. Application to Methanolic Extracts of Two Oregano Species*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1998. **46**(10): p. 4185-4192.
85. Bianco, A., et al., *Analysis by HPLC-MS/MS of biophenolic components in olives and oils*. Analytical Letters, 2001. **34**(6): p. 1033-1051.
86. Subba Rao, M.V.S.S.T. and G. Muralikrishna, *Evaluation of the Antioxidant Properties of Free and Bound Phenolic Acids from Native and Malted Finger Millet (Ragi, Eleusine coracana Indaf-15)*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002. **50**(4): p. 889-892.
87. Ooghe, W.C., et al., *Characterization of Orange Juice (Citrus sinensis) by Flavanone Glycosides*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1994. **42**(10): p. 2183-2190.
88. Amarowicz, R. and F. Shahidi, *A rapid chromatographic method for separation of individual catechins from green tea*. Food Research International, 1996. **29**(1): p. 71-76.
89. Chen, Q., et al., *Simultaneous analysis of main catechins contents in green tea (Camellia sinensis (L.)) by Fourier transform near infrared reflectance (FT-NIR) spectroscopy*. Food Chemistry, 2009. **113**(4): p. 1272-1277.
90. Vallejo, F., F.A. Tomás-Barberán, and F. Ferreres, *Characterisation of flavonols in broccoli (Brassica oleracea L. var. italica) by liquid chromatography UV diode-array detection electrospray ionisation mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 2004. **1054**(1-2): p. 181-193.
91. Murphy, P.A., et al., *Isoflavones in Soy-Based Infant Formulas*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1997. **45**(12): p. 4635-4638.
92. Klejdus, B., D. Vitamvásová-Štěřbová, and V. Kubáň, *Identification of isoflavone conjugates in red clover (Trifolium pratense) by liquid chromatography-mass spectrometry after two-dimensional solid-phase extraction*. Analytica Chimica Acta, 2001. **450**(1-2): p. 81-97.
93. Rostagno, M.A., M. Palma, and C.G. Barroso, *Fast analysis of soy isoflavones by high-performance liquid chromatography with monolithic columns*. Analytica Chimica Acta, 2007. **582**(2): p. 243-249.
94. Klejdus, B., et al., *Rapid-resolution HPLC with spectrometric detection for the determination and identification of isoflavones in soy preparations and plant extracts*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2007. **389**(7-8): p. 2277-85.
95. Castia, T., et al., *Characterization of grapes cultivated in Sardinia: Chemometric methods applied to the anthocyanic fraction*. Sciences des aliments, 1992. **12**: p. 239-255.
96. Dao, L.T., et al., *Improved Method for the Stabilization of Anthocyanidins*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1998. **46**(9): p. 3564-3569.

97. Takeoka, G.R., et al., *Characterization of Black Bean (Phaseolus vulgaris L.) Anthocyanins*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1997. **45**(9): p. 3395-3400.
98. Tian, Q., et al., *Screening for anthocyanins using high-performance liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry with precursor-ion analysis, product-ion analysis, common-neutral-loss analysis, and selected reaction monitoring*. Journal of Chromatography A, 2005. **1091**(1-2): p. 72-82.
99. Lazarus, S.A., et al., *High-Performance Liquid Chromatography/Mass Spectrometry Analysis of Proanthocyanidins in Foods and Beverages*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1999. **47**(9): p. 3693-3701.
100. Siess, M.-H.I.n., et al., *Flavonoids of Honey and Propolis: Characterization and Effects on Hepatic Drug-Metabolizing Enzymes and Benzo[a]pyrene DNA Binding in Rats*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1996. **44**(8): p. 2297-2301.
101. Wang, L.-F., D.-M. Kim, and C.Y. Lee, *Effects of Heat Processing and Storage on Flavanols and Sensory Qualities of Green Tea Beverage*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2000. **48**(9): p. 4227-4232.
102. Klejdus, B., et al., *Ultrahigh-pressure liquid chromatography of isoflavones and phenolic acids on different stationary phases*. Journal of Chromatography A, 2008. **1195**(1-2): p. 52-59.
103. Sumner, L.W., P. Mendes, and R.A. Dixon, *Plant metabolomics: large-scale phytochemistry in the functional genomics era*. Phytochemistry, 2003. **62**(6): p. 817-36.
104. Fecka, I., A. Kowalczyk, and W. Cisowski, *Optimization of the separation of flavonoid glycosides and rosmarinic acid from Mentha piperita on HPTLC plates*. JPC - Journal of Planar Chromatography - Modern TLC, 2004. **17**(1): p. 22-25.
105. Maleš, Ž., et al., *Thin-layer chromatographic analysis of flavonoids, phenolic acids, and amino acids in some Croatian Hypericum*. JPC - Journal of Planar Chromatography - Modern TLC, 2004. **17**(4): p. 280-285.
106. Wójciak-Kosior, M., G. Matysik, and A. Skalska, *Densitometric determination of kinetics of hydrolysis of flavonoid glycosides*. JPC - Journal of Planar Chromatography - Modern TLC, 2004. **17**(4): p. 286-289.
107. Krygier, K., F. Sosulski, and L. Hogge, *Free, esterified, and insoluble-bound phenolic acids. 1. Extraction and purification procedure*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1982. **30**(2): p. 330-334.
108. Sosulski, F., K. Krygier, and L. Hogge, *Free, esterified, and insoluble-bound phenolic acids. 3. Composition of phenolic acids in cereal and potato flours*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1982. **30**(2): p. 337-340.
109. Wu, H., et al., *Allelochemicals in Wheat (Triticum Aestivum L.): Variation of Phenolic Acids in Root Tissues*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2000. **48**(11): p. 5321-5325.
110. Deng, F. and S.W. Zito, *Development and validation of a gas chromatographic-mass spectrometric method for simultaneous identification and quantification of marker compounds including bilobalide, ginkgolides and flavonoids in Ginkgo biloba L. extract and pharmaceutical preparations*. Journal of Chromatography A, 2003. **986**(1): p. 121-127.

111. Liggins, J., et al., *Daidzein and genistein content of fruits and nuts*. The Journal of Nutritional Biochemistry, 2000. **11**(6): p. 326-331.
112. Valls, J., et al., *Advanced separation methods of food anthocyanins, isoflavones and flavanols*. Journal of Chromatography A, 2009. **1216**(43): p. 7143-7172.
113. Jiang, T.F., Y. Li, and Y.P. Shi, *Determination of six major flavonoid glycosides in Saussurea mongolica by capillary electrophoresis*. Planta Med, 2004. **70**(3): p. 284-7.
114. Calvo, D., et al., *Migration order of wine anthocyanins in capillary zone electrophoresis*. Analytica Chimica Acta, 2004. **524**(1&2): p. 207-213.
115. Huang, H.-Y., W.-C. Lien, and C.-W. Chiu, *Comparison of microemulsion electrokinetic chromatography and micellar electrokinetic chromatography methods for the analysis of phenolic compounds*. Journal of Separation Science, 2005. **28**(9-10): p. 973-981.
116. Dinelli, G., et al., *Compositional changes induced by UV-B radiation treatment of common bean and soybean seedlings monitored by capillary electrophoresis with diode array detection*. Journal of Separation Science, 2007. **30**(4): p. 604-611.
117. Zhang, Y., et al., *Separation and determination of isoflavones in red clover by micellar electrokinetic capillary chromatography*. Biomed Chromatogr, 2007. **21**(9): p. 987-92.
118. Kamangerpour, A., et al., *Supercritical Fluid Chromatography of polyphenolic compounds in grape seed extract*. Chromatographia, 2002. **55**(7-8): p. 417-421.

Capítulo 1: Estabilidad de extractos de isoflavonas de soja

1 INTRODUCCIÓN

1.1 LA SOJA

La soja (*Glycine max*) es una planta de la familia de las leguminosas (fabaceae). (Figura 18)



Figura 18. Semillas y vaina de soja.

El grano de soja y sus subproductos, como aceite y harina de soja, se utilizan tanto en la alimentación humana como en la animal [1] debido a su contenido nutricional, rico en proteínas y grasa (tabla 12), superior a los del resto de las legumbres y cereales.

Los adultos necesitan ingerir con la dieta 8 aminoácidos (los niños 9) de los 20 necesarios para sintetizar proteínas. Las proteínas “más completas”, es decir, las que poseen la mayoría de los aminoácidos necesarios, suelen encontrarse en los alimentos de origen animal. Sin embargo, la soja aporta 8 aminoácidos esenciales en la edad adulta, aunque el aporte de metionina sea algo escaso; pero esto puede compensarse fácilmente incluyendo cereales, huevos o lácteos en la alimentación diaria [1]. Por ello los derivados de la soja se consumen en sustitución de los productos cárnicos.

Tabla 12. Contenido nutricional de la semilla de soja.

VALOR NUTRICIONAL (por cada 100 g)		AMINOÁCIDOS presentes en la semilla de soja	
Energía	370 Kcal	Arginina	7,50 %
Proteínas	38,0 g	Cistina	1,10 %
Grasas	18,6 g	Fenilalanina*	5,00 %
Carbohidratos	15,8 g	Histidina	2,20 %
Fibra total	15,2 g	Isoleucina*	4,80 %
Fibra soluble	6,58 g	Leucina*	7,60 %
Fibra insoluble	8,60 g	Lisina*	6,50 %
		Metionina*	1,40 %
Vitamina B1	0,61 mg	Tirosina	3,50 %
Vitamina B2	0,27 mg	Treonina*	3,80 %
Vitamina A	2,00 µg	Triptófano*	1,30 %
Vitamina E	2,90 mg	Valina*	5,00 %
Calcio	240 mg		
Hierro	9,70 mg		
Magnesio	250 mg		
Zinc	4,30 mg		
Sodio	5,00 mg		
Potasio	1730 mg		
Fósforo	660 mg		

*aminoácidos esenciales

La soja, como alimento funcional, ha suscitado diversos estudios donde se relaciona su consumo con los posibles efectos beneficiosos para la salud humana, entre los que se encuentran la prevención de los cánceres de mama y próstata [2], la prevención de enfermedades cardiovasculares [3], la prevención de la osteoporosis [4] y la mitigación de los síntomas de la menopausia [5]. Todos estos beneficios potenciales para la salud, que aporta el consumo de soja, están relacionados con su composición química; entre los compuestos responsables de estos beneficios se encuentran los inhibidores de proteasas, las saponinas, los ácidos fenólicos, el ácido fítico y las isoflavonas [6].

1.2 SOJA Y SALUD

El consumo regular de proteína de soja reduce significativamente la concentración de lípidos en la sangre como se ha demostrado en ciertos estudios [7]. Se ha comprobado que los aminoácidos de la proteína de soja son capaces de actuar como antioxidantes frente al colesterol de baja densidad [8]. Además, mujeres tratadas con soja después de la menopausia presentan menor riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares, lo que podría ser debido a los diversos fitoestrógenos presentes en la soja, tales como las isoflavonas [9, 10].

El consumo de soja se ha relacionado también con la prevención de la osteoporosis. Se conoce la relación entre el consumo de proteína de origen animal,

rica en aminoácidos azufrados, y la pérdida del calcio en la orina, este efecto se puede mitigar mediante el consumo de soja, en lugar de productos cárnicos, ya que aporta proteína con pocos aminoácidos azufrados. Pero además, la soja contiene isoflavonas que actúan como hormonas vegetales con efecto estrogénico en la menopausia y ayudan a retener el calcio [11-13].

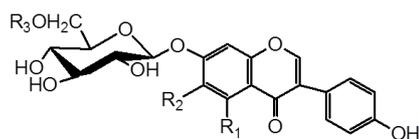
Otro efecto que se asocia al consumo de soja es el papel protector frente al cáncer de mama y próstata. Dietas ricas en soja se han asociado con países y grupos étnicos que presentan bajo riesgo de padecer cáncer de mama [14, 15]. Sin embargo, también existen diversos estudios epidemiológicos, *in vitro* e *in vivo*, que relacionan el consumo de soja con el riesgo de padecer cáncer; los cuales fueron revisados en varias publicaciones [15-17], llegando a la conclusión de que no hay suficientes datos para concluir que ambos aspectos estén relacionados, por lo que son necesarios más estudios, ya que los efectos observados no son sólo atribuibles a la ingesta de soja sino que parecen estar condicionados por otros factores como son los genéticos y el sexo masculino o femenino. Pero por otro lado en junio de 1990, el Instituto Nacional del Cáncer, en Washington D.C., convocó a expertos en investigación para estudiar los efectos anticancerígenos de la soja, y coincidieron en afirmar que había grandes posibilidades de que la soja tenga una función importante en la prevención del cáncer, e identificaron 5 sustancias anticancerígenas diferentes: fitoesteroles, fitatos, saponinas, inhibidores de proteasas y ácidos fenólicos [8]. También ha sido descrito que aunque el potencial efecto de la soja contra el cáncer de mama y próstata puede ser debido a todos estos compuestos, la mayoría de los resultados apuntan a que las isoflavonas son grandes responsables de ello [18-29].

1.3 LAS ISOFLAVONAS

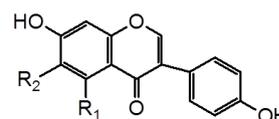
Entre todos los compuestos beneficiosos para la salud de la soja nos vamos a centrar en uno de sus fitoquímicos más importantes, las isoflavonas.

Las isoflavonas pertenecen al grupo de compuestos fenólicos clasificados como flavonoides. Son metabolitos secundarios de las plantas, que se conocen como fitoestrógenos por su actividad estrogénica [30]. Estos compuestos se encuentran en cantidades importantes en plantas leguminosas como la soja.

La estructura básica característica de las isoflavonas es un núcleo de flavona, compuesto por dos anillos de benceno unidos ambos a un anillo heterocíclico (*Figura 19*).



Glucósidos



Agluconas

Isoflavona	Abrev.	R1	R2	R3
Malonil Daidzina	MDi	H	H	COCH ₂ COOH
Malonil Glicitina	MGly	H	OCH ₃	COCH ₂ COOH
Malonil Genistina	MGi	OH	H	COCH ₂ COOH
Acetil Daidzina	ADi	H	H	COCH ₃
Acetil Glicitina	AGly	H	OCH ₃	COCH ₃
Acetil Genistina	AGe	OH	H	COCH ₃
Daidzina	Di	H	H	H
Glicitina	Gly	H	OCH ₃	H
Genistina	Gi	OH	H	H

Isoflavona	Abrev.	R1	R2
Daidzeína	De	H	H
Gliciteína	Gle	H	OCH ₃
Genisteína	Ge	OH	H

Figura 19. Estructura química, nombres y abreviatura de las isoflavonas.

Las principales isoflavonas que se encuentran en la soja son la genisteína (4',5,7-trihidroxiisoflavona) (Ge), daidzeína (4',7-dihidroxiisoflavona) (De), gliciteína (4',7-dihidroxi-6-metoxi-isoflavona) (Gle) y sus respectivos derivados glucósidos, acetil y malonil.

Su distribución no es homogénea en la semilla, estudios como el de Kudou y col. [31], entre otros [32, 33], determinaron la concentración de isoflavonas en cada parte de la legumbre madura encontrando que en el hipocótilo el total de isoflavonas es entre 5,5 y 6,0 veces mayor que el encontrado en el cotiledón. Gliciteína y sus derivados se encuentran sólo en el hipocótilo de la misma, mientras que en la cascarilla de la soja no se hay isoflavonas. La aparición de las isoflavonas depende del desarrollo de la legumbre, encontrando que glucósidos y maloniles aumentan su concentración entre los 35 y 60 días después de la floración de la planta, mientras que los maloniles representan el 66% del total de las isoflavonas en semillas maduras. Además se ha encontrado distinto periodo de formación para cada isoflavona: genistina y malonil genistina aumentan su concentración durante el último estadio de desarrollo de la legumbre, mientras que daidzina y malonil daidzina se producen durante todo el desarrollo de la planta.

El interés en las isoflavonas radica en que han mostrado efectos beneficiosos para la salud, tanto *in vitro* como *in vivo* relacionados con el consumo de productos de soja [28, 29, 34], siendo estos efectos relativos bien al tratamiento o bien a la prevención de enfermedades.

Existen varios posibles mecanismos de acción por los cuales las isoflavonas pueden actuar en la prevención de enfermedades, incluyendo entre ellos actividad estrogénica/antiestrogénica, anti-proliferación de células, inducción de la apoptosis, actividad antioxidante, antiinflamatoria, regulación del sistema inmune y cambios en la señalización celular [34].

En concreto, su actividad estrogénica es bien conocida desde hace mucho tiempo, aunque en comparación con los estrógenos fisiológicos su actividad es particularmente débil (1/10000 y 1/1000 la actividad del 17- β -estradiol [24, 25]) sin embargo, también se ha comprobado que poseen una actividad antiestrogénica debido a su competencia por los receptores de los estrógenos [35].

Para el estudio de las isoflavonas, la soja es un buen material de trabajo ya que tiene una alta disponibilidad, es barata y relativamente rica en isoflavonas, siendo su contenido medio entre 500 y 4000 mg/Kg de soja, dependiendo de diversos factores ambientales como la región y el año de cultivo, la variedad de soja, etc. [34, 36]; además de en la concentración total, también se han encontrado diferencias en el perfil de las isoflavonas.

1.4 ESTABILIDAD DE LAS ISOFLAVONAS

1.4.1 Degradación e interconversión

Kudou y col. 1991 [31] comprobaron al extraer las isoflavonas de la soja que los malonil derivados se extraen en mayor cantidad a temperatura ambiente que a 80°C, comprobando de este modo que se trata de derivados térmicamente inestables que con temperaturas elevadas se transforman en su glucósido y acetyl derivados, excepto para acetyl genistina. Por otro lado, Simonne y col. 2000 [37] estudiaron el efecto del hervido, escaldado, congelado y liofilizado del escaldado de las sojas, comprobando que todos los procesos reducen significativamente el contenido total de isoflavonas, hasta en un 56% en el caso de las sojas escaldadas. Estas pérdidas se explican por la solubilidad de las isoflavonas en el agua durante el tratamiento que provoca su extracción de la matriz; al aplicar calor en el hervido se observa el aumento de las concentraciones de los derivados glucósidos.

Además, existen diversos estudios sobre la estabilidad de las isoflavonas durante la extracción en distintas condiciones de calor y pH [34, 38], pero estas transformaciones también se pueden dar durante el almacenamiento y durante el procesado de la soja, cambiando el perfil y la cantidad de las isoflavonas. Las posibles interconversiones entre las isoflavonas se muestran en la *figura 20*.

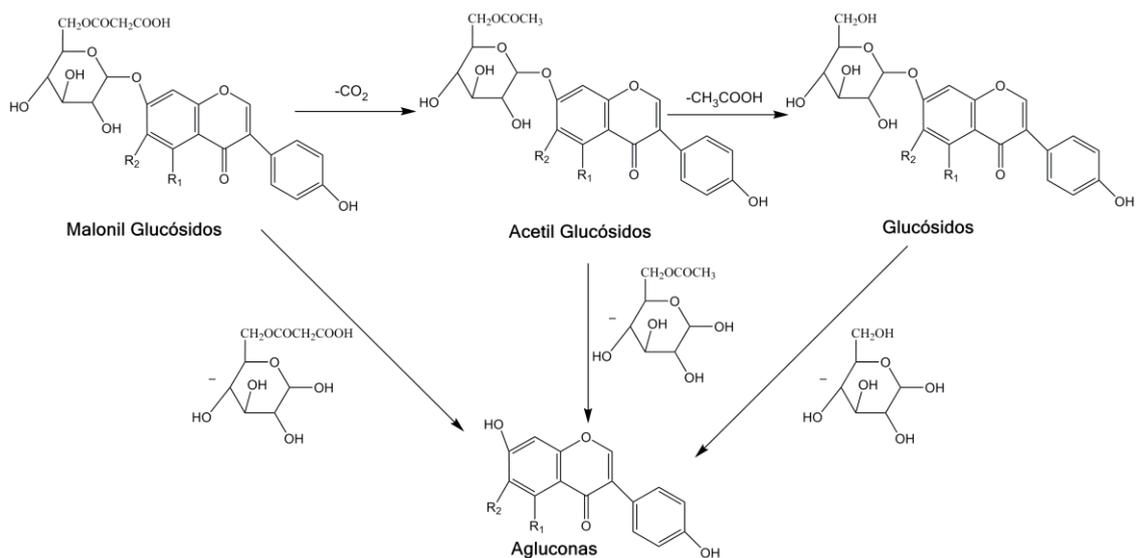


Figura 20. Principales vías de interconversión de las isoflavonas.

Ungar y col. 2003 [39] realizaron un estudio sobre la estabilidad térmica de disoluciones de daidzeína y genisteína en metanol o dimetilsulfóxido a 120°C y a distintos pH, neutro y alcalino. En ambas condiciones se produce la degradación de las isoflavonas obteniendo una reducción para la daidzeína a pH 7 del 40% y a pH 9 del 15%, en cambio el efecto del medio neutro estabiliza más la genisteína reduciéndola en un 22%, al contrario del medio alcalino que la reduce en un 60%. Realizaron el estudio de la cinética de degradación incubando las disoluciones entre 70 y 90°C y pH entre 7 y 9, observando una cinética de reacción de primer orden para ambas isoflavonas. La degradación de genisteína fue acelerada por el medio alcalino obteniendo constantes de reacción mayores que en medio neutro; lo mismo se observa para la daidzeína, por lo que el pH influye en la degradación. Además se observa que a temperaturas altas la daidzeína es más lábil que la genisteína, siendo la mayor degradación a 95°C para la genisteína, con una reducción del 29%, y a 98°C para daidzeína, disminuyendo su concentración en un 58%.

Una explicación para la mayor estabilidad de la genisteína se encuentra en el número de sustituyentes hidroxilo de los anillos aromáticos de la isoflavona. Varios estudios de estabilidad de polifenoles muestran un incremento en la estabilidad asociado con la disminución del número de grupos hidroxilo [40], por lo que se puede suponer que el incremento del número de grupos hidroxilo en el anillo aromático unido al heterociclo (anillo B) puede desestabilizar a la isoflavona; sin embargo, según el estudio de Ungar y col. 2003, la daidzeína es menos estable que la genisteína, siendo la única diferencia entre ambos la ausencia de un grupo hidroxilo en el anillo aromático cuyos carbonos forman parte del heterociclo (anillo A) (figura 19) en la daidzeína, por lo que se puede concretar que es este hecho lo que desestabiliza esa isoflavona. Este desvío en la estabilidad con respecto al resto de estudios de estabilidad en polifenoles se puede explicar por la localización de ese grupo hidroxilo, que es el carbono 5 del

anillo A, muy próximo al grupo 4-oxo del anillo C, el cual puede estabilizar la hidrólisis en el anillo A de la genisteína. Además en este estudio se realizaron análisis microcalorimétricos de la degradación observando que en las condiciones anaerobias de estos análisis se producían más rápido que en las condiciones aerobias de los análisis isotérmicos, obteniendo diferentes energías de activación para cada caso. Estas diferencias sugieren que existen dos o más reacciones de degradación que difieren en su mecanismo, sus productos e incluso en su dependencia con la temperatura. La menor estabilidad de la daidzeína frente a la genisteína también se observa con sus derivados, como se puede comprobar en el estudio de Mathias y col. 2006 [41]. Además en este estudio se observó mayor estabilidad en condiciones ácidas para los malonil derivados frente a los acetil derivados, indicando mayor estabilidad por el grupo malonil frente al grupo acetil.

Chien y col. 2005 [42] realizaron el estudio cinético de la conversión y degradación de la genisteína y sus derivados glucósido, acetil y malonil durante la aplicación de calor húmedo y seco a 100, 150 y 200°C, a distintos tiempos entre 0 y 180 min. Las reacciones que se estudiaron se muestran en la *figura 21*. Se observó que con calor seco la mayor constante de degradación es para la malonil genistina, seguido de genistina, genisteína y acetil genistina; en cambio en el caso de la aplicación de calor húmedo se observa el orden inverso al observado con calor seco, además de que para el calor húmedo las constantes de degradación son del orden de 10 a 100 veces mayores que para el seco, por lo que aplicando calor húmedo las isoflavonas son más susceptibles de degradación y conversión que con la aplicación de calor seco. La conversión del malonil genistina es la más rápida durante el calentamiento, así que comparado con tres derivados de genisteína es el derivado más lábil.

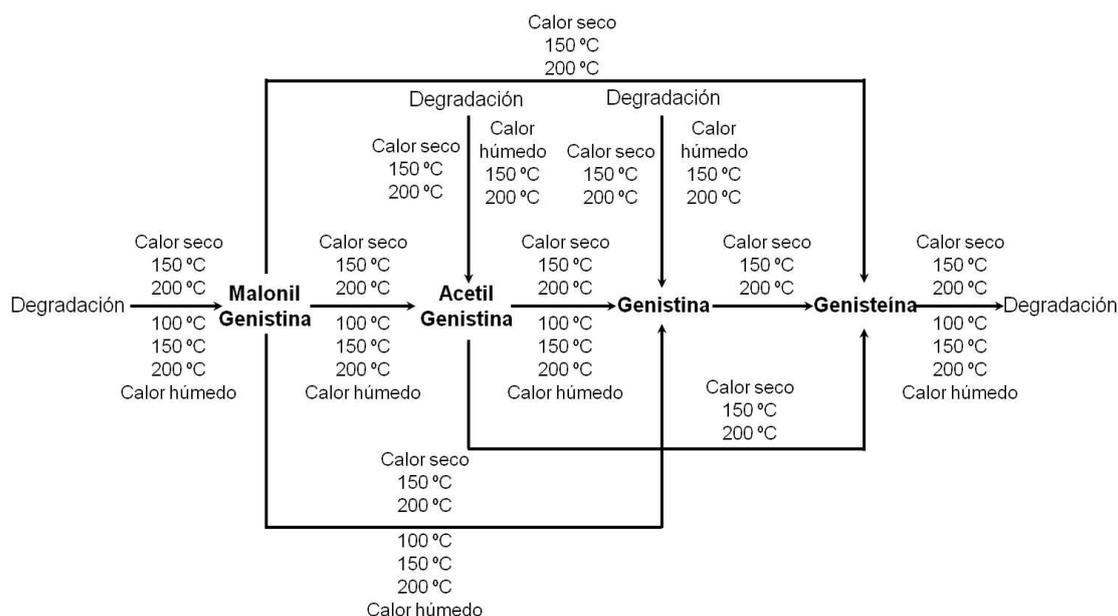


Figura 21. Principales reacciones de transformación y degradación.

Estas reacciones debidas al calor pueden ser debidas a una degradación térmica oxidativa, pero se han estudiado otro tipo de degradaciones debidas a las enzimas glucosidasas, propias de la soja, que afectan a la interconversión entre glucósidos y agluconas, mediante la hidrólisis de dichos glucósidos [43, 44]. Esta degradación es propia de los procesos de remojo de la soja, como el que se da durante la producción de la bebida de soja. La máxima actividad de las glucosidasas se da a 45°C a un pH óptimo de 5,5, aunque son activas en un rango de 4,3-7,0 de pH. Para inhibir estas enzimas, además de inactivarlas por calor (>60°C), se pueden utilizar aditivos como son HgCl₂, AgNO₃ y D-glucono-δ-lactona para conseguir dicha inactivación.

Además de estas reacciones existen otras que afectan a las isoflavonas en los alimentos, como son las reacciones de Maillard, responsables del desarrollo del color marrón y el aroma durante el procesado y almacenamiento de los alimentos, debido a la formación de aminas heterocíclicas como productos de reacción. Davies y col. 1998 [45] comprobaron que en proteína de soja se producían reacciones de Maillard por dos vías, la propia autodegradación de la genisteína y la reacción de la genisteína con el aminoácido lisina presente en la proteína; esta última reacción se comprobó que se producía a temperaturas menores de 30°C y en tiempos cortos (2 meses).

Todas o parte de estas reacciones se observan tanto en el procesado de la soja y sus productos, como en el almacenamiento de la misma y sus extractos.

1.4.2 Estabilidad en el procesado de la soja y sus derivados

Además de como tal, la soja puede ser consumida de diversas formas, ya sea como semillas, tofu, bebida de soja, incluida en cereales y galletas... Con lo comentado en el apartado anterior es de esperar que la distribución y perfil de isoflavonas varíe según el alimento de que se trate, debido a la relativa inestabilidad de las mismas en las condiciones de procesado de la soja natural. Se ha comprobado que la aplicación de altas temperaturas puede promover la descarboxilación de los malonil glucósidos a acetil glucósidos. Por otro lado, la hidrólisis del éster transforma los malonil y acetil glucósidos a glucósidos. También es posible por medio de otros tratamientos generar las formas agluconas por ruptura del enlace glucosídico, e incluso se ha estudiado la inestabilidad de las formas agluconas en condiciones ácidas [46]. A continuación se describen algunos estudios de esta variabilidad observada.

Los diferentes aspectos del procesado pueden desencadenar alguna degradación o interconversión entre las isoflavonas presentes en la materia prima. Un ejemplo de esto son los concentrados de proteína de soja, ya que según el método de obtención de la proteína, poseen perfiles de isoflavonas totalmente distintos. En el caso de obtención por extracción alcohólica se produce una pérdida de más del 95%

de las isoflavonas presentes inicialmente, mientras que en el caso de la obtención mediante extracción por lavado acuoso, se conservan la mayoría de las isoflavonas presentes en la soja original [46].

Diversos estudios han documentado los cambios en las isoflavonas en el procesado de la soja para la obtención de diversos productos como bebida de soja y tofu [43, 47-50]. De todos los pasos del proceso, el molido de la soja es un punto crítico donde puede variar el contenido total de las isoflavonas según la temperatura que se utilice para ello. Jackson y col. 2002 [47] observaron un aumento en 12 y 23 veces la concentración de daidzeína y gliciteína respectivamente en el proceso de agitación y molienda con agua hirviendo. Prabhakaran y col. 2006 [49] observaron un cambio en la actividad de las β -glucosidasas según se realizara el molido a 45 o 95°C, observando un aumento en la concentración de agluconas al moler a menor temperatura; a 95°C la concentración de agluconas es menor, sin embargo aumenta la concentración de isoflavonas totales.

También se ha estudiado la estabilidad de las isoflavonas en diversos productos de soja. En el caso de las bebidas de soja fermentadas [51, 52] se observa que agluconas y glucósidos son estables durante el almacenamiento en presencia de lactobacillus. La degradación de las agluconas es menor que las de los glucósidos y el orden de estabilidad es daidzeína, mayor que la genisteína, siendo la de menor estabilidad la gliciteína. Se observan mayores constantes de degradación para las agluconas a 25 y 37°C y menores constantes de degradación a bajas temperaturas como son -80 y 4°C; en el caso de los glucósidos, ocurre lo contrario.

Hayes y col. 2003 [53] estudiaron la estabilidad de la bebida de soja uperizada almacenada a distintas temperaturas durante 3 meses. Observaron un aumento de los glucósidos y la disminución de los derivados acetil y malonil en el tiempo; las agluconas no presentaron ningún cambio. Para daidzina se observa el aumento de su concentración pasado un mes de almacenaje a 23 y 38°C en cambio, a 4°C, ese aumento se observa pasados 3 meses. En el caso de la genistina el aumento de concentración se observa pasado un mes para cualquiera de las tres temperaturas estudiadas.

Anderson y col. 1995 [54] estudiaron los cambios en las isoflavonas durante el procesado de diferentes alimentos de soja. Mediante un tratamiento de calor los acetiles aumentan su concentración debido posiblemente a la descarboxilación de los maloniles. En el tofu el contenido en isoflavonas es bajo debido a su procesado acuoso donde las isoflavonas se extraen de la matriz y pasan al agua de procesado. Lo mismo ocurre con la proteína de soja hecha por medio de extracción alcohólica acuosa. En alimentos fermentados como el tempeh y el miso se observan mayores concentraciones en agluconas debido a la hidrólisis enzimática que se provoca durante la fermentación. En este estudio se observa que no hay pérdida de las isoflavonas en el procesado, salvo en aquellos casos en los que se han realizado

extracciones alcohólicas. Se dan interconversiones debidas al tratamiento térmico y a la fermentación, pero las isoflavonas totales se mantienen constantes. La disminución del contenido en isoflavonas en algunos alimentos se debe a la dilución debida a la adición de otros ingredientes, como la sal.

Wang y col. 1996 [55] estudiaron el balance de masa de las isoflavonas durante el procesado de la soja para la obtención de tempeh, bebida de soja, miso y proteína de soja. En el proceso de obtención de tempeh se observaron pérdidas de un 12% en el remojo y un 49% en el proceso térmico. En cambio para el tofu, la mayor pérdida (44%) se produce durante la coagulación. Para la obtención de la proteína de soja en la extracción alcalina se pierde un 53%. Sobre el perfil de isoflavonas también se dan cambios. En la producción del *tempeh*, la bebida de soja y el tofu disminuyen las concentraciones de malonil daidzina y malonil genistina después del remojo y la cocción. En cambio, debido al proceso térmico aumentan las concentraciones de acetil daidzina y acetil genistina. Después de la fermentación del tempeh se observa un aumento de daidzeína y genisteína debido a la hidrólisis enzimática. En el caso de la proteína de soja, la extracción alcalina provoca un aumento en la daidzeína y la genisteína.

1.4.3 Estabilidad del almacenamiento de soja

Hay que tener en cuenta que no sólo el procesado afecta a la concentración y el perfil de isoflavonas; el almacenamiento y las condiciones de almacenamiento a largo plazo pueden afectar a la distribución y contenido de las mismas, disminuyendo e incrementando sus concentraciones individuales. Hay diversos estudios de contenido en isoflavonas y del perfil de las mismas durante el almacenamiento en distintas condiciones y habiendo sido añadidos distintos aditivos.

Hou y col. 2002 [56] estudiaron la estabilidad de las isoflavonas en distintas condiciones de temperatura, humedad y tiempo. Con valores de humedad altos y a 30°C de temperatura, los derivados malonil decrecen con el paso del tiempo, llegando hasta un 1% del total de las isoflavonas pasados 9 meses. Los derivados glucósido pasan del 12% al 26% en dos meses y luego decrecen hasta un 2% a los 9 meses de almacenamiento. En cambio las agluconas aumentan del 1% al 79% del total en 5 meses y hasta el 97% pasado los 9 meses. Reduciendo los tiempos de almacenamiento se reducen las degradaciones observadas, e incluso almacenando a 4°C se consigue que no haya variación en las isoflavonas durante 18 meses de almacenamiento; en este caso no se observaron ni hidrólisis por β -glucosidasas ni actividad de desesterificación.

En diversos estudios [57] se establece que la temperatura afecta a la estabilidad de las isoflavonas, siguiendo una relación de Arrhenius entre la temperatura y la degradación. La cinética de las reacciones de conversión de las

isoflavonas es de primer orden. Los derivados malonil son los más lábiles durante el almacenamiento, mientras que los derivados genisteína son más estables que los daidzeína en el caso del almacenamiento de semillas de soja.

Kim y col. 2005 [58] no observaron diferencias significativas en el contenido medio de isoflavonas encontrado al almacenar semillas de soja durante tres años a temperatura ambiente y a -20°C . En ambas condiciones se observan grandes variaciones en el contenido de derivados malonil, pero las diferencias no son significativas entre las dos condiciones. Por tanto, se puede concluir que es posible conservar la concentración media pero no el perfil de las isoflavonas.

Huang y col. 2009 [59] estudiaron la degradación de las isoflavonas en soja al vapor, y posteriormente liofilizada, almacenada a dos temperaturas (4 y 25°C) añadiendo o no un absorbente de oxígeno, como es el "AGELESS Oxigen Absorber", y un desecante, "SECA PAX" durante un periodo de 120 días. Observaron que hay mayores pérdidas a mayor temperatura y que la adición de un desecante aumenta la estabilidad de las isoflavonas, por lo que la humedad afecta a la estabilidad. También se observó menor estabilidad para los derivados de gliciteína lo cual comparando su estructura con las otras isoflavonas puede ser debido a la presencia del grupo metoxi en la posición 6 del anillo aromático cuyos carbonos forman parte del heterociclo, que puede tener un menor energía de enlace haciendo menos estables a estos derivados cuando son comparados con las otras isoflavonas que poseen un grupo hidroxilo en la misma posición.

1.4.4 Estabilidad de los extractos de isoflavonas de soja

Confirmada la inestabilidad de las isoflavonas tanto en el procesado de los alimentos, como en el almacenamiento de la materia prima, hay indicios para suponer que existe esa misma inestabilidad en los extractos de las isoflavonas, lo que puede dar lugar a errores analíticos en la determinación de dichas isoflavonas. Por tanto, en el análisis de las isoflavonas se debe tener en cuenta la estabilidad de las mismas bajo ciertas condiciones de almacenamiento antes de planificar una rutina de análisis, evitando así los errores analíticos debido a la degradación e interconversión entre formas. En concreto, se ha documentado una velocidad de conversión de las formas malonil a sus correspondientes glucósidos de $0,2-0,3\%$ (mol/mol) por hora a temperatura ambiente [34].

De Rijke y col. 2001 [60] documentaron la estabilidad de dos formas malonil de isoflavonas obtenidas de un extracto metanólico del trébol rojo. Para ello almacenaron los extractos en tres condiciones distintas: a temperatura ambiente, a -20°C y otra a -20°C después de evaporarlos a sequedad bajo corriente de nitrógeno. A temperatura ambiente la degradación de los maloniles ocurre casi inmediatamente dando lugar a los glucósidos, que sí se conservan. En el caso del extracto metanólico

evaporado y almacenado a -20°C , en 24 horas se descomponen completamente los derivados malonil, algo que justifican por la posible no evaporación total del disolvente. En cambio en los extractos de metanol almacenados también a -20°C sin evaporación previa la degradación no es completa hasta después de varios días; por tanto, es posible conservar estos extractos de uno a dos días sin que se produzca degradación; pasadas dos semanas, la interconversión es completa.

Una de las pocas publicaciones encontradas acerca de la conservación de extractos de isoflavonas de soja es la de Rostagno y col. 2005 [61] donde se evalúan, durante siete días, diversos factores que afectan al almacenaje tales como la temperatura, el tiempo, la luz UV y el espacio de cabeza del vial. En este caso se evalúa la estabilidad de extractos etanólicos de soja y de los patrones de daidzeína, gliciteína, genisteína y sus derivados malonil y glucósidos. Los resultados observados indican que el tiempo de almacenaje afecta al perfil de isoflavonas pero que dicho perfil depende de la temperatura: el perfil se mantiene constante a temperaturas menores de 10°C , llegando a conservarse durante 30 días a una temperatura de -20°C . A temperatura ambiente se observa la disminución de los maloniles y el incremento de los glucósidos, lo que indica que existe una conversión entre las formas; las velocidades de conversión de malonil a glucósido a temperatura ambiente son de $0,117\ \mu\text{M}/\text{hora}$ para genisteína, $0,018\ \mu\text{M}/\text{hora}$ para daidzeína y $0,010\ \mu\text{M}/\text{hora}$ para gliciteína. A 40°C las velocidades de degradación aumentan siendo casi el doble si lo comparamos con lo ocurrido a temperatura ambiente. En el caso de las agluconas no se observa variación. Otro de los parámetros estudiados es la incidencia de la luz UV en los viales; en este caso se observa que dicha incidencia aumenta las velocidades de conversión de los derivados malonil y que tanto la concentración de gliciteína, como la de daidzeína decrecen. En el caso de la influencia del espacio en cabeza existente en el vial, se concluye que si está lleno al 100 o al 50%, no afecta cuando se almacena entre 10 y 25°C , pero si se ha almacenado el extracto a 40°C con un espacio de cabeza del 50% se reducen más los derivados malonil, llegando a convertirse totalmente en los derivados glucósidos.

A la hora de obtener extractos que vayan a ser utilizados como aditivos para otros alimentos, también es importante tener en cuenta esta inestabilidad. Dentro de este contexto existen estudios sobre la estabilidad a lo largo de un año de extractos obtenidos por atomización (*spray dried*) [62, 63]. Se estudió la estabilidad de extractos líquidos y extractos secos de daidzeína y genisteína almacenados a 0°C [63] y se observó que, a esa temperatura, en el extracto en disolución se había producido una reducción del 40,62% de daidzeína y del 99,77% de genisteína pasados doce meses; en cambio, para los extractos secos obtenidos, la daidzeína tan sólo se reduce en un 14,28% y en un 28,27% la genisteína. Se puede concluir que en ambas condiciones se produce una reducción en la concentración, aunque se comprueba de nuevo que el agua tiene un efecto crucial en la estabilidad, puesto que su presencia acelera significativamente la degradación de las isoflavonas.

Todas estas variaciones en el perfil y concentración de isoflavonas en la soja y productos derivados afecta a la hora de realizar los estudios que relacionan su consumo con los posibles efectos beneficiosos en la salud. Por ello, en el análisis cuantitativo de las isoflavonas en soja y productos derivados, se debe tener en cuenta, además de la cantidad total de las mismas, las formas concretas en las que se encuentran, ya que cada una presenta unas características distintas de digestibilidad y de bioactividad. Por tanto, estos perfiles han de ser considerados, necesariamente, cuando se realicen estudios epidemiológicos relacionados con el consumo de diferentes alimentos.

2 OBJETIVOS

Por lo que se ha visto en la introducción de este capítulo, la estabilidad de las muestras es un aspecto crítico en el análisis y uso de las isoflavonas. Es esencial considerar la estabilidad de los extractos de isoflavonas de soja para poder llevar a cabo correctamente el análisis rutinario de un gran número de muestras evitando errores analíticos debidos al inadecuado almacenamiento de las mismas antes del análisis. Además esos extractos de isoflavonas se podrían utilizar como aditivos para alimentos, por lo que también es importante conocer la estabilidad de las distintas formas de las isoflavonas presentes en los extractos a añadir.

En este capítulo se va a estudiar la estabilidad de las isoflavonas durante 12 meses de almacenamiento, fijándonos tanto en el perfil como en la concentración de las mismas. Para ello se obtienen distintos extractos de isoflavonas líquidos y liofilizados, procedentes de soja y de proteína texturizada de soja, de modo que los perfiles de isoflavonas objeto de estudio sean distintos; estos extractos se almacenan en distintas condiciones:

- Distintas temperaturas: temperatura ambiente, 5 °C y -20 °C.
- Adición de un agente antioxidante, BHT (2,6-di-*tert*-butil-4-metilfenol) en concentraciones del 0,01% y 0,05%.
- Adición de un inhibidor de la enzima β -glucosidasa (D-(+)-glucono- δ -lactona) en concentraciones 1 y 10 mM.
- Combinación de ambos aditivos.

Estos extractos, en las diferentes condiciones y con los distintos aditivos adicionados, se guardan por duplicado y se analizan mediante HPLC-DAD, cada dos meses, durante los seis primeros meses –se toman muestras pasados 2, 4 y 6 meses– y al año, evaluando la estabilidad de las isoflavonas almacenadas a las distintas temperaturas, así como sus reacciones de interconversión y degradación en presencia o no de los aditivos.

3 EXPERIMENTAL

3.1 MATERIALES Y REACTIVOS

3.1.1 Reactivos y disolventes

Etanol, metanol y acetonitrilo de grado HPLC se adquirieron en VWR (West Chester, PA, USA). El ácido acético del 96% utilizado fue de Merck (Darmstadt, Germany) y el agua ultrapura empleada durante las extracciones y el análisis ha sido obtenida por un sistema de purificación Mili-Q water Advantage A10 de Millipore (Bedford, MA, USA). En este sistema el agua se somete a una desionización en dos etapas a través de resinas de intercambio iónico. Todos los disolventes fueron sometidos a una desgasificación previa a su utilización utilizando para ello un baño de ultrasonidos.

2,6-Di-*tert*-butil-4-metilfenol (BHT) y D-(+)-glucono- δ -lactona, ambos de pureza superior al 99%, se obtuvieron de Merck (Darmstadt, Germany). El inhibidor enzimático de las β -glucosidasas se adiciona como sólido en la cantidad determinada (1-10 mM) al extracto de isoflavonas líquido. En cambio, para adicionar el antioxidante BHT se realiza una disolución al 10% en etanol y se adiciona la alícuota necesaria sobre el extracto líquido de isoflavonas para obtener la concentración deseada (0,01 ó 0,05%).

3.1.2 Sustancias patrón

Los patrones de isoflavonas utilizados se muestran en la *tabla 13* junto con su proveedor. Todos se almacenaron antes de su uso a -20 °C. Su estructura química y su abreviatura se muestran en la *figura 19*.

Tabla 13. Patrones de isoflavonas utilizados y su proveedor.

Isoflavona	Proveedor
Daidzina	LC Labs (Woburn, MA, USA)
Glicitina	
Genistina	
Daidzeína	
Gliciteína	
Genisteína	
Malonil daidzina	Wako Chemicals (Neuss, Germany)
Malonil glicitina	
Malonil genistina	
Acetil daidzina	
Acetil glicitina	
Acetil genistina	

La pureza de los patrones de glucósidos y agluconas de las isoflavonas es superior al 99%, mientras que la pureza de los derivados acetil y malonil es mayor del 90%. Las disoluciones madre de cada una de las isoflavonas se prepararon en metanol y se almacenaron a -80°C .

3.1.3 Muestras

Una muestra de soja amarilla y otra de proteína texturizada de soja fueron utilizadas como materia prima para obtener los extractos a estudiar. Ambas muestras fueron adquiridas en un supermercado en la localidad de Soria y almacenadas a -20°C antes de su uso.

3.2 INSTRUMENTACIÓN

3.2.1 Baño de ultrasonidos

Las extracciones se realizaron en un baño de ultrasonidos Transsonic TH-I-55 (Elma Hans Schmidbauer GmbH & Co. KG, Singen, Germany) (*figura 22*), que cuenta una potencia ultrasónica efectiva de 600 W, con variación de frecuencia (25 y 45 KHz, y modo *sweep* que combina ambas) y posibilidad de trabajar a temperaturas de hasta 80°C .



Figura 22. Extracción de las muestras en el baño de ultrasonidos.

3.2.2 Liofilizador

Los extractos líquidos obtenidos mediante la extracción asistida por ultrasonidos, se liofilizan en un liofilizador Cryodos -80 (IMA-Telstar S.L., Terrassa, Barcelona, España) (*Figura 23*).



Figura 23. Liofilizador

3.2.3 Cromatógrafo de líquidos de alta resolución (HPLC)

El análisis mediante cromatografía líquida de alta resolución con detección ultravioleta (HPLC-UV) de las isoflavonas se realizó en un sistema Waters (Waters Corp., Milford, Massachusetts) formado por un módulo de separación (2695), con un horno de columna integrado, un inyector de muestra automático y un detector de fila de fotodiodos 2998 (*diode array*). El sistema cromatográfico HPLC-DAD se muestra en la *figura 24*.



Figura 24. Sistema cromatográfico utilizado para el análisis de isoflavonas.

3.3 PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS DE ISOFLAVONAS

Para la extracción de las isoflavonas de las muestras se utilizó un método de extracción asistida por ultrasonidos basado en las condiciones optimizadas por Rostagno y col. 2003 [64].

3.3.1 Extractos líquidos

Para la realización de los extractos de isoflavonas líquidos se pesan 20 g de muestra (soja o proteína texturizada de soja) que se extraen con 250 mL de etanol acuoso al 50%. La mezcla se introduce en el baño de ultrasonidos en modo *sweep* de frecuencia –alterna 25 y 45 KHz de frecuencia durante el análisis-, al 100% de intensidad, durante 30 min a 60 °C [64]. Una vez finalizada la extracción, la mezcla se deja enfriar y se filtró a través de papel de filtro. Se repite la extracción, con otros 20 g de muestra, hasta obtener el volumen suficiente de extracto para realizar el estudio de estabilidad completo. Todos los extractos se combinan para obtener un extracto homogéneo de isoflavonas.

Para el estudio de la estabilidad de los extractos de isoflavonas obtenidos se almacenan por duplicado, evitando la incidencia de luz, en botes de color topacio a cada una de las temperaturas de estudio seleccionadas (temperatura ambiente, 5°C y -20°C), con y sin aditivos. Los extractos líquidos objeto de análisis fueron los que se detallan en la *tabla 14*.

Tabla 14. Extractos líquidos en los que se estudia la estabilidad de las isoflavonas.

Tipo de extracto	Características
Sin aditivos (NoAd)	Sin inhibidor enzimático ni antioxidante
Inhibidor 1 mM	Añadido inhibidor enzimático en una concentración de 1 mM
Inhibidor 10 mM	Añadido inhibidor enzimático en una concentración de 10 mM
Antioxidante 0,01%	Añadido antioxidante en una concentración 0,01%
Antioxidante 0,05%	Añadido antioxidante en una concentración 0,05%
Inhibidor 10 mM y antioxidante 0,05% (I+B)	Añadido inhibidor enzimático en una concentración de 10 mM y antioxidante en una concentración 0,05%

Un resumen del esquema seguido para llevar a cabo el estudio de estabilidad de los extractos etanólicos se muestra en la *figura 25*.

En el momento de analizar los extractos almacenados durante 2, 4, 6, o 12 meses, y antes de su análisis mediante HPLC-DAD, la alícuota necesaria se filtra a través de un filtro de jeringa de nylon de 0,2 μm de tamaño de poro (VWR, West Chester, PA, USA) y se introduce en un vial que se colocará en el inyector automático del equipo.

Es importante recordar que todo esto se lleva a cabo tanto para los extractos procedentes de soja, como para los procedentes de la proteína texturizada de soja.

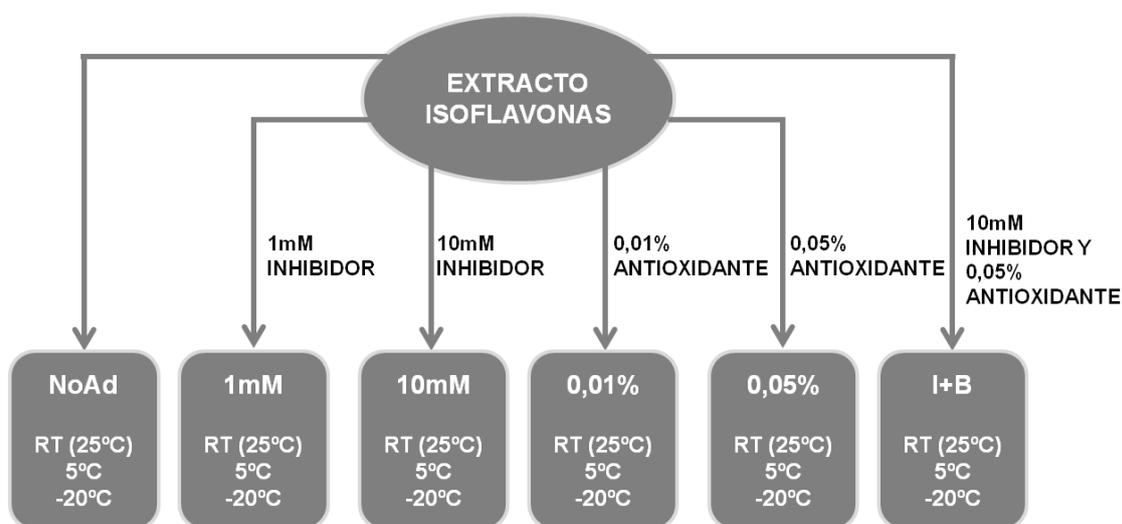


Figura 25. Esquema experimental para el estudio de estabilidad de extractos líquidos de isoflavonas. NoAd: sin aditivos.

3.3.2 Extractos liofilizados

Para los extractos liofilizados de proteína texturizada de soja se realiza la extracción del mismo modo que en los extractos líquidos (apartado anterior). Una vez obtenido el extracto líquido, se le adicionan los aditivos, si corresponde, se filtran a través de un filtro de nylon de 0,2 μm y se añaden 0,5 mL de estos extractos filtrados en viales de cromatografía; a cada vial se le adicionan 0,5 mL de agua destilada para diluir el etanol de los extractos y de este modo poder liofilizarlos. Se preparan, por duplicado tantos viales como puntos de estudio; se congelan a -20°C y después se liofilizan. Una vez liofilizados los viales se almacenan a las temperaturas correspondientes del estudio. Un resumen del esquema seguido para llevar a cabo este trabajo se muestra en la *figura 26*.

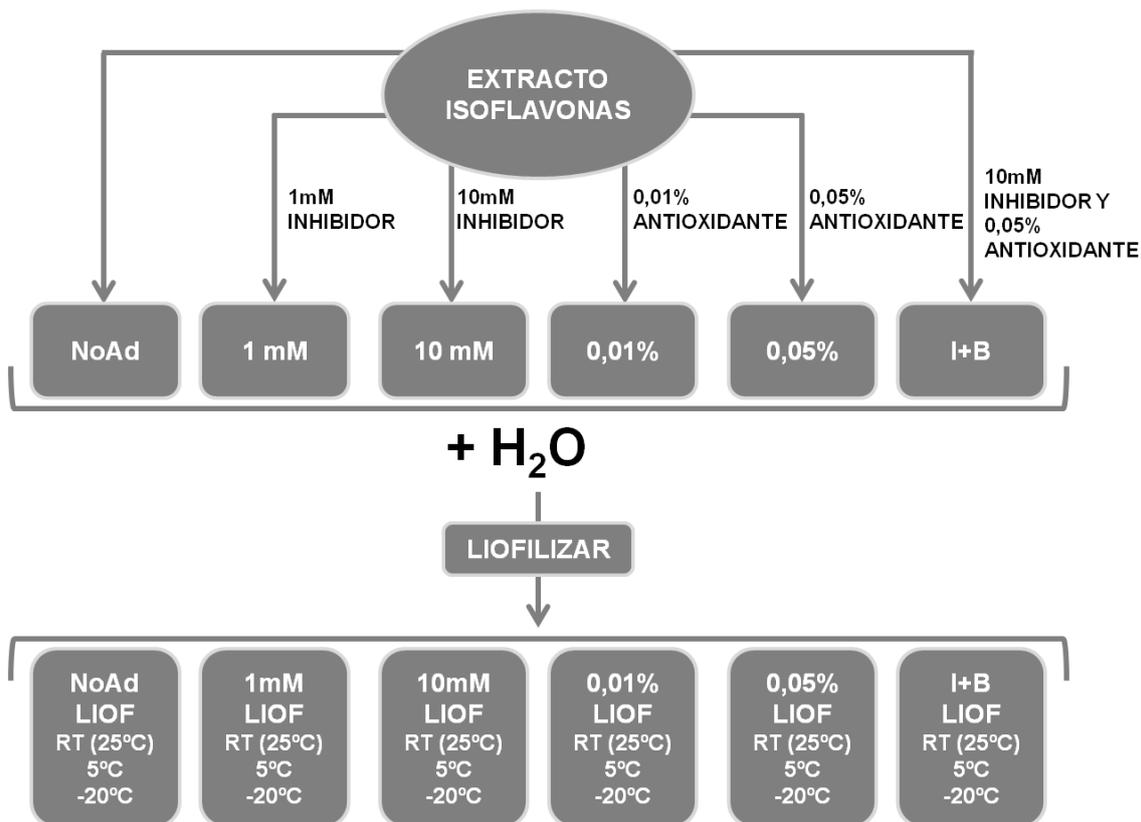


Figura 26. Esquema experimental para el estudio de estabilidad de extractos liofilizados de isoflavonas. NoAd: sin aditivos.

En el momento de su análisis, el contenido de los viales se redisuelve en 0,5 mL de etanol acuoso al 50%, de modo que los extractos liofilizados se pueden analizar mediante cromatografía (HPLC-DAD).

3.4 ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO DE LAS ISOFLAVONAS

El primer método utilizado para el análisis cromatográfico de las isoflavonas está basado en el desarrollado por Rostagno y col. 2004 [65]; a partir de éste, se ajustó el gradiente para mejorar la separación de las 12 isoflavonas, obteniendo como método optimizado de análisis el que se muestra en la *tabla 15*.

La columna utilizada para la separación es una columna particulada convencional C₁₈ Xbridge™, de 3,5 µm de tamaño de poro y dimensiones de 4,6x150 mm (Waters Corporation, Milford, MA, USA). El tiempo de equilibrado utilizado entre inyecciones es de 20 minutos. La absorbancia para la detección fue monitorizada entre 210 y 400 nm, cuantificando a 254 nm. El volumen de inyección se fijó en 10 µL. El software utilizado para el control del equipo y la recogida de datos fue Empower 2 versión 6.10.01.00.

Tabla 15. Método cromatográfico para el análisis de las isoflavonas.

Flujo	0,8 mL/min	
Temperatura	35°C	
Fases móviles	Fase A	Agua 0,1% ácido acético
	Fase B	Metanol 0,1% ácido acético
Gradiente	Tiempo (min)	% B
	0,00	0
	10,00	30
	15,00	30
	20,00	35
	30,00	35
	40,00	50
	45,00	100
	55,00	100
60,00	0	

La separación obtenida para las doce isoflavonas objeto de estudio se muestra en la *figura 27*, en la que se muestra el cromatograma obtenido a la longitud de onda de 254 nm.

La identificación de las isoflavonas fue llevada a cabo comparando los tiempos de retención y los espectros ultravioleta de cada uno de los compuestos (*figura 28*) con los correspondientes a los patrones individuales de cada una de las isoflavonas inyectadas con el mismo método y en las mismas condiciones.

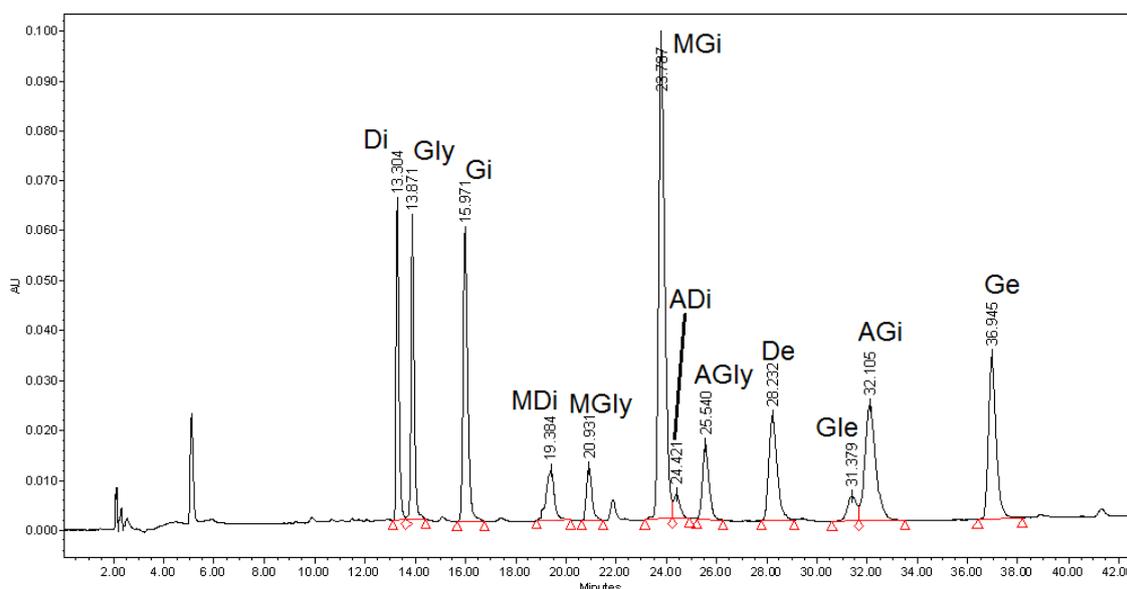


Figura 27. Cromatograma de los patrones de las doce isoflavonas utilizadas para el estudio de la estabilidad en el almacenamiento de extractos de isoflavonas. La concentración de las agluconas y los derivados glucósidos es de 10 ppm y para los derivados malonil y acetil es de 5 ppm, excepto para MGi que es de 15 ppm.

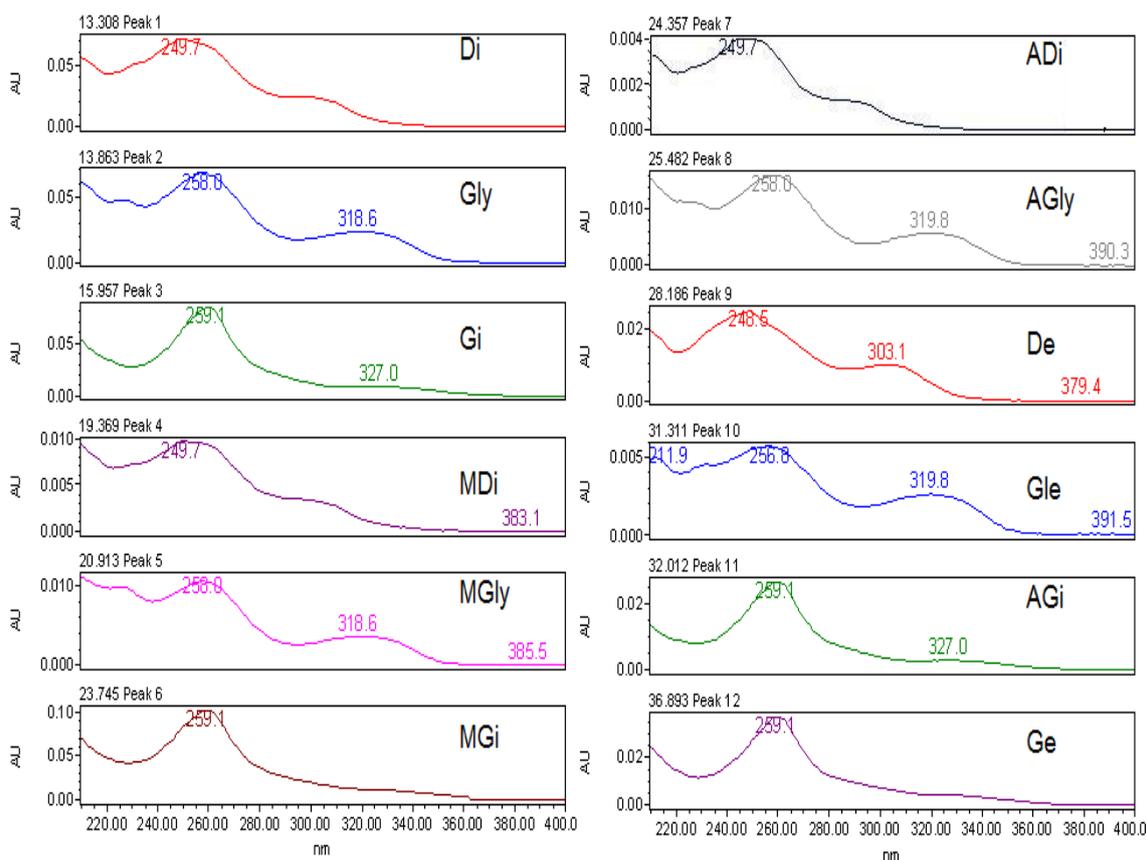


Figura 28. Espectros UV de los patrones de las doce isoflavonas identificadas para el estudio de la estabilidad en el almacenamiento de extractos de isoflavonas.

La cuantificación se realizó por medio de las áreas obtenidas para cada pico cromatográfico a 254 nm, utilizando el método del patrón externo. La curva de calibrado para cada isoflavona se realizó con 7 puntos representando la concentración frente al área. Las ecuaciones de regresión y coeficientes de correlación (R^2) se calcularon usando el software Microsoft Excel 2007, y se muestran en la *tabla 16*.

Tabla 16. Curvas de calibrado para cada isoflavona.

Isoflavona	Ordenada	Pendiente	R^2
Di	-16086	49107	0,9996
Gly	15000	41132	0,9997
Gi	35433	69906	0,9997
MDi	-19415	59272	0,9996
MGly	17895	49070	0,9997
MGi	42484	83818	0,9997
ADi	-17710	54067	0,9996
AGly	16410	44998	0,9997
De	2576	58617	0,9997
Gle	-29311	57633	0,9993
AGi	38870	76687	0,9997
Ge	-52890	95416	0,9998

Los límites de detección y cuantificación (*tabla 17*) fueron determinados considerando el valor de 3 y 10 veces la desviación estándar del blanco, obtenido a partir de blancos de muestra (n=10), dividido por la pendiente de la curva de calibrado para cada una de las isoflavonas [42].

Tabla 17. Límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) para cada isoflavona objeto de estudio.

Isoflavona	LOD µg/L	LOQ µg/L
Di	30,8	102
Gly	18,4	61,5
Gi	14,4	48,1
MDi	0,23	0,77
MGly	3,15	10,5
MGi	1,02	3,40
ADi	6,70	22,4
AGly	12,6	41,9
De	3,90	13,0
Gle	16,6	55,2
AGi	5,50	18,3
Ge	3,67	12,2

Los límites de detección y cuantificación que se muestran en la *tabla 17* son los denominados instrumentales (calculados a través de los estándares), sin embargo, los cromatogramas obtenidos a partir de la extracción de las isoflavonas de las muestras no son todo lo limpios que se pueden desear y se observan compuestos pertenecientes a otras familias distintas que coeluyen con las isoflavonas objeto de estudio, por lo que podemos hablar del límite de cuantificación “experimental” que es el que se muestra en la *tabla 18*; para determinar este límite se ha tenido en cuenta “la suciedad” del cromatograma de las muestras reales con las que se trabaja.

Tabla 18. Límites de cuantificación para cada isoflavona en las muestras (LOQmuestras).

Isoflavona	LOQexptal. mg/L
Di	0,50
Gly	0,50
Gi	0,25
MDi	1,00
MGly	1,00
MGi	2,00
ADi	2,00
AGly	1,00
De	1,00
Gle	1,00
AGi	0,50
Ge	0,50

Estos límites se han calculado por comparación de los cromatogramas de las muestras con los de los patrones inyectados a distintos niveles de concentración con el mismo método cromatográfico; superponiendo ambos cromatogramas y observando qué concentración mínima es visible teniendo en cuenta los compuestos interferentes que se observan en las muestras. Una superposición de cromatogramas usada para la determinación de este límite es la que se muestra en la *figura 29*. A esa concentración mínima cuantificable la hemos denominado límite de cuantificación experimental en muestras (LOQexptal.) y, obviamente, son superiores a los límites instrumentales obtenidos para los patrones utilizando el método cromatográfico anteriormente descrito.

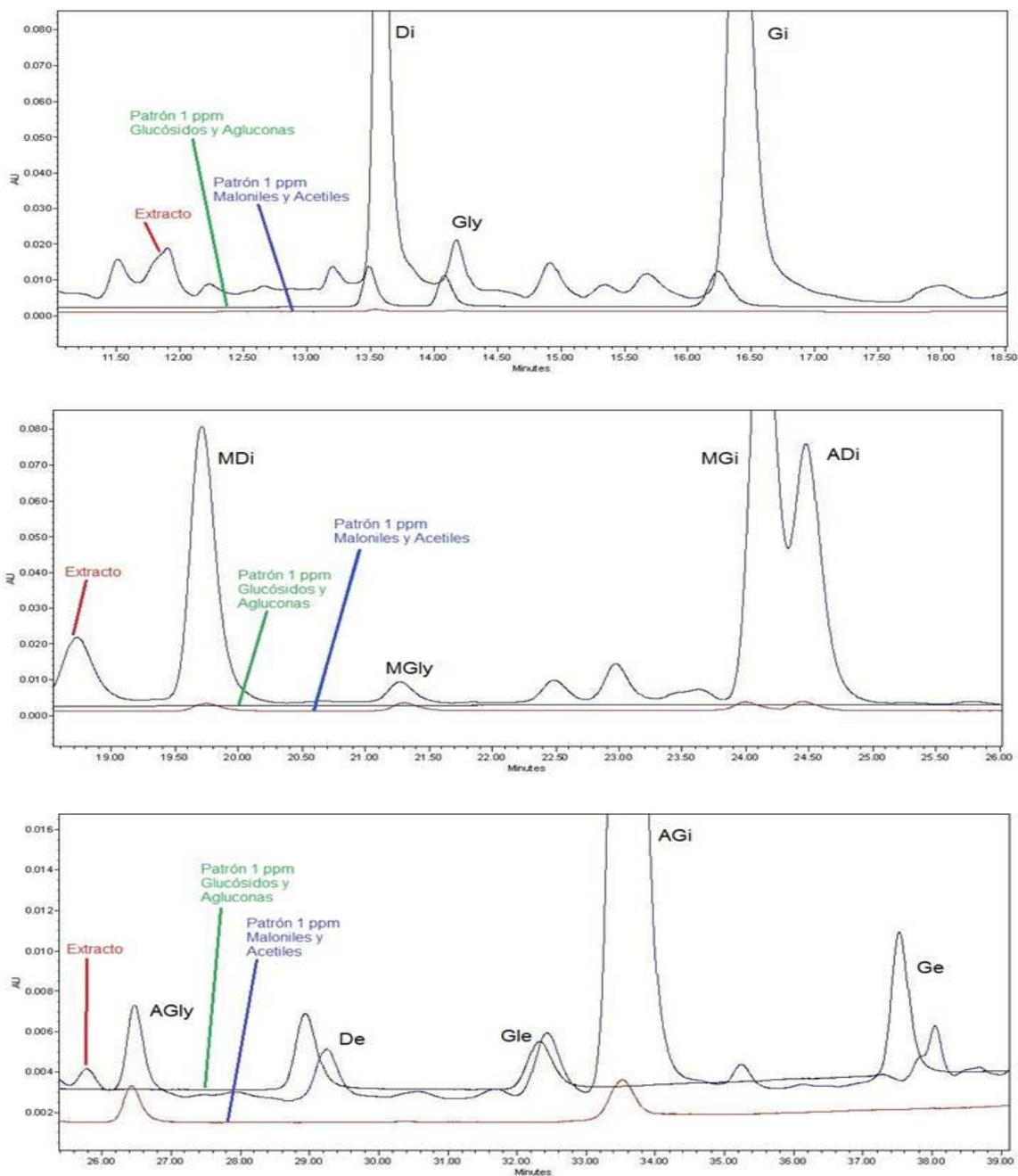


Figura 29. Superposición de los cromatogramas del extracto de proteína de soja y del patrón de las isoflavonas (1 ppm) utilizados para la determinación del límite de cuantificación experimental (LOQ_{exptal}).

3.5 ESTUDIO DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS

Para realizar el estudio de la estabilidad de los extractos y comprobar los efectos de los distintos factores se decidió trabajar con el porcentaje de variación, “%Var”, en vez de trabajar directamente con las concentraciones. Este valor lo hemos definido como el porcentaje de variación con respecto a la referencia inicial, es decir, el extracto inicial a tiempo cero (sin haber sido almacenado). “%Var” es la diferencia, en porcentaje, del aumento o disminución de la concentración de la isoflavona estudiada, en unas condiciones concretas, con respecto a la referencia, es decir:

$$\%Var = \frac{[Isoflavona]_i - [Isoflavona]_{Referencia}}{[Isoflavona]_{Referencia}} \cdot 100$$

Siendo *i* la condición (aditivo, tiempo, temperatura) concreta. De esta manera se pueden comparar las variaciones en las isoflavonas estudiadas, independientemente de su concentración. Además, permite estudiar cada uno de los derivados de cada una de las familias de isoflavonas objeto de análisis.

En el caso de los extractos liofilizados, además se determina cómo afecta el proceso de la liofilización sobre la concentración de las isoflavonas. Para ello se obtienen las concentraciones tanto del extracto líquido como las del extracto liofilizado y se calcula la recuperación del proceso, es decir, el porcentaje de recuperación de cada isoflavona detectada en el extracto, “%Rec”. Este porcentaje de recuperación se calcula por medio de la fórmula:

$$\%Rec = \frac{[Isoflavona]_{extracto\ liofilizado}}{[isoflavona]_{extracto\ líquido}} \cdot 100$$

Los datos de áreas y concentraciones fueron procesados con el software Microsoft Excel 2007.

Para estudiar estadísticamente los resultados se ha utilizado el software SPSS 16.0. Se han realizado análisis de la variancia (ANOVA) teniendo en cuenta los factores a estudiar (tipo de muestra, tratamiento, tiempo de almacenamiento, temperatura), de modo que se pueda concluir si los factores estudiados provocan o no diferencias estadísticamente significativas en el “%Var” anteriormente descrito; el nivel de significatividad que se ha utilizado en todos los casos es del 95%. Los factores estudiados, así como los niveles de cada uno de ellos se muestran en la *tabla 19*.

Tabla 19. Factores y niveles de los mismos estudiados mediante ANOVA.

Factor	Nivel	Abrev.
Tipo de muestra	Líquida	LIQ
	Liofilizada	LIOF
Temperatura	Temperatura ambiente	RT
	5°C	5°C
	-20°C	-20°C
Tiempo de almacenamiento	Referencia inicial	0 M
	2 meses	2 M
	4 meses	4 M
	6 meses	6 M
	12 meses	12 M
Tratamiento	Sin aditivos	NoAd
	Inhibidor 1 mM	1 mM
	Inhibidor 10 mM	10 mM
	Antioxidante 0,01%	0,01%
	Antioxidante 0,05%	0,05%
	Inhibidor 10mM + Antioxidante 0,05%	I+B

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 EXTRACTOS LÍQUIDOS ETANÓLICOS DE SOJA

4.1.1 Composición del extracto líquido etanólico de soja

El análisis mediante HPLC-DAD del extracto etanólico de soja presenta el perfil que se muestra en la *figura 30* a una longitud de onda de 254 nm. Se muestra el cromatograma de isoflavonas del extracto de soja líquida inicial obtenido por el método de extracción descrito en el apartado 3.3.1. Las 9 isoflavonas que se detectan son daidzina (Di), glicitina (Gly), genistina (Gi), malonil daidzina (MDi), malonil glicitina (MGly), malonil genistina (MGi), daidzeína (De), gliciteína (Gle) y genisteína (Ge), en concentraciones que se encuentran en la *tabla 20*. En la *figura 31* se muestran sus correspondientes espectros de UV.

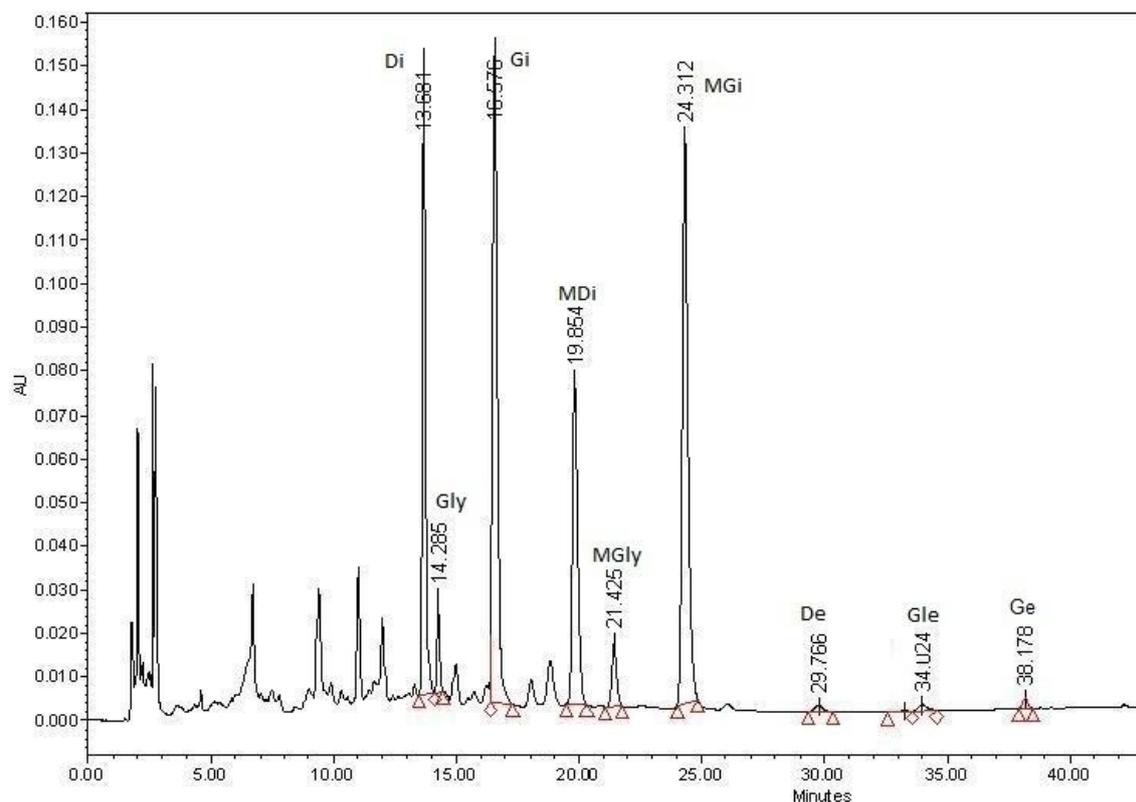


Figura 30. Cromatograma del extracto etanólico de isoflavonas de la muestra de soja

Tabla 20. Concentración de las isoflavona en el extracto etanólico inicial de la muestra de soja y su desviación estándar (sd). mg/Kg \pm sd

Isoflavona	Concentración
Di	329 \pm 3,39
Gly	67,0 \pm 0,72
Gi	363 \pm 4,57
MDi	259 \pm 2,60
MGly	59,4 \pm 0,73
MGi	355 \pm 4,69
De	24,9 \pm 0,29
Gle	8,82 \pm 0,06
Ge	29,5 \pm 0,43

Las isoflavonas predominantes en este extracto son los derivados glucósidos y los maloniles. Las agluconas son las especies minoritarias, por lo que los resultados obtenidos para estas especies no serán tan precisos como el resto debido a su baja concentración; las concentraciones de las agluconas se encuentran próximas a los límites de cuantificación en muestras (LOQ_{exptal}, tabla 18).

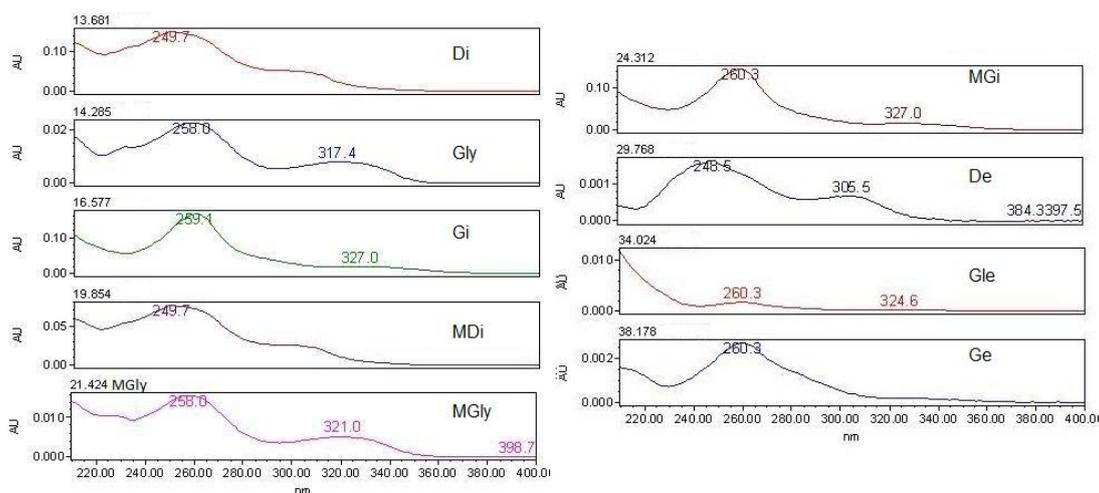


Figura 31. Espectros UV de las isoflavonas detectadas en los extractos etanólicos de soja.

4.1.2 Estudio de la estabilidad de extractos líquidos etanólicos de soja

En primer lugar, se muestran en la *tabla 21* las concentraciones de las isoflavonas detectadas en los extractos etanólicos de soja estudiados.

Tabla 21. Concentración de las isoflavonas estudiadas para los extractos de soja etanólicos en las distintas condiciones; los resultados se dan como mg/Kg ± sd

REFERENCIA	Daidzina	Glicitina	Genistina	Malonil Daidzina	Malonil Glicitina	Malonil Genistina	Daidzeina	Gliciteina	Genisteina	Total
SOJA 1ª	329 ± 3,39	67,0 ± 0,72	363 ± 4,57	259 ± 2,60	59,3 ± 0,73	355 ± 4,69	24,9 ± 0,29	8,82 ± 0,06	29,5 ± 0,43	1496
NoAd	2 M	409 ± 29,8	105 ± 10,5	510 ± 26,5	167 ± 12,4	33,2 ± 1,42	246 ± 19,1	18,7 ± 0,67	11,2 ± 0,98	21,8 ± 0,4
	4 M	461 ± 8,48	115 ± 1,16	585 ± 9,46	96,5 ± 1,60	15,8 ± 1,52	139 ± 6,04	11,9 ± 0,33	7,28 ± 0,08	14,2 ± 1,53
	6 M	474 ± 21,8	101 ± 15,6	646 ± 26,0	29,5 ± 4,19	<LOD	38,9 ± 5,87	13,2 ± 2,90	7,38 ± 0,07	16,7 ± 1,81
	12 M	563 ± 7,08	111 ± 0,69	774 ± 10,9	9,26 ± 1,22	<LOD	3,62 ± 0,12	13,1 ± 1,23	7,38 ± 0,12	16,1 ± 0,14
	2 M	347 ± 20,6	88,9 ± 14,8	410 ± 28,1	217 ± 10,7	44,1 ± 1,52	308 ± 18,5	17,6 ± 1,16	7,80 ± 0,35	20,3 ± 1,32
	4 M	376 ± 22,6	98,1 ± 2,11	460 ± 27,4	176 ± 20,8	35,2 ± 0,50	247 ± 2,61	15,8 ± 1,95	7,51 ± 0,39	19,2 ± 2,10
	6 M	400 ± 23,8	83,0 ± 10,2	524 ± 25,9	88,6 ± 17,7	13,4 ± 1,95	127 ± 1,30	9,31 ± 1,60	7,33 ± 0,01	13,9 ± 1,15
	12 M	418 ± 6,77	75,2 ± 0,44	555 ± 9,71	120 ± 3,24	18,7 ± 0,67	171 ± 2,96	12,1 ± 0,36	7,22 ± 0,36	15,1 ± 0,75
	2 M	325 ± 18,3	73,8 ± 8,93	368 ± 16,7	256 ± 15,2	53,4 ± 3,68	343 ± 17,4	11,9 ± 1,35	8,48 ± 0,47	12,9 ± 0,03
	4 M	325 ± 4,03	89,9 ± 3,78	368 ± 3,68	259 ± 3,37	54,1 ± 1,35	348 ± 4,08	21,8 ± 1,38	7,87 ± 0,29	12,3 ± 1,27
	6 M	303 ± 7,06	59,7 ± 4,13	367 ± 12,1	238 ± 1,85	49,4 ± 2,39	332 ± 4,13	21,0 ± 1,34	7,99 ± 0,04	11,6 ± 0,17
	12 M	311 ± 3,47	53,1 ± 0,71	379 ± 1,50	249 ± 4,38	46,2 ± 2,26	341 ± 6,14	18,2 ± 0,78	7,82 ± 0,07	11,6 ± 0,12
1 mM	2 M	448 ± 27,9	108 ± 15,8	529 ± 20,0	181 ± 12,5	36,3 ± 2,35	257 ± 19,9	18,6 ± 2,15	11,0 ± 0,87	22,3 ± 1,22
	4 M	494 ± 0,67	125 ± 14,6	602 ± 3,81	103 ± 0,33	18,2 ± 0,32	144 ± 3,74	12,1 ± 1,48	7,34 ± 0,03	14,7 ± 1,56
	6 M	492 ± 12,0	101 ± 11,6	645 ± 13,6	28,4 ± 5,68	0,50 ± 1,75	41,5 ± 1,00	13,8 ± 1,90	7,55 ± 0,17	17,7 ± 1,58
	12 M	606 ± 3,20	116 ± 1,70	812 ± 2,09	9,87 ± 1,40	<LOD	4,34 ± 0,94	12,5 ± 1,49	7,67 ± 0,06	18,2 ± 0,31
	2 M	371 ± 31,2	91,2 ± 4,92	429 ± 25,8	233 ± 13,0	47,8 ± 2,40	324 ± 23,3	18,2 ± 1,15	8,08 ± 0,61	20,3 ± 1,24
	4 M	409 ± 25,6	78,0 ± 17,8	470 ± 20,1	193 ± 17,8	37,9 ± 3,13	265 ± 23,0	17,3 ± 1,05	7,47 ± 0,08	19,7 ± 1,62
	6 M	389 ± 9,71	79,7 ± 0,83	487 ± 16,8	161 ± 2,39	28,3 ± 2,06	229 ± 4,37	14,9 ± 0,56	7,64 ± 0,18	19,3 ± 2,75
	12 M	448 ± 0,69	79,5 ± 0,77	579 ± 2,00	132 ± 0,75	21,3 ± 0,67	184 ± 1,59	14,2 ± 0,59	7,71 ± 0,03	17,1 ± 1,08
	2 M	330 ± 22,6	73,5 ± 7,21	368 ± 17,4	255 ± 11,2	54,4 ± 4,14	344 ± 16,5	16,7 ± 0,48	8,17 ± 0,76	18,0 ± 2,92
	4 M	325 ± 8,36	85,7 ± 1,18	370 ± 9,36	262 ± 2,93	53,3 ± 1,27	349 ± 5,44	22,4 ± 1,98	8,03 ± 0,10	27,0 ± 0,09
	6 M	304 ± 7,40	60,0 ± 3,40	363 ± 16,5	239 ± 4,79	48,0 ± 0,06	332 ± 5,62	20,3 ± 0,32	7,88 ± 0,05	26,3 ± 0,81
	12 M	311 ± 4,81	51,2 ± 1,59	383 ± 1,01	251 ± 2,16	46,7 ± 1,37	346 ± 8,09	21,5 ± 1,79	7,78 ± 0,03	26,9 ± 0,24
10 mM	2 M	437 ± 23,0	107 ± 0,62	517 ± 26,8	174 ± 5,68	35,4 ± 1,59	247 ± 16,6	19,7 ± 1,19	8,23 ± 0,21	22,7 ± 1,45
	4 M	494 ± 5,26	132 ± 7,21	600 ± 14,2	106 ± 0,21	18,4 ± 2,34	145 ± 1,53	13,7 ± 0,26	7,37 ± 0,26	15,7 ± 1,54
	6 M	557 ± 2,22	112 ± 0,07	737 ± 2,77	36,2 ± 3,09	2,21 ± 1,64	50,2 ± 1,39	17,3 ± 0,62	7,65 ± 0,10	21,5 ± 0,61
	12 M	608 ± 3,29	115 ± 0,41	814 ± 3,74	10,6 ± 1,46	<LOD	6,26 ± 1,21	15,1 ± 1,72	7,82 ± 0,26	20,0 ± 0,49
	2 M	364 ± 21,0	98,3 ± 6,77	421 ± 35,3	230 ± 13,9	47,8 ± 2,20	317 ± 2,46	19,3 ± 0,28	8,03 ± 0,19	22,3 ± 1,77
	4 M	393 ± 23,2	56,0 ± 19,1	464 ± 31,8	200 ± 2,86	42,0 ± 1,16	276 ± 3,66	19,0 ± 0,26	7,74 ± 0,18	23,6 ± 1,73
	6 M	327 ± 28,5	63,8 ± 18,5	402 ± 29,8	137 ± 19,6	23,3 ± 6,15	193 ± 4,86	12,6 ± 1,04	7,45 ± 0,18	15,6 ± 1,96
	12 M	445 ± 9,55	79,7 ± 1,98	570 ± 7,84	134 ± 0,93	22,0 ± 0,78	185 ± 3,53	15,3 ± 1,63	7,87 ± 0,00	20,1 ± 1,32
	2 M	307 ± 24,1	74,2 ± 6,14	344 ± 20,4	239 ± 12,9	50,2 ± 2,89	323 ± 14,2	14,0 ± 1,56	7,74 ± 0,03	16,3 ± 1,88
	4 M	330 ± 2,47	86,3 ± 1,82	372 ± 4,17	259 ± 0,13	55,1 ± 0,80	350 ± 0,26	22,0 ± 2,25	7,88 ± 0,20	25,5 ± 1,16
	6 M	255 ± 20,9	47,6 ± 9,66	293 ± 23,8	205 ± 17,8	40,2 ± 11,0	279 ± 6,82	16,6 ± 1,19	7,67 ± 0,29	22,3 ± 1,78
	12 M	311 ± 2,72	51,2 ± 2,91	384 ± 6,32	251 ± 0,20	47,2 ± 0,95	345 ± 1,77	20,9 ± 2,41	7,75 ± 0,10	26,8 ± 0,82

Tabla 21 (cont.). Concentración de las isoflavonas estudiadas para los extractos de soja etanólicos en las distintas condiciones; los resultados se dan como mg/Kg \pm sd

REFERENCIA SOJA ^{2a}	Daidzina	Glicitina	Genistina	Malonil Daidzina	Malonil Glicitina	Malonil Genistina	Daidzeína	Gliciteína	Genisteína	Total
	2M	443 \pm 15,5	118 \pm 10,8	510 \pm 19,0	182 \pm 1,27	36,2 \pm 0,45	247 \pm 0,06	17,4 \pm 2,44	8,56 \pm 0,57	20,5 \pm 2,66
4M	349 \pm 21,1	88,3 \pm 15,3	423 \pm 27,6	106 \pm 11,0	16,5 \pm 2,97	143 \pm 4,33	9,75 \pm 1,56	7,17 \pm 0,34	14,3 \pm 1,70	1157
6M	558 \pm 8,69	119 \pm 2,14	737 \pm 14,9	30,8 \pm 0,67	<LOD	42,8 \pm 0,85	14,9 \pm 0,05	7,60 \pm 0,17	19,4 \pm 0,02	1529
12M	611 \pm 0,20	115 \pm 1,57	805 \pm 4,55	11,1 \pm 0,24	1,02 \pm 0,44	3,97 \pm 0,08	14,3 \pm 0,12	7,36 \pm 0,04	16,1 \pm 0,59	1585
2M	384 \pm 22,5	91,5 \pm 3,16	421 \pm 23,1	239 \pm 16,6	50,7 \pm 3,71	325 \pm 23,4	18,6 \pm 0,37	8,56 \pm 0,48	21,4 \pm 1,15	1559
4M	325 \pm 26,1	92,3 \pm 15,5	375 \pm 29,3	132 \pm 10,6	23,1 \pm 2,35	178 \pm 14,5	10,6 \pm 0,51	7,09 \pm 0,20	13,1 \pm 2,90	1157
6M	384 \pm 1,83	80,2 \pm 0,07	469 \pm 9,91	162 \pm 7,18	29,4 \pm 2,03	236 \pm 2,46	11,5 \pm 1,45	7,39 \pm 0,29	14,6 \pm 0,51	1394
12M	450 \pm 2,70	80,8 \pm 1,30	555 \pm 0,93	133 \pm 2,21	21,5 \pm 0,22	187 \pm 0,51	10,7 \pm 0,26	7,34 \pm 0,28	14,5 \pm 1,11	1460
2M	331 \pm 3,20	80,2 \pm 7,07	364 \pm 1,51	256 \pm 3,27	55,0 \pm 0,37	337 \pm 9,16	12,9 \pm 1,05	8,28 \pm 0,56	13,6 \pm 1,31	1459
4M	305 \pm 22,1	73,7 \pm 12,0	348 \pm 22,0	245 \pm 22,7	48,7 \pm 3,28	326 \pm 3,22	19,7 \pm 1,50	7,76 \pm 0,14	25,7 \pm 1,85	1400
6M	297 \pm 1,88	59,7 \pm 0,96	357 \pm 6,27	243 \pm 2,42	49,0 \pm 1,50	337 \pm 3,95	19,4 \pm 0,03	7,96 \pm 0,02	27,1 \pm 0,07	1397
12M	312 \pm 3,97	53,0 \pm 3,08	379 \pm 10,6	249 \pm 0,55	48,3 \pm 0,95	342 \pm 4,26	18,3 \pm 2,92	7,77 \pm 0,15	27,4 \pm 0,54	1437
2M	454 \pm 21,5	104 \pm 10,9	525 \pm 35,6	186 \pm 2,63	36,5 \pm 1,57	252 \pm 4,69	19,0 \pm 1,24	8,57 \pm 0,73	22,1 \pm 1,08	1607
4M	362 \pm 20,5	92,4 \pm 16,0	432 \pm 26,2	111 \pm 9,61	18,1 \pm 1,66	149 \pm 12,8	10,5 \pm 0,89	7,19 \pm 0,60	15,3 \pm 1,39	1197
6M	560 \pm 10,1	117 \pm 3,00	739 \pm 11,9	29,5 \pm 2,05	0,03 \pm 0,07	42,1 \pm 1,34	14,4 \pm 0,64	7,62 \pm 0,21	18,5 \pm 0,70	1528
12M	608 \pm 0,38	112 \pm 4,27	805 \pm 8,78	9,09 \pm 1,37	<LOD	4,05 \pm 0,64	15,2 \pm 0,27	7,34 \pm 0,02	16,3 \pm 0,84	1575
2M	372 \pm 23,4	95,8 \pm 2,88	417 \pm 33,8	236 \pm 6,13	49,7 \pm 1,44	318 \pm 12,0	17,3 \pm 1,00	8,37 \pm 0,63	19,4 \pm 1,39	1533
4M	372 \pm 6,78	95,9 \pm 4,18	432 \pm 33,2	140 \pm 8,71	24,9 \pm 20,6	191 \pm 11,2	8,18 \pm 1,58	7,13 \pm 0,19	11,1 \pm 1,21	1282
6M	384 \pm 0,70	79,5 \pm 0,22	472 \pm 0,61	167 \pm 0,35	29,7 \pm 0,19	235 \pm 0,74	10,4 \pm 0,05	7,47 \pm 0,02	14,4 \pm 0,59	1400
12M	442 \pm 5,46	77,2 \pm 0,87	557 \pm 3,60	130 \pm 0,85	19,5 \pm 1,48	183 \pm 2,08	12,6 \pm 0,43	7,30 \pm 0,44	14,0 \pm 0,99	1443
2M	325 \pm 3,30	80,1 \pm 1,36	360 \pm 0,54	256 \pm 1,09	54,9 \pm 1,81	337 \pm 3,32	13,0 \pm 1,60	8,43 \pm 0,61	15,2 \pm 1,73	1450
4M	293 \pm 26,4	77,4 \pm 19,1	330 \pm 24,3	235 \pm 4,19	47,6 \pm 4,49	314 \pm 5,05	19,6 \pm 0,58	7,78 \pm 0,28	25,0 \pm 1,96	1349
6M	297 \pm 1,95	59,7 \pm 0,12	356 \pm 5,62	242 \pm 1,88	48,8 \pm 1,31	336 \pm 1,70	20,2 \pm 0,67	7,79 \pm 0,12	27,2 \pm 0,49	1395
12M	310 \pm 6,71	52,8 \pm 0,89	375 \pm 7,46	246 \pm 0,85	48,0 \pm 0,49	339 \pm 2,50	20,3 \pm 0,29	7,71 \pm 0,39	27,7 \pm 0,19	1427
2M	447 \pm 25,9	107 \pm 10,2	516 \pm 35,7	188 \pm 16,1	37,8 \pm 2,60	252 \pm 15,7	20,5 \pm 0,62	8,77 \pm 0,68	24,5 \pm 1,39	1601
4M	393 \pm 14,7	100 \pm 12,2	472 \pm 18,6	128 \pm 3,68	24,2 \pm 1,79	175 \pm 4,56	11,4 \pm 1,52	7,29 \pm 0,45	14,1 \pm 1,14	1324
6M	543 \pm 17,1	113 \pm 0,41	721 \pm 23,9	32,1 \pm 0,82	0,64 \pm 0,08	47,9 \pm 2,13	15,3 \pm 0,85	7,37 \pm 0,13	20,6 \pm 1,13	1501
12M	606 \pm 2,82	113 \pm 2,13	802 \pm 9,02	11,6 \pm 0,98	1,55 \pm 0,99	7,10 \pm 0,44	14,0 \pm 0,89	7,73 \pm 0,03	19,2 \pm 1,55	1582
2M	374 \pm 28,4	91,5 \pm 2,35	423 \pm 35,1	240 \pm 16,9	50,5 \pm 2,56	320 \pm 24,9	18,0 \pm 1,03	8,58 \pm 0,40	19,9 \pm 1,27	1545
4M	318 \pm 23,1	83,9 \pm 17,9	370 \pm 24,6	128 \pm 10,1	23,7 \pm 2,10	170 \pm 13,8	9,45 \pm 0,46	7,13 \pm 0,41	13,7 \pm 1,55	1124
6M	379 \pm 11,0	77,4 \pm 0,72	469 \pm 19,7	160 \pm 2,72	29,1 \pm 1,03	225 \pm 7,79	13,2 \pm 1,07	7,41 \pm 0,16	17,5 \pm 1,55	1377
12M	451 \pm 5,04	77,3 \pm 5,81	562 \pm 14,2	130 \pm 0,22	22,3 \pm 0,90	182 \pm 1,73	14,7 \pm 1,03	7,42 \pm 0,13	18,1 \pm 2,03	1465
2M	332 \pm 2,85	76,8 \pm 1,95	363 \pm 2,37	259 \pm 0,88	55,5 \pm 0,54	348 \pm 0,35	20,2 \pm 1,53	8,72 \pm 0,13	22,4 \pm 2,80	1485
4M	296 \pm 20,3	75,4 \pm 12,4	333 \pm 27,9	233 \pm 3,30	47,7 \pm 6,23	314 \pm 4,94	20,3 \pm 1,75	7,81 \pm 0,20	26,0 \pm 2,68	1352
6M	298 \pm 0,40	59,7 \pm 2,00	359 \pm 4,38	243 \pm 0,92	48,9 \pm 0,98	337 \pm 0,59	20,2 \pm 0,18	7,90 \pm 0,03	27,2 \pm 0,43	1401
12M	314 \pm 0,55	52,2 \pm 2,37	381 \pm 16,7	249 \pm 7,23	48,6 \pm 1,57	344 \pm 9,33	19,2 \pm 1,44	7,72 \pm 0,01	27,4 \pm 1,45	1442

A partir de los resultados obtenidos mediante análisis de la varianza (ANOVA) se puede decir que no hay diferencias estadísticamente significativas, con un nivel de confianza del 95%, en la concentración total de isoflavonas, independientemente de las condiciones de almacenamiento empleadas, por lo que podemos afirmar que durante un año no hay pérdidas en la cantidad total de isoflavonas en los extractos estudiados.

Sin embargo, sí se observan cambios en las concentraciones individuales de las isoflavonas, por lo que tal y como se ha explicado en la introducción de este capítulo, las isoflavonas presentes en los extractos no se degradan, sino que se interconvierten entre sí.

Para ver qué factor o factores son los responsables de que existan diferencias significativas en los “%Var” de las distintas especies, se realizó un análisis de la varianza para los tres factores a estudiar: temperatura, tiempo de almacenamiento y tratamiento realizado. El nivel de confianza del estudio fue de nuevo del 95% ($p < 0,05$).

Los resultados obtenidos en el estudio ANOVA, para cada isoflavona, teniendo en cuenta cada uno de los factores, se muestra en la *tabla 22*. Cuando el factor a estudiar tiene efecto significativo ($p < 0,05$) sobre la variación de concentración de esa isoflavona, se muestra el resultado sombreado en azul.

Tabla 22. Resultados del ANOVA de 3 factores para cada una de las isoflavonas objeto de estudio en los extractos etanólicos de soja.

Isoflavona	Factores					
	Temperatura almacenamiento		Tiempo almacenamiento		Tratamiento	
	F	Sig.	F	Sig.	F	Sig.
Di	1406	0,00	102	0,00	21,6	0,00
Gly	183	0,00	14,8	0,00	2,99	0,02
Gi	1186	0,00	166	0,00	3,47	0,01
MDi	8932	0,00	1581	0,00	36,3	0,00
MGLy	423	0,00	76,6	0,00	2,31	0,05
MGi	2093	0,00	377	0,00	15,3	0,00
De	19,8	0,00	1,51	0,22	116	0,00
Gle	2,78	0,07	13,3	0,00	0,50	0,79
Ge	22,6	0,00	0,22	0,88	124	0,00

Tal y como se desprende de los resultados del estudio ANOVA, el tiempo de almacenamiento ejerce un efecto estadísticamente significativo en la variación de concentración de todas las isoflavonas estudiadas, excepto de daidzeína y genisteína. El tratamiento (adición de BHT y/o de inhibidor enzimático) realizado al extracto también tiene efecto para prácticamente todas las isoflavonas, excepto para malonil glicitina y gliciteína. En el caso de la temperatura, a priori uno de los más influyentes independientemente de los resultados estadísticos realizados, se observa que tiene

efecto ($p < 0,05$) para todas las isoflavonas estudiadas menos para gliciteína. Para determinar entre qué niveles del factor temperatura se producen esas diferencias significativas, se ha realizado el test de la mínima diferencia significativa (LSD); los resultados de esta prueba se muestran en la *tabla 23*.

Tabla 23. Resultados del test de la mínima diferencia significativa comparando los distintos niveles del factor temperatura ($p < 0,05$) para los extractos etanólicos de soja.

Isoflavona	Temperatura	Temperatura	Sig.
Di	RT	5°C	0,00
		-20°C	0,00
	-20°C	5°C	0,00
Gly	RT	5°C	0,00
		-20°C	0,00
	-20°C	5°C	0,00
Gi	RT	5°C	0,00
		-20°C	0,00
	-20°C	5°C	0,00
MDi	RT	5°C	0,00
		-20°C	0,00
	-20°C	5°C	0,00
MGly	RT	5°C	0,00
		-20°C	0,00
	-20°C	5°C	0,00
MGi	RT	5°C	0,00
		-20°C	0,00
	-20°C	5°C	0,00
De	RT	5°C	0,06
		-20°C	0,00
	-20°C	5°C	0,00
Gle	RT	5°C	0,20
		-20°C	0,29
	-20°C	5°C	0,02
Ge	RT	5°C	0,02
		-20°C	0,00
	-20°C	5°C	0,00

Como se observa en la tabla, para la mayoría de las isoflavonas existen variaciones significativas ($p < 0,05$) entre todas las temperaturas estudiadas. Uniendo estos resultados junto con los presentados en la *tabla 21*, podemos decir que los glucósidos (Di, Gly y Gi) aumentan su concentración cuando la temperatura de almacenamiento es mayor, y que ocurre lo contrario en el caso de los derivados malonil, lo que indica una posible interconversión entre maloniles y glucósidos favorecida por temperaturas mayores.

En el caso de la gliciteína no se observan diferencias significativas entre las distintas temperaturas; para la daidzeína no se observan diferencias significativas entre RT y 5°C, pero el almacenamiento a -20°C, evita la degradación que se observa a temperatura ambiente y a 5°C.

En este contexto, se estudió de forma más exhaustiva qué ocurre con cada uno de los factores realizando el estudio estadístico de los datos para cada una de las condiciones estudiadas.

4.1.3 Efecto de la temperatura

De todos los factores estudiados la temperatura es la que más afecta al perfil y concentración de las isoflavonas. En la *figura 32* se muestra la variación de la concentración media de las distintas formas de isoflavonas estudiadas a lo largo del tiempo de almacenamiento, a cada una de las temperaturas estudiadas, en el extracto identificado en la *figura 25* como NoAd.

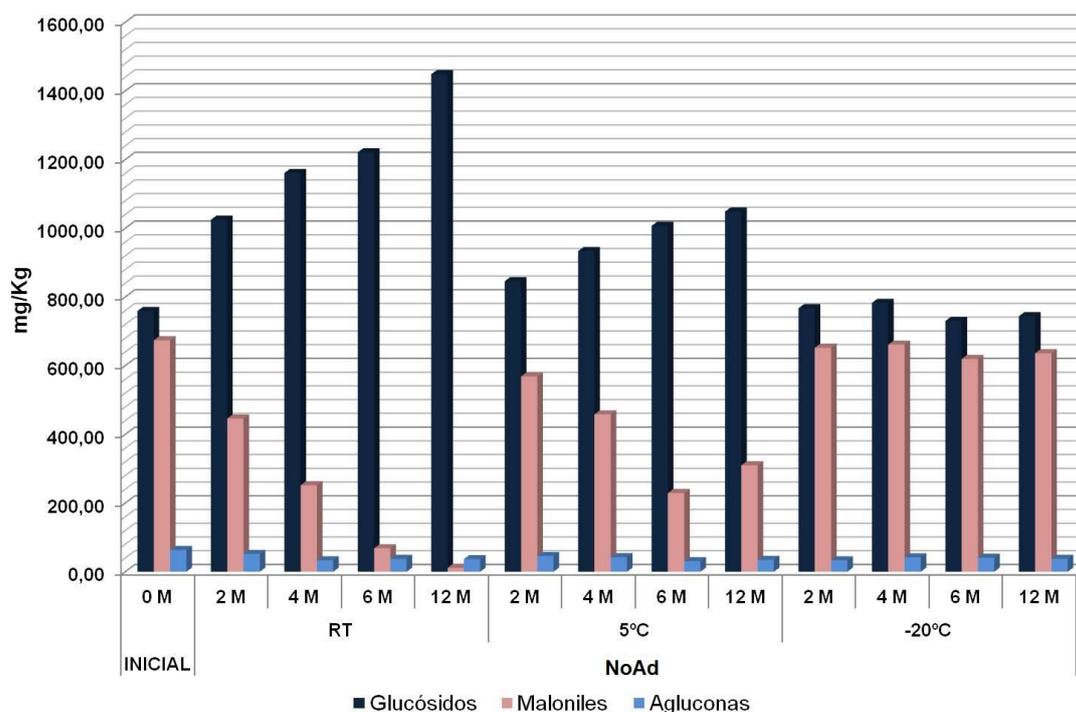


Figura 32. Variación en la concentración media de las distintas formas de isoflavonas estudiadas a distintos tiempos de almacenamiento y a las distintas temperaturas para el extracto etanólico de soja sin aditivos (NoAd).

En el extracto sin aditivos, a temperatura ambiente (RT), la concentración de glucósidos aumenta hasta un 91% en los doce meses de almacenamiento y lo contrario se observa para los maloniles, hecho que se puede explicar considerando una posible interconversión de los maloniles que pasan a glucósidos. En cambio para las agluconas, se observa una ligera disminución con el paso del tiempo independientemente de la temperatura de almacenamiento; sin embargo, no se

observa tendencia clara de la variación frente a la referencia inicial. En la *tabla 24*, se muestra el análisis de la varianza de dos factores, temperatura y tiempo de almacenamiento, para el extracto NoAd.

Tabla 24. ANOVA de dos factores para el extracto etanólico de soja NoAd.

Isoflavona	NoAd			
	Factores			
	Temperatura almacenamiento		Tiempo almacenamiento	
	F	Sig.	F	Sig.
Di	128	0,00	14,0	0,00
Gly	109	0,00	18,1	0,00
Gi	65,6	0,00	10,5	0,00
MDi	976	0,00	138	0,00
MGly	381	0,00	56,3	0,00
MGi	70,3	0,00	15,4	0,00
De	1,36	0,29	0,60	0,63
Gle	0,79	0,48	2,30	0,13
Ge	2,36	0,14	0,79	0,52

Este estudio demuestra que para las agluconas no hay diferencias significativas entre las distintas temperaturas y tiempos de almacenamiento, por lo que podemos decir que las agluconas no se ven afectadas significativamente por las reacciones de interconversión o degradación posibles. Además su concentración es baja y en algunos casos se encuentran por debajo del límite de cuantificación experimental mostrado en la *tabla 18*, lo que puede llevar a errores asociados a su cuantificación. Teniendo en cuenta lo anterior, se decide no tener en cuenta en esta discusión su variación individual.

En los extractos almacenados a 5°C, el efecto observado a temperatura ambiente se reduce a la mitad. Los glucósidos aumentan y las formas malonil disminuyen, siendo los valores de aumento o disminución la mitad que los observados a temperatura ambiente; esto ocurre a todos los tiempos de almacenamiento considerados. A -20°C, se conservan tanto glucósidos como maloniles hasta los 12 meses, por lo que a esta temperatura se consiguen evitar las reacciones de interconversión entre maloniles y glucósidos. Por lo que respecta a la conservación de la concentración global de cada una de las formas de isoflavonas estudiadas, podemos decir que a -20°C, es posible conservarlas almacenadas hasta 12 meses.

El tiempo de almacenamiento tiene efecto significativo para los derivados glucósido y los maloniles.

El % de variación con respecto el valor de referencia (al comienzo del estudio, 0 meses) para cada isoflavona, forma glucósido y forma malonil, en cada periodo de tiempo y temperatura, se muestra en la *figura 33*.

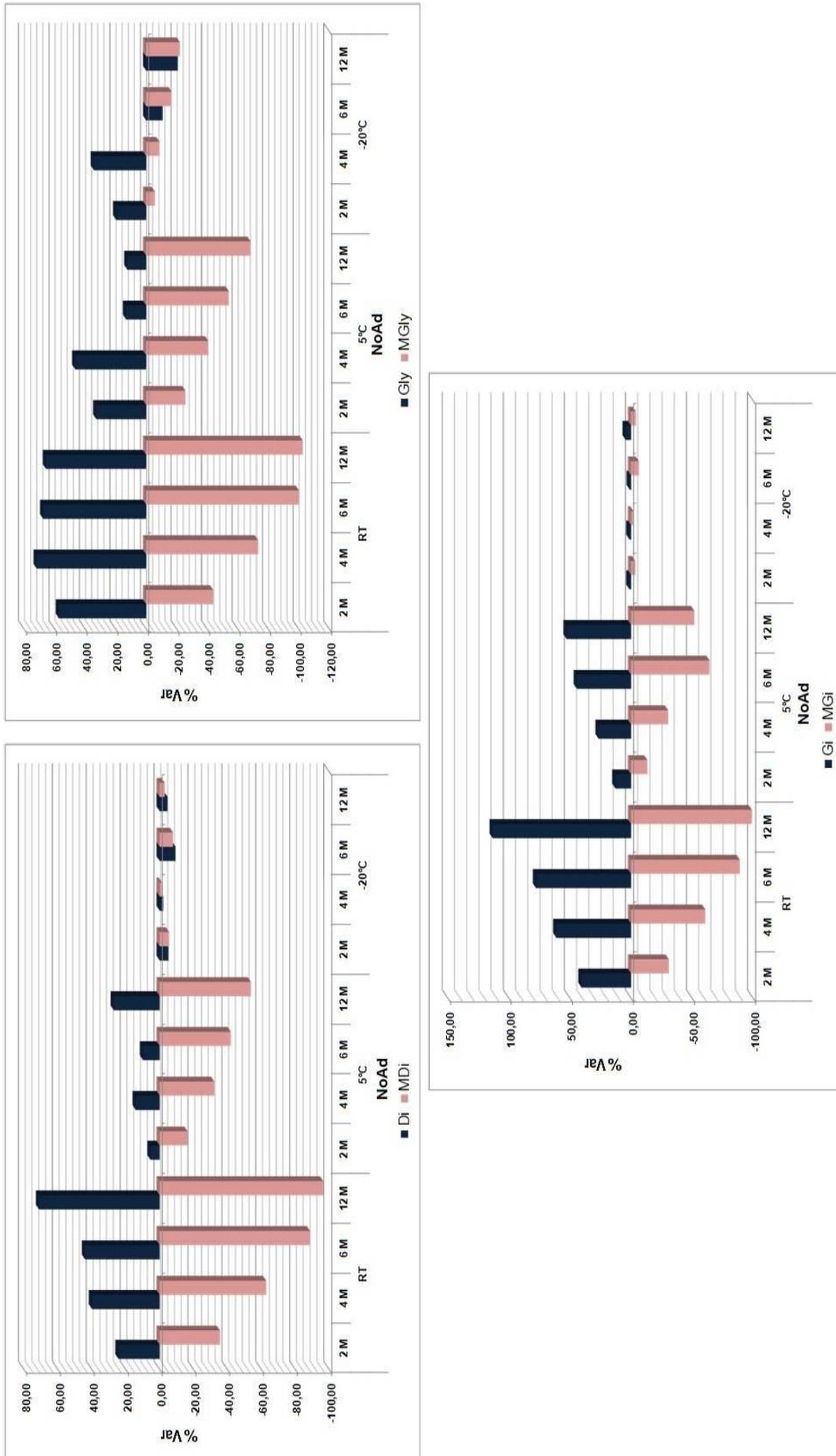


Figura 33. % Variación de cada isoflavona en cada periodo de tiempo y temperatura para los extractos etanólicos de soja sin aditivos, NoAd.

De entre todas las isoflavonas estudiadas se observa que los derivados de gliciteína son más lábiles que los derivados de daidzeína o genisteína, siendo menor el efecto de ralentización de las reacciones de interconversión al disminuir la temperatura. Esto confirma lo observado en la bibliografía [59], donde se afirma que los derivados de gliciteína son los más lábiles frente a los de daidzeína y los de genisteína. En el caso de los derivados de gliciteína a -20°C se produce la interconversión del derivado de malonil glicitina a glicitina hasta los 6 meses de almacenamiento, observando diferencias significativas en sus concentraciones hasta ese tiempo, siendo constante esa variación desde los 6 hasta los 12 meses. En cambio para los derivados de genisteína y daidzeína a -20°C no hay interconversión, es decir, se conservan.

En general, a menor temperatura de almacenamiento, mayor conservación del perfil de isoflavonas en los extractos estudiados, siendo -20°C la temperatura idónea para conservar el perfil inicial, al menos, para derivados de daidzeína y genisteína.

4.1.4 Efecto de la adición de un inhibidor de β -glucosidasa

En la *figura 34* se puede observar el comportamiento de cada forma de isoflavona en el tiempo, cuando se añaden al extracto distintas concentraciones del inhibidor de β -glucosidasa, a las distintas temperaturas de almacenamiento.

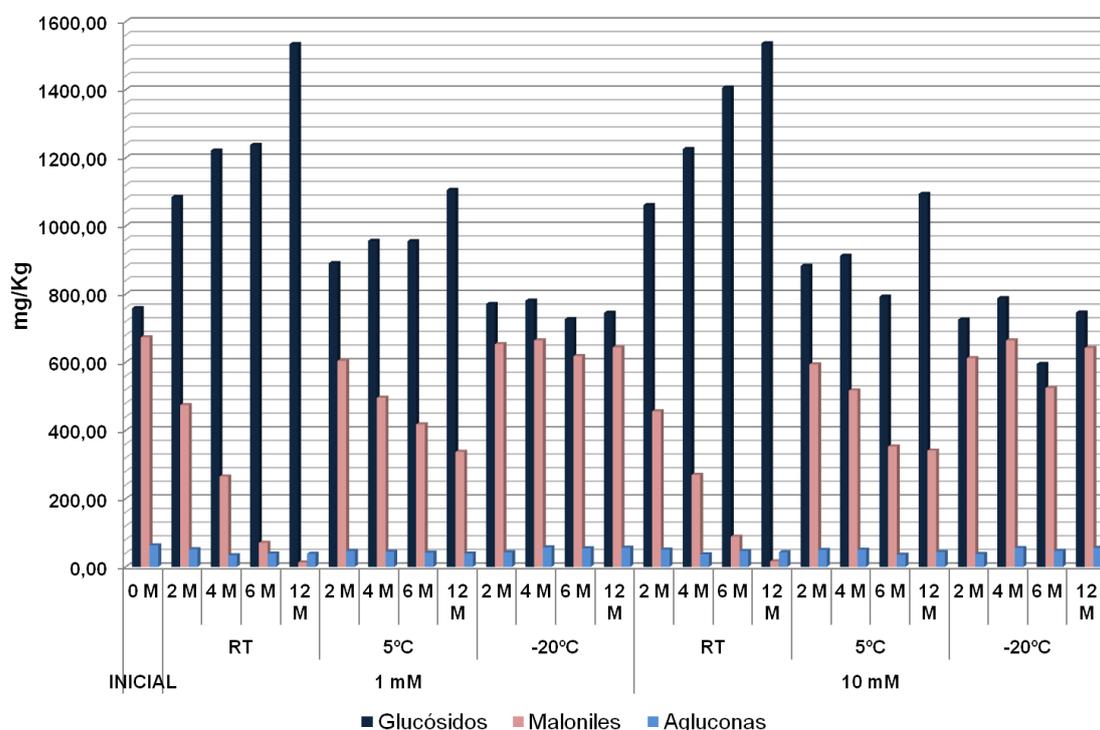


Figura 34. Variación en la concentración media de las distintas formas de isoflavonas a distintos tiempos de almacenamiento y distintas temperaturas para el extracto etanólico de soja con inhibidor de β -glucosidasa (1 mM y 10 mM).

No existen diferencias significativas entre las dos concentraciones de aditivo (1 mM o 10 mM) adicionadas. Como ocurría en el caso del extracto sin aditivos, no se observan en las agluconas diferencias significativas en los diferentes tiempos de almacenamiento y a las distintas temperaturas estudiadas; sí que existen variaciones significativas en los derivados. A temperatura ambiente (RT) se produce, a partir de los 2 meses de almacenamiento, un aumento de los glucósidos, que alcanzan el doble de su concentración inicial pasados 12 meses; este aumento, debido a la interconversión de formas, supone la reducción a la mitad de las formas malonil.

A 5°C se reducen estas reacciones de interconversión a la mitad, como ocurría en el extracto sin aditivos (NoAd) y a -20°C se conservan las concentraciones totales hasta pasados 12 meses. Por lo tanto, de estos datos se puede deducir que la adición de un inhibidor de β -glucosidasa no tiene ningún efecto en la conservación de los extractos de isoflavonas de soja, ya que los efectos observados son los debidos a la temperatura de almacenamiento. Esta observación podría significar que las reacciones de interconversión que se observan no son reacciones catalizadas por las enzimas β -glucosidasas, lo que no es inesperado puesto que la actividad máxima de estas enzimas se da a 45°C [43].

El resultado del análisis de la varianza de dos factores para estos extractos, cuyo aditivo es el inhibidor de β -glucosidasas, se muestra en la tabla 25.

Tabla 25. ANOVA de dos factores para los extractos etanólicos de soja 1 mM y 10 mM de inhibidor.

Isoflavona	1 mM de inhibidor				10 mM de inhibidor			
	Factores				Factores			
	Temperatura almacenamiento		Tiempo almacenamiento		Temperatura almacenamiento		Tiempo almacenamiento	
	F	Sig.	F	Sig.	F	Sig.	F	Sig.
Di	70,6	0,00	5,98	0,01	491	0,00	39,1	0,00
Gly	103	0,00	23,4	0,00	260	0,00	49,9	0,00
Gi	73,4	0,00	11,2	0,00	527	0,00	76,6	0,00
MDi	1012	0,00	174	0,00	1612	0,00	259	0,00
MGly	974	0,00	185	0,00	148	0,00	37,7	0,00
MGi	650	0,00	121	0,00	1101	0,00	180	0,00
De	2,72	0,11	0,23	0,88	0,96	0,41	0,09	0,96
Gle	0,46	0,66	2,01	0,17	0,78	0,48	9,91	0,00
Ge	2,73	0,11	0,09	0,97	0,90	0,43	0,15	0,93

Tal y como ocurría para el extracto sin aditivos (NoAd) las agluconas no se ven afectadas por los dos factores estudiados ($p > 0,05$), excepto la variación de concentración de la gliciteína que se ve afectada significativamente debido al tiempo de almacenamiento. Sin embargo, este resultado puede no ser del todo consistente puesto que su concentración en el extracto se encuentra próxima a su límite de cuantificación en la muestra. Estas variaciones individuales se pueden comprobar en la figura 35, que muestra el % de variación para cada isoflavona.

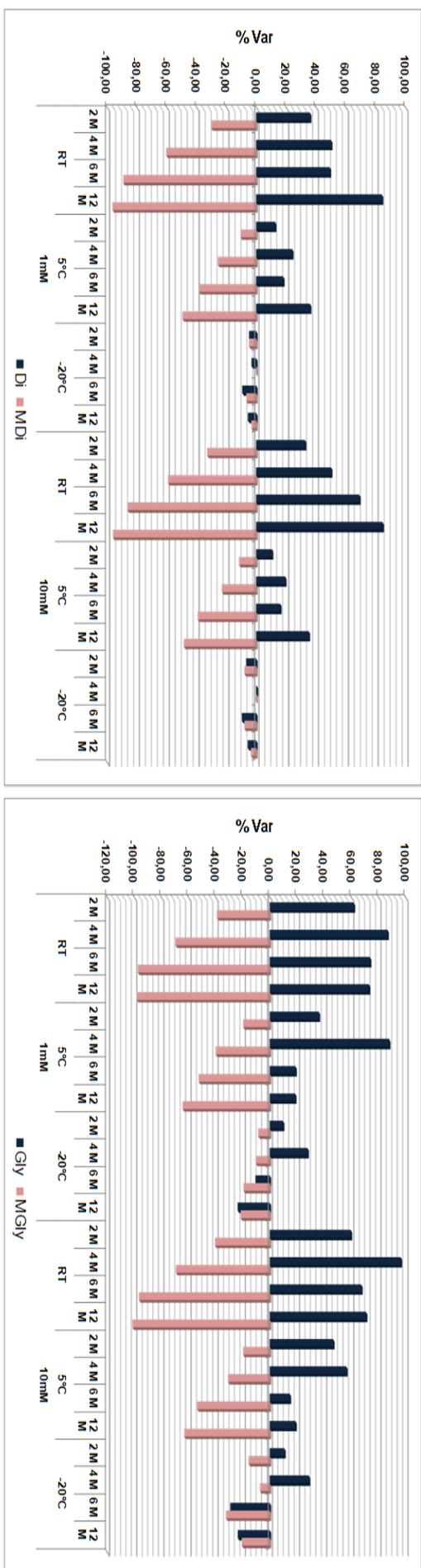


Figura 35 % Variación de cada isoflavona en cada periodo de tiempo y a las distintas temperaturas para los extractos etanólicos de soja con Inhibidor.

Para cada una de las isoflavonas se observa que no hay diferencias entre la adición de una concentración 1 mM ó 10 mM. Al igual que para los extractos sin aditivos (NoAd) y los descritos en la bibliografía [57, 59], se observa que los derivados de gliciteína son más lábiles que los derivados de daidzeína o genisteína; a -20°C se produce la interconversión de la malonil glicitina a glicitina hasta los 6 meses de almacenamiento, observando diferencias significativas en sus concentraciones hasta ese tiempo, siendo constante esa variación desde los 6 hasta los 12 meses en cambio, para los derivados de daidzeína y genisteína, no se observa este efecto.

Con todo lo anterior, podemos concluir que la adición del inhibidor D-(+)-glucono- δ -lactona, no afecta a la estabilidad de las isoflavonas, observándose de nuevo que los efectos medidos son debidos a la temperatura.

4.1.5 Efecto de la adición de un antioxidante

Con lo visto en la bibliografía, y lo que hemos deducido a partir de los resultados obtenidos hasta el momento, las reacciones de interconversión y degradación de las distintas formas de isoflavonas son reacciones de pérdida de grupos con oxígeno, por lo que son reacciones de oxidación-reducción. Para evitar este tipo de reacciones se adicionó a los extractos un antioxidante como es el 6-di-*tert*-butil-4-metilfenol (BHT). En la *figura 36* se puede observar el comportamiento de cada forma de isoflavona cuando al extracto etanólico se le adicionan distintas concentraciones (0,01% y 0,05%) del antioxidante y dichos extractos se almacenan a distintas temperaturas.

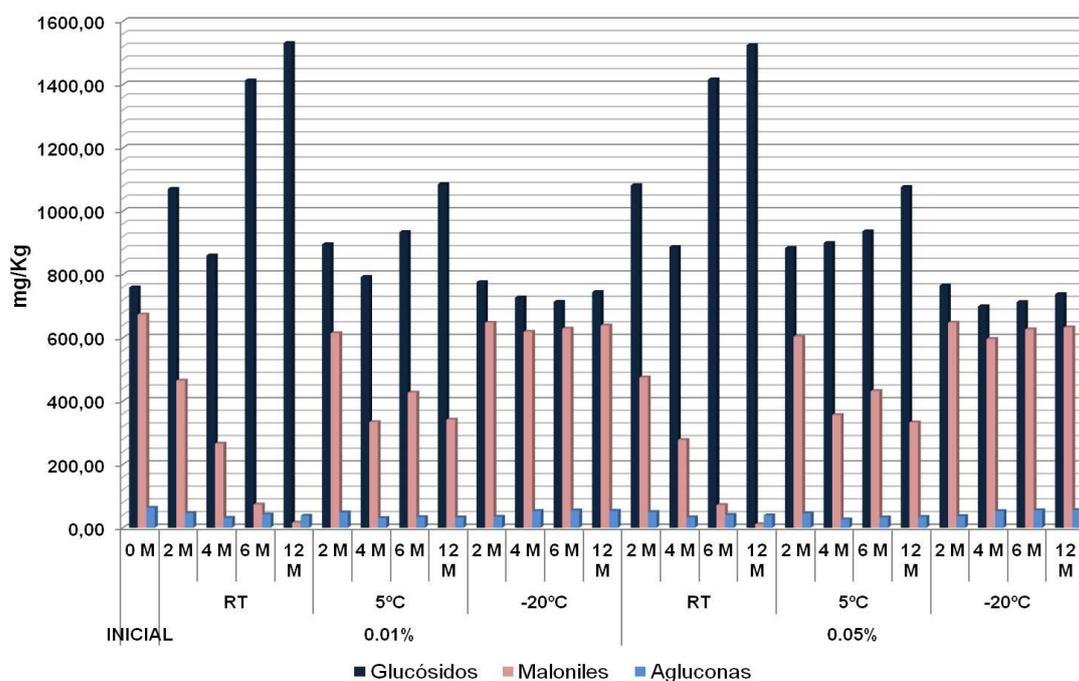


Figura 36. Variación en la concentración media de las distintas formas de isoflavonas estudiadas a distintos tiempos de almacenamiento y distintas temperaturas para el extracto etanólico de soja con BHT al 0,01% y 0,05%.

Comparando con los otros extractos etanólicos de soja estudiados (NoAd e inhibidor), no se observan diferencias. En general, tampoco existen diferencias significativas entre los valores obtenidos cuando se adiciona un 0,01% ó un 0,05% de antioxidante. Como ocurría con los extractos sin aditivos y los que contenían el inhibidor enzimático, para las agluconas no se observan diferencias significativas en los diferentes tiempos de almacenamiento ni para las distintas temperaturas. A temperatura ambiente (RT) se produce un aumento de los glucósidos que alcanzan el doble de su concentración inicial pasados 12 meses y, consecuentemente, se reducen a la mitad las formas malonil. A 5°C las reacciones de interconversión se reducen a la mitad y a -20°C se conservan las concentraciones totales hasta pasados 12 meses.

Observando más detenidamente qué ocurre para cada una de las formas de isoflavonas, se observan algunas diferencias con respecto a los otros extractos estudiados. A los 4 meses de almacenamiento se produce un menor aumento de los glucósidos, pero a los 6 y 12 meses el comportamiento es totalmente análogo al observado en los extractos identificados como NoAd y con inhibidor.

El análisis de la varianza de dos factores realizado para los extractos con el antioxidante BHT se muestra en la *tabla 26*.

Tabla 26. ANOVA de dos factores para el extracto etanólico de soja con 0,01 % y 0,05 % de BHT.

Isoflavona	0,01% de BHT				0,05% de BHT			
	Factores				Factores			
	Temperatura almacenamiento		Tiempo almacenamiento		Temperatura almacenamiento		Tiempo almacenamiento	
	F	Sig.	F	Sig.	F	Sig.	F	Sig.
Di	760	0,00	47,4	0,00	676	0,00	37,3	0,00
Gly	36,2	0,00	2,06	0,16	13,3	0,00	0,65	0,60
Gi	606	0,00	79,6	0,00	860	0,00	108	0,00
MDi	2049	0,00	380	0,00	12374	0,00	2452	0,00
MGLy	44,2	0,00	7,37	0,01	50,7	0,00	10,3	0,00
MGi	1990	0,00	331	0,00	6791	0,00	1181	0,00
De	2,57	0,12	0,34	0,80	7,78	0,01	0,74	0,55
Gle	3,77	0,05	17,5	0,00	1,26	0,32	9,32	0,00
Ge	6,43	0,01	0,26	0,85	7,71	0,01	0,13	0,94

La concentración de antioxidante no influye significativamente en la concentración de las distintas formas de isoflavonas. Tanto la temperatura como el tiempo de almacenaje afectan de forma estadísticamente significativa a la mayoría de las isoflavonas estudiadas. Las isoflavonas donde el efecto no es significativo tienen unas concentraciones próximas a sus límites de cuantificación experimentales, por lo que estos resultados podrían deberse al error intrínseco a su cuantificación.

Para comprobar cómo afectan estos factores de forma individual, en la *figura 37* se muestra el % de variación con respecto a los valores iniciales para las temperaturas y tiempos de almacenamiento estudiados.

En este caso se observa el mismo comportamiento para los dos niveles de concentración de antioxidante. Los resultados son totalmente comparables a los obtenidos para los extractos sin aditivos y los extractos con inhibidor enzimático. Las únicas diferencias se han obtenido en el caso de las isoflavonas más lábiles: los derivados de gliciteína. En el caso de la malonil glicitina, cuando se almacena el extracto a 5°C, la degradación observada pasados 2 meses es del 5%, menor que la observada en el resto de extractos (degradación del 20%), por lo que con la adición del antioxidante BHT se consigue una reducción de la degradación sufrida en los dos primeros meses. A partir de los 4 meses, su comportamiento es totalmente comparable al observado para los otros extractos, es decir, se observa el mismo efecto debido a la temperatura y el paso del tiempo, sin observar efecto alguno debido al antioxidante añadido. Una posible explicación para el comportamiento observado es que durante los primeros meses el antioxidante es efectivo pero a lo largo del tiempo de almacenamiento, dicho antioxidante es consumido lentamente y por lo tanto deja de cumplir su función como tal observándose, a partir de este momento, que la muestra sigue su cinética de degradación normal. Por otro lado, a -20°C, pasados 2 meses, se observa que la concentración de la malonil glicitina se conserva, mientras que sin la adición del antioxidante, pasados 2 meses, se observa una disminución del 15% aproximadamente.

Para el derivado malonil de la genisteína se observa que a 5°C su degradación es casi nula pasados 2 meses y de un 25% menos pasados 4 meses, en comparación con lo observado en los otros extractos sin antioxidante. Sin embargo, a partir de los 6 meses, su comportamiento es el mismo que el observado en los extractos sin aditivos.

Estas diferencias entre la adición y la no adición de un antioxidante pueden indicarnos que las reacciones de degradación e interconversión de las isoflavonas son reacciones de oxidación, puesto que en algunos casos, en presencia de BHT, se observan menores variaciones. Esto significa que, a priori, la adición de BHT, permite un almacenamiento más seguro de las muestras que van a ser sometidas a un análisis cuantitativo en el laboratorio.

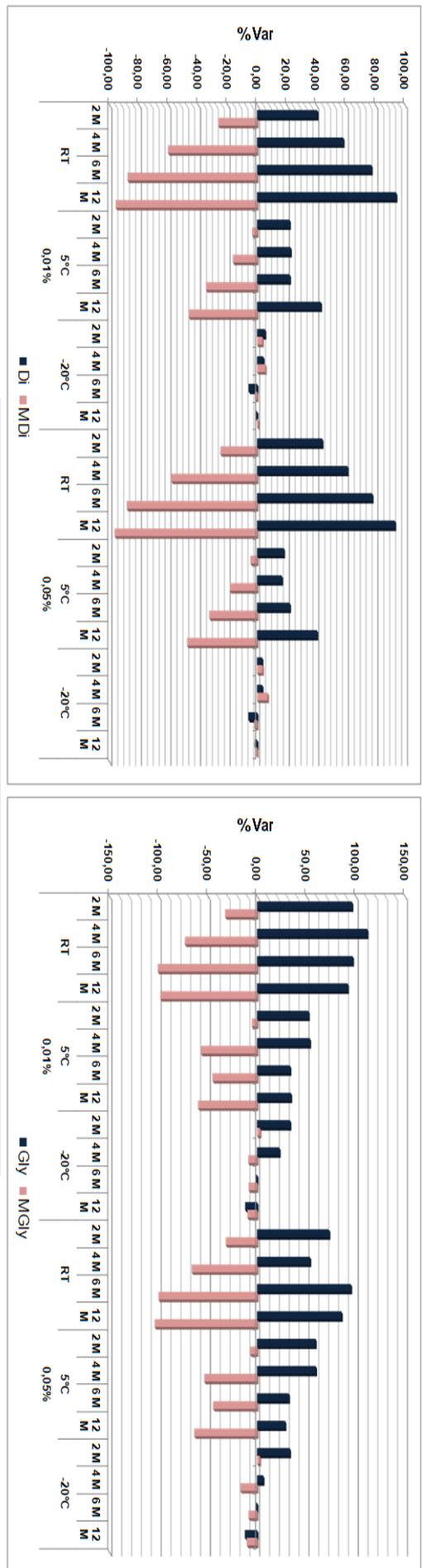


Figura 37. % Variación de cada isoflavona en cada periodo de tiempo y temperatura para los extractos etanólicos de soja con antioxidante.

4.1.6 Efecto de la adición conjunta del inhibidor de β -glucosidasa y el antioxidante BHT

En este caso se estudiaron cuáles eran los efectos debidos a la adición del inhibidor y la del antioxidante en el mismo extracto, buscando un efecto cooperativo entre ambos inhibidores de las reacciones de degradación e interconversión conocidas para las isoflavonas. En la *figura 38* se muestra el comportamiento de cada forma de isoflavona a distintos tiempos de almacenamiento y distintas temperaturas, en los extractos etanólicos en los que se adicionaron una concentración 10 mM de D-(+)-glucono- δ -lactona y 0,05% de 6-di-*tert*-butil-4-metilfenol (BHT), denominados extractos I+B.

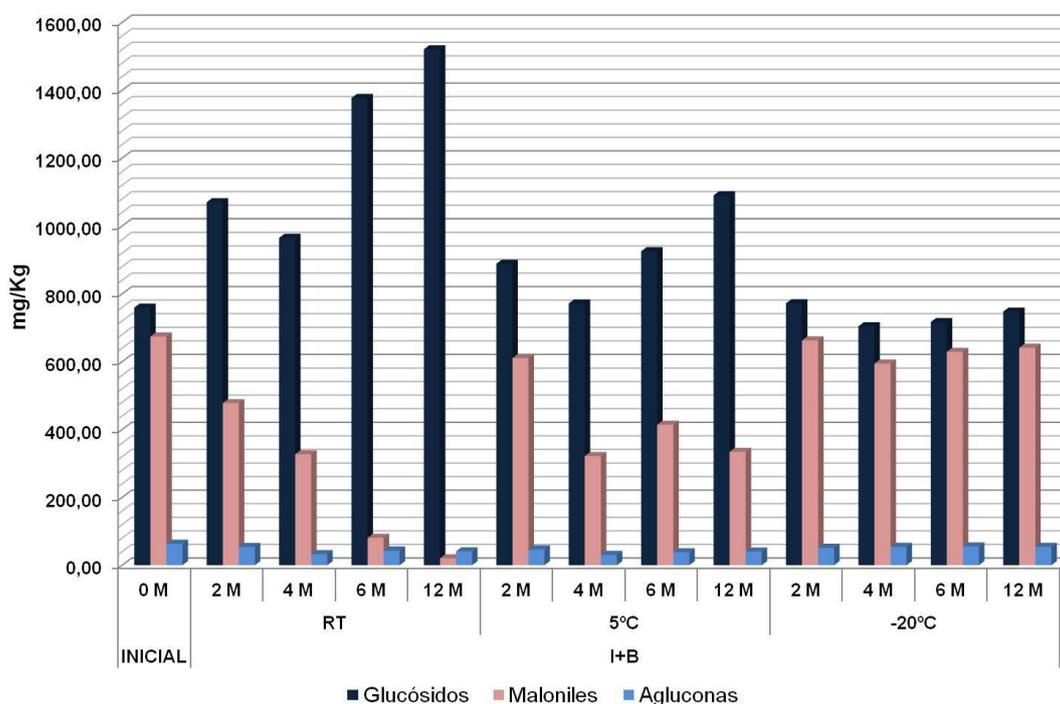


Figura 38. Variación en la concentración media de las distintas formas de isoflavonas estudiadas a distintos tiempos de almacenamiento y distintas temperaturas para el extracto etanólico de soja I+B.

Tal y como se desprende de la figura, el comportamiento de las isoflavonas en este caso es totalmente similar al observado en los extractos con antioxidante, no observándose efecto diferente debido a la adición de los dos aditivos juntos. Se detecta, como en los extractos donde se adiciona el antioxidante, la disminución a los 4 meses del aumento de los glucósidos.

En la *tabla 27* se muestra el análisis de la varianza de dos factores, y en la *figura 22* el % de variación con respecto a los valores iniciales.

Tabla 27. ANOVA de dos factores para el extracto etanólico de soja con 10 mM de inhibidor de β -glucosidasa y 0,05% de BHT.

Isoflavona	10 mM de inhibidor + 0,05% de BHT			
	Factores			
	Temperatura almacenamiento		Tiempo almacenamiento	
	F	Sig.	F	Sig.
Di	530	0,00	36,5	0,00
Gly	14,3	0,00	0,54	0,66
Gi	522	0,00	73,4	0,00
MDi	1132	0,00	233	0,00
MGly	35,3	0,00	7,65	0,00
MGi	1278	0,00	230	0,00
De	13,6	0,00	3,59	0,05
Gle	2,71	0,11	16,4	0,00
Ge	12,9	0,00	0,08	0,97

En la *figura 39* se observa el mismo comportamiento que el observado en la *figura 37* en los extractos en los que sólo se ha adicionado antioxidante. La variación de los derivados malonil de la genistina y glicitina se ve afectada de igual manera que en los extractos del apartado anterior a los 2 meses de almacenamiento a bajas temperaturas, siendo menor al adicionarse el antioxidante que sin la adición del mismo.

Según estos resultados, y tal y como era de esperar teniendo en cuenta los resultados de los apartados anteriores, se puede concluir que no se observa un efecto sinérgico como resultado de la adición del inhibidor y el antioxidante en un mismo extracto. Tan sólo se observan las variaciones debidas a la temperatura de almacenamiento y al antioxidante añadido para el caso de la malonil glicitina y para la malonil genistina, por lo que no es necesaria la adición del inhibidor de β -glucosidasa para la conservación de las isoflavonas.

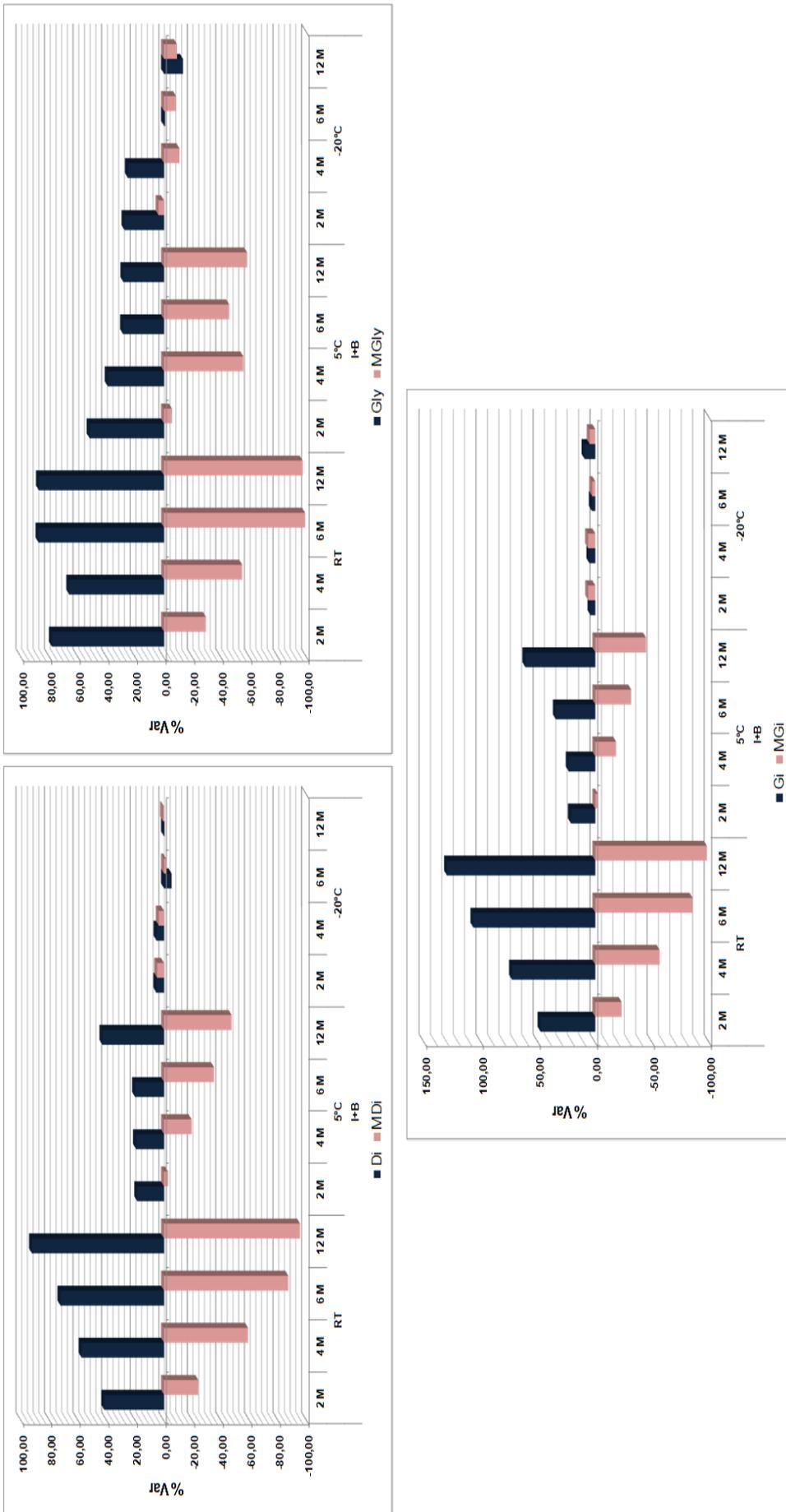


Figura 39. % Variación de cada isoflavona en cada periodo de tiempo y a distintas temperaturas para los extractos etanólicos de soja con inhibidor y antioxidante.

4.1.7 Conservación de los extractos líquidos etanólicos de soja

Se puede concluir que para la conservación de extractos líquidos etanólicos de isoflavonas de soja la temperatura es el factor más influyente, siendo las bajas temperaturas las más adecuadas para mantener el perfil y la concentración de las isoflavonas presentes en el extracto. El almacenamiento de los extractos a -20°C permite la conservación de los derivados de daidzeína y genisteína hasta pasados 12 meses. En el caso de los derivados de gliciteína se reducen las reacciones de interconversión y degradación, pero no se evitan.

Realizando un análisis de varianza para cada temperatura de almacenamiento estudiada, pasados 2 meses de almacenamiento, podemos ver si hay o no efecto significativo de los tratamientos utilizados en esos 2 meses. Los resultados obtenidos se muestran en la *tabla 28*.

Tabla 28. ANOVA a cada temperatura pasados 2 meses de los extractos etanólicos de soja.

Isoflavona	2 MESES					
	TODOS LOS TRATAMIENTOS					
	RT		5°C		-20°C	
	F	Sig.	F	Sig.	F	Sig.
Di	1,40	0,35	1,08	0,46	6,82	0,02
Gly	1,01	0,49	1,77	0,25	3,84	0,07
Gi	0,21	0,95	0,13	0,98	2,07	0,20
MDi	2,77	0,12	2,14	0,19	14,2	0,00
MGly	6,55	0,02	8,24	0,01	6,55	0,02
MGi	1,43	0,34	1,33	0,36	5,32	0,03
De	6,84	0,02	2,50	0,15	4,23	0,05
Gle	0,34	0,88	2,86	0,12	0,34	0,88
Ge	4,01	0,06	1,65	0,28	4,11	0,06

A temperatura ambiente, sólo se observan diferencias significativas de concentración para la malonil glicitina y la daidzeína. Observando los resultados del estudio de la mínima diferencia significativa (LSD), realizado para ver cuál es el tratamiento responsable de tales diferencias, se observa que las diferencias son significativas entre los extractos sin aditivos o con el inhibidor y los extractos con antioxidante. Por tanto, la adición de antioxidante reduce ligeramente la degradación de la malonil glicitina y la daidzeína.

Realizando el mismo estudio cuando los extractos se han almacenado a 5°C , se observa que sólo hay efecto significativo para la malonil glicitina y, al igual que en el caso anterior, las diferencias se dan entre los extractos con y sin antioxidante. Esto se ha observado anteriormente en el estudio de los extractos con antioxidante, donde se observaba una conservación mayor (aunque no se evita la degradación) pasados dos meses cuando se ha añadido el antioxidante BHT.

A -20°C se ha observado la mayor conservación de los tres derivados maloniles y del glucósido de daidzina entre los extractos sin y con antioxidantes. Podemos decir que la adición de antioxidante, almacenando a -20°C , permite la conservación de estas isoflavonas, incluida la malonil glicitina, que en otros extractos se degradaba en las mismas condiciones de temperatura.

La adición de un agente antioxidante como es el 6-di-*tert*-butil-4-metilfenol (BHT) permite evitar la degradación de los derivados maloniles hasta pasados 2 meses de almacenamiento a -20°C .

4.1.8 Conclusión del estudio realizado sobre el almacenamiento de los extractos líquidos etanólicos de soja

Las condiciones óptimas de almacenamiento para la conservación de las isoflavonas mayoritarias (96%) en los extractos líquidos etanólicos de soja son una temperatura de -20°C y la adición de un agente antioxidante (BHT, a cualquiera de las concentraciones estudiadas), que permite mantener tanto el perfil como la concentración de isoflavonas hasta pasados 2 meses de almacenamiento.

Pasados esos 2 meses de almacenamiento y hasta los 12 meses, es posible, en las condiciones de los extractos descritos, la conservación del perfil y la concentración de todas las isoflavonas menos de los derivados de gliciteína que se degrada más de un 10% hasta los 12 meses de almacenamiento, como se puede observar en la *figura 40*.

La superposición de los cromatogramas de los extractos etanólicos de soja a los 12 meses de almacenamiento con y sin antioxidante y la referencia inicial (0 meses) se muestra en la *figura 41*.

Por lo tanto, aunque la adición de BHT permite una mayor conservación de los derivados de gliciteína, los valores sin la adición del mismo siguen conservándose con variaciones en torno al 20% después de un año de almacenamiento.

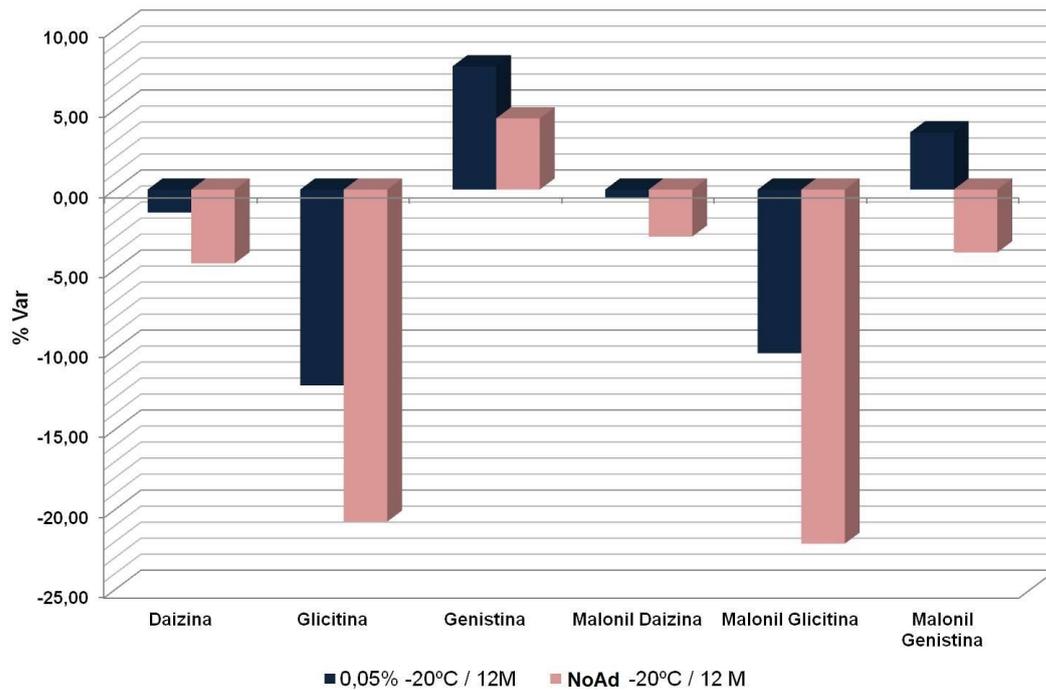


Figura 40. % Variación de cada isoflavona a los 12 meses de almacenamiento en el extracto etanólico de soja almacenado a -20°C con antioxidante a una concentración de 0,05% y sin aditivos (NoAd).

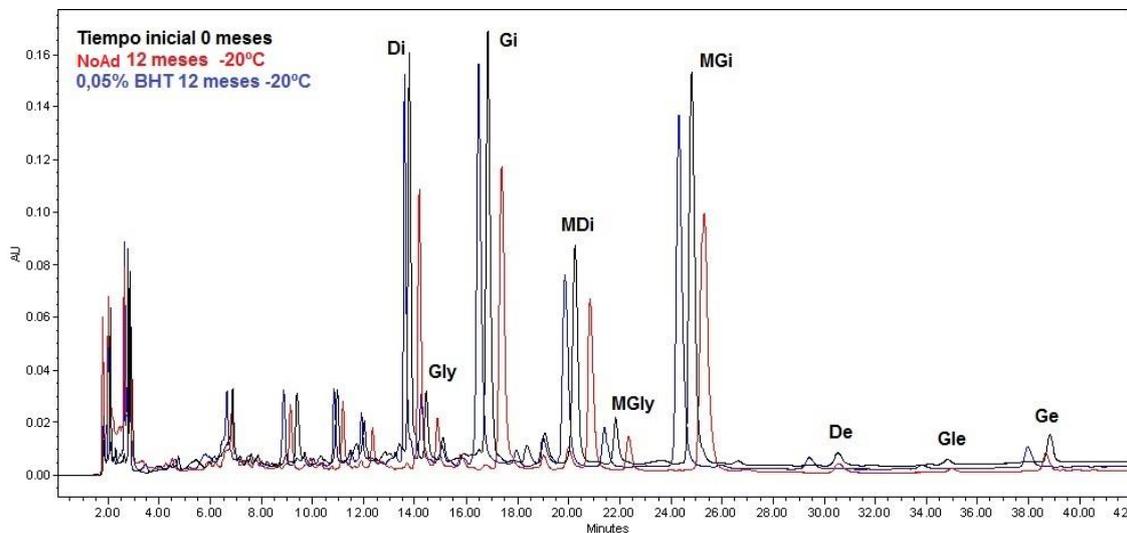


Figura 41. Cromatograma superpuesto de los extractos etanólicos de soja en el tiempo inicial (0 meses), en negro, a los 12 meses de almacenamiento a -20°C sin aditivos (NoAd), en rojo, y con antioxidante a una concentración de 0,05%, en azul.

4.2 EXTRACTOS LÍQUIDOS ETANÓLICOS DE PROTEÍNA DE SOJA

4.2.1 Composición del extracto líquido etanólico de proteína de soja

En los extractos etanólicos de proteína texturizada de soja se detectan las 12 isoflavonas de soja estudiadas: daidzina, glicitina, genistina, malonil daidzina, malonil glicitina, acetil daidzina, acetil glicitina, daidzéina, acetil gliciteína, gliciteína y genisteína. En la *figura 42* se observa el cromatograma de isoflavonas del extracto líquido de proteína de soja inicial, a tiempo cero del estudio. En la *figura 43* se muestran los espectros UV de las isoflavonas detectadas. Como se puede observar en esta última figura, los espectros, en el caso de la isoflavona gliciteína no es su espectro característico y es debido a la interferencia ejercida por el derivado acetil de la genisteína que eluye muy próximo a ella y en una concentración elevada con respecto a la aglucona.

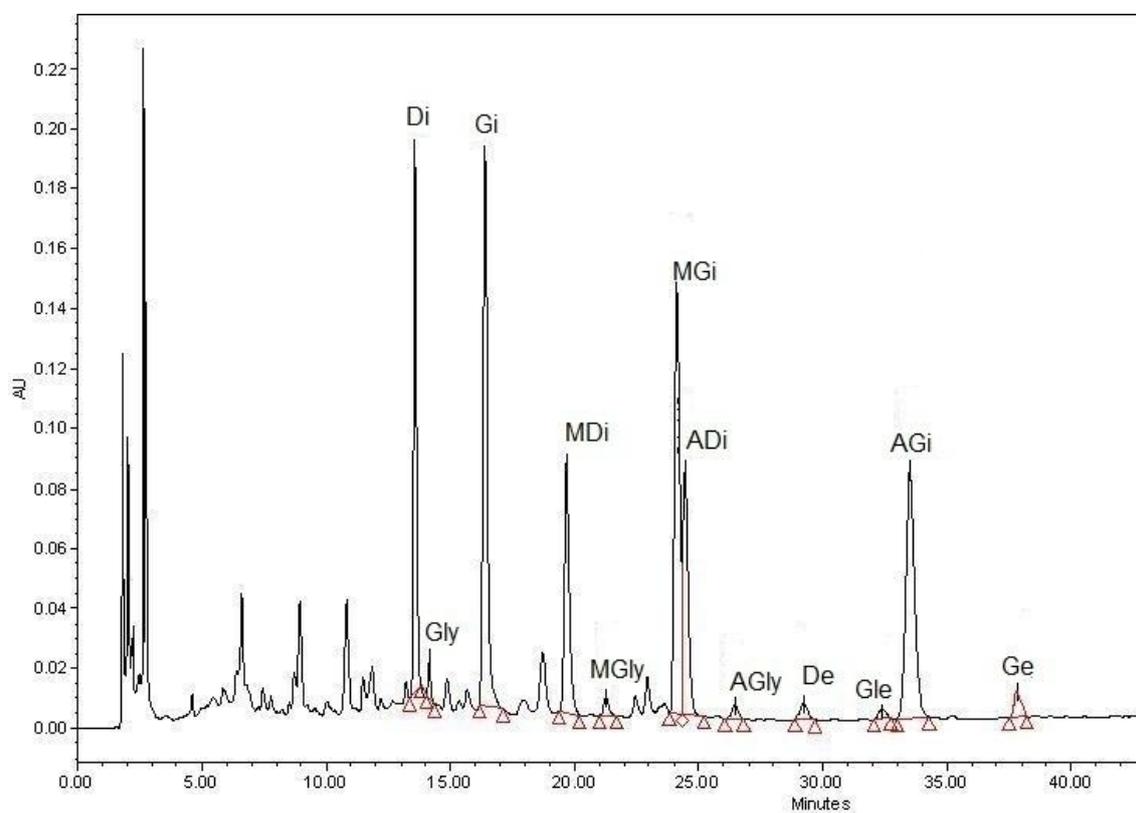


Figura 42. Cromatograma de las isoflavonas del extracto etanólico de proteína de soja a estudiar.

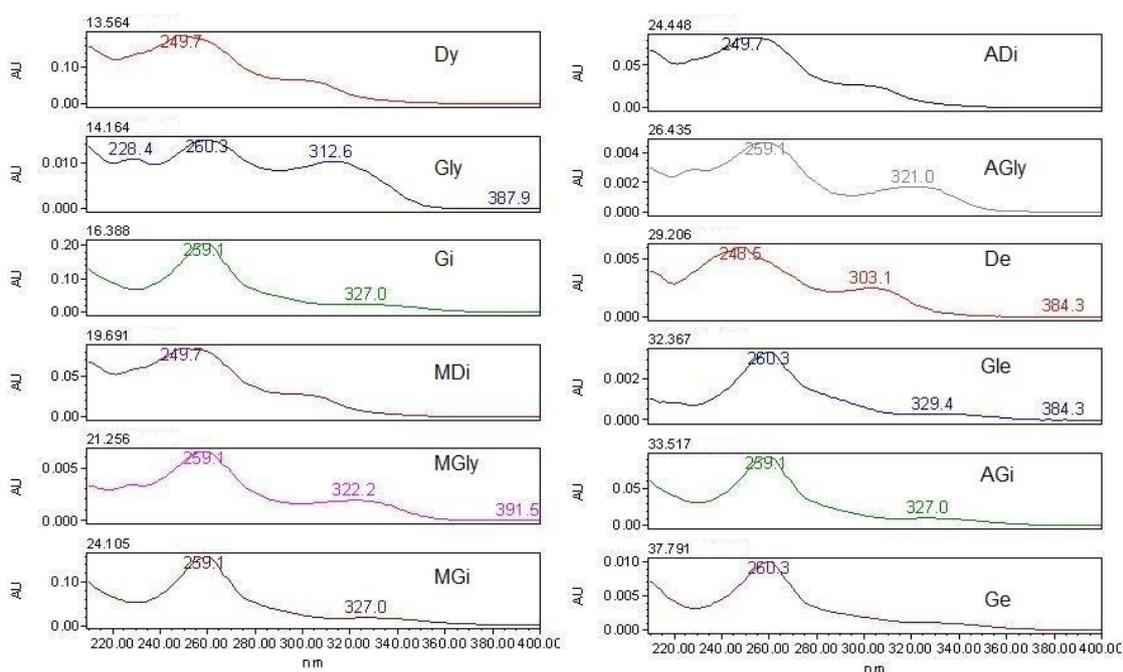


Figura 43. Espectros UV de las isoflavonas detectadas en los extractos etanólicos de proteína de soja

La concentración inicial de las isoflavonas en los extractos estudiados es la que se muestra en la *tabla 29*. Como se puede observar las isoflavonas mayoritarias son los derivados glucósidos seguidos de los derivados acetiles y luego los maloniles. Las agluconas siguen teniendo concentraciones muy próximas a sus correspondientes límites de cuantificación. En comparación con los resultados obtenidos al analizar los extractos etanólicos de soja, cabe destacar que en los extractos de proteína de soja se pueden estudiar las formas acetyl de las isoflavonas, lo que permite detectar otras interconversiones que en los extractos de soja no se han podido estudiar.

Tabla 29. Concentración de las isoflavonas en el extracto inicial de la muestra de proteína de soja y su desviación estándar (sd). mg/Kg \pm sd

Isoflavona	Concentración
Di	402 \pm 1,19
Gly	40,8 \pm 1,08
Gi	395 \pm 7,35
MDi	257 \pm 4,23
MGly	17,2 \pm 0,84
MGi	378 \pm 5,44
ADi	455 \pm 10,7
AGly	19,1 \pm 1,24
De	21,6 \pm 2,87
Gle	27,7 \pm 1,72
AGi	335 \pm 1,28
Ge	23,7 \pm 2,44

Otra diferencia con respecto al perfil del extracto etanólico de soja, además de la detección de los derivados acetil, es que el glucósido de glicitina está en menor concentración, tal y como al igual que la malonil glicitina. Por tanto, hay que tenerlo en cuenta en la discusión de los resultados ya que puede dar lugar a errores debido al error intrínseco a su cuantificación.

Además, como se puede observar en la *figura 42*, el derivado acetil de la daidzina se encuentra poco resuelto, apareciendo junto con el derivado malonil de la genistina, por lo que su cuantificación también puede ir acompañada de resultados menos precisos para ambas isoflavonas conforme vayan cambiando sus concentraciones durante el estudio de la estabilidad.

4.2.2 Estudio de la estabilidad de extractos líquidos etanólicos de proteína de soja

En la *tabla 30* se muestran las concentraciones de isoflavonas encontradas en los extractos etanólicos de proteína de soja almacenados para realizar el estudio de estabilidad de los mismos en distintas condiciones.

Con respecto a la concentración total de isoflavonas durante el almacenamiento, al realizar los estudios ANOVA se observan diferencias estadísticamente significativas, con un nivel de confianza del 95%, para todas las condiciones de almacenamiento empleadas y desde los primeros dos meses de almacenamiento. Por lo que a diferencia de lo encontrado para los extractos de soja, existen pérdidas en la concentración total de isoflavonas en los extractos de proteína de soja desde los dos primeros meses de almacenamiento; pérdidas que continúan observándose hasta el año. Este hecho nos indica que se producen reacciones de degradación de las isoflavonas presentes en los extractos de proteína de soja estudiados. La gran diferencia entre el extracto etanólico de la proteína de soja y el de la soja son los acetiles, por lo que se podría pensar que esas reacciones de degradación son aquellas donde intervienen estas formas de isoflavonas que no se encontraban en los extractos de soja, en los que no se observaban estas variaciones en la concentración total.

Además también se observan cambios en las concentraciones individuales de las isoflavonas, por lo que se dan reacciones de interconversión entre las isoflavonas.

Debido a las diferencias en las concentraciones de las isoflavonas entre los dos extractos etanólicos estudiados se pueden estudiar al completo la influencia de las distintas reacciones que pueden sufrir las isoflavonas y que se han comentado al principio de este capítulo.

Tabla 30. Concentración de las isoflavonas estudiadas para los extractos de proteína de soja líquidos en las distintas condiciones; los resultados se dan como mg/Kg ± sd

REFERENCIA	Proteína 1 ^a	Daidzina	Gliciteína	Genisteína	Malonil Daidzina	Malonil Gliciteína	Malonil Genisteína	Acetil Daidzina	Acetil Gliciteína	Daidzeína	Acetil Gliciteína	Acetil Genisteína	Genisteína Total		
NoAd	RT	2 M	486 ± 1,25	34,2 ± 2,08	567 ± 3,37	164 ± 4,26	7,11 ± 0,44	228 ± 1,66	318 ± 2,92	16,2 ± 0,06	16,3 ± 0,08	16,0 ± 0,24	303 ± 0,41	21,1 ± 0,78	2178
		4 M	590 ± 4,33	44,1 ± 2,03	688 ± 1,89	99,7 ± 1,50	1,38 ± 0,30	207 ± 2,50	352 ± 7,64	16,2 ± 0,47	14,7 ± 0,18	13,9 ± 0,06	284 ± 0,08	17,9 ± 0,32	2327
		6 M	716 ± 3,15	54,2 ± 0,83	871 ± 1,66	34,6 ± 0,49	<LOD	69,9 ± 6,78	240 ± 4,97	12,7 ± 0,04	15,4 ± 0,10	13,2 ± 0,35	247 ± 1,70	21,0 ± 0,06	2295
		12 M	791 ± 4,42	52,8 ± 4,62	941 ± 7,53	9,22 ± 0,39	<LOD	89,4 ± 1,63	<LOD	7,24 ± 3,47	8,26 ± 1,06	11,1 ± 0,15	186 ± 0,30	10,0 ± 0,02	2105
	5°C	2 M	417 ± 2,19	32,1 ± 0,30	478 ± 37,9	234 ± 4,55	14,8 ± 0,08	314 ± 12,5	389 ± 6,96	17,8 ± 1,67	15,9 ± 0,22	21,3 ± 1,61	329 ± 30,0	17,2 ± 1,74	2280
		4 M	429 ± 3,81	34,0 ± 2,56	478 ± 6,48	202 ± 1,69	11,3 ± 0,28	331 ± 13,3	485 ± 8,20	17,4 ± 0,47	10,5 ± 0,60	17,7 ± 0,32	297 ± 3,27	12,9 ± 0,40	2326
		6 M	473 ± 7,02	37,9 ± 3,98	542 ± 20,7	170 ± 0,93	7,67 ± 0,01	309 ± 13,1	479 ± 8,42	16,3 ± 0,02	11,7 ± 0,21	14,3 ± 1,97	299 ± 8,46	16,3 ± 1,32	2376
		12 M	529 ± 1,05	36,3 ± 2,21	591 ± 0,03	127 ± 0,18	3,66 ± 0,18	313 ± 0,36	<LOD	11,7 ± 0,34	5,62 ± 0,60	13,0 ± 0,42	279 ± 3,72	9,31 ± 1,57	1918
	-20°C	2 M	362 ± 2,59	29,6 ± 2,66	412 ± 6,81	264 ± 1,51	18,9 ± 0,76	336 ± 7,50	423 ± 8,17	16,8 ± 0,69	23,2 ± 0,97	24,9 ± 0,60	329 ± 4,89	27,2 ± 0,80	2268
		4 M	358 ± 0,52	32,8 ± 0,51	389 ± 7,35	251 ± 0,89	18,5 ± 0,30	392 ± 6,68	530 ± 10,6	17,7 ± 0,33	22,3 ± 0,06	24,7 ± 0,47	320 ± 6,01	29,7 ± 1,44	2384
		6 M	359 ± 5,75	33,1 ± 1,49	401 ± 7,87	255 ± 4,01	17,7 ± 0,18	406 ± 27,7	554 ± 33,7	17,4 ± 0,86	21,6 ± 0,94	24,8 ± 0,71	328 ± 8,20	19,8 ± 1,73	2438
		12 M	375 ± 1,48	31,5 ± 2,01	403 ± 13,9	251 ± 3,89	15,2 ± 0,74	479 ± 8,04	<LOD	14,2 ± 1,14	19,8 ± 1,45	21,4 ± 0,25	327 ± 4,21	28,4 ± 0,36	1966
1 mM	RT	2 M	478 ± 4,53	33,6 ± 2,08	558 ± 0,82	163 ± 3,46	7,16 ± 0,51	229 ± 2,17	321 ± 3,61	16,6 ± 0,25	16,5 ± 0,81	17,8 ± 0,08	307 ± 2,74	20,8 ± 1,51	2168
		4 M	576 ± 2,30	43,3 ± 0,16	671 ± 4,57	99,0 ± 0,75	1,46 ± 0,28	205 ± 3,09	358 ± 3,41	16,9 ± 1,10	14,6 ± 0,66	11,4 ± 0,04	293 ± 2,98	18,2 ± 0,47	2307
		6 M	656 ± 4,12	48,0 ± 0,10	791 ± 55,8	33,0 ± 2,09	<LOD	62,9 ± 10,4	246 ± 16,0	13,3 ± 1,56	12,2 ± 1,61	13,1 ± 1,14	254 ± 20,2	17,0 ± 0,98	2146
		12 M	749 ± 1,12	51,4 ± 2,18	889 ± 24,2	9,59 ± 0,68	<LOD	108 ± 3,04	<LOD	12,7 ± 0,70	6,76 ± 0,66	11,6 ± 0,40	218 ± 6,75	9,03 ± 0,04	2065
	5°C	2 M	422 ± 2,65	32,8 ± 0,39	484 ± 42,6	231 ± 5,76	14,5 ± 0,28	314 ± 22,4	397 ± 20,4	17,5 ± 1,39	14,1 ± 1,40	21,9 ± 1,36	323 ± 27,0	16,2 ± 0,74	2289
		4 M	424 ± 2,50	34,5 ± 0,07	470 ± 1,07	202 ± 0,57	11,4 ± 0,11	334 ± 4,00	489 ± 1,38	17,3 ± 0,23	10,6 ± 1,62	19,1 ± 0,28	297 ± 5,85	14,3 ± 0,18	2324
		6 M	459 ± 1,90	37,8 ± 1,75	521 ± 7,62	170 ± 0,25	7,68 ± 0,09	306 ± 13,3	472 ± 19,0	16,4 ± 0,04	7,85 ± 1,39	17,0 ± 0,34	291 ± 2,93	11,3 ± 1,75	2317
		12 M	522 ± 1,65	35,6 ± 2,82	582 ± 5,86	126 ± 1,86	3,56 ± 0,13	314 ± 2,22	<LOD	12,1 ± 0,52	5,50 ± 0,06	13,9 ± 0,24	281 ± 1,10	7,45 ± 0,14	1903
	-20°C	2 M	355 ± 5,52	29,7 ± 0,06	400 ± 11,8	252 ± 4,12	48,7 ± 43,5	324 ± 13,7	381 ± 35,8	16,5 ± 0,45	15,7 ± 1,46	24,1 ± 1,21	312 ± 15,8	18,1 ± 1,17	2176
		4 M	355 ± 1,87	30,3 ± 0,36	392 ± 5,71	253 ± 2,60	18,2 ± 0,17	388 ± 7,23	529 ± 17,8	17,5 ± 0,73	21,8 ± 0,01	24,4 ± 0,06	317 ± 4,96	29,2 ± 0,57	2376
		6 M	336 ± 29,0	31,3 ± 2,70	378 ± 32,1	240 ± 19,9	16,5 ± 2,30	385 ± 0,52	524 ± 5,87	15,7 ± 1,27	20,1 ± 1,17	23,8 ± 0,64	309 ± 21,4	18,0 ± 1,47	2297
		12 M	371 ± 8,16	30,3 ± 1,05	398 ± 11,7	248 ± 1,03	14,8 ± 0,39	474 ± 4,41	<LOD	14,2 ± 1,26	21,3 ± 0,55	21,3 ± 0,50	324 ± 4,18	28,6 ± 0,21	1946
10 mM	RT	2 M	449 ± 5,89	29,4 ± 1,84	518 ± 1,61	159 ± 4,02	6,94 ± 0,30	221 ± 3,31	336 ± 23,0	15,7 ± 0,18	15,6 ± 0,17	22,2 ± 0,22	294 ± 2,14	18,5 ± 1,51	2085
		4 M	519 ± 0,06	39,1 ± 0,30	597 ± 3,00	96,5 ± 0,57	1,65 ± 0,22	197 ± 1,51	348 ± 2,84	17,0 ± 0,13	11,9 ± 1,32	20,8 ± 0,33	284 ± 3,96	15,8 ± 1,22	2147
		6 M	596 ± 6,21	43,3 ± 2,38	723 ± 5,88	34,4 ± 0,53	<LOD	74,3 ± 9,19	279 ± 1,94	16,5 ± 0,38	10,7 ± 1,07	18,9 ± 0,01	284 ± 0,86	15,5 ± 1,75	2095
		12 M	631 ± 1,48	44,1 ± 1,87	747 ± 1,78	9,43 ± 0,66	<LOD	139 ± 1,05	<LOD	14,9 ± 1,37	6,26 ± 1,00	16,0 ± 0,17	263 ± 3,34	8,82 ± 0,59	1880
	5°C	2 M	374 ± 2,09	30,8 ± 1,24	413 ± 5,42	218 ± 1,56	13,7 ± 0,18	283 ± 10,2	349 ± 13,4	15,2 ± 0,56	7,93 ± 1,91	21,5 ± 0,81	275 ± 13,8	12,5 ± 1,02	2015
		4 M	394 ± 3,90	35,0 ± 2,41	429 ± 5,71	193 ± 2,14	11,5 ± 0,09	314 ± 1,50	466 ± 0,76	16,4 ± 0,39	10,1 ± 0,80	21,7 ± 0,76	283 ± 9,59	14,2 ± 1,76	2187
		6 M	409 ± 3,55	37,3 ± 2,02	449 ± 6,54	163 ± 0,43	7,78 ± 0,04	274 ± 13,9	429 ± 8,56	15,2 ± 0,23	1,68 ± 0,42	19,9 ± 0,33	253 ± 6,00	7,80 ± 0,01	2067
		12 M	462 ± 3,49	35,4 ± 0,40	502 ± 7,51	123 ± 0,40	3,79 ± 0,11	295 ± 1,92	<LOD	11,6 ± 0,30	2,15 ± 0,42	17,5 ± 1,18	251 ± 6,64	8,58 ± 1,30	1712
	-20°C	2 M	342 ± 10,9	28,7 ± 0,47	382 ± 12,3	246 ± 8,13	12,6 ± 8,22	312 ± 28,0	366 ± 2,82	15,4 ± 0,34	11,8 ± 1,10	23,2 ± 1,12	294 ± 20,2	13,5 ± 0,39	2047
		4 M	344 ± 1,57	30,9 ± 0,06	371 ± 3,83	246 ± 0,30	17,8 ± 0,25	373 ± 1,33	507 ± 5,10	16,7 ± 0,26	20,1 ± 0,09	23,5 ± 0,39	302 ± 4,09	26,5 ± 1,07	2281
		6 M	336 ± 1,07	33,0 ± 1,12	370 ± 7,90	241 ± 5,54	16,9 ± 0,93	373 ± 4,07	509 ± 5,86	16,0 ± 0,06	16,2 ± 0,93	23,5 ± 0,46	303 ± 5,76	18,4 ± 1,50	2256
		12 M	344 ± 6,41	30,4 ± 1,44	370 ± 1,63	239 ± 0,62	14,4 ± 0,06	449 ± 2,74	<LOD	12,4 ± 0,49	13,8 ± 1,50	20,9 ± 0,25	303 ± 3,80	20,4 ± 1,59	1817

Tabla 30 (cont.). Concentración de las isoflavonas estudiadas para los extractos de proteína de soja líquidos en las distintas condiciones; los resultados se dan como mg/Kg ± sd

REFERENCIA	PROTEÍNA	Daidzina	Glicitina	Genistina	Malonil		Acetil		Daidzeína	Gliciteína	Acetil		Genisteína Total	
					Daidzina	Genistina	Daidzina	Glicitina			Daidzeína	Gliciteína		
		380 ± 1,10	36,1 ± 0,89	388 ± 7,06	254 ± 3,84	16,4 ± 0,35	382 ± 4,85	511 ± 10,0	17,3 ± 0,45	19,7 ± 1,98	25,7 ± 0,73	322 ± 0,19	25,1 ± 1,25	2377
RT	2 M	472 ± 5,20	32,2 ± 0,56	548 ± 7,26	161 ± 1,65	6,84 ± 0,08	226 ± 5,06	338 ± 17,2	15,6 ± 0,35	12,2 ± 0,11	13,9 ± 1,93	282 ± 3,77	15,5 ± 0,70	2123
	4 M	585 ± 3,39	45,6 ± 0,49	673 ± 7,84	95,4 ± 6,79	1,28 ± 0,92	199 ± 10,5	341 ± 14,9	15,3 ± 1,07	10,2 ± 0,13	13,1 ± 0,43	261 ± 7,95	13,9 ± 1,35	2254
	6 M	698 ± 3,54	51,9 ± 1,35	819 ± 2,04	32,0 ± 0,64	<LOD	66,5 ± 4,18	214 ± 3,56	11,1 ± 0,47	8,06 ± 0,62	12,1 ± 1,24	216 ± 0,66	11,9 ± 1,10	2141
	12 M	757 ± 1,30	52,1 ± 1,58	894 ± 12,3	8,69 ± 0,08	<LOD	81,7 ± 1,29	<LOD	8,57 ± 0,41	3,82 ± 0,42	11,1 ± 0,32	165 ± 2,64	10,3 ± 0,07	1992
0,01%	2 M	370 ± 4,13	28,0 ± 1,92	422 ± 0,30	219 ± 2,37	13,0 ± 0,21	288 ± 0,93	358 ± 3,69	15,2 ± 0,10	8,53 ± 1,19	18,8 ± 0,57	275 ± 8,25	11,3 ± 1,86	2025
	4 M	422 ± 4,74	33,3 ± 1,37	466 ± 6,48	194 ± 6,29	10,6 ± 0,88	328 ± 12,9	469 ± 22,4	16,7 ± 0,61	11,2 ± 0,14	16,6 ± 0,91	285 ± 11,9	15,1 ± 0,57	2266
	6 M	445 ± 1,72	34,0 ± 1,03	475 ± 8,85	167 ± 2,68	7,39 ± 0,04	280 ± 8,43	428 ± 3,87	14,4 ± 0,10	2,77 ± 0,76	13,0 ± 0,25	250 ± 2,31	9,16 ± 1,87	2126
	12 M	476 ± 1,17	35,6 ± 1,10	508 ± 16,1	121 ± 3,03	3,50 ± 0,04	285 ± 5,71	<LOD	13,1 ± 0,47	0,49 ± 0,28	11,6 ± 0,13	221 ± 9,74	10,2 ± 0,01	1686
-20°C	2 M	339 ± 5,35	26,8 ± 2,28	378 ± 14,4	244 ± 7,67	16,4 ± 0,57	313 ± 10,1	377 ± 2,83	15,7 ± 0,06	13,3 ± 0,89	23,3 ± 0,42	296 ± 13,2	14,0 ± 1,83	2056
	4 M	342 ± 2,02	31,8 ± 0,05	382 ± 6,65	241 ± 10,3	16,6 ± 1,39	372 ± 22,4	500 ± 29,6	16,4 ± 1,16	20,0 ± 0,16	23,2 ± 0,87	302 ± 8,72	28,0 ± 0,64	2277
	6 M	347 ± 4,60	30,5 ± 2,04	381 ± 18,2	245 ± 7,79	16,9 ± 0,71	359 ± 31,0	474 ± 6,58	15,8 ± 0,20	15,7 ± 1,18	23,0 ± 0,36	305 ± 14,3	12,2 ± 0,58	2225
	12 M	345 ± 8,44	29,4 ± 0,41	364 ± 7,07	239 ± 4,04	15,0 ± 0,77	451 ± 4,00	<LOD	12,7 ± 0,50	18,5 ± 1,12	20,6 ± 0,49	301 ± 0,93	23,7 ± 1,70	1820
RT	2 M	469 ± 3,17	32,6 ± 0,78	544 ± 0,08	161 ± 0,61	6,64 ± 0,18	224 ± 1,18	325 ± 0,07	15,1 ± 0,09	11,0 ± 0,69	12,4 ± 0,56	278 ± 4,35	14,6 ± 0,82	2092
	4 M	581 ± 6,71	45,7 ± 0,69	674 ± 2,49	94,8 ± 5,73	1,28 ± 0,79	199 ± 10,4	345 ± 12,8	15,4 ± 0,67	11,3 ± 0,73	13,1 ± 0,33	263 ± 7,47	15,1 ± 0,04	2259
	6 M	690 ± 5,70	50,7 ± 0,18	810 ± 8,88	32,2 ± 0,36	<LOD	71,2 ± 1,71	218 ± 5,58	11,1 ± 0,06	8,05 ± 0,47	13,1 ± 0,38	218 ± 4,28	11,2 ± 1,68	2133
	12 M	710 ± 4,98	51,1 ± 3,42	822 ± 73,4	9,16 ± 0,13	<LOD	74,3 ± 5,25	<LOD	5,50 ± 0,57	2,83 ± 1,94	10,3 ± 0,37	147 ± 18,3	10,2 ± 0,04	1842
0,05%	2 M	373 ± 0,44	26,3 ± 2,08	426 ± 9,85	218 ± 2,17	12,8 ± 0,02	291 ± 4,03	350 ± 5,64	15,5 ± 0,06	12,2 ± 1,88	19,1 ± 0,02	284 ± 0,99	14,7 ± 1,34	2043
	4 M	410 ± 1,71	34,7 ± 1,87	455 ± 21,2	194 ± 11,0	10,9 ± 0,71	326 ± 28,9	476 ± 24,5	16,5 ± 0,53	8,26 ± 0,48	19,2 ± 1,62	279 ± 14,0	12,1 ± 1,85	2242
	6 M	439 ± 1,04	34,9 ± 0,95	469 ± 5,47	163 ± 0,53	7,30 ± 0,08	283 ± 7,51	432 ± 15,2	14,3 ± 0,30	2,41 ± 0,57	12,9 ± 0,26	248 ± 9,42	7,83 ± 0,06	2112
	12 M	478 ± 2,73	36,0 ± 2,17	512 ± 36,9	120 ± 7,13	3,51 ± 0,19	288 ± 17,1	<LOD	14,4 ± 0,72	0,62 ± 0,43	11,5 ± 0,38	226 ± 23,2	10,1 ± 0,16	1699
-20°C	2 M	333 ± 5,61	24,2 ± 1,92	378 ± 6,84	239 ± 8,43	16,1 ± 0,72	307 ± 11,5	354 ± 6,20	15,2 ± 0,14	14,8 ± 0,26	23,0 ± 0,52	292 ± 13,4	17,3 ± 0,83	2013
	4 M	357 ± 1,32	32,6 ± 0,38	399 ± 22,2	250 ± 1,22	17,9 ± 0,70	388 ± 2,47	526 ± 2,64	17,5 ± 0,11	21,1 ± 1,10	23,9 ± 0,01	314 ± 7,84	28,9 ± 1,10	2376
	6 M	344 ± 7,64	29,2 ± 1,03	380 ± 8,65	242 ± 5,06	16,8 ± 0,32	374 ± 3,50	513 ± 4,00	15,8 ± 0,15	14,0 ± 1,85	22,7 ± 0,86	299 ± 8,80	15,9 ± 1,18	2266
	12 M	346 ± 2,76	28,2 ± 0,27	368 ± 3,66	239 ± 1,19	14,5 ± 0,04	452 ± 2,57	<LOD	13,0 ± 0,33	19,1 ± 0,21	20,4 ± 0,15	305 ± 1,57	25,8 ± 0,05	1831
RT	2 M	448 ± 1,48	29,9 ± 1,44	506 ± 0,40	159 ± 3,92	6,21 ± 0,55	218 ± 3,23	324 ± 4,54	16,0 ± 0,21	13,0 ± 1,75	22,0 ± 0,34	288 ± 4,36	16,9 ± 1,20	2046
	4 M	524 ± 3,73	40,7 ± 3,83	604 ± 13,9	93,6 ± 4,05	1,75 ± 0,51	199 ± 9,16	364 ± 15,7	17,0 ± 0,45	12,6 ± 0,02	21,1 ± 0,11	287 ± 2,57	17,8 ± 0,45	2182
	6 M	592 ± 2,81	43,8 ± 0,74	688 ± 6,62	33,3 ± 0,52	<LOD	74,7 ± 2,32	268 ± 1,63	16,2 ± 0,06	4,55 ± 0,17	18,5 ± 0,65	270 ± 4,44	8,63 ± 0,48	2018
	12 M	610 ± 1,07	45,0 ± 2,47	719 ± 3,87	8,73 ± 0,06	<LOD	138 ± 1,39	<LOD	15,7 ± 1,04	2,65 ± 0,35	15,9 ± 1,78	253 ± 1,03	10,2 ± 0,09	1819
5°C	2 M	371 ± 2,64	26,9 ± 0,25	419 ± 5,50	217 ± 0,93	12,4 ± 0,11	283 ± 2,47	354 ± 13,7	15,0 ± 0,18	8,86 ± 0,57	21,8 ± 0,06	277 ± 3,17	11,7 ± 0,55	2018
	4 M	412 ± 1,21	36,6 ± 2,72	446 ± 5,28	194 ± 5,78	11,2 ± 1,46	330 ± 13,6	479 ± 23,2	16,8 ± 1,19	9,85 ± 1,74	19,1 ± 0,53	283 ± 13,1	14,6 ± 1,28	2252
	6 M	419 ± 1,70	33,5 ± 0,58	455 ± 3,22	160 ± 0,14	7,85 ± 0,01	277 ± 4,89	435 ± 7,41	15,4 ± 0,16	4,02 ± 0,06	20,3 ± 0,01	262 ± 2,93	7,76 ± 0,03	2097
	12 M	462 ± 4,39	37,1 ± 1,09	506 ± 12,7	123 ± 0,88	4,13 ± 0,15	299 ± 4,16	<LOD	16,1 ± 0,42	2,08 ± 0,35	17,4 ± 0,11	256 ± 6,70	10,2 ± 0,04	1732
-20°C	2 M	341 ± 3,05	26,4 ± 3,30	381 ± 4,07	241 ± 5,35	16,3 ± 0,80	317 ± 18,0	371 ± 0,64	15,6 ± 0,35	14,6 ± 0,27	23,8 ± 0,83	293 ± 7,67	16,6 ± 0,07	2057
	4 M	356 ± 7,55	33,2 ± 0,80	396 ± 24,6	247 ± 3,42	17,5 ± 1,71	393 ± 6,89	521 ± 13,2	17,2 ± 0,42	20,9 ± 0,67	24,1 ± 0,04	310 ± 1,85	28,9 ± 0,95	2364
	6 M	341 ± 6,97	31,5 ± 1,03	371 ± 9,01	242 ± 5,08	17,0 ± 0,33	374 ± 23,4	512 ± 21,02	15,6 ± 0,28	14,3 ± 1,92	23,0 ± 0,62	298 ± 8,24	16,4 ± 1,25	2255
	12 M	341 ± 1,78	29,8 ± 0,41	363 ± 3,45	238 ± 2,33	14,7 ± 0,25	447 ± 7,01	<LOD	12,9 ± 0,22	14,5 ± 1,22	20,4 ± 0,27	297 ± 5,70	21,3 ± 1,16	1799

Al igual que en el estudio de estabilidad de los extractos etanólicos de soja, para los extractos etanólicos de proteína de soja estudiamos también qué factor o factores son los responsables de que existan diferencias en los porcentajes de variación (%Var) de las distintas especies estudiadas. Se realiza un estudio de análisis de la varianza, con un nivel de confianza del 95%, para los tres factores: temperatura, tiempo de almacenamiento y tratamiento realizado. Los resultados de este ANOVA se muestran en la *tabla 31*, donde aparecen sombreados en azul aquellos factores que tienen efecto significativo ($p < 0,05$) sobre la variación de concentración de esa isoflavona.

Tabla 31. Resultados del ANOVA de 3 factores para cada una de las isoflavonas objeto de estudio en los extractos etanólicos de proteína de soja.

Isoflavona	Factores					
	Temperatura almacenamiento		Tiempo almacenamiento		Tratamiento	
	F	Sig.	F	Sig.	F	Sig.
Di	1415	0,00	142	0,00	16,4	0,00
Gly	576	0,00	163	0,00	30,3	0,00
Gi	5115	0,00	426	0,00	76,0	0,00
MDi	1114	0,00	145	0,00	2,2	0,06
MGly	11477	0,00	1190	0,00	1,7	0,13
MGi	10865	0,00	260	0,00	25,0	0,00
ADi	168	0,00	1329	0,00	13,9	0,00
AGly	48,9	0,00	198	0,00	21,4	0,00
De	267	0,00	57,3	0,00	11,0	0,00
Gle	1537	0,00	281	0,00	131	0,00
AGi	522	0,00	202	0,00	33,2	0,00
Ge	671	0,00	44,2	0,00	33,4	0,00

Con relación al tiempo de almacenamiento, éste ejerce un efecto estadísticamente significativo en la concentración de todas las isoflavonas del extracto estudiadas. Recordar que en el caso de los extractos de soja este efecto no fue estadísticamente significativo para daidzeína y genisteína; esta diferencia podría ser debida a que estas dos isoflavonas se encuentran ligeramente en menor concentración en el extracto de proteína de soja y puede haber cierto error debido a que se encuentran en concentraciones muy cercanas al límite de cuantificación.

El tratamiento (adición de inhibidor enzimático y/o adición de BHT) también ejerce un efecto estadísticamente significativo para todas las isoflavonas menos para los derivados malonil de la daidzina y la glicitina.

Al igual que con los extractos etanólicos de soja, la temperatura es el factor más influyente a priori, observando que su efecto provoca diferencias de concentración estadísticamente significativas ($p < 0,05$) para todas las isoflavonas estudiadas. Se ha realizado el test de la mínima diferencia significativa (LSD) para

determinar entre qué niveles del factor temperatura se producen dichas diferencias; los resultados se muestran en la *tabla 32*.

Tabla 32. Resultados del test de la mínima diferencia significativa comparando los distintos niveles del factor temperatura ($p < 0,05$) para los extractos etanólicos de proteína de soja.

Isoflavona	Temperatura	Temperatura	Sig.
Di	RT	5°C	0,00
		-20°C	0,00
	-20°C	5°C	0,00
Gly	RT	5°C	0,00
		-20°C	0,00
	-20°C	5°C	0,00
Gi	RT	5°C	0,00
		-20°C	0,00
	-20°C	5°C	0,00
MDi	RT	5°C	0,00
		-20°C	0,00
	-20°C	5°C	0,00
MGly	RT	5°C	0,00
		-20°C	0,00
	-20°C	5°C	0,00
MGi	RT	5°C	0,00
		-20°C	0,00
	-20°C	5°C	0,00
ADi	RT	5°C	0,00
		-20°C	0,00
	-20°C	5°C	0,00
AGly	RT	5°C	0,00
		-20°C	0,00
	-20°C	5°C	0,10
De	RT	5°C	0,00
		-20°C	0,00
	-20°C	5°C	0,00
Gle	RT	5°C	0,00
		-20°C	0,00
	-20°C	5°C	0,00
AGi	RT	5°C	0,00
		-20°C	0,00
	-20°C	5°C	0,00
Ge	RT	5°C	0,00
		-20°C	0,00
	-20°C	5°C	0,00

Como se observa en la tabla anterior, para todas las isoflavonas existen variaciones de concentración estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre todas las temperaturas estudiadas. Tan sólo para la acetil glicitina no se han encontrado diferencias significativas entre almacenar a 5°C y -20°C , por lo que disminuyendo la temperatura de almacenamiento no se observan diferencias en su concentración.

Uniendo estos resultados con los presentados en la *tabla 30* se observan las mismas tendencias que para los extractos etanólicos de soja; la concentración de los glucósidos aumenta cuando la temperatura de almacenamiento es mayor, mientras que los derivados malonil se encuentran en menor concentración al aumentar la temperatura de almacenamiento, lo que indica una posible interconversión entre maloniles y glucósidos favorecida por temperaturas mayores. Además, en el extracto etanólico de proteína de soja, se detectan los derivados acetil que disminuyen su concentración al aumentar la temperatura de almacenamiento, al igual que ocurría con los derivados malonil, por lo que también indica una posible interconversión a glucósidos. Para el caso de la acetil daidzina se observa un aumento de su concentración pasados 2 y 4 meses de almacenamiento a 5°C de temperatura, lo que indica una posible interconversión de los derivados malonil a derivados acetil, tal y como se indica en la *figura 20*. A los 12 meses no se detecta la acetil daidzina, lo que indicaría que se interconvierte en daidzina. En el caso de la acetil daidzina a -20°C se observa un aumento desde los 4 meses hasta los 12 meses, sin interconversiones al correspondiente glucósido.

En el caso de las agluconas se observa una disminución de la concentración al aumentar la temperatura de almacenamiento, lo que puede indicar que existen pérdidas debido a su degradación.

Para realizar el estudio más exhaustivo se realiza el estudio estadístico de los datos para cada una de las condiciones estudiadas.

4.2.3 Efecto de la temperatura

Al igual que se vio en los extractos líquidos etanólicos de soja, también para los extractos etanólicos de proteína de soja la temperatura es el factor que más afecta tanto al perfil como a la concentración de las isoflavonas. La variación de concentración media de las distintas formas de isoflavonas estudiadas a lo largo del tiempo de almacenamiento, a cada una de las temperaturas estudiadas se muestra en la *figura 44*.

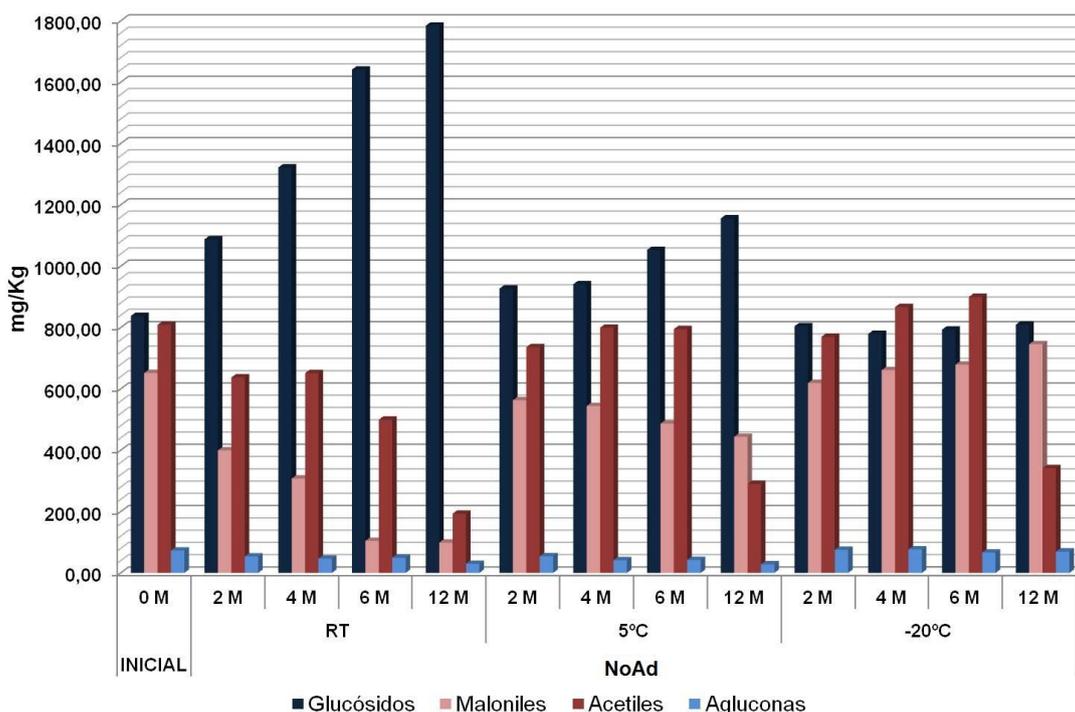


Figura 44. Variación en la concentración media de las distintas formas de isoflavonas estudiadas a distintos tiempos de almacenamiento y a las distintas temperaturas para el extracto etanólico de proteína de soja sin aditivos, NoAd.

A temperatura ambiente (RT), en el extracto de proteína de soja sin aditivos se observa un aumento de los glucósidos de más del doble pasados 12 meses; lo contrario se observa en los derivados malonil y acetil que no se degradan por completo pero sí en un alto porcentaje, siendo mayor esta degradación para los maloniles y observando que en el caso de los acetiles parece conservarse el total entre los 2 y 4 meses de almacenamiento, posiblemente por su generación en la reacción de interconversión de derivados malonil a derivados acetil. La concentración de las agluconas también disminuye.

A 5°C el efecto observado es una reducción a la mitad tanto en la concentración de glucósidos como en la de los maloniles. En cambio para los acetiles y las agluconas el comportamiento es distinto. En el caso de las formas acetiles se observa que su concentración total se conserva hasta los 6 meses, y se reduce a más de la mitad entre los 6 y 12 meses. El comportamiento de las agluconas es similar, observándose una disminución como la mencionada a temperatura ambiente.

Al reducir la temperatura de almacenamiento hasta los -20°C se consigue la conservación de todas las formas de isoflavonas estudiadas hasta los 6 meses. Pasados 12 meses de almacenamiento a -20°C sólo los derivados acetil se degradan, conservándose el resto de formas estudiadas.

Como se observa en la figura 44 la temperatura afecta a todas las formas de isoflavonas estudiadas, al igual que el tiempo de almacenamiento. Esto concuerda con el análisis de varianza de los dos factores cuyos resultados se muestran en la tabla 33,

donde se observa que todas las isoflavonas estudiadas se ven afectadas significativamente ($p < 0,05$) tanto por la temperatura como por el tiempo de almacenamiento. A continuación se van a estudiar los %Var de todas las isoflavonas, no como en el estudio de los extractos etanólicos de soja donde no se estudiaron las agluconas individualmente porque aunque disminuían, no se veían afectadas por los factores estudiados.

Tabla 33. ANOVA de dos factores para el extracto etanólico de proteína de soja NoAd.

Isoflavona	NoAd			
	Factores			
	Temperatura almacenamiento		Tiempo almacenamiento	
	F	Sig.	F	Sig.
Di	5233	0,00	720	0,00
Gly	68,8	0,00	14,7	0,00
Gi	1458	0,00	174	0,00
MDi	13183	0,00	1960	0,00
MGLy	5470	0,00	684	0,00
MGi	2289	0,00	29,3	0,00
ADi	377	0,00	2099	0,00
AGly	17,4	0,00	31,7	0,00
De	104	0,00	27,2	0,00
Gle	347	0,00	49,3	0,00
AGi	120	0,00	36,6	0,00
Ge	105	0,00	11,9	0,00

En la *figura 45* se observa el % variación con respecto al valor de referencia (0 meses) para cada isoflavona, en cada periodo de tiempo y para cada una de las temperaturas estudiadas. Los derivados de gliciteína son los más lábiles, sobre todo su derivado malonil que se degrada hasta casi su totalidad pasados 4 meses, y por completo a partir de los 6 meses, cuando el extracto se almacena a temperatura ambiente. Entre los derivados glucósidos el más estable es la genistina, se genera más que la daidzina y la glicitina, esta última incluso no se genera hasta pasados los 4 meses a temperatura ambiente. Estos datos de estabilidad de cada familia concuerdan con lo observado en la bibliografía [57, 59]. De los derivados acetil el más lábil es la acetil daidzina, independientemente de la temperatura de almacenamiento.

Al reducir la temperatura de almacenamiento se reducen las interconversiones, observando que el efecto se reduce a la mitad a 5°C. A -20°C se consigue la conservación de los derivados de genisteína hasta los 12 meses. En cambio, la acetil daidzina se conserva hasta los 6 meses y se degrada por completo a los 12 meses. En el caso de los derivados de gliciteína se reducen considerablemente las reacciones de interconversión y degradación pero no llegan a detenerse.

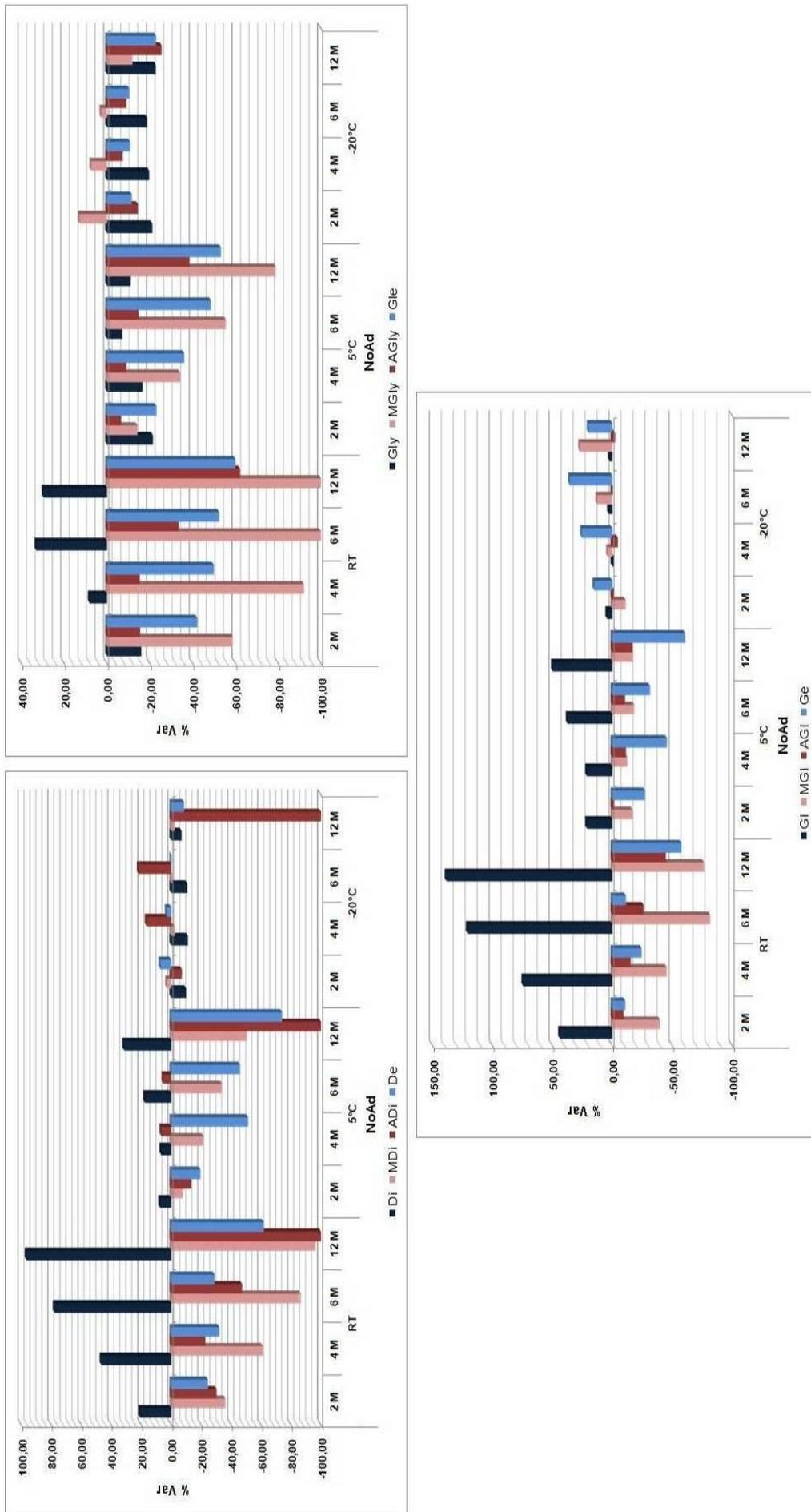


Figura 45. % Variación de cada isoflavona en cada periodo de tiempo y temperatura para los extractos etanólicos de proteína de soja sin aditivos, NoAd.

Al igual que ocurría en el caso de los extractos de soja en general, a menor temperatura de almacenamiento mayor conservación del perfil de isoflavonas en los extractos estudiados, siendo -20°C la temperatura idónea para conservar, al menos, los derivados de genisteína y los de daidzeína hasta los 6 meses de almacenamiento.

Comparando los aumentos y disminuciones de las formas de isoflavonas estudiadas con los observados en los extractos de soja, comprobamos que se generan más glucósidos en el caso de los extractos de proteína de soja, pero sólo a temperatura ambiente y a partir de los 6 meses, algo que puede ser debido a la presencia de otros derivados de isoflavonas, como son los acetiles que también se interconvierten en glucósidos, como ya se ha explicado al principio del capítulo.

Además, la disminución de los derivados de malonil es similar, para cualquier temperatura estudiada, que la observada en los extractos de soja, excepto en el caso de la malonil genistina donde no se llega a degradar del todo, como se observaba en la soja; esto puede ser debido a la presencia de acetyl genistina que sufre la reacción de interconversión a su derivado malonil.

El comportamiento de los derivados de gliciteína, comparado con el observado en los extractos de soja es ligeramente diferente, lo que puede ser explicado por su menor concentración en los extractos de proteína de soja que puede dar lugar a errores en su cuantificación. En cambio, los derivados de genisteína y daidzeína tienen un comportamiento en la proteína de soja totalmente análogo al observado en la soja.

4.2.4 Efecto de la adición de un inhibidor de β -glucosidasa

Como se ha descrito al principio de este capítulo una posible vía de degradación/interconversión de las isoflavonas es la debida a reacciones catalizadas por las enzimas β -glucosidasas, por ello en este estudio se incluyó la adición a los extractos de un inhibidor de las mismas para estudiar su efecto en el almacenamiento de extractos.

El comportamiento de cada forma de isoflavona, en el tiempo y a distintas temperaturas, cuando se añaden al extracto de proteína de soja distintas concentraciones del inhibidor de β -glucosidasa (1 y 10 mM) se muestra en la *figura 46*.

Para los glucósidos, se observan diferencias significativas en su concentración entre la adición de las distintas concentraciones del inhibidor, cuando los extractos son almacenados a temperatura ambiente (RT) y a 5°C . El aumento en la concentración de los glucósidos en el caso de adicionar inhibidor de β -glucosidasa en la concentración más alta (10 mM) es menor que si se adiciona menos o no se adiciona nada (*figura 27*). Se puede pensar que alguno de los pasos en la obtención de la proteína de soja reactiva las enzimas β -glucosidasas de la soja y se mantienen con cierta actividad a temperaturas mayores de 0°C en el almacenamiento de los extractos, por ello al adicionar el inhibidor las reacciones catalizadas por dichas

enzimas no se producen y los glucósidos no se interconvierten en sus agluconas, de ahí su menor aumento. Cuando se almacena el extracto a -20°C no se observa esta diferencia entre las distintas concentraciones de inhibidor adicionado y se conserva la concentración total de glucósidos hasta pasados 12 meses.

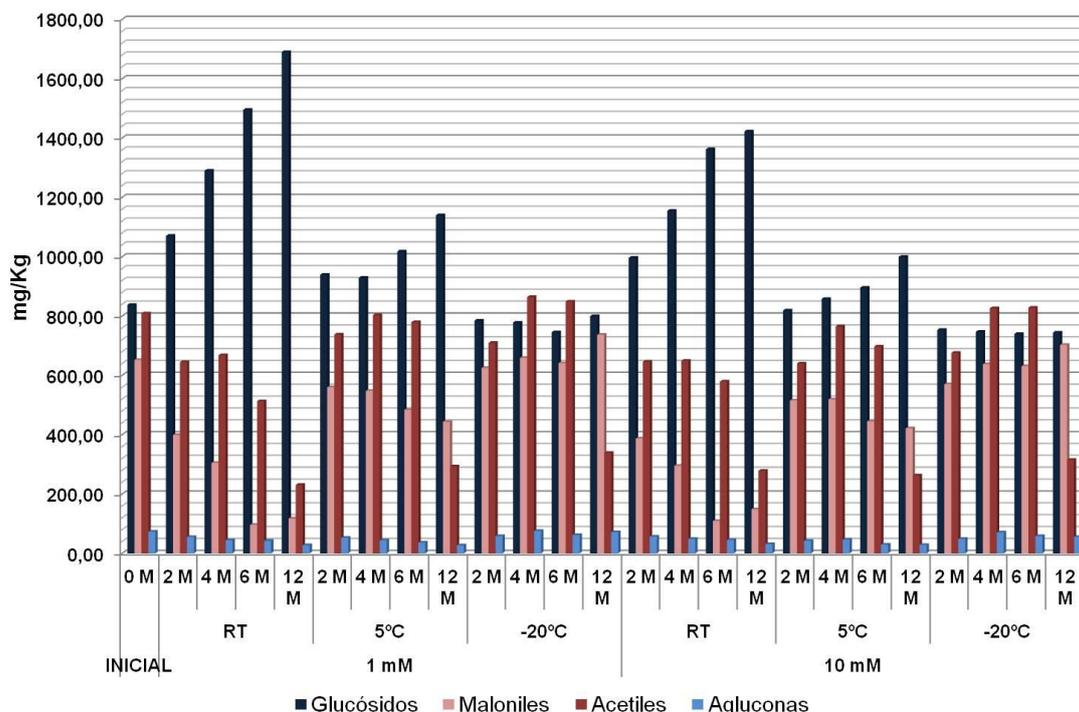


Figura 46. Variación en la concentración media de las distintas formas de isoflavonas a distintos tiempos de almacenamiento y distintas temperaturas para el extracto etanólico de proteína de soja con inhibidor de β -glucosidasa (1 mM y 10 mM).

En cambio para los derivados malonil, acetil y agluconas no se observan diferencias estadísticamente significativas y el comportamiento es análogo al observado en los extractos sin aditivos, puesto que al disminuir la temperatura la disminución observada se va reduciendo. A -20°C se conserva el perfil hasta los 6 meses; a los 12 meses de almacenamiento los derivados acetil se degradan hasta en un 60%. Debido a esto se puede pensar que las reacciones de interconversión que ocurren a estos derivados a esta temperatura no son reacciones catalizadas por las enzimas β -glucosidasas, algo que ya se observó en los extractos de soja.

Los resultados del análisis de la varianza de dos factores realizado con los resultados obtenidos en el análisis de los extractos etanólicos de proteína de soja cuyo aditivo es el inhibidor β -glucosidasa se muestran en la *tabla 34*.

Tabla 34. ANOVA de dos factores para el extracto etanólico de proteína de soja 1 mM y 10 mM de inhibidor.

Isoflavona	1 mM de inhibidor				10 mM de inhibidor			
	Factores				Factores			
	Temperatura almacenamiento		Tiempo almacenamiento		Temperatura almacenamiento		Tiempo almacenamiento	
	F	Sig.	F	Sig.	F	Sig.	F	Sig.
Di	585	0,00	72,0	0,00	30,912	0,00	1,46	0,28
Gly	160	0,00	28,0	0,00	18,049	0,00	10,7	0,00
Gi	486	0,00	45,9	0,00	8336,715	0,00	628	0,00
MDi	1638	0,00	254	0,00	31,503	0,00	2,19	0,14
MGLy	883	0,00	113	0,00	4668	0,00	574	0,00
MGi	1650	0,00	51,0	0,00	3150	0,00	76,7	0,00
ADi	203	0,00	1400	0,00	4,69	0,03	47,6	0,00
AGly	3,51	0,06	26,9	0,00	3,77	0,05	15,2	0,00
De	21,0	0,00	3,38	0,05	49,3	0,00	12,3	0,00
Gle	584	0,00	102	0,00	98,3	0,00	83,9	0,00
AGi	42,0	0,00	22,8	0,00	89,3	0,00	13,9	0,00
Ge	123	0,00	10,2	0,00	72,2	0,00	9,72	0,00

Tanto para la adición de 1 mM como 10 mM la temperatura de almacenamiento tiene efecto estadísticamente significativo para todas las isoflavonas menos para el acetil glicitina que, como se observa en la *figura 47*, presenta un comportamiento similar independientemente de la temperatura de almacenamiento.

El tiempo de almacenamiento tiene efecto estadísticamente significativo ($p < 0,05$) para casi todas las isoflavonas estudiadas, pero según la concentración de inhibidor adicionado hay diferencias; con la adición de 1 mM no hay efecto significativo del tiempo para daidzeína y en el caso de la adición de 10 mM no hay efecto para daidzina y malonil daidzina.

Teniendo en cuenta lo que se observa en la *figura 47* se pueden explicar los resultados del análisis de varianza. En los derivados de daidzeína, con la adición de una concentración 10 mM de inhibidor se observa que la concentración del glucósido y del derivado de malonil a -20°C no varían, se mantienen constantes, de ahí que en el estudio estadístico no se observen diferencias.

Las diferencias debidas a la adición de una concentración 1 mM o 10 mM se observan en todos los glucósidos estudiados a temperatura ambiente y 5°C , siendo menor la diferencia de concentración entre los valores a los distintos tiempos y su valor inicial. Sin embargo, esa diferencia no se observa al almacenar a -20°C , temperatura a la cual se produce la menor variación en la concentración inicial de los glucósidos.

Las agluconas se reducen durante el tiempo de almacenamiento del estudio, y no se observan diferencias en general entre almacenar a temperatura ambiente y a

5°C, pero al almacenar los extractos a -20°C se reduce considerablemente esa disminución en la concentración.

En el caso de los derivados de daidzeína se observa que a temperatura ambiente y a 5°C el glucósido de daidzina aumenta y el derivado malonil y la aglucona disminuyen. En cambio a -20°C, se conserva su concentración y se reducen las posibles reacciones de interconversión y/o degradación entre las isoflavonas. En el caso de la acetil daidzina, pasados 12 meses de almacenamiento se degrada en su totalidad a cualquier temperatura e independientemente de la concentración de inhibidor adicionada. Hasta los 6 meses, al reducir la temperatura reducimos las reacciones implicadas y se conserva el perfil de los derivados de daidzeína, siendo -20°C la condición óptima para su almacenaje, sea cual sea la concentración del inhibidor.

En general, los derivados de gliciteína son los más lábiles, especialmente el derivado malonil de la glicitina, para el que se observa una degradación de más de la mitad pasados 2 meses de almacenamiento y de su totalidad a los 6 meses cuando se almacena a temperatura ambiente. A 5°C se reduce a la mitad, pero sigue siendo la mayor variación entre las isoflavonas estudiadas. En cambio la acetil glicitina parece más estable que el resto de derivados acetiles presentes, pero al disminuir la temperatura no se observan diferencias en la variación de la concentración. A -20°C, independientemente de la concentración de inhibidor adicionado, se consigue la mayor conservación del perfil en los derivados de gliciteína, pero no se evitan las reacciones de degradación/interconversión.

Los derivados de genisteína son los más estables; aunque la malonil genistina es la más lábil de los derivados maloniles estudiados a temperatura ambiente; a 5°C es el que menor porcentaje de variación presenta a lo largo del tiempo del estudio. A -20°C se consigue la conservación del perfil de derivados de genisteína hasta pasados 12 meses de almacenamiento.

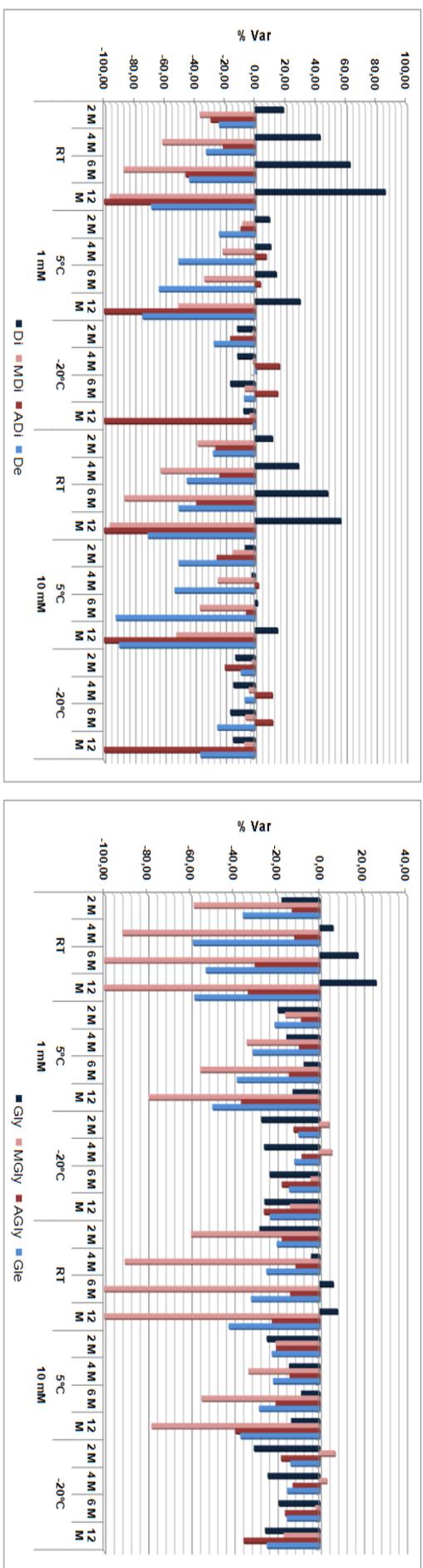


Figura 47. % Variación de cada isoflavona en cada periodo de tiempo y a las distintas temperaturas para los extractos de proteína de soja con inhibidor.

Por lo tanto, se puede concluir que la adición del inhibidor D-(+)-glucono- δ -lactona sólo afecta a la estabilidad de los derivados glucósidos a temperaturas de almacenamiento superiores a 5°C y a una concentración mínima de 10 mM, pero no evita las reacciones de interconversión, simplemente las reduce en un 30% aproximadamente. Por lo tanto, sigue siendo la temperatura el factor más influyente a la hora de almacenar los extractos de isoflavonas, y su reducción a -20°C es la forma más aconsejable para conservar los extractos hasta 6 meses, sobre todo para los derivados de daidzeína y genisteína.

4.2.5 Efecto de la adición de un antioxidante

Como se ha comentado anteriormente otra posible vía de reacción de degradación y/o interconversión de las isoflavonas estudiadas es la oxidación-reducción. Por ello se adicionó a los extractos etanólicos un antioxidante habitual como es el BHT para evitar este tipo de reacciones.

En la *figura 48* se muestra el comportamiento de las isoflavonas estudiadas en el extracto de proteína de soja cuando se adiciona un 0,01% o un 0,05% del antioxidante y se almacenan a distintas temperaturas.

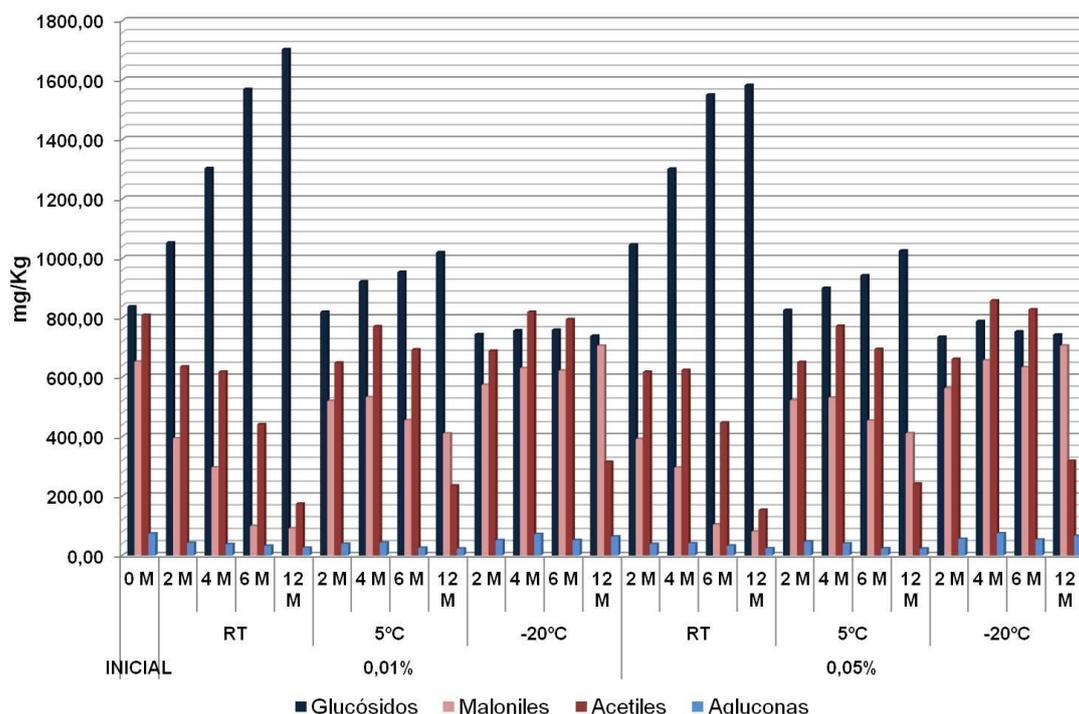


Figura 48. Variación en la concentración media de las distintas formas de isoflavonas estudiadas a distintos tiempos de almacenamiento y distintas temperaturas para el extracto etanólico de proteína de soja con BHT al 0,01% y 0,05%.

Lo primero que se observa es que no existen diferencias significativas entre la adición de una concentración de BHT de 0,01% ó de 0,05%. Los glucósidos aumentan hasta el doble pasados 12 meses de almacenamiento a temperatura ambiente. Al

reducir la temperatura a 5°C se reduce este aumento, siendo de un 30% a los 12 meses. Al almacenar los extractos a -20°C se consigue su conservación durante los 12 meses. El comportamiento contrario se observa para los maloniles, los acetiles y las agluconas, cuya concentración se reduce cuando se aumenta la temperatura de almacenamiento. En el caso de los acetiles, su concentración se reduce en un 80% pasados 12 meses a temperatura ambiente; sin embargo, al almacenar los extractos a 5°C, pasados 2 meses se reduce su concentración, pero desde los 4 meses hasta los 6 aumenta dicha concentración y se iguala a la inicial, lo que indica que se producen acetiles debido a la pérdida de los grupo malonil que provienen de los malonil derivados. A los 12 meses la concentración de los acetiles se reduce hasta un 60% a 5°C. Almacenando a -20°C se consigue la conservación de los derivados acetiles hasta los 6 meses de almacenamiento.

Atendiendo a los resultados obtenidos para cada una de las formas de isoflavonas en estas condiciones, no se observan diferencias con el extracto sin aditivos estudiado. Esto se confirma con el análisis de varianza de dos factores realizado con los resultados obtenidos al analizar los extractos etanólicos a los que se les ha añadido el antioxidante BHT; estos resultados se muestran en la *tabla 35*.

Tabla 35. ANOVA de dos factores para el extracto de proteína de soja con 0,01 % y 0,05 % de BHT.

Isoflavona	0,01% de BHT				0,05% de BHT			
	Factores				Factores			
	Temperatura almacenamiento		Tiempo almacenamiento		Temperatura almacenamiento		Tiempo almacenamiento	
	F	Sig.	F	Sig.	F	Sig.	F	Sig.
Di	4102	0,00	477	0,00	455	0,00	49,6	0,00
Gly	377	0,00	79,8	0,00	246	0,00	65,0	0,00
Gi	4448	0,00	337	0,00	355	0,00	25,3	0,00
MDi	2364	0,00	341	0,00	2917	0,00	428	0,00
MGLy	1022	0,00	91,1	0,00	2692	0,00	242	0,00
MGi	1477	0,00	42,5	0,00	1102	0,00	25,9	0,00
ADi	56,3	0,00	448	0,00	156	0,00	1097	0,00
AGLy	38,2	0,00	63,5	0,00	212	0,00	217	0,00
De	68,1	0,00	11,5	0,00	87,6	0,00	18,7	0,00
Gle	320	0,00	30,2	0,00	298	0,00	36,3	0,00
AGi	251	0,00	113	0,00	118	0,00	46,2	0,00
Ge	80,0	0,00	12,7	0,00	257	0,00	12,4	0,00

Al igual que para los extractos sin aditivos tanto la temperatura como el tiempo de almacenamiento tienen efecto estadísticamente significativo sobre todas las isoflavonas estudiadas, independientemente de la concentración de antioxidante adicionado. Estas variaciones quedan reflejadas en la *figura 49*, donde se muestra la variación de cada isoflavona de forma individual.

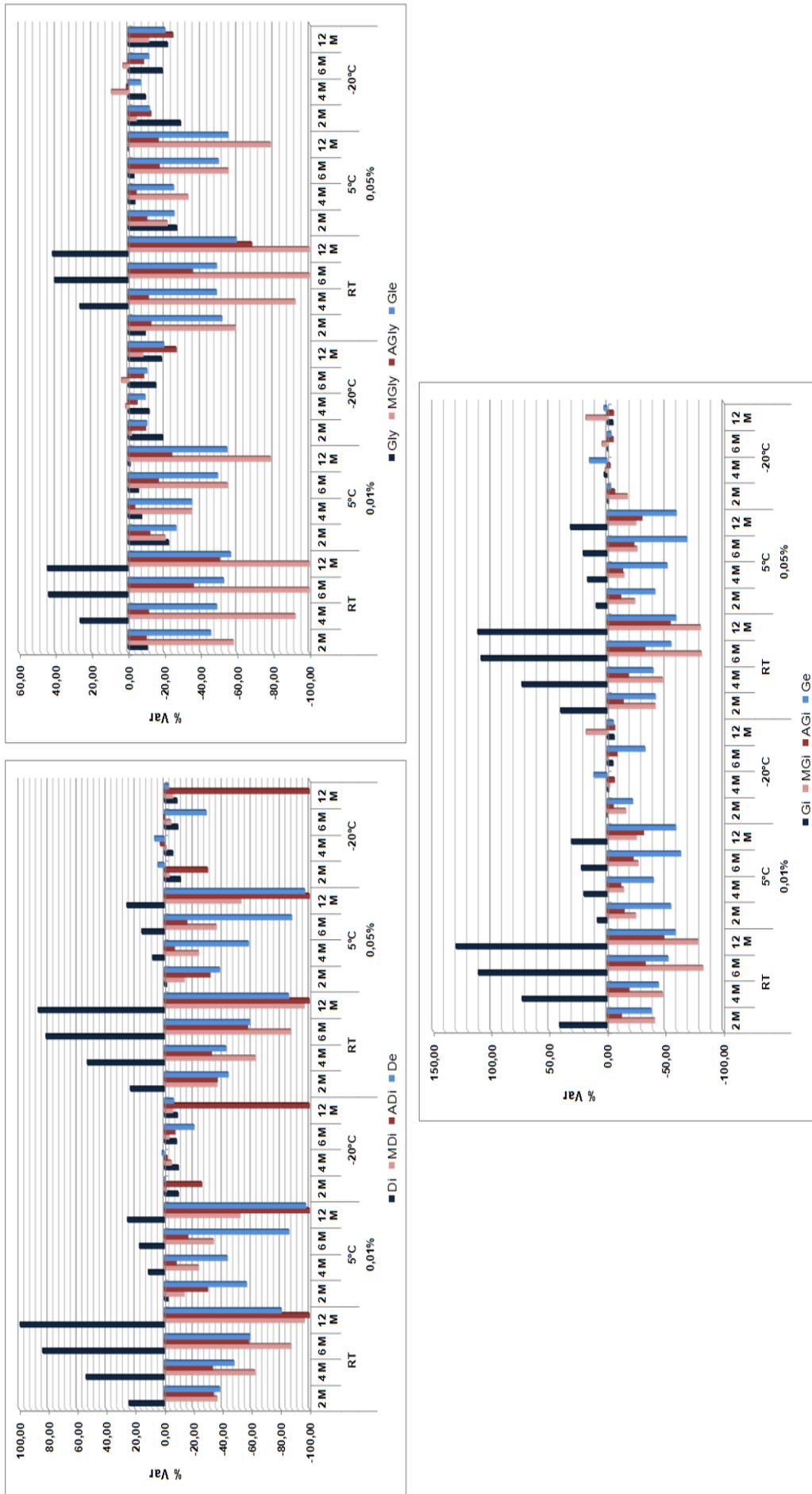


Figura 49. % Variación de cada isoflavona en cada periodo de tiempo y temperatura para los extractos etanólicos de proteína de soja con antioxidante.

En el caso de los derivados de daidzeína se observa lo mismo que para el extracto etanólico de proteína de soja sin aditivos; la daidzina aumenta y la malonil daidzina, acetil daidzina y la daidzeína disminuyen. Al disminuir la temperatura de almacenamiento se reducen las variaciones observadas, consiguiendo la conservación de las formas predominantes hasta los 6 meses de almacenamiento utilizando como temperatura -20°C . A partir de los 6 meses de almacenamiento la acetil daidzina se degrada completamente, siendo el derivado acetil el más inestable de los estudiados.

La malonil glicitina sigue siendo la forma más inestable de los derivados maloniles estudiados. La temperatura es el único factor que determina su conservación y a -20°C se puede conservar la concentración de los derivados de gliciteína con una pérdida menor al 20% hasta pasados 12 meses de almacenamiento.

Los derivados de genisteína son los más estables y a -20°C se conservan durante todo el tiempo del estudio de almacenamiento.

En los extractos etanólicos de soja se detectó el efecto de la adición del antioxidante a 5°C sobre la malonil glicitina, que se degradaba un 5% pasados 2 meses de almacenamiento, en comparación con la degradación de un 20% observada sin la adición del antioxidante. En los extractos etanólicos de proteína de soja no se observa esa diferencia, algo que puede ser debido a que en estos extractos la concentración de la malonil glicitina es menor que en los extractos de soja, por lo que no se detecta el efecto del antioxidante a concentraciones de compuesto cercanas al límite de cuantificación. En este caso, tampoco se observa la conservación hasta los 2 meses de la malonil genistina a 5°C que se detectaba en la soja; esta diferencia, puede ser debida a la presencia de los acetiles.

Algo que se observa en los extractos de proteína de soja es que para las tres formas glucósido estudiadas se conserva la concentración entre los 6 meses y los 12 meses al adicionar antioxidante (BHT) en una concentración de 0,05% a los extractos y almacenarlos a temperatura ambiente, algo que nos lleva a pensar que es posible que la presencia del antioxidante pueda detener la interconversión a largo plazo de alguna otra forma de isoflavona en su glucósido. Este efecto se observa sólo en el extracto de proteína de soja y no en el extracto de soja, lo que podría significar que el antioxidante influye en aquellas reacciones en las que interviene el derivado acetil, que es el único que se encuentra en estos extractos y no en los de soja.

En general, al igual que en los otros extractos estudiados, el almacenamiento de los extractos etanólicos de proteína de soja a -20°C permite la conservación de las isoflavonas estudiadas hasta pasados 6 meses de almacenamiento y hasta pasados 12 meses en el caso de los derivados de genisteína.

4.2.6 Efecto de la adición conjunta del inhibidor de β -glucosidasa y el antioxidante BHT

Al igual que con el extracto etanólico de soja, con el extracto etanólico de proteína de soja se estudió el efecto debido a la adición del inhibidor y el antioxidante en un mismo extracto.

Como se puede observar en la *figura 50* el comportamiento de las formas de isoflavonas estudiadas es similar al observado en los casos estudiados anteriormente.

En los extractos almacenados a temperatura ambiente la concentración de los glucósidos aumenta durante el tiempo de almacenamiento, pero no llegan a doblar su concentración pasados 12 meses de almacenamiento, tal y como ocurría en el caso del extracto etanólico de proteína de soja sin aditivos, sino que aumentan de forma similar a lo observado en aquellos extractos de proteína de soja a los que se adiciona inhibidor en una concentración 10 mM. Al reducir la temperatura de almacenamiento también se reduce ese aumento, siendo mínimo a -20°C .

En el caso de los derivados malonil, los derivados acetyl y las agluconas se observa una reducción en su concentración durante el tiempo de almacenamiento que disminuye al disminuir la temperatura de almacenamiento, llegando incluso a conservarse su concentración cuando se almacenan a -20°C , hasta pasados 6 meses de almacenamiento. Sólo en el caso de los derivados acetyl, pasados 12 meses de almacenamiento a -20°C se produce una disminución de más de la mitad, conservándose la concentración del resto de las formas de las isoflavonas estudiadas.

En el análisis de la varianza de dos factores realizado con los resultados obtenidos en el análisis de este extracto etanólico de proteína de soja que se muestra en la *tabla 36* se observa que ambos factores tienen efecto estadísticamente significativo sobre todas las isoflavonas detectadas en el extracto.

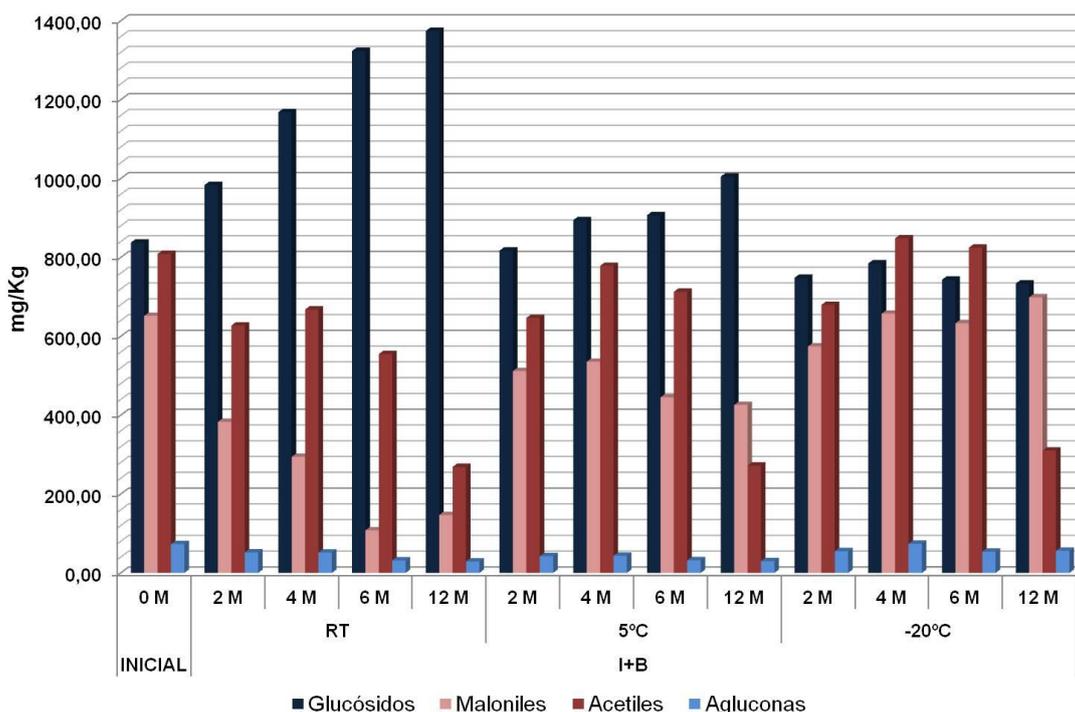


Figura 50. Variación en la concentración media de las distintas formas de isoflavonas estudiadas a distintos tiempos de almacenamiento y distintas temperaturas para el extracto etanólico de proteína de soja I+B.

Tabla 36. ANOVA de dos factores para el extracto etanólico de proteína de soja con 10 mM de inhibidor de β -glucosidasa y 0,05% de BHT.

Isoflavona	10 mM de inhibidor + 0,05% de BHT			
	Factores			
	Temperatura almacenamiento		Tiempo almacenamiento	
	F	Sig.	F	Sig.
Di	2260	0,00	217	0,00
Gly	62,1	0,00	39,0	0,00
Gi	1436	0,00	109	0,00
MDi	4955	0,00	686	0,00
MGly	3362	0,00	254	0,00
MGi	3047	0,00	112	0,00
ADi	189	0,00	1830	0,00
AGly	12,1	0,00	20,8	0,00
De	22,9	0,00	8,93	0,00
Gle	92,4	0,00	52,6	0,00
AGi	94,7	0,00	26,2	0,00
Ge	132	0,00	18,3	0,00

La *figura 51* muestra el porcentaje de variación en la concentración de cada una de las isoflavonas estudiadas en los extractos de proteína de soja sobre los que se ha adicionado una concentración 10 mM de inhibidor y un 0,05% de antioxidante cuando se almacenan a distintas temperaturas y durante distintos tiempos.

El comportamiento es el mismo que el observado en el resto de extractos de proteína de soja estudiados hasta ahora. Se observa el menor aumento de los glucósidos con respecto al extracto etanólico sin aditivos (NoAd).

No se observan diferencias cuando se comparan estos resultados con los obtenidos en el estudio de almacenamiento de los extractos a los que se les ha añadido una concentración 10 mM de inhibidor. La acetil daidzina es el más lábil de los derivados acetiles estudiados, mientras que la malonil glicitina es la más inestable de los derivados malonil estudiados. Al disminuir la temperatura de almacenamiento disminuyen las variaciones de concentración en las isoflavonas estudiadas al igual que se ha venido observando hasta el momento.

Se observa una ligera conservación de los derivados glucósidos a temperatura ambiente entre los 6 y los 12 meses, algo que también se observaba en los extractos donde se adicionaba el antioxidante en una concentración del 0,05%, y una ralentización de la generación de glucósidos a largo plazo probablemente producido por la presencia de los derivados acetil.

Con todo lo anterior se puede llegar a la conclusión de que los efectos que se detectan son los observados al adicionar el antioxidante y el inhibidor de β -glucosidasas en su concentración mayor; estos efectos no logran detener la degradación y/o interconversión de las isoflavonas presentes en el extracto.

El único factor que permite la conservación de las isoflavonas en los extractos estudiados es la temperatura. A -20°C se conservan casi la totalidad de las isoflavonas estudiadas hasta pasados 6 meses de almacenamiento; a partir de los 6 meses de almacenamiento se observa una disminución en la concentración de la acetil daidzina y la acetil glicitina, pero no del resto.

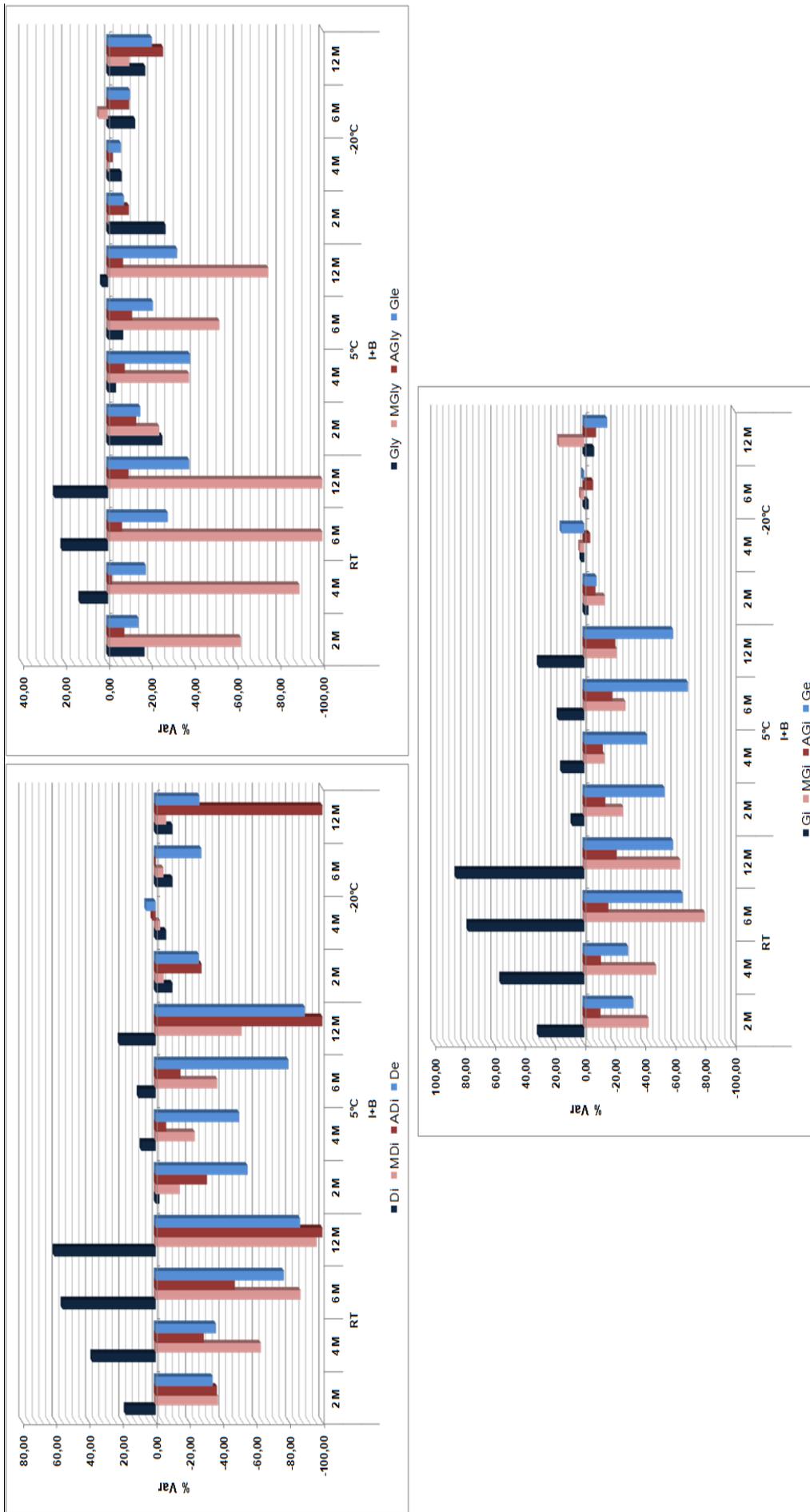


Figura 51. % Variación de cada isoflavona en cada periodo de tiempo y a distintas temperaturas para los extractos etanólicos de proteína de soja con inhibidor y antioxidante.

4.2.7 Conservación de los extractos líquidos etanólicos de proteína de soja

Teniendo en cuenta tanto los resultados obtenidos en el estudio de la conservación de las isoflavonas de soja en los extractos etanólicos de proteína de soja, se puede concluir que la temperatura es el factor más influyente; conservando los extractos a bajas temperaturas se puede mantener el perfil y la concentración de las isoflavonas presentes en los extractos.

El almacenamiento a -20°C permite la conservación de los derivados de daidzeína y genisteína hasta pasados 6 meses y de todos los demás, salvo la acetil daidzina, hasta los 12 meses. En el caso de los derivados de gliciteína se reducen las reacciones de interconversión y degradación, pero no se evitan.

Al igual que en el caso de los extractos etanólicos de soja, se realizó el análisis de varianza para cada temperatura de almacenamiento estudiada pasados 2 meses de almacenamiento, para observar si hay o no efecto estadísticamente significativo de los tratamientos utilizados. Los resultados de este estudio se muestran en la *tabla 37*.

Tabla 37. ANOVA a cada temperatura pasados 2 meses para los extractos etanólicos de proteína de soja.

Isoflavona	2 MESES					
	TODOS LOS TRATAMIENTOS					
	RT		5°C		-20°C	
	F	Sig.	F	Sig.	F	Sig.
Di	41,3	0,00	0,69	0,65	6,86	0,02
Gly	3,02	0,11	1,26	0,39	2,86	0,12
Gi	88,8	0,00	3,10	0,10	32,8	0,00
MDi	0,70	0,64	1,18	0,42	10,7	0,01
MGIy	0,76	0,61	26,8	0,00	20,9	0,00
MGI	5,36	0,03	3,93	0,06	21,2	0,00
ADi	5,57	0,03	1,53	0,31	13,4	0,00
AGly	18,3	0,00	1,93	0,22	4,72	0,04
De	7,45	0,01	7,89	0,01	0,74	0,62
Gle	41,0	0,00	2,77	0,12	5,04	0,04
AGi	8,69	0,01	2,94	0,11	34,2	0,00
Ge	11,2	0,01	1,99	0,21	14,7	0,00

A temperatura ambiente (RT) se observan diferencias estadísticamente significativas de concentración para todas las isoflavonas detectadas, excepto para glicitina, malonil daidzina y malonil glicitina. Para ver qué tratamiento es el responsable de estas diferencias se realiza el test de la mínima diferencia significativa (LSD).

En el caso de los glucósidos se observa que para los tres, las diferencias son estadísticamente significativas entre los extractos sin aditivos, con inhibidor a baja concentración (1mM) y sólo con antioxidante frente a los extractos con 10 mM de inhibidor y con inhibidor y antioxidante; por tanto, la adición del inhibidor reduce ligeramente el aumento de los glucósidos a temperatura ambiente. Lo mismo se observa para las agluconas.

Para el resto de isoflavonas aparecen diferencias significativas en el porcentaje de variación encontrados cuando los extractos se someten a los distintos tratamientos, sin embargo, no se observa una tendencia clara que permita concluir a qué se deben las diferencias encontradas.

A 5°C sólo se observan diferencias significativas en las concentraciones para la malonil glicitina y la daidzeína. Las concentraciones de ambas son muy bajas, y dichas concentraciones van disminuyendo a lo largo del estudio, siendo cada vez más próximas a los límites de cuantificación en muestra fijados, lo que puede dar lugar a errores en su cuantificación.

A la menor temperatura de almacenamiento, -20°C, se observa que las diferencias en el %Var entre tratamientos son significativas para todas las isoflavonas menos para la glicitina y la daidzeína. Al igual que ocurría en el caso anterior, los datos obtenidos en el estudio de la mínima diferencia no permiten sacar conclusiones sobre el efecto del tratamiento.

Por lo tanto, aunque la adición del inhibidor de β -glucosidasa ejerce un efecto positivo en los glucósidos a temperatura ambiente, no se trata de un efecto importante para la conservación del perfil y concentración de las isoflavonas. Por lo tanto, podemos decir que el único factor que nos permite conservarlas es la temperatura.

4.2.8 Conclusión del estudio realizado sobre el almacenamiento de los extractos líquidos etanólicos de proteína de soja

Las condiciones óptimas de almacenamiento para la conservación de las isoflavonas en los extractos etanólicos de proteína de soja son -20°C, temperatura que permite mantener tanto el perfil como la concentración de isoflavonas hasta pasados 2 meses de almacenamiento.

Pasados los 2 meses de almacenamiento y hasta los 6 meses, es posible la conservación parcial del perfil y la concentración de todas las isoflavonas sin encontrar diferencias importantes con las encontradas en el extracto etanólico inicial.

La conservación hasta los 12 meses no es posible para la acetil daidzina que se degrada en ese periodo de tiempo independientemente la temperatura utilizada. Lo mismo ocurre con los derivados de la gliciteína que se degradan durante todo el tiempo de almacenamiento aunque con variaciones menores del 50%.

Para el resto de las isoflavonas (derivados de la daidzeína y genisteína) es posible la conservación a -20°C hasta los 12 meses de almacenamiento, tal y como se muestra en la *figura 52*.

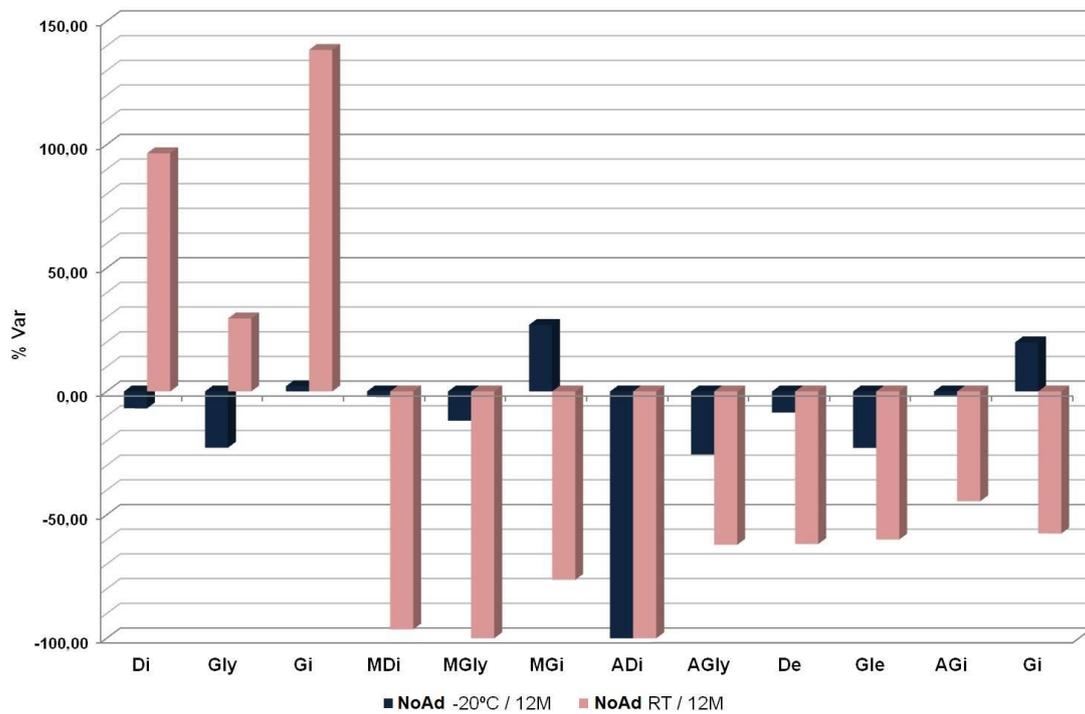


Figura 52. % Variación de cada isoflavona a los 12 meses de almacenamiento en el extracto etanólico de proteína de soja almacenado a -20°C y a temperatura ambiente (RT) sin aditivos (NoAd).

En la *figura 53* se muestra el cromatograma superpuesto a 254 nm del extracto etanólico inicial de proteína de soja y los extractos etanólicos de proteína de soja a los 12 meses de almacenamiento a temperatura ambiente y a -20°C.

En el cromatograma a -20°C se observa la degradación de la acetil daidzina y de los derivados de gliciteína, pero no la del resto de isoflavonas estudiadas comparando con el inicial y el de los 12 meses a temperatura ambiente.

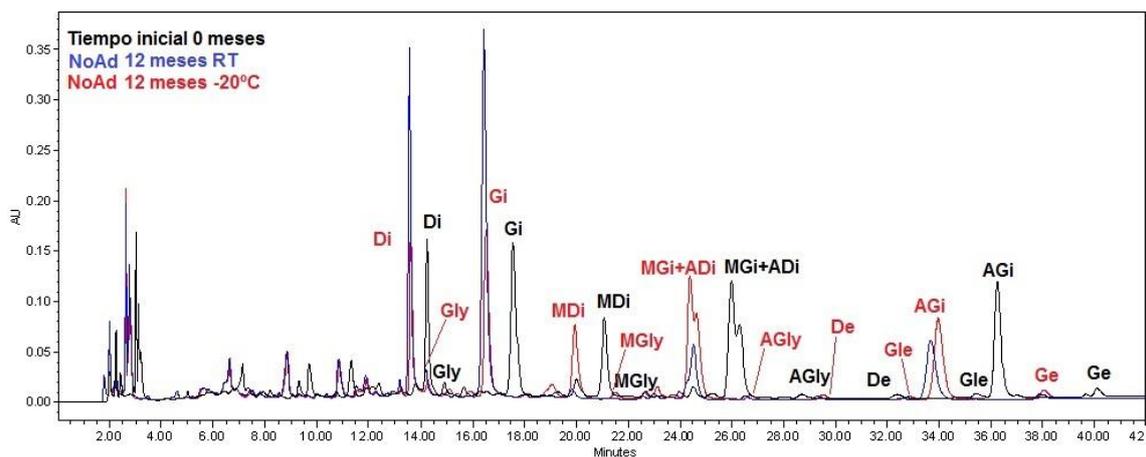


Figura 53. Cromatograma superpuesto de los extractos etanólicos de proteína de soja en el tiempo inicial (0 meses), en negro, y a los 12 meses de almacenamiento sin aditivos (NoAd) a temperatura ambiente (RT), en azul, y a -20°C , en rojo.

4.3 EXTRACTOS LIOFILIZADOS ETANÓLICOS DE PROTEÍNA DE SOJA

4.3.1 Composición del extracto liofilizado de proteína de soja

Una vez estudiados los extractos etanólicos de isoflavonas de soja en distintas matrices se estudió la estabilidad del extracto etanólico liofilizado de la proteína de soja. Se eligió esta matriz debido al mayor número de isoflavonas presentes en ella. La preparación de los extractos se describe en el apartado 3.3.2, siguiendo el esquema de la *figura 26* para su almacenamiento.

El perfil cromatográfico del extracto liofilizado de proteína de soja inicial (0 meses) obtenido mediante análisis por HPLC-DAD a la longitud de onda de 254nm se muestra en la *figura 54*.

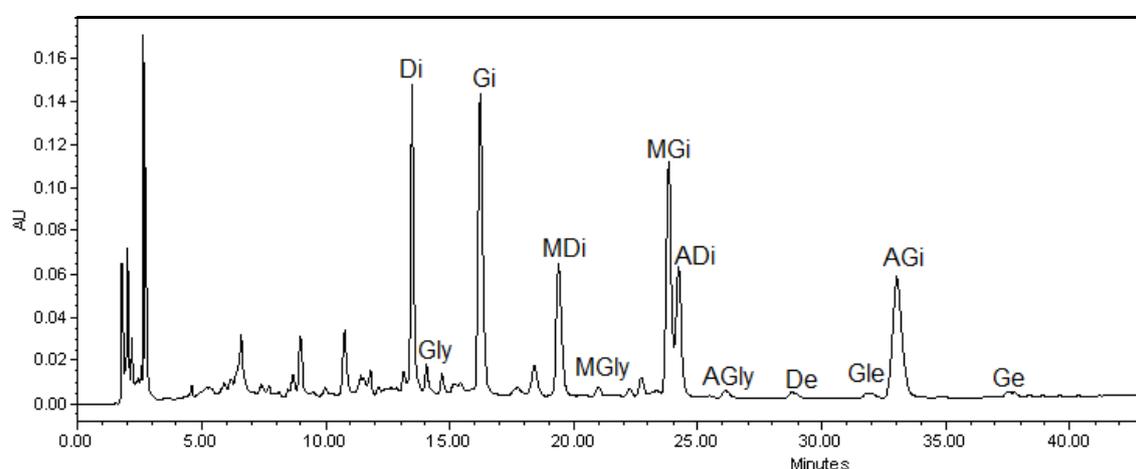


Figura 54. Cromatograma del extracto liofilizado de isoflavonas de proteína de soja.

La concentración a tiempo cero de las isoflavonas detectadas en este extracto de referencia y sus espectros UV que permiten identificarlas se muestran en la *tabla 48* y la *figura 55* respectivamente.

Tabla 38. Concentración de las isoflavonas en el extracto liofilizado inicial de la muestra de proteína de soja y su desviación estándar (sd). mg/Kg±sd

Isoflavona	Concentración
Di	323 ± 26,4
Gly	26,9 ± 4,10
Gi	340 ± 27,0
MDi	226 ± 16,3
MGly	10,5 ± 1,51
MGi	273 ± 21,4
ADi	285 ± 19,4
AGly	14,0 ± 1,61
De	14,5 ± 1,13
Gle	23,9 ± 1,24
AGi	271 ± 22,1
Ge	19,9 ± 0,87

Para este extracto las isoflavonas mayoritarias siguen siendo los glucósidos (38%), seguido por los derivados acetiles (31%) y los maloniles (28%). Las agluconas son las formas isoflavónicas minoritarias (3%). Para cualquiera de las isoflavonas estudiadas sus concentraciones son menores a las encontradas en los extractos etanólicos de proteína de soja vistas en el apartado anterior.

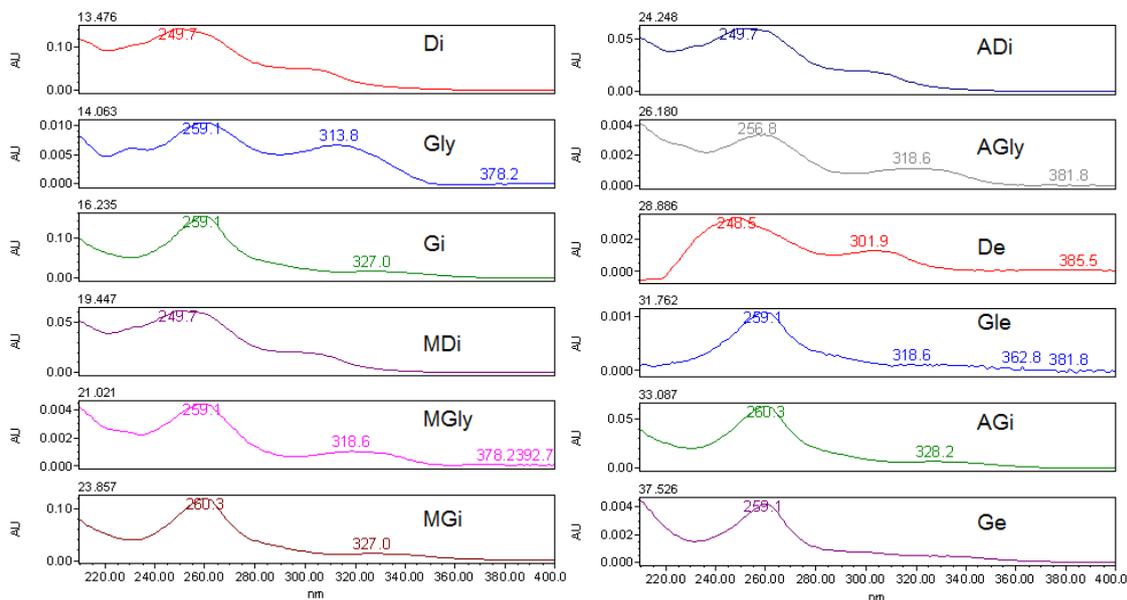


Figura 55. Espectros UV de las isoflavonas detectadas en el extracto liofilizado de proteína de soja.

Como ocurría en los extractos etanólicos de la proteína de soja, las concentraciones de la acetil glicina, la malonil glicitina y las tres agluconas son bajas y próximas a los límites de cuantificación en la muestra, lo que se tiene que tener en cuenta a la hora de sacar conclusiones con los estudios estadísticos realizados.

Como hemos visto en la *tabla 38*, los valores obtenidos al analizar el extracto liofilizado inicial son menores que los encontrados en el extracto etanólico (*tabla 29*), por lo que antes de la realización del estudio de almacenamiento de estos extractos liofilizados se estudió el efecto de la liofilización en dicho extracto. Para ello se realizó el estudio de recuperación de compuestos en los extractos tras liofilizarlos para comprobar si existen pérdidas debidas a la liofilización.

En la *figura 56* se muestran superpuestos los cromatogramas del extracto etanólico de proteína de soja (negro) y el mismo extracto liofilizado (rojo). No se observan pérdidas completas de ninguna de las isoflavonas detectadas, aunque sí que se observa cierta disminución en todos los picos, mayor en los picos más lábiles, como son los derivados malonil y acetil de las isoflavonas. Las magnitudes de estas pérdidas, expresados como % de recuperación, se han calculado como se indica en el apartado 3.5 de este capítulo y se muestran en la *tabla 39*.

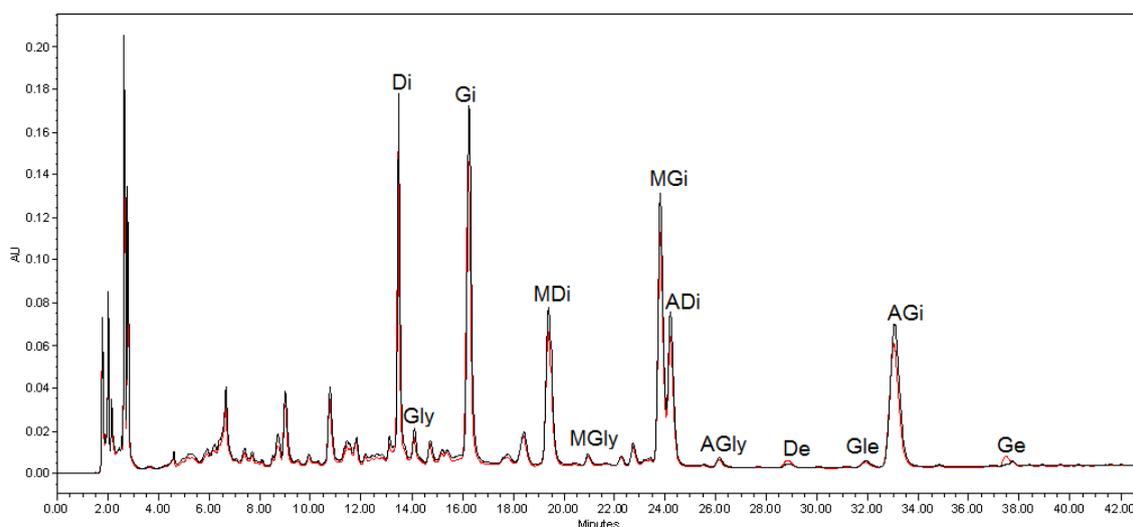


Figura 56. Cromatogramas superpuestos a 254 nm del extracto etanólico (en negro) y el extracto liofilizado (en rojo) de proteína de soja.

Tabla 39. Recuperación (% Rec.) de las isoflavonas detectadas en los extractos de proteína de soja al someterse al proceso de liofilización y su desviación estándar relativa (RSD), ambas en porcentaje (% RSD)

Isoflavona	% Rec.	% RSD
Di	93,2	6,79
Gly	87,2	8,56
Gi	95,9	4,08
MDi	93,6	7,95
MGly	82,9	5,41
MGli	92,8	7,77
ADi	98,0	8,26
AGly	86,3	7,86
De	100,8	7,36
Gle	104,7	1,54
AGi	96,5	1,37
Ge	93,2	8,06

Sólo en los casos de los derivados de la isoflavona glicitina se obtienen recuperaciones inferiores al 90%, algo que como ya hemos visto durante el estudio de la estabilidad con los extractos etanólicos son las isoflavonas más lábiles, pero aun así su recuperación no es inferior al 85%; por lo que se puede trabajar con estos extractos sabiendo que inicialmente hay una variación menor del 15% en algunas isoflavonas desde el principio del estudio respecto del extracto líquido de partida.

La resolución cromatográfica que se consigue entre los derivados malonil y acetil de las isoflavonas genistina y daidzina, respectivamente, es baja, al igual que ocurría en el extracto etanólico de proteína de soja (figura 42 y figura 53) por tanto, como anteriormente, se tendrá en cuenta este hecho a la hora de discutir los resultados. A medida que se van produciendo las interconversiones entre las isoflavonas las concentraciones de estos derivados van disminuyendo y debido a su escasa resolución la precisión en su cuantificación puede disminuir. En todo momento

se ha podido proceder a la cuantificación de estas isoflavonas en el extracto etanólico de proteína de soja.

Sin embargo en el caso de los extractos liofilizados, debido a que se realizaron con posterioridad al estudio de los extractos etanólicos y con la misma columna cromatográfica, se observó que el envejecimiento de la columna, provoca una mayor pérdida de resolución entre estas dos isoflavonas a partir de los dos meses de almacenamiento, tal y como se observa en la *figura 57*, lo que hace que sea imposible estudiar su estabilidad sin cometer errores significativos en su cuantificación.

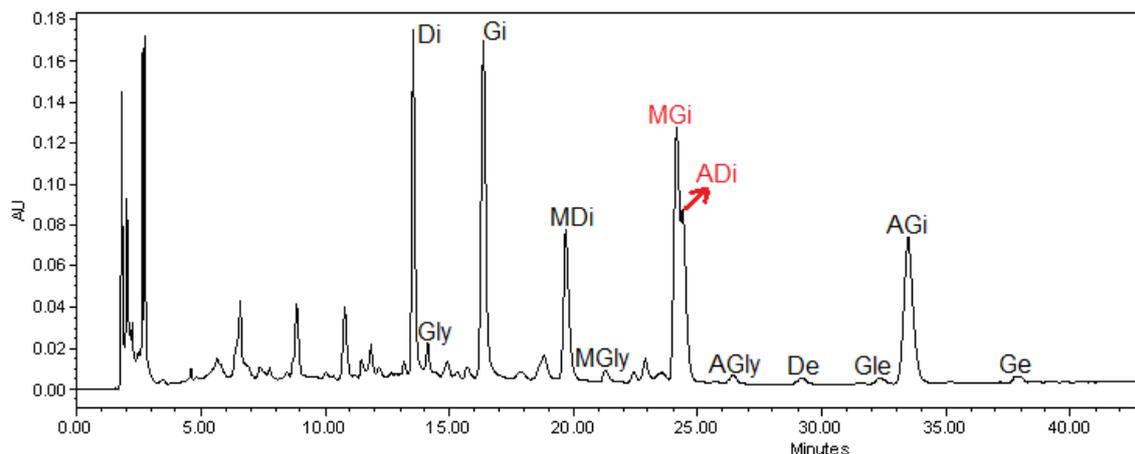


Figura 57. Cromatograma de isoflavonas del extracto liofilizado de proteína de soja a los dos meses de almacenamiento. En rojo se muestran las dos isoflavonas que se van a ignorar en el estudio por no ser capaces de resolver ambos picos cromatográficos.

Por lo tanto en este caso las isoflavonas a estudiar son 10: tres agluconas con sus tres derivados glucósidos, los derivados malonil daidzina y malonil glicitina, y los derivados acetil glicitina y acetil genistina.

Aunque no ha sido posible su cuantificación, se observa durante el estudio de almacenamiento que la acetil daidzina se comporta del mismo modo que en los extractos etanólicos de proteína de soja puesto que se degrada desde el principio del estudio, hasta que desaparece al final del mismo. En cambio, la malonil genistina se degrada en menor medida, tal y como se observa en el extracto etanólico de proteína de soja.

4.3.2 Estudio de la estabilidad de extractos liofilizados de proteína de soja

Los datos de concentración de las diez isoflavonas que se cuantifican durante el estudio de almacenamiento de los extractos liofilizados de proteína de soja a las distintas temperaturas y tratamientos realizados se muestran en la *tabla 40*.

Como se puede observar, la concentración total de isoflavonas en algunos puntos del estudio es mayor que la propia referencia a tiempo cero del estudio. Este hecho se debe a que al eliminar de nuestra discusión la malonil genistina y la acetil daidzina, no se tienen en cuenta estos compuestos en el cálculo de la concentración total de isoflavonas.

Como se ha visto en el estudio del almacenamiento del extracto líquido de proteína de soja sus concentraciones no son constantes, sino que varían a lo largo del tiempo de almacenamiento degradándose e interconvirtiéndose en otras formas isoflavónicas. El grado de esa interconversión no es posible conocerlo, lo que nos impide saber qué cantidad de esos dos compuestos se interconvierten en sus otros derivados; por tanto, el aumento de concentración de esos derivados durante el tiempo almacenamiento no sabemos en qué grado es debido a los dos compuestos eliminados de nuestro estudio. Por ello, los datos de la concentración total de isoflavonas no nos sirven para saber si hay degradación o no.

Con todo lo anterior cabe destacar que nuestro objetivo en el estudio de estabilidad de estos extractos liofilizados se va a basar en estudiar si se mantiene la concentración de las isoflavonas individuales estudiadas y en escoger las mejores condiciones para su almacenamiento, durante el mayor tiempo posible, con la menor pérdida respecto a su concentración inicial.

Tabla 40. Concentración de las isoflavonas estudiadas para los extractos liofilizados de proteína de soja en las distintas condiciones; los resultados se dan como mg/Kg \pm sd

REFERENCIA PROTEÍNA LIOFILIZADA 1ª		Daidzina	Glicitina	Genistina	Malonil Daidzina	Malonil Glicitina	Acetil Glicitina	Daidzeína	Gliciteína	Acetil Genistina	Genisteína	Total	
		362 \pm 3,30	34,9 \pm 0,17	367 \pm 7,02	246 \pm 2,87	13,9 \pm 0,17	16,2 \pm 0,09	16,6 \pm 1,83	25,1 \pm 0,31	295 \pm 4,63	20,6 \pm 0,99	2003	
NoAd	RT	2M	345 \pm 9,88	27,6 \pm 2,07	375 \pm 2,59	241 \pm 1,12	16,8 \pm 0,50	16,2 \pm 0,36	14,3 \pm 0,15	22,0 \pm 0,34	295 \pm 2,49	15,2 \pm 0,06	2189
		4M	348 \pm 4,94	26,7 \pm 1,07	382 \pm 7,83	232 \pm 3,04	14,6 \pm 0,26	15,6 \pm 0,79	13,7 \pm 0,90	21,8 \pm 0,08	290 \pm 3,00	15,1 \pm 0,02	2218
		6M	433 \pm 0,05	28,6 \pm 1,20	379 \pm 5,00	267 \pm 4,00	13,6 \pm 1,80	14,4 \pm 1,00	16,9 \pm 1,50	21,6 \pm 2,10	285 \pm 5,30	15,0 \pm 0,80	2523
		12M	331 \pm 2,76	32,4 \pm 1,06	363 \pm 3,00	192 \pm 0,85	14,7 \pm 0,78	13,0 \pm 0,41	12,0 \pm 1,22	19,4 \pm 0,09	278 \pm 8,35	14,0 \pm 0,16	1660
		2M	344 \pm 6,92	29,3 \pm 1,11	372 \pm 1,14	242 \pm 0,88	16,9 \pm 0,56	16,1 \pm 0,13	14,2 \pm 0,25	22,3 \pm 0,16	295 \pm 3,05	15,6 \pm 0,06	2174
		4M	343 \pm 8,71	28,6 \pm 1,02	372 \pm 16,0	233 \pm 7,41	14,8 \pm 0,26	15,4 \pm 0,78	13,9 \pm 0,62	22,0 \pm 0,81	285 \pm 10,3	15,3 \pm 0,25	2187
	5°C	2M	319 \pm 0,05	30,2 \pm 2,01	342 \pm 13,7	213 \pm 8,60	13,3 \pm 0,01	13,4 \pm 0,02	11,6 \pm 0,26	21,0 \pm 1,01	270 \pm 2,01	14,6 \pm 0,29	2143
		4M	308 \pm 2,60	30,5 \pm 0,15	330 \pm 9,35	193 \pm 0,38	15,2 \pm 0,81	12,0 \pm 0,31	10,2 \pm 0,67	18,8 \pm 0,70	264 \pm 1,64	13,9 \pm 0,18	1587
		6M	335 \pm 26,4	29,0 \pm 1,04	367 \pm 16,4	239 \pm 8,20	14,6 \pm 1,54	15,6 \pm 1,56	14,3 \pm 0,07	22,1 \pm 0,19	291 \pm 9,29	15,1 \pm 0,75	2163
		12M	343 \pm 4,66	29,5 \pm 0,23	377 \pm 2,89	240 \pm 0,05	15,2 \pm 0,35	15,7 \pm 0,30	15,8 \pm 1,40	22,6 \pm 0,02	290 \pm 2,81	15,4 \pm 0,24	2228
		2M	320 \pm 20,5	29,9 \pm 2,00	360 \pm 10,6	233 \pm 2,98	14,8 \pm 1,55	15,0 \pm 0,27	16,7 \pm 0,78	22,4 \pm 0,54	289 \pm 8,15	24,3 \pm 0,34	2302
		4M	351 \pm 15,5	27,1 \pm 0,05	295 \pm 2,01	240 \pm 14,8	15,3 \pm 1,01	11,0 \pm 0,01	17,9 \pm 1,55	18,5 \pm 0,50	245 \pm 2,01	20,3 \pm 1,01	1613
1 mM	RT	2M	337 \pm 16,9	27,6 \pm 1,88	365 \pm 15,6	233 \pm 7,24	15,8 \pm 0,14	15,4 \pm 0,92	13,3 \pm 0,64	21,4 \pm 0,33	285 \pm 10,4	14,6 \pm 0,12	2134
		4M	345 \pm 3,63	29,8 \pm 1,18	378 \pm 10,5	227 \pm 2,96	14,5 \pm 0,45	15,3 \pm 0,29	13,5 \pm 0,26	21,8 \pm 0,26	284 \pm 1,69	15,4 \pm 0,27	2191
		6M	310 \pm 7,24	27,5 \pm 0,97	333 \pm 2,40	195 \pm 5,97	12,1 \pm 0,04	12,6 \pm 0,42	10,9 \pm 0,46	19,9 \pm 0,13	253 \pm 2,02	14,7 \pm 0,11	2014
		12M	341 \pm 2,95	34,8 \pm 3,37	368 \pm 4,87	190 \pm 2,49	15,4 \pm 0,80	13,5 \pm 0,47	11,9 \pm 0,54	20,0 \pm 0,80	283 \pm 7,20	15,0 \pm 0,15	1692
		2M	343 \pm 8,33	29,4 \pm 0,43	377 \pm 2,28	243 \pm 0,46	17,4 \pm 0,84	16,2 \pm 0,28	14,6 \pm 0,05	22,2 \pm 0,33	295 \pm 0,02	15,8 \pm 0,35	2186
		4M	352 \pm 16,3	30,0 \pm 1,87	385 \pm 16,7	237 \pm 9,42	15,1 \pm 0,86	16,0 \pm 0,97	14,9 \pm 0,76	22,6 \pm 1,08	292 \pm 14,2	16,1 \pm 0,38	2239
	5°C	2M	320 \pm 11,7	30,9 \pm 0,71	360 \pm 11,3	222 \pm 6,75	14,4 \pm 0,18	14,5 \pm 0,45	12,6 \pm 0,65	21,8 \pm 0,82	283 \pm 9,85	15,7 \pm 0,34	2240
		4M	298 \pm 2,60	20,7 \pm 0,15	202 \pm 9,35	186 \pm 0,38	14,5 \pm 0,81	11,5 \pm 0,31	10,4 \pm 0,67	19,1 \pm 0,70	261 \pm 1,64	14,3 \pm 0,01	1551
		6M	337 \pm 10,1	29,0 \pm 1,79	377 \pm 6,15	244 \pm 1,17	17,0 \pm 0,22	15,9 \pm 0,10	15,2 \pm 0,84	22,6 \pm 0,08	293 \pm 2,22	16,2 \pm 0,28	2143
		12M	340 \pm 7,95	28,5 \pm 2,11	368 \pm 14,0	234 \pm 2,72	14,8 \pm 0,46	15,1 \pm 0,68	14,2 \pm 0,26	22,1 \pm 0,13	283 \pm 9,29	15,8 \pm 0,49	2185
		2M	308 \pm 7,05	28,1 \pm 3,51	337 \pm 1,44	222 \pm 5,45	13,6 \pm 0,88	13,6 \pm 0,75	12,1 \pm 0,58	21,1 \pm 0,08	270 \pm 0,91	15,4 \pm 0,01	2156
		4M	308 \pm 20,4	20,4 \pm 4,22	334 \pm 18,3	214 \pm 9,61	17,8 \pm 1,15	13,1 \pm 0,71	11,2 \pm 0,76	20,3 \pm 0,95	276 \pm 13,15	14,9 \pm 0,37	1664
10 mM	RT	2M	340 \pm 6,24	31,6 \pm 0,23	366 \pm 1,97	235 \pm 1,46	16,0 \pm 0,69	15,6 \pm 0,37	13,9 \pm 0,12	21,7 \pm 0,10	287 \pm 1,75	16,0 \pm 0,27	2156
		4M	355 \pm 7,81	34,2 \pm 3,45	385 \pm 2,79	224 \pm 2,92	14,5 \pm 0,27	15,1 \pm 0,04	13,5 \pm 0,29	21,9 \pm 0,15	286 \pm 0,72	16,2 \pm 0,22	2201
		6M	333 \pm 14,6	30,4 \pm 2,65	368 \pm 15,6	204 \pm 9,79	12,8 \pm 0,65	13,9 \pm 0,93	12,0 \pm 0,72	21,6 \pm 0,48	275 \pm 13,4	15,8 \pm 0,41	2168
		12M	335 \pm 5,08	34,1 \pm 0,95	368 \pm 8,65	180 \pm 0,92	14,4 \pm 0,05	12,9 \pm 0,36	10,5 \pm 0,24	19,9 \pm 0,14	272 \pm 0,51	14,8 \pm 0,44	1643
		2M	345 \pm 1,27	30,4 \pm 1,98	367 \pm 5,08	243 \pm 4,48	17,0 \pm 1,20	16,2 \pm 0,48	14,2 \pm 0,51	22,2 \pm 0,45	294 \pm 1,86	16,4 \pm 0,06	2181
		4M	333 \pm 0,98	27,0 \pm 0,57	363 \pm 5,20	222 \pm 3,57	14,3 \pm 0,36	14,5 \pm 0,10	13,0 \pm 0,31	21,3 \pm 0,69	273 \pm 6,20	15,7 \pm 0,33	2106
	5°C	2M	320 \pm 13,1	31,8 \pm 0,95	361 \pm 15,9	221 \pm 7,22	14,5 \pm 0,58	14,8 \pm 0,33	12,5 \pm 0,39	22,0 \pm 0,24	283 \pm 8,83	15,9 \pm 0,41	2241
		4M	294 \pm 25,3	20,8 \pm 2,93	204 \pm 20,9	188 \pm 16,2	15,5 \pm 0,85	11,8 \pm 1,18	10,2 \pm 2,75	19,3 \pm 0,92	254 \pm 19,4	14,3 \pm 0,22	1539
		6M	331 \pm 4,87	28,9 \pm 0,28	359 \pm 7,79	240 \pm 4,06	16,7 \pm 0,69	15,7 \pm 0,29	14,7 \pm 1,03	22,3 \pm 0,31	288 \pm 4,49	16,4 \pm 0,15	2102
		12M	344 \pm 13,6	29,8 \pm 1,49	380 \pm 18,6	241 \pm 13,0	14,9 \pm 1,10	15,8 \pm 0,96	14,8 \pm 0,92	22,7 \pm 1,20	291 \pm 15,2	16,4 \pm 0,18	2233
		2M	322 \pm 8,49	27,7 \pm 1,79	347 \pm 1,07	230 \pm 3,13	14,7 \pm 0,50	14,6 \pm 0,30	15,7 \pm 0,33	22,2 \pm 0,29	286 \pm 2,24	22,7 \pm 0,33	2253
		4M	327 \pm 0,06	33,9 \pm 0,01	354 \pm 5,25	222 \pm 1,56	16,4 \pm 0,07	14,6 \pm 0,52	16,5 \pm 0,36	20,5 \pm 0,25	298 \pm 2,72	21,6 \pm 0,41	1770

Tabla 40 (cont.). Concentración de las isoflavonas estudiadas para los extractos liofilizados de proteína de soja en las distintas condiciones; los resultados se dan como mg/Kg ± sd

REFERENCIA PROTEÍNA LIOFILIZADA 2ª	Daidzina	Glicitina	Genistina	Malonil Daidzina	Malonil Glicitina	Acetil Glicitina	Daidzeína	Gliciteína	Acetil Genistina	Genisteína	Total
0,01%	2 M	323 ± 26,4	26,9 ± 2,10	340 ± 27,0	226 ± 16,3	10,5 ± 1,51	14,5 ± 1,13	23,9 ± 1,24	271 ± 22,1	19,9 ± 0,87	1827
	4 M	353 ± 2,70	29,2 ± 1,69	385 ± 16,1	248 ± 3,60	16,2 ± 0,62	16,7 ± 0,82	22,6 ± 0,75	306 ± 10,2	18,3 ± 1,18	2303
	6 M	359 ± 3,21	29,9 ± 1,59	388 ± 7,75	240 ± 6,09	16,2 ± 1,45	15,7 ± 0,48	15,6 ± 0,06	303 ± 4,77	18,3 ± 0,15	2312
	12 M	330 ± 1,55	16,5 ± 0,89	358 ± 8,56	188 ± 5,25	9,47 ± 0,48	12,4 ± 0,14	13,1 ± 0,98	19,5 ± 1,12	257 ± 12,2	17,5 ± 0,56
0,05%	2 M	320 ± 9,05	32,5 ± 2,41	356 ± 4,93	181 ± 4,53	13,7 ± 0,60	12,6 ± 0,15	19,6 ± 0,30	272 ± 7,93	17,3 ± 0,65	1617
	4 M	343 ± 9,62	28,5 ± 0,76	376 ± 8,29	243 ± 4,45	16,0 ± 0,31	16,2 ± 0,34	16,6 ± 0,48	303 ± 6,78	19,3 ± 0,19	2271
	6 M	349 ± 0,65	30,5 ± 2,12	381 ± 7,77	239 ± 5,00	16,4 ± 1,30	15,6 ± 0,34	15,6 ± 0,40	301 ± 7,29	19,0 ± 0,93	2303
	12 M	360 ± 6,21	46,5 ± 3,69	388 ± 16,29	218 ± 10,5	39,5 ± 1,27	42,4 ± 0,53	43,1 ± 1,18	287 ± 17,2	47,5 ± 1,76	2310
I+B	2 M	320 ± 22,4	34,6 ± 0,76	352 ± 17,8	204 ± 8,32	16,2 ± 1,41	14,1 ± 2,07	20,5 ± 0,56	284 ± 16,1	17,4 ± 0,24	1688
	4 M	348 ± 12,5	28,7 ± 2,89	374 ± 24,3	246 ± 11,0	15,9 ± 1,13	16,1 ± 0,17	16,6 ± 0,68	303 ± 11,8	19,5 ± 1,04	2281
	6 M	346 ± 12,1	31,1 ± 2,76	387 ± 15,8	244 ± 10,5	15,6 ± 1,13	15,9 ± 0,17	16,8 ± 0,88	301 ± 11,8	18,9 ± 1,04	2292
	12 M	307 ± 35,5	20,0 ± 0,81	323 ± 31,2	204 ± 19,0	12,1 ± 1,89	12,1 ± 1,76	10,9 ± 0,96	247 ± 19,9	16,0 ± 1,11	1961
RT	2 M	295 ± 7,05	29,1 ± 2,51	319 ± 1,44	206 ± 5,65	16,7 ± 0,88	12,2 ± 0,58	20,0 ± 0,08	266 ± 0,91	16,5 ± 0,46	1598
	4 M	331 ± 8,34	28,3 ± 0,04	355 ± 2,14	234 ± 5,38	15,3 ± 0,36	15,3 ± 0,42	11,5 ± 0,27	277 ± 1,68	15,5 ± 0,57	2161
	6 M	349 ± 8,52	29,0 ± 0,49	371 ± 16,3	238 ± 3,81	16,0 ± 1,23	15,3 ± 0,59	11,8 ± 1,73	287 ± 7,98	15,5 ± 0,58	2259
	12 M	309 ± 3,88	24,1 ± 0,60	320 ± 1,12	183 ± 15,0	11,1 ± 0,20	12,3 ± 0,45	11,9 ± 1,10	241 ± 10,3	15,8 ± 1,55	1877
5°C	2 M	346 ± 18,9	34,5 ± 2,05	375 ± 21,8	203 ± 0,28	16,3 ± 0,01	14,1 ± 0,58	20,7 ± 0,30	285 ± 14,2	14,4 ± 1,89	1736
	4 M	341 ± 8,97	29,0 ± 1,05	366 ± 20,3	243 ± 4,32	16,2 ± 0,93	16,0 ± 0,80	11,7 ± 1,82	289 ± 14,8	15,2 ± 1,80	2222
	6 M	344 ± 8,54	29,7 ± 0,43	361 ± 22,7	239 ± 1,29	16,4 ± 1,55	15,0 ± 0,31	9,78 ± 1,23	281 ± 14,8	14,6 ± 1,96	2228
	12 M	336 ± 11,5	17,8 ± 2,04	340 ± 28,34	209 ± 6,28	11,6 ± 1,01	13,0 ± 0,45	8,10 ± 1,30	249 ± 15,3	12,2 ± 1,35	1994
-20°C	2 M	288 ± 14,7	29,2 ± 5,21	306 ± 22,0	189 ± 9,82	14,6 ± 2,98	12,1 ± 1,80	7,62 ± 0,77	238 ± 0,67	12,2 ± 0,74	1483
	4 M	324 ± 16,1	27,9 ± 1,28	347 ± 28,2	237 ± 9,28	15,2 ± 1,50	15,1 ± 1,01	10,8 ± 1,99	274 ± 22,5	14,9 ± 1,20	2116
	6 M	337 ± 14,3	28,2 ± 1,30	368 ± 20,2	240 ± 5,30	16,1 ± 0,64	15,6 ± 0,22	12,4 ± 0,22	286 ± 7,51	17,6 ± 1,63	2220
	12 M	346 ± 11,5	27,8 ± 3,05	350 ± 36,2	219 ± 15,8	21,6 ± 1,58	23,0 ± 0,83	18,1 ± 1,50	259 ± 20,3	22,2 ± 2,78	2114
RT	2 M	324 ± 10,4	31,4 ± 0,69	347 ± 18,2	224 ± 2,31	18,9 ± 0,17	14,1 ± 0,51	9,11 ± 2,33	284 ± 15,4	13,4 ± 0,90	1729
	4 M	328 ± 16,7	29,4 ± 0,89	357 ± 12,6	222 ± 13,5	13,7 ± 0,63	15,0 ± 1,16	14,8 ± 1,09	281 ± 13,8	19,3 ± 0,94	2121
	6 M	348 ± 11,0	30,1 ± 1,61	382 ± 10,1	222 ± 0,43	14,9 ± 0,63	14,9 ± 0,26	14,1 ± 0,09	291 ± 1,61	19,7 ± 0,59	2227
	12 M	355 ± 17,26	20,2 ± 3,28	373 ± 20,6	214 ± 8,31	11,9 ± 2,15	14,0 ± 1,04	8,39 ± 1,70	267 ± 25,3	14,3 ± 1,63	2108
5°C	2 M	344 ± 16,1	30,6 ± 0,50	376 ± 28,5	186 ± 7,16	15,1 ± 0,38	13,4 ± 0,82	8,75 ± 0,02	277 ± 19,7	13,3 ± 7,97	1677
	4 M	327 ± 7,15	29,3 ± 0,89	356 ± 5,34	230 ± 4,67	14,4 ± 0,25	15,4 ± 0,28	15,3 ± 0,04	284 ± 5,87	19,3 ± 0,58	2142
	6 M	345 ± 11,2	31,9 ± 1,31	378 ± 16,5	230 ± 2,41	15,6 ± 1,00	15,0 ± 0,22	14,8 ± 0,17	294 ± 2,01	19,6 ± 0,87	2248
	12 M	332 ± 14,0	18,6 ± 2,89	359 ± 13,4	203 ± 13,2	10,9 ± 1,28	12,7 ± 1,19	14,3 ± 1,90	263 ± 30,3	18,1 ± 1,79	2025
-20°C	2 M	329 ± 0,05	34,3 ± 1,38	361 ± 5,42	205 ± 0,05	16,9 ± 0,24	13,9 ± 0,28	15,7 ± 0,05	284 ± 4,12	22,7 ± 0,58	1712
	4 M	332 ± 19,5	30,1 ± 3,20	363 ± 23,7	236 ± 15,5	14,5 ± 1,62	15,4 ± 1,36	18,1 ± 5,08	289 ± 21,9	24,2 ± 0,61	2200
	6 M	331 ± 13,1	32,7 ± 0,11	374 ± 13,4	239 ± 7,65	16,1 ± 1,42	15,6 ± 0,71	18,4 ± 1,53	301 ± 10,9	24,2 ± 0,61	2265
	12 M	347 ± 14,2	28,4 ± 2,89	386 ± 31,7	240 ± 6,05	14,6 ± 0,90	15,3 ± 0,31	18,4 ± 2,10	305 ± 35,3	20,6 ± 1,72	2353
		312 ± 10,2	32,3 ± 3,38	333 ± 24,5	218 ± 8,41	18,3 ± 2,27	13,7 ± 0,85	6,33 ± 0,37	274 ± 7,01	8,63 ± 1,48	1665

En el apartado anterior se han comentado los resultados de los extractos etanólicos (líquidos). Antes de comentar los resultados de los extractos liofilizados se ha realizado el estudio de varianza de ambos extractos de proteína de soja, tanto etanólicos como liofilizados, para comprobar si el tipo de muestra (si es líquido o liofilizado), la temperatura (RT, 5°C y -20°C), el tiempo de almacenamiento (2, 4, 6 y 12 meses) y el tratamiento (adición o no de aditivos) son factores que afectan a las diferencias en el “%Var” estudiado. Los resultados de este estudio de varianza, con un nivel de confianza del 95%, se muestran en la *tabla 41*. Sombreado en azul aparecen los datos donde el factor tiene efecto significativo ($p < 0,05$) sobre la variación de la concentración de esa isoflavona, es decir, existe diferencia estadísticamente significativa en las variaciones respecto a su referencia inicial.

Tabla 41. Resultados del ANOVA de 4 factores para cada una de las isoflavonas objeto de estudio en los extractos de proteína de soja.

Isoflavona	Factores							
	Tipo de muestra		Temperatura almacenamiento		Tiempo almacenamiento		Tratamiento	
	F	Sig.	F	Sig.	F	Sig.	F	Sig.
Di	855	0,00	778	0,00	48,2	0,00	28,6	0,00
Gly	17,0	0,00	154	0,00	75,7	0,00	78,1	0,00
Gi	3401	0,00	2161	0,00	103	0,00	30,0	0,00
MDi	1628	0,00	800	0,00	206	0,00	7,62	0,00
MGly	3608	0,00	513	0,00	44,5	0,00	59,3	0,00
AGly	351	0,00	32,9	0,00	104	0,00	43,2	0,00
De	352	0,00	116	0,00	48,9	0,00	15,3	0,00
Gle	1342	0,00	313	0,00	124	0,00	34,1	0,00
AGi	974	0,00	127	0,00	114	0,00	15,5	0,00
Ge	134	0,00	299	0,00	42,9	0,00	9,37	0,00

Como se observa, los cuatro factores ejercen un efecto estadísticamente significativo para todas las isoflavonas estudiadas. Sin embargo, el único factor cuyo efecto tiene significado analítico es el tipo de muestra. No vamos a analizar el resto de factores en este estudio de varianza porque el tipo de muestra afecta directamente en las variaciones debidas al resto de factores, y por ello existen las diferencias observadas.

Que el extracto sea líquido o liofilizado afecta a la conservación en el almacenamiento, y comparando las concentraciones de ambos extractos durante el estudio se puede concluir que la liofilización de los extractos conserva la concentración de cada una de las isoflavonas, ya que la variación con respecto a la referencia inicial es mucho menor en el caso de los extractos liofilizados que en el caso de los extractos etanólicos que se estudian en el apartado 4.2 de este capítulo.

Para el estudio del efecto de los otros tres factores realizamos el estudio de varianza únicamente para los datos de los extractos liofilizados, como se ha realizado con los extractos etanólicos en apartados anteriores. Los resultados de este estudio de varianza (ANOVA) se muestran en la *tabla 42*.

Tabla 42. Resultados del ANOVA de 3 factores para cada una de las isoflavonas objeto de estudio en los extractos liofilizados de proteína de soja.

Isoflavona	Factores					
	Temperatura almacenamiento		Tiempo almacenamiento		Tratamiento	
	F	Sig.	F	Sig.	F	Sig.
Di	2,80	0,07	9,19	0,00	25,94	0,00
Gly	10,25	0,00	33,30	0,00	56,33	0,00
Gi	3,16	0,05	23,92	0,00	22,20	0,00
MDi	12,35	0,00	64,70	0,00	12,86	0,00
MGly	21,00	0,00	2,26	0,09	63,35	0,00
AGly	15,81	0,00	29,16	0,00	38,42	0,00
De	5,91	0,00	14,86	0,00	25,02	0,00
Gle	18,54	0,00	32,21	0,00	21,20	0,00
AGi	0,74	0,48	24,28	0,00	24,11	0,00
Ge	12,87	0,00	19,91	0,00	24,43	0,00

El tiempo de almacenamiento ejerce un efecto estadísticamente significativo ($p < 0,05$) durante el estudio para todas las isoflavonas estudiadas menos para el derivado malonil de la glicitina. Esto puede ser debido a que esta isoflavona se encuentra en concentración muy baja que puede llevar a un error asociado a su cuantificación.

La adición de inhibidor enzimático y/o antioxidante (BHT), es decir, el tratamiento, ejerce un efecto estadísticamente significativo para todas las isoflavonas estudiadas en estos extractos y, a priori, es el factor más influyente.

La temperatura de almacenamiento ejerce efecto estadísticamente significativo para todas las isoflavonas menos para daidzina, genistina y acetil genistina. Para abordar el estudio de los resultados obtenidos en el análisis de estos extractos se van a estudiar los factores del mismo modo que en los apartados anteriores para ver qué niveles de estos dos factores, temperatura y tiempo de almacenamiento, son los responsables de esas diferencias significativas.

En primer lugar se ha realizado el test de la mínima diferencia significativa (LSD) para determinar entre qué niveles del factor temperatura existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). Los valores obtenidos se muestran en la *tabla 43*. Los datos donde el factor tiene efecto significativo ($p < 0,05$) sobre la variación de la concentración de esa isoflavona se resaltan sombreados en azul.

Tabla 43. Resultados del test de la mínima diferencia significativa comparando los distintos niveles del factor temperatura ($p < 0,05$) para los extractos liofilizados de proteína de soja.

Isoflavona	Temperatura	Temperatura	Sig.
Di	RT	5°C	0,08
		-20°C	0,03
	-20°C	5°C	0,62
Gly	RT	5°C	0,00
		-20°C	0,84
	-20°C	5°C	0,00
Gi	RT	5°C	0,22
		-20°C	0,01
	-20°C	5°C	0,21
MDi	RT	5°C	0,04
		-20°C	0,00
	-20°C	5°C	0,01
MGly	RT	5°C	0,00
		-20°C	0,00
	-20°C	5°C	0,00
AGly	RT	5°C	0,00
		-20°C	0,15
	-20°C	5°C	0,00
De	RT	5°C	0,00
		-20°C	0,00
	-20°C	5°C	0,89
Gle	RT	5°C	0,00
		-20°C	0,02
	-20°C	5°C	0,00
AGi	RT	5°C	0,38
		-20°C	0,25
	-20°C	5°C	0,78
Ge	RT	5°C	0,00
		-20°C	0,00
	-20°C	5°C	0,32

En este caso, a diferencia de lo que ocurre con los extractos etanólicos de proteína de soja donde para todas la isoflavonas existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$), no existen esas diferencias para algunas isoflavonas, por lo que la temperatura no les afecta de igual manera en los extractos liofilizados que en los extractos líquidos etanólicos. En concreto para la daidzina y la genistina no se observa efecto significativo entre las variaciones encontradas cuando se almacenan los extractos a 5°C y las encontradas a temperatura ambiente (RT) y -20°C, pero sí que se observan diferencias entre temperatura ambiente y -20°C; en sus agluconas,

daidzeína y genisteína, se observa efecto a 5°C, pero no hay diferencias con -20°C. En cambio, para el derivado acetil de genistina no hay efecto estadísticamente significativo entre las tres temperaturas estudiadas, por lo que la temperatura no afecta. También se observa que para glicitina y su derivado acetil no hay diferencias significativas entre la variación a temperatura ambiente y -20°C. Los maloniles de daidzina y glicitina son los únicos a los que les afectan estadísticamente todas las temperaturas de almacenamiento estudiadas.

Como podemos ver en la *tabla 40*, no se observan las mismas variaciones que se observaban en los extractos etanólicos de proteína de soja. Al aumentar la temperatura no se observan asociados a los glucósidos los aumentos de concentración que se observaban antes, ni tampoco el aumento de los acetiles y su posterior disminución. La disminución de los derivados malonil se detecta pero en menor magnitud que en los extractos etanólicos. Todo ello nos lleva a pensar que la liofilización de los extractos permite la detención de las reacciones de interconversión entre las isoflavonas durante más tiempo que en los extractos líquidos. Esto confirma que la presencia de agua acelera estas reacciones de interconversión y/o degradación, como se observó en los trabajos de estabilidad de semillas de soja de Huang y col. 2009 [59] o de extractos de isoflavonas de soja obtenidos por atomización de Sobharaksha y col. 2011 [63].

Se puede concluir que las variaciones que se observan dependen tanto de la temperatura como posiblemente del tratamiento realizado en el extracto y debemos estudiarlo más exhaustivamente, tal y como se ha venido realizando durante todo este capítulo.

4.3.3 Efecto de la temperatura

Para poder estudiar los extractos de isoflavonas primero debemos saber cómo afecta la temperatura durante el tiempo de almacenamiento, sin aditivos añadidos, a la variación de las isoflavonas estudiadas. En la *figura 58* se muestra la variación de la concentración media de las formas de las isoflavonas estudiadas a lo largo del tiempo de almacenamiento y a las distintas temperaturas estudiadas.

La primera evidencia que nos muestra esta figura es que no se observan importantes diferencias, entre las diferentes formas de isoflavonas, a los distintos tiempos de almacenamiento y las distintas temperaturas estudiadas.

Comparando esta gráfica con la *figura 44*, la correspondiente a los extractos etanólicos de proteína de soja, se observa que en el caso de los extractos liofilizados a temperatura ambiente no aparece el gran aumento de los glucósidos observado en los extractos etanólicos, ni tampoco la gran disminución de las formas malonil y acetil hasta los 6 meses de almacenamiento.

Para cualquier temperatura existe una ligera disminución de todas las formas de isoflavonas desde los 2 meses debido a la pérdida producida durante el proceso de

liofilización, como hemos visto en el apartado 4.3.1. A temperatura ambiente se observa que los glucósidos mantienen su concentración hasta los 12 meses, en el caso de los derivados malonil y acetil se mantienen hasta los 6 meses, disminuyendo hasta un 80 y 73% de % Var, respectivamente, a los 12 meses. Las formas aglucona también disminuyen en torno a un 80% de % Var hasta pasados 12 meses.

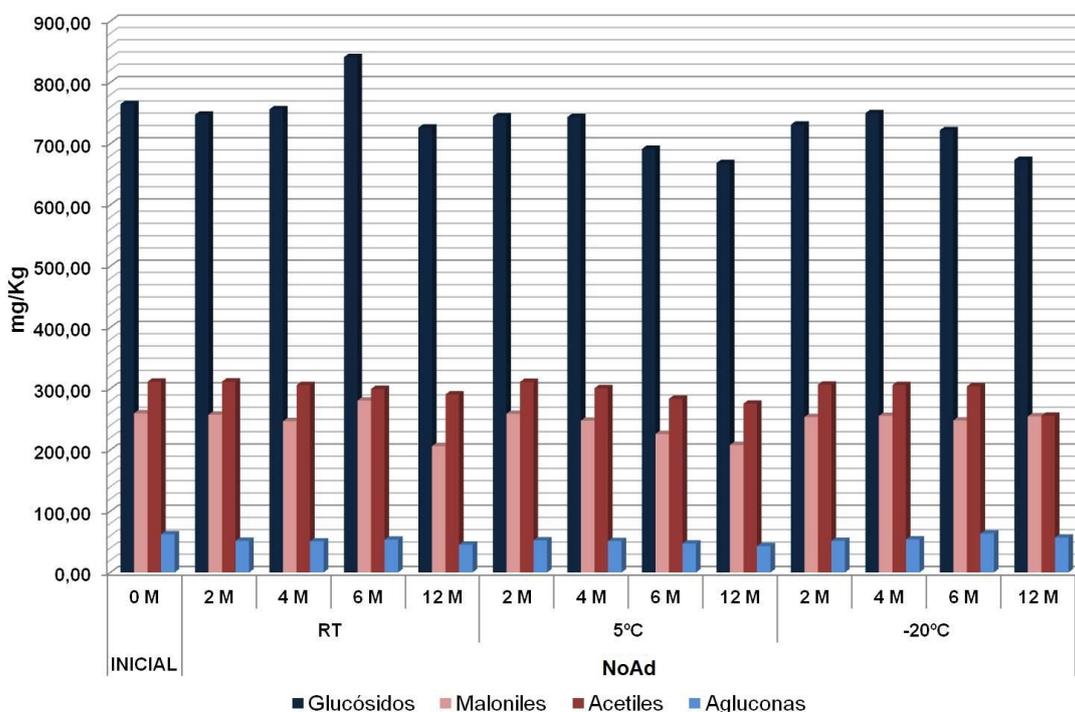


Figura 58. Variación en la concentración media de las distintas formas de isoflavonas estudiadas a distintos tiempos de almacenamiento y a las distintas temperaturas para el extracto liofilizado de proteína de soja sin aditivos, NoAd.

A temperaturas menores como 5°C y -20°C se observa una disminución ligeramente mayor que a temperatura ambiente a partir de los 6 meses de almacenamiento de los glucósidos y los acetiles. Esto podría ser debido tal vez a la humedad encontrada en su lugar de almacenamiento (la nevera y el congelador, respectivamente), humedad que no se encontraba en el lugar de almacenamiento a temperatura ambiente. Aunque los viales estudiados estuvieran tapados con film de parafina, a bajas temperaturas, con el paso del tiempo, este cierre no es hermético ni fiable, y tal vez esa humedad afecte a las reacciones de interconversión y/o degradación, tal y como se vio en otros estudios [59, 63]. Esta disminución observada es menor a -20°C que a 5°C.

En el caso de los derivados malonil, pasados 12 meses de almacenamiento se observa que a medida que disminuye la temperatura de almacenamiento se reduce su disminución pasando desde un 30% a temperatura ambiente hasta un 10% a -20°C.

A pesar de estas ligeras diferencias en la conservación entre las temperaturas bajas y la temperatura ambiente el comportamiento es similar para cualquier temperatura de almacenamiento. Por lo que se puede concluir que la liofilización hace

que se conserve mejor tanto el perfil de isoflavonas, como su concentración, independientemente de la temperatura, ya que las variaciones observadas no son tan determinantes como en el caso de las observadas en los extractos etanólicos. Esto concuerda con lo observado en el estudio de varianza inicial (de tres factores) donde la temperatura ya no era el factor más influyente a priori que afectaba a todas las isoflavonas estudiadas, hecho que ocurría en los otros extractos estudiados.

Para comprobar lo observado se realiza el análisis de varianza de los dos factores estudiados en este caso, el tiempo y la temperatura de almacenamiento. Los resultados de este estudio se muestran en la *tabla 44*. Sombreado en azul se resaltan aquellas isoflavonas donde el factor ejerce un efecto estadísticamente significativo ($p < 0,05$).

Tabla 44. ANOVA de dos factores para el extracto liofilizado de proteína de soja sin aditivos, NoAd.

Isoflavona	NoAd			
	Factores			
	Temperatura almacenamiento		Tiempo almacenamiento	
	F	Sig.	F	Sig.
Di	2,22	0,15	0,86	0,49
Gly	2,27	0,15	5,26	0,02
Gi	24,7	0,00	47,4	0,00
MDi	1,42	0,28	2,85	0,08
MGly	0,06	0,94	13,3	0,00
AGly	2,86	0,10	63,3	0,00
De	5,18	0,02	0,56	0,65
Gle	2,28	0,15	131	0,00
AGi	7,62	0,01	47,2	0,00
Ge	677	0,00	155	0,00

La temperatura de almacenamiento ya no afecta a todas las isoflavonas, sólo a algunas, al igual que el tiempo de almacenamiento. De las formas glucósido sólo genistina se ve afectada significativamente por la temperatura. Los dos derivados malonil estudiados no se ven afectados y de los derivados acetil, sólo el derivado acetil de la genistina se ve afectado. En cambio la daidzeína y la genisteína sí que se ven afectadas por la temperatura. En el caso del tiempo de almacenamiento, afecta a todas las isoflavonas estudiadas, excepto a los derivados de daidzeína estudiados, glucósido, malonil y aglucona.

Para comprobar estas diferencias estadísticamente significativas en cada isoflavona es mejor estudiar este caso en concreto con la *figura 59* que muestra el % variación con respecto al valor de referencia (0 meses) para cada isoflavona (derivado glucósido, malonil, acetil y aglucona) en cada periodo de tiempo y para cada una de las temperaturas.

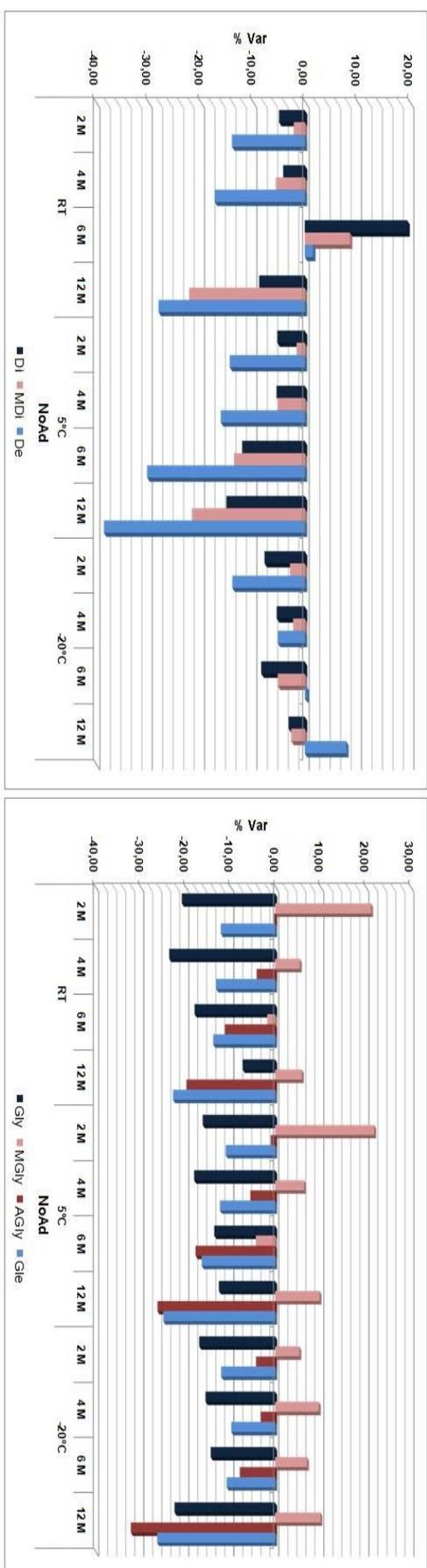


Figura 59. % Variación de cada isoflavona en cada periodo de tiempo y temperatura para los extractos liofilizados de proteína de soja sin aditivos, NoAd.

En la gráfica por formas de isoflavonas (*figura 58*) no se observan las grandes variaciones observadas en los extractos etanólicos con respecto a la referencia; en este caso, ya no hay porcentajes de variación mayores del 50% para ninguna de las temperaturas estudiadas y durante todo el tiempo de almacenamiento.

Se debe tener en cuenta a la hora de analizar estos resultados que las agluconas y los derivados de malonil y acetil glicitina están en una concentración próxima a los límites de cuantificación, por lo que sus variaciones pueden ser debidas a errores en su cuantificación.

Los derivados de la daidzeína cuando son almacenados a -20°C sufren las variaciones de concentración más pequeñas (menores del 10%) para todo el tiempo de almacenamiento estudiado. Hasta los 4 meses, para cualquier temperatura, las variaciones también son menores del 10%. El compuesto que mayor variación sufre es la daidzeína pero, como ya se comentó anteriormente, esta isoflavona presenta una concentración muy baja en todo momento, lo que puede dar lugar a un error en su cuantificación.

Los derivados de gliciteína son los que mayores variaciones presentan, algo asociado a su carácter más lábil que el de las otras familias de isoflavonas estudiadas [59], sin embargo, no hay que olvidar que todos los derivados de gliciteína y la propia gliciteína se encuentran en concentraciones muy próximas a los límites de cuantificación y por ello también es esperable su mayor variación. Comparando su comportamiento para cualquier temperatura en el almacenamiento de los extractos liofilizados, con respecto a los extractos etanólicos se comprueba que la liofilización y el almacenamiento a cualquier temperatura permite una conservación del perfil de los derivados de gliciteína similar al obtenido para los extractos etanólicos almacenados a -20°C .

Los derivados que menores variaciones sufren son, como se ha visto anteriormente y en la bibliografía [56, 57, 59], los derivados de genisteína; para estos compuestos las variaciones son menores del 10% para todas las temperaturas y hasta los 6 meses. También hasta los 6 meses las menores variaciones se observan para -20°C .

Con estos resultados podemos concluir que a -20°C y hasta los 6 meses de almacenamiento los extractos liofilizados de proteína de soja se conservan con una variación en su concentración en torno al 20%, con respecto al extracto liofilizado inicial (0 meses).

El tiempo de almacenamiento para la mayoría de las isoflavonas estudiadas en los extractos liofilizados sólo es significativo a partir de los 6 y 12 meses, y la temperatura no tiene ese efecto observado en los apartados anteriores para los extractos etanólicos.

Algo a tener en cuenta es que con la liofilización del extracto de isoflavonas se consigue que para cualquier temperatura, las variaciones sean menores del 30%

durante los primeros 6 meses de almacenamiento. Algo que para los extractos etanólicos sólo se conseguía almacenándolos a temperaturas de -20°C .

4.3.4 Efecto de la adición de un inhibidor de β -glucosidasa

Para comprobar si una de las posibles vías de degradación/interconversión son las reacciones catalizadas por enzimas β -glucosidasas se adiciona un inhibidor de estas enzimas, D-(+)-glucono- δ -lactona, a los extractos y se estudia su comportamiento durante el tiempo de almacenamiento.

Las concentraciones medias de las distintas formas de isoflavonas en los extractos donde se adiciona el inhibidor de β -glucosidasa a dos concentraciones, 1 mM y 10 mM, durante los distintos tiempos de almacenamiento y a las temperaturas estudiadas se muestran en la *figura 60*.

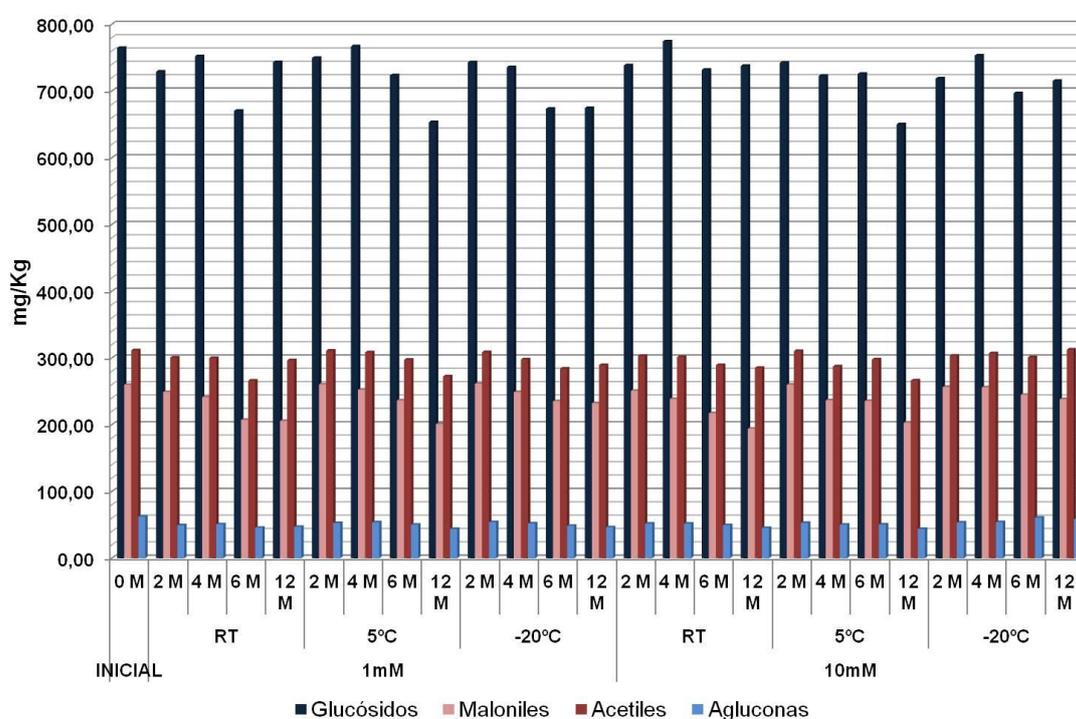


Figura 60. Variación en la concentración media de las distintas formas de isoflavonas a distintos tiempos de almacenamiento y distintas temperaturas para el extracto liofilizado de proteína de soja con inhibidor de β -glucosidasa (1 mM y 10 mM).

No se observan diferencias estadísticamente significativas entre estos datos de los extractos donde se adiciona el inhibidor enzimático y los presentados en la *figura 58* de los extractos sin aditivos. El comportamiento es totalmente análogo al presentado sin aditivos, por lo que el factor que influye en la conservación principalmente es la temperatura del extracto, tal y como se observó anteriormente.

Por lo tanto, y al igual que en el estudio de los anteriores extractos, al no observarse diferencias con sus extractos análogos sin aditivos se puede concluir que

las reacciones de interconversión/degradación que se puedan llevar a cabo durante el almacenamiento no son reacciones catalizadas por las enzimas β -glucosidasas.

Los resultados del análisis de varianza de dos factores para los extractos liofilizados de proteína de soja cuyo aditivo es el inhibidor β -glucosidasa se muestran en la *tabla 45*.

Tabla 45. ANOVA de dos factores para el extracto liofilizado de proteína de soja 1 mM y 10 mM de inhibidor.

Isoflavona	1mM de inhibidor				10mM de inhibidor			
	Factores				Factores			
	Temperatura almacenamiento		Tiempo almacenamiento		Temperatura almacenamiento		Tiempo almacenamiento	
	F	Sig.	F	Sig.	F	Sig.	F	Sig.
Di	1,81	0,21	11,7	0,00	3,85	0,05	6,22	0,01
Gly	0,89	0,44	7,33	0,00	4,49	0,04	5,35	0,01
Gi	1,22	0,33	18,9	0,00	5,55	0,02	6,08	0,01
MDi	21,6	0,00	81,4	0,00	19,1	0,00	37,2	0,00
MGLy	12,3	0,00	38,7	0,00	7,46	0,01	16,3	0,00
AGly	0,86	0,45	45,7	0,00	5,45	0,02	25,4	0,00
De	5,02	0,03	55,8	0,00	21,7	0,00	3,55	0,05
Gle	4,22	0,04	24,5	0,00	3,74	0,05	21,0	0,00
AGi	1,27	0,32	10,8	0,00	5,86	0,02	2,83	0,08
Ge	13,4	0,00	17,7	0,00	363	0,00	52,8	0,00

Según los datos de este estudio de análisis de la varianza se observan diferencias en la influencia de los factores en los extractos con diferentes concentraciones de inhibidor. Sin embargo, los valores de porcentaje de variación obtenidos, con respecto al valor de referencia (0 meses), para cada isoflavona que se muestran en la *figura 61*, no suponen diferencias relevantes desde el punto de vista de la conservación de los extractos, puesto que a pesar de que dichas diferencias son estadísticamente significativas, dicha significatividad puede deberse al error intrínseco a la medida utilizando el método descrito.

Para todas las isoflavonas estudiadas el comportamiento encontrado en los extractos liofilizados, con ambas concentraciones de inhibidor, es análogo al observado en los extractos liofilizados sin aditivo, NoAd.

Al igual que en el extracto liofilizado sin aditivo NoAd se debe tener en cuenta a la hora de analizar estos resultados que las agluconas y los derivados de malonil y acetyl glicitina están en una concentración muy baja, próxima a los límites de cuantificación.

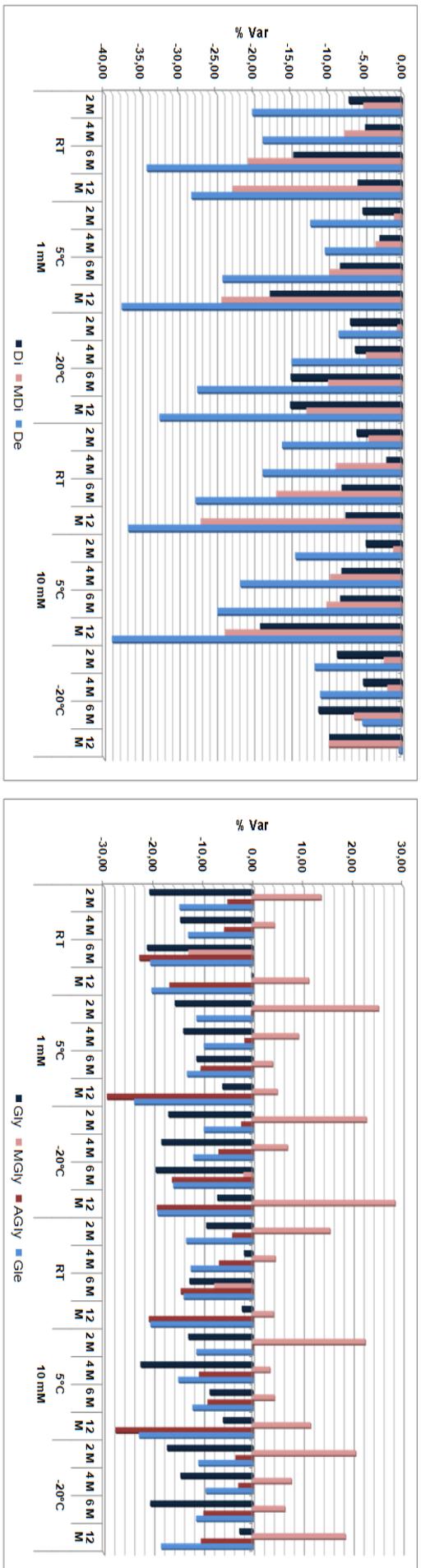


Figura 61. % Variación de cada isoflavona en cada periodo de de tiempo y temperatura para los extractos liofilizados de proteína de soja con inhibidor.

A -20°C es cuando sufren las menores variaciones de concentración los derivados de la daidzeína, siendo estas variaciones próximas al 10% durante todo el tiempo de almacenamiento. También se observan estas variaciones para cualquier temperatura de almacenamiento hasta pasados 4 meses. La aglucona daidzeína, es la que mayores variaciones experimenta, pero estas variaciones pueden ser debidas a errores de cuantificación puesto que se encuentra en concentraciones muy bajas.

Al igual que en el apartado anterior las mayores variaciones observadas son para la familia de los derivados de gliciteína y las menores para los derivados de genisteína.

Comparando estos resultados con los observados en la *figura 59*, para el extracto liofilizado sin aditivos, se puede concluir que las posibles reacciones de interconversión y/o degradación no se ven afectadas por la adición del inhibidor D-(+)-glucono- δ -lactona.

En el estudio de estabilidad de los extractos etanólicos de proteína de soja se observó un efecto positivo, al adicionar la concentración de 10 mM del inhibidor, en la conservación de las agluconas del extracto a temperaturas superiores a 5°C . Sin embargo, en el caso de los extractos liofilizados no se observa este efecto positivo, lo que puede ser debido a que la liofilización permite detener, al menos en parte, cualquier reacción de degradación y/o interconversión de las que se detectaban en los extractos etanólicos.

Por lo tanto, en el caso de los extractos liofilizados, la adición del inhibidor de β -glucosidasa no ejerce ningún efecto significativo en la conservación, y al igual que para los extractos liofilizados sin aditivo, NoAd, conservar a temperaturas bajas permiten una variación menor, próxima al 20%, para la mayoría de las isoflavonas estudiadas hasta los 6 meses de almacenamiento.

4.3.5 Efecto de la adición de un antioxidante

Las reacciones de oxidación-reducción son otras de las posibles vías de degradación y/o interconversión de las isoflavonas. Para evitar este tipo de reacciones se adiciona el antioxidante BHT, a dos niveles de concentración, a los extractos etanólicos antes de proceder a su liofilización y posterior almacenamiento, y se estudia su concentración pasados 2, 4, 6 y 12 meses desde su almacenamiento.

La concentración media para cada periodo de tiempo y temperatura de almacenamiento de las distintas formas de isoflavonas estudiadas en el extracto liofilizado de proteína de soja donde se ha adicionado 0,01% y 0,05% del antioxidante BHT se muestra en la *figura 62*.

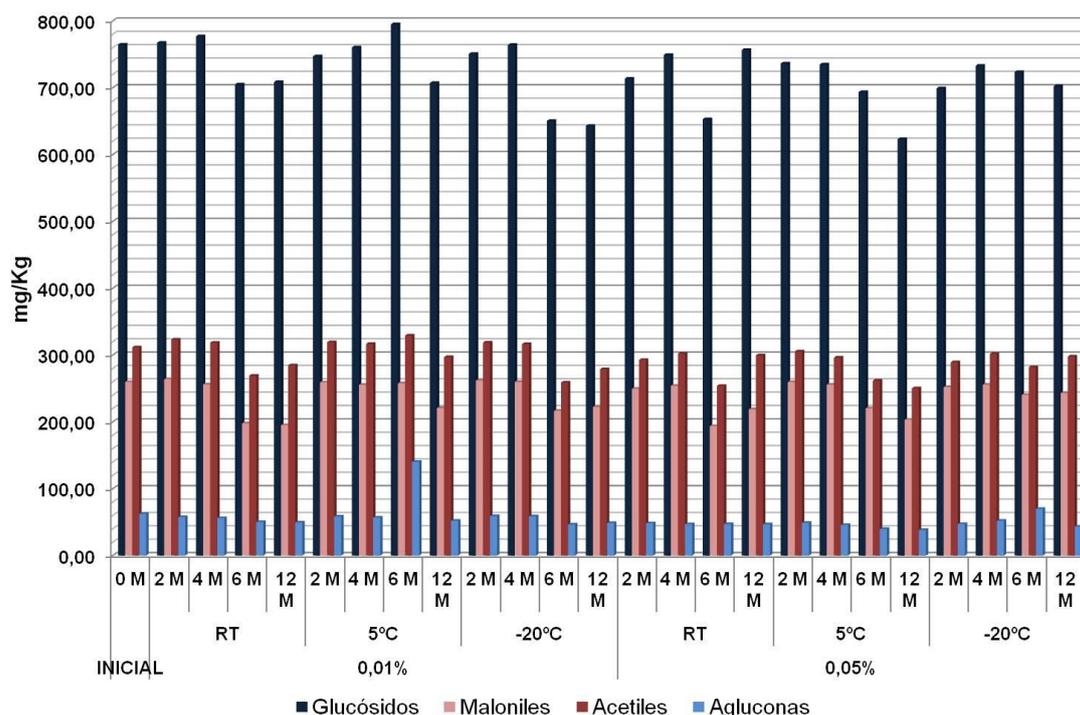


Figura 62. Variación en la concentración media de las distintas formas de isoflavonas estudiadas a distintos tiempos de almacenamiento y distintas temperaturas para el extracto liofilizado de proteína de soja con BHT al 0,01% y 0,05%.

Al igual que anteriormente las variaciones que se observan son menores del 10% a temperatura ambiente, independientemente de la concentración de antioxidante adicionado. A 5°C y -20°C, a partir de los 6 meses, se observa una mayor disminución de la concentración de glucósidos y derivados acetiles comparando con la temperatura ambiente, algo que también se observaba en los otros extractos liofilizados (sin aditivos y con inhibidor). La disminución es menor para el extracto con mayor concentración de antioxidante (0,05%), consiguiéndose una disminución de la concentración de glucósidos y acetiles menor del 10% pasados 12 meses desde su almacenamiento a -20°C.

Para los extractos liofilizados donde se adicionó una concentración de BHT de 0,01% se conserva su concentración con una variación menor del 20% hasta los 6 meses de almacenamiento para cualquier forma de isoflavona estudiada y para cualquier temperatura de almacenamiento, siendo menor para la temperatura ambiente que para las temperaturas más bajas.

Para todas las formas de isoflavonas estudiadas en el caso de los extractos donde se adicionó una concentración de antioxidante del 0,05% la variación es menor del 20% hasta los 6 meses a temperatura ambiente (RT) y 5°C. En cambio para -20°C, hasta los 12 meses, las variaciones en las concentraciones de las formas de isoflavonas estudiadas son menores del 10%.

El estudio de varianza de dos factores realizado sobre los porcentajes de variación (%Var) con respecto a la referencia inicial (0 meses) que se muestra en la

tabla 46 indica diferencias entre los extractos con diferentes concentraciones de antioxidante adicionadas, mostrando un efecto diferente para cada factor estudiado.

Tabla 46. ANOVA de dos factores para el extracto liofilizado de proteína de soja con 0,01% y 0,05% de BHT.

Isoflavona	0,01% de BHT				0,05% de BHT			
	Factores				Factores			
	Temperatura almacenamiento		Tiempo almacenamiento		Temperatura almacenamiento		Tiempo almacenamiento	
	F	Sig.	F	Sig.	F	Sig.	F	Sig.
Di	5,22	0,02	11,6	0,00	0,24	0,79	0,83	0,50
Gly	56,6	0,00	7,63	0,00	0,83	0,46	7,34	0,00
Gi	8,93	0,00	16,0	0,00	0,38	0,69	1,00	0,43
MDi	7,33	0,01	78,4	0,00	1,37	0,29	11,6	0,00
MGly	170	0,00	32,9	0,00	1,18	0,34	0,36	0,79
AGly	315	0,00	194	0,00	0,88	0,44	0,77	0,53
De	313	0,00	168	0,00	1,24	0,32	1,07	0,40
Gle	745	0,00	488	0,00	0,98	0,40	0,84	0,50
AGi	5,54	0,02	31,0	0,00	0,58	0,58	2,54	0,11
Ge	543	0,00	377	0,00	1,38	0,29	1,36	0,30

Para los extractos liofilizados con un 0,01% de BHT tanto la temperatura como el tiempo de almacenamiento tienen efecto estadísticamente significativo sobre todas las isoflavonas estudiadas. En cambio para los extractos liofilizados con 0,05% de BHT la temperatura no ejerce ningún efecto sobre las isoflavonas estudiadas y el tiempo de almacenamiento sólo ejerce efecto estadísticamente significativo sobre la glicitina y la malonil daidzina.

En la figura 63 se muestra la variación de cada isoflavona de forma individual en los extractos liofilizados de proteína de soja con antioxidante añadido. Como antes, se debe tener en cuenta la baja concentración de las agluconas y de los derivados malonil y acetil de la gliciteína. Para la mayoría de las isoflavonas estudiadas las variaciones observadas son menores del 30%, independientemente de la temperatura de almacenamiento y del tiempo almacenado.

En el caso de los derivados de daidzeína comparando la adición de 0,01% y 0,05% se observan diferencias en el derivado de malonil, observando una menor variación para bajas temperaturas de almacenamiento al adicionar una concentración mayor de antioxidante. Para temperatura ambiente y 5°C se observa a partir de los 6 meses de almacenamiento un descenso en su concentración con respecto a la referencia a 0 meses, algo que no se observa a -20°C y con 0,05% de antioxidante adicionado.

El comportamiento del resto de derivados de daidzeína es análogo al observado en los extractos liofilizados sin y con inhibidor, independientemente de la concentración de antioxidante adicionado.

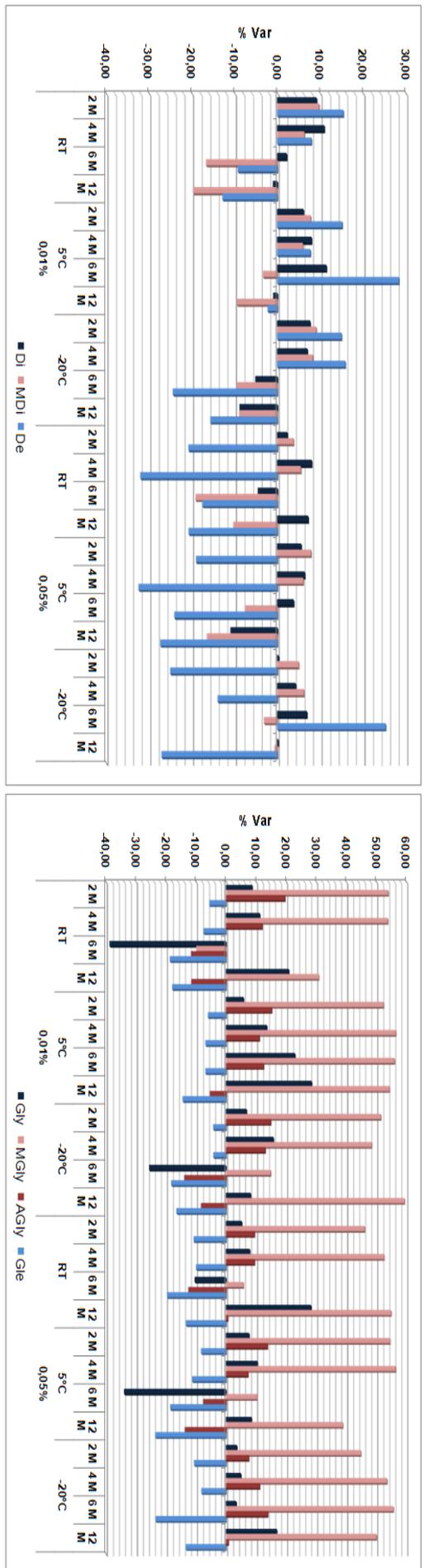


Figura 63. % Variación de cada isoflavona en cada periodo de tiempo y temperatura para los extractos liofilizados de proteína de soja con antioxidante.

Los datos observados en los derivados de gliciteína son diversos y sin una tendencia explicable. Algo también observado en los otros extractos estudiados, debido a su baja concentración, y a su carácter más lábil, que provoca que su concentración disminuya a lo largo de todo el estudio; por todo ello, los datos obtenidos pueden tener asociados ciertos errores en su cuantificación y por ello resultan poco concluyentes. Sin embargo, para el derivado acetil de la glicitina se observa un aumento de su concentración con respecto al extracto inicial, 0 meses; algo que en los extractos sin antioxidante (sin y con inhibidor) es inverso. Por lo tanto, es posible que la adición del antioxidante permita una mayor conservación de este derivado malonil, pero al ser tan baja su concentración este resultado no es concluyente.

Los derivados de genisteína tienen un comportamiento totalmente análogo al observado en los extractos anteriores. Se observa una ligera diferencia entre la adición de las distintas concentraciones de antioxidante, siendo menor la variación de genistina y acetil genistina al adicionar 0,05%, pero estas diferencias son pequeñas.

Por lo tanto sí existe un ligero efecto al adicionar una concentración de 0,05% de BHT a los extractos, por lo que se puede concluir que ciertas reacciones de interconversión y/o degradación son debidas a reacciones de reducción-oxidación, y que pueden ser ralentizadas por la adición de un antioxidante.

Las variaciones observadas en estos extractos liofilizados son más bajas en comparación con las observadas en los mismos extractos etanólicos que se mostraban en la *figura 49*. Además, en el caso de los extractos liofilizados, el antioxidante no ejerce efecto sobre los glucósidos como ejercía en los extractos etanólicos, debido tal vez a que la liofilización provoca la reducción de las reacciones de degradación y/o interconversión que se observaban en los extractos líquidos.

Para asegurarse una variación menor del 20% hasta los 12 meses de almacenamiento es conveniente la adición de este antioxidante en una concentración al 0,05% en los extractos líquidos de proteína de soja antes de su liofilización.

4.3.6 Efecto de la adición conjunta del inhibidor de β -glucosidasa y el antioxidante BHT

Hemos estudiado el efecto por separado de la adición de un inhibidor de reacciones enzimáticas y de un antioxidante, pero para completar el estudio se debe tener en cuenta algún tipo de efecto cooperativo de la adición de los dos posibles conservantes utilizados. En la *figura 64* se muestra la variación de la concentración media de las distintas formas de isoflavonas estudiadas en extractos liofilizados de proteína de soja donde se adicionó el inhibidor de β -glucosidasa en una concentración de 10 mM y el antioxidante BHT en una concentración de 0,05% (extracto I+B) a distintas temperatura y tiempos de almacenamiento.

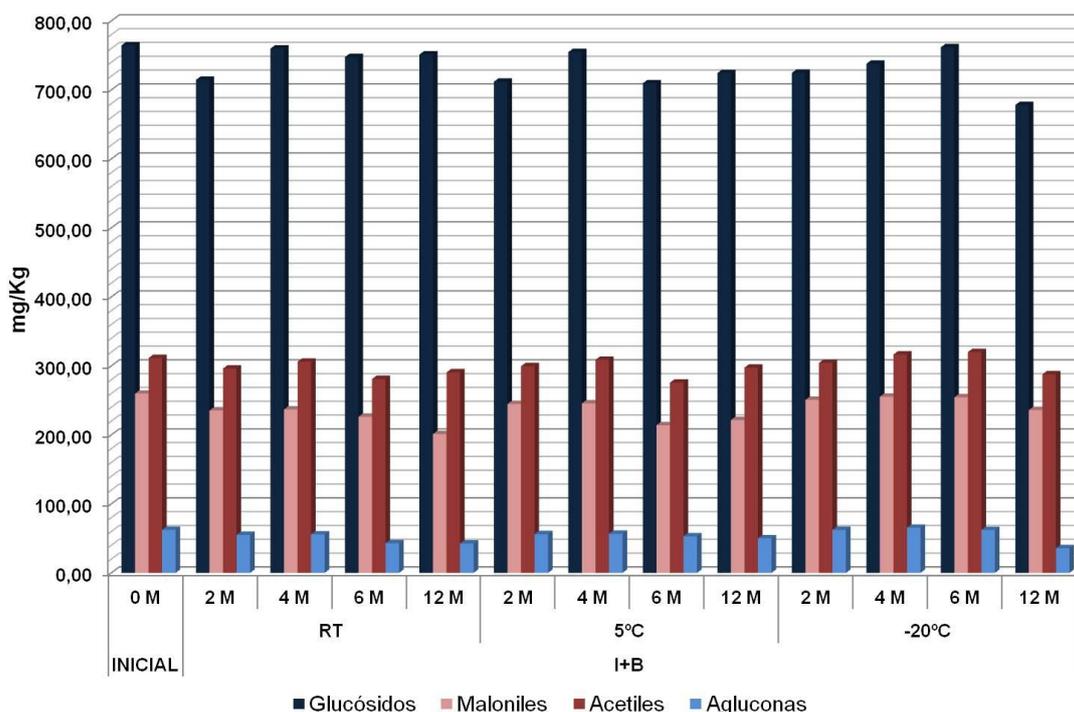


Figura 64. Variación en la concentración media de las distintas formas de isoflavonas estudiadas a distintos tiempos de almacenamiento y distintas temperaturas para el extracto liofilizado de proteína de soja I+B.

Estos resultados son totalmente análogos a los observados en el apartado anterior al adicionar el antioxidante BHT en una concentración de 0,05%, las variaciones son inferiores al 10%. La disminución en la concentración de glucósidos observada a 5°C y -20°C comparada con RT es menor que en los extractos sin antioxidante, y al igual que anteriormente (apartado 4.3.5.) la variación es menor del 10% para glucósidos, maloniles y acetiles hasta los 12 meses de almacenamiento.

Al igual que antes, se consigue a -20°C la conservación de las formas de isoflavonas estudiadas hasta los 12 meses de almacenamiento con una variación máxima del 10% en su concentración con respecto a la concentración al principio del estudio (0 meses).

En la *tabla 47* se muestra el análisis de varianza de dos factores para estos extractos liofilizados de proteína de soja. Al igual que en todos los análisis de varianza mostrados aparece sombreado en azul cuando el factor ejerce un efecto estadísticamente significativo ($p < 0,05$) sobre la concentración de la isoflavona correspondiente.

Tabla 47. ANOVA de dos factores para el extracto liofilizado de proteína de soja con 10 mM de inhibidor de β -glucosidasa y 0,05% de BHT.

Isoflavona	10 mM de inhibidor + 0,05% de BHT			
	Factores			
	Temperatura almacenamiento		Tiempo almacenamiento	
	F	Sig.	F	Sig.
Di	0,39	0,69	2,21	0,14
Gly	0,92	0,42	14,1	0,00
Gi	0,37	0,70	2,62	0,10
MDi	1,43	0,28	4,51	0,02
MGly	1,07	0,37	9,07	0,00
AGly	0,39	0,68	5,27	0,02
De	1,79	0,21	3,14	0,07
Gle	0,78	0,48	2,92	0,08
AGi	0,80	0,47	1,73	0,21
Ge	1,98	0,18	6,56	0,01

No se observan diferencias estadísticamente significativas para ninguna isoflavona debidas a la temperatura de almacenamiento, algo que también se detectaba para los extractos liofilizados de proteína de soja con 0,05% de BHT.

En cambio, el tiempo de almacenamiento ahora ejerce un efecto estadísticamente significativo para los derivados de la gliciteína excepto para la forma aglucona, y también para la genisteína, debido tal vez a su baja concentración; también es significativo para el derivado malonil de la daidzina, algo que coincide con el estudio de varianza para los extractos liofilizados con 0,05% de antioxidante adicionado.

En la *figura 65* se muestra el %Var para cada una de las isoflavonas estudiadas en estos extractos liofilizados para las distintas temperaturas y los distintos tiempos de almacenamiento.

Teniendo en cuenta que las agluconas y los derivados malonil y acetil de la glicitina están en una concentración próxima a los límites de cuantificación, sus variaciones pueden deberse en algunos casos a errores en la cuantificación. Para el resto de isoflavonas las variaciones observadas son menores del 30% independientemente de la temperatura de almacenamiento y del tiempo almacenado, tal y como ocurría en los extractos liofilizados sólo con antioxidante.

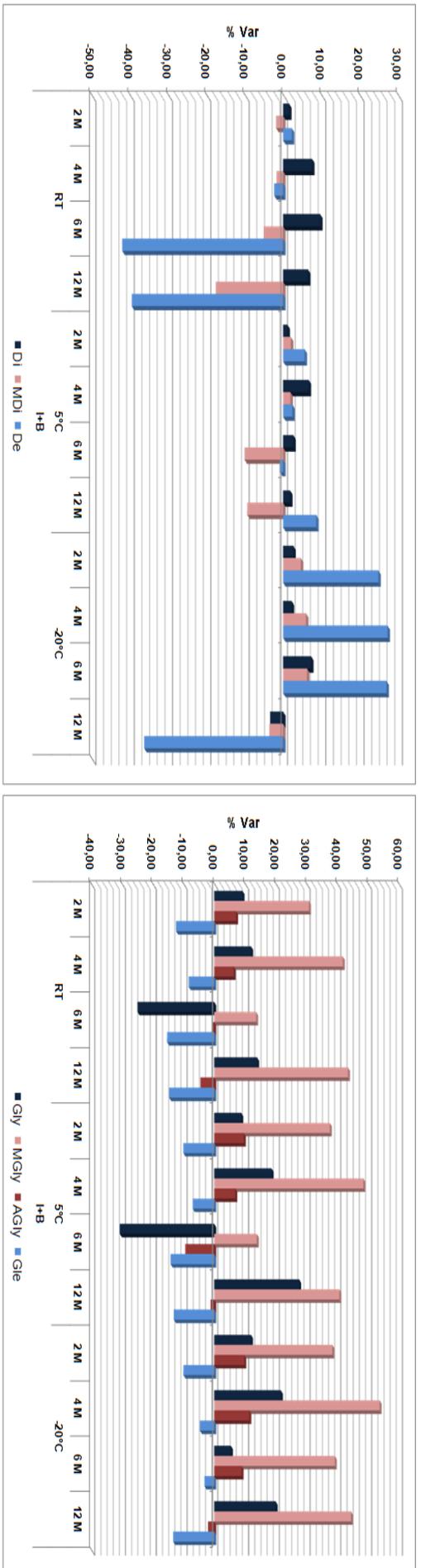


Figura 65. % Variación de cada isoflavona en cada periodo de tiempo y a distintas temperaturas para los extractos liofilizados de proteína de soja con inhibidor y antioxidante.

El comportamiento de todas las isoflavonas estudiadas es comparable al observado en los extractos donde se adicionó una concentración de 0,05% de BHT, siendo la mejor condición en todas las familias de isoflavonas estudiadas el almacenamiento a -20°C, ya que permite conseguir la conservación hasta los 12 meses con una variación de concentración menor del 20%. Pero al igual que en el apartado anterior, las diferencias entre extractos con diferentes tratamientos son pequeñas.

En ningún caso se detecta una variación diferente a la esperada debida a la adición del BHT, por lo que se puede concluir que la adición del inhibidor no ejerce ningún efecto en la conservación de los extractos.

4.3.7 Conservación de los extractos liofilizados de proteína de soja

Teniendo en cuenta los resultados mostrados en los apartados 4.1 y 4.2 de la conservación de las isoflavonas en los extractos etanólicos, la temperatura juega un papel importante. Pero observando los resultados de este apartado, sobre la conservación de los extractos liofilizados, vemos que la temperatura ya no es un factor de tanto peso, y aunque es recomendable el almacenamiento a temperaturas bajas, se ha comprobado que las variaciones cuando se conservan a temperatura ambiente no son tan drásticas como se observaba en los extractos líquidos. Para las isoflavonas estudiadas, independientemente de la temperatura de almacenamiento, se consiguen variaciones menores del 30% a los 12 meses de almacenamiento.

Para comprobar si el efecto de los tratamientos realizados en los extractos liofilizados es estadísticamente significativo se realiza el análisis de varianza a cada temperatura de almacenamiento estudiada pasados 2 meses de almacenamiento. Estos resultados se muestran en la *tabla 48*.

Tabla 48. ANOVA para cada temperatura pasados 2 meses para los extractos liofilizados de proteína de soja.

Isoflavona	2 MESES					
	TODOS LOS TRATAMIENTOS					
	RT		5°C		-20°C	
	F	Sig.	F	Sig.	F	Sig.
Di	9,42	0,01	7,72	0,01	3,88	0,06
Gly	20,4	0,00	19,5	0,00	28,3	0,00
Gi	6,55	0,02	5,12	0,04	1,39	0,35
MDi	5,92	0,03	15,2	0,00	3,63	0,07
MGly	20,2	0,00	13,1	0,00	6,88	0,02
AGly	9,88	0,01	8,74	0,01	3,75	0,07
De	21,5	0,00	27,9	0,00	3,14	0,10
Gle	4,06	0,06	2,95	0,11	2,13	0,19
AGi	8,93	0,01	6,34	0,02	2,25	0,18
Ge	13,6	0,00	15,3	0,00	3,23	0,09

Tanto para la temperatura ambiente (RT) como para 5°C existen diferencias estadísticamente significativas entre los distintos tratamientos realizados en los extractos liofilizados. Realizando el estudio de la mínima diferencia significativa se comprueba que para ambas temperaturas el tratamiento responsable de esas diferencias es la adición del antioxidante BHT, en cualquiera de sus dos concentraciones.

En cambio para el almacenamiento a -20°C no se observan diferencias estadísticamente significativas para la mayoría de las isoflavonas estudiadas; sólo se encuentran estas diferencias para la glicitina y la malonil glicitina. A través del estudio de la mínima diferencia significativa para ambas isoflavonas, es la adición del antioxidante BHT la que ejerce un efecto estadísticamente significativo frente al resto de tratamientos.

Por lo tanto para temperaturas de almacenamiento de -20°C la adición de BHT sólo influye en la glicitina y la malonil glicitina, pero a temperaturas mayores sí que existe un efecto positivo en la conservación de todas las isoflavonas.

En los datos comentados durante todo este apartado sobre la conservación de los extractos liofilizados se observa que las variaciones durante el tiempo de almacenamiento en algunos casos no tienen un perfil tan definido como se observaba en los datos de los extractos etanólicos estudiados previamente. Por ello se decide realizar un estudio de varianza para cada uno de los tratamientos realizados y a cada temperatura para determinar si el tiempo de almacenamiento ejerce un efecto estadísticamente significativo.

Los resultados de este estudio de varianza para ver el efecto del tiempo de almacenamiento sobre cada tratamiento y a cada temperatura se muestran en la *tabla 49*.

Al disminuir la temperatura para casi todos los tratamientos el efecto es estadísticamente significativo ($p < 0,05$) para un número menor de isoflavonas. Esto es algo que concuerda con lo que se observó en los extractos líquidos donde las menores temperaturas de almacenamiento permitían una conservación durante más tiempo. Pero en el caso de la adición de 0,05% de BHT, y por lo tanto también en el caso en el que se adicionan los dos aditivos (10 mM de inhibidor + 0,05% de BHT), no se observan diferencias estadísticamente significativas durante el tiempo de almacenamiento para ninguna temperatura de almacenamiento.

Por lo tanto según estos resultados la adición de un antioxidante como el BHT a una concentración de 0,05% permite que la concentración no varíe desde los 2 hasta los 12 meses de almacenamiento.

Tabla 49. ANOVA a cada uno de los tratamientos realizados en los extractos liofilizados de proteína de soja para cada temperatura de almacenamiento durante los 12 meses de almacenamiento.

Isoflavona	NoAd																	
	1 mM						10 mM											
	TEMPERATURAS		TEMPERATURAS		TEMPERATURAS		TEMPERATURAS		TEMPERATURAS		TEMPERATURAS							
	RT	5°C	-20°C	RT	5°C	-20°C	RT	5°C	-20°C	RT	5°C	-20°C						
F	Sig.	F	Sig.	F	Sig.	F	Sig.	F	Sig.	F	Sig.	F	Sig.					
Di	135	0,00	19,1	0,01	0,04	0,99	5,59	0,06	9,26	0,03	4,18	0,10	2,28	0,22	4,92	0,08	2,43	0,21
Gly	9,17	0,03	2,64	0,19	10,7	0,02	5,37	0,07	4,03	0,11	1,22	0,41	1,43	0,36	3,73	0,12	10,7	0,02
Gi	7,42	0,04	10,7	0,02	40,3	0,00	7,83	0,04	15,3	0,01	6,59	0,05	1,89	0,27	4,35	0,09	3,65	0,12
MDi	699	0,00	69,3	0,00	0,02	1,00	36,9	0,00	38,6	0,00	14,0	0,01	43,9	0,00	12,1	0,02	3,32	0,14
MGly	16,9	0,01	17,4	0,01	0,30	0,82	25,7	0,00	10,1	0,02	18,9	0,01	14,1	0,01	4,59	0,09	4,26	0,10
AGly	52,3	0,00	38,11	0,00	15,5	0,01	11,9	0,02	30,7	0,00	13,4	0,01	10,7	0,02	16,0	0,01	3,15	0,15
De	14,2	0,01	32,5	0,00	0,31	0,82	11,9	0,02	34,7	0,00	19,8	0,01	28,6	0,00	2,90	0,17	1,51	0,34
Gle	99,6	0,00	16,9	0,01	844	0,00	9,05	0,03	10,4	0,02	9,35	0,03	24,3	0,00	8,71	0,03	4,16	0,10
AGI	5,43	0,07	13,8	0,01	43,6	0,00	11,3	0,02	6,36	0,05	2,79	0,17	2,55	0,19	4,56	0,09	0,81	0,55
Ge	87,4	0,00	46,7	0,00	249	0,00	28,0	0,00	13,8	0,01	5,44	0,07	6,74	0,05	19,2	0,01	272	0,00

Isoflavona	0,05%																	
	0,01%						10 mM + 0,05%											
	TEMPERATURAS		TEMPERATURAS		TEMPERATURAS		TEMPERATURAS		TEMPERATURAS		TEMPERATURAS							
	RT	5°C	-20°C	RT	5°C	-20°C	RT	5°C	-20°C	RT	5°C	-20°C						
F	Sig.	F	Sig.	F	Sig.	F	Sig.	F	Sig.	F	Sig.	F	Sig.					
Di	26,9	0,00	3,80	0,11	4,45	0,09	0,37	0,78	0,67	0,61	0,62	0,64	0,89	0,52	1,79	0,29	1,50	0,34
Gly	36,7	0,00	48	0,00	15,0	0,01	2,83	0,17	3,98	0,11	2,32	0,22	55,3	0,00	1,85	0,28	2,90	0,17
Gi	6,92	0,05	4,34	0,10	9,88	0,03	0,29	0,83	2,24	0,23	0,37	0,78	0,84	0,54	3,16	0,15	1,57	0,33
MDi	133	0,00	23,2	0,01	11,0	0,02	6,81	0,05	2,90	0,16	5,21	0,07	3,20	0,15	1,50	0,34	1,15	0,43
MGly	28,0	0,00	287	0,00	7,85	0,04	3,65	0,12	0,07	0,98	0,14	0,93	7,58	0,04	1,74	0,30	2,71	0,18
AGly	84,2	0,00	890	0,00	9,23	0,03	2,01	0,26	0,29	0,83	0,43	0,74	2,67	0,18	2,19	0,23	1,87	0,28
De	43,4	0,00	329	0,00	57,0	0,00	0,19	0,90	1,82	0,28	0,47	0,72	1,02	0,47	3,28	0,14	1,03	0,47
Gle	32,3	0,00	2643	0,00	22,3	0,01	1,31	0,39	0,35	0,79	0,53	0,69	3,11	0,15	1,25	0,40	1,07	0,46
AGI	24,3	0,00	2,17	0,23	15,0	0,01	0,56	0,67	4,61	0,09	1,56	0,33	3,98	0,11	1,00	0,48	0,55	0,67
Ge	1,54	0,33	1761	0,00	16,9	0,01	0,31	0,82	2,13	0,24	0,52	0,69	0,96	0,49	10,3	0,02	1,63	0,32

4.3.8 Conclusión del estudio realizado sobre el almacenamiento de los extractos liofilizados de proteína de soja

Las condiciones óptimas de almacenamiento para la conservación de los derivados de daidzina y genistina detectadas en los extractos liofilizados de proteína de soja, con variaciones menores del 20%, es cualquier temperatura de almacenamiento y la adición del antioxidante BHT en una concentración de 0,05%. En estas condiciones podemos almacenar los extractos liofilizados hasta 12 meses.

Para el caso de los derivados de glicitina, debido a su carácter más lábil, no es posible esta conservación y aún almacenando a bajas temperaturas y con el antioxidante añadido, las variaciones son en torno al 40% desde los 2 primeros meses de almacenamiento. Teniendo en cuenta que los derivados de gliciteína representan el 4% del total de las isoflavonas detectadas en estos extractos, frente al 47% de los derivados de daidzeína y el 49% de los derivados de genisteína, la pérdida de los derivados de gliciteína en el almacenamiento durante los dos meses de almacenamiento, aunque sufriesen una variación del 50% respecto al inicial, sólo supondría la pérdida de un 2% de las isoflavonas totales del extracto.

Por lo tanto podemos concluir que con la adición de BHT podemos conservar en torno a un 80% del extracto inicial de las isoflavonas detectadas en el extracto liofilizado de proteína de soja, como se puede observar en la *figura 66*.

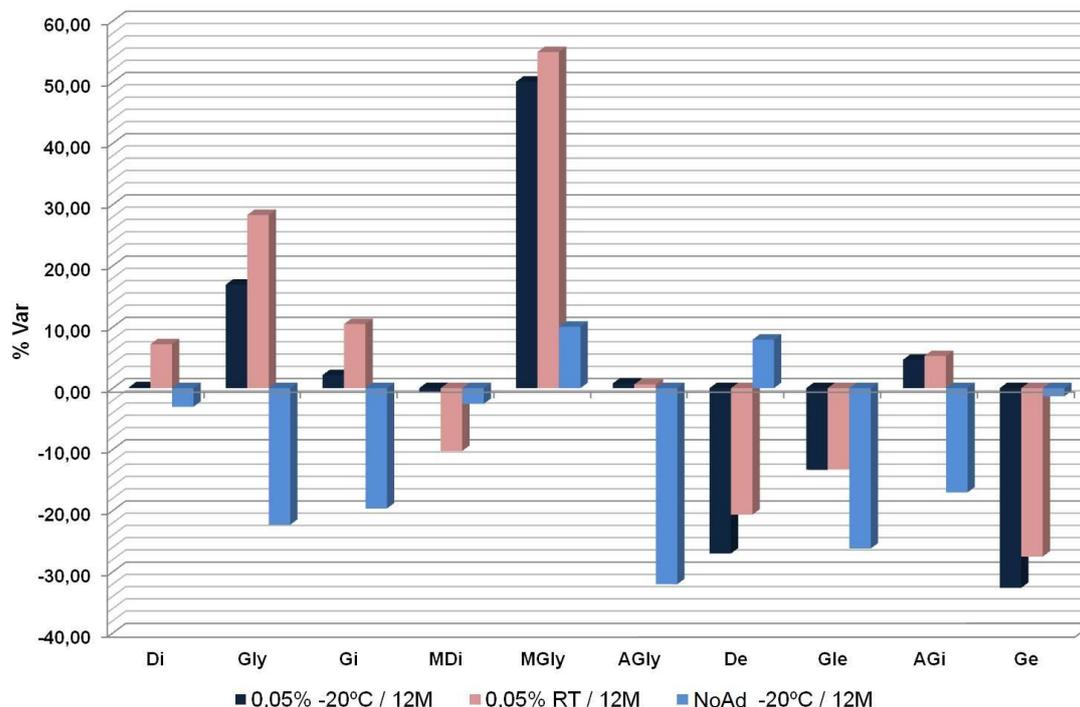


Figura 66. % Variación de cada isoflavona pasados 12 meses de almacenamiento en el extracto liofilizado de proteína de soja almacenado a -20°C y a temperatura ambiente (RT) con 0,05% de BHT y el extracto liofilizado de proteína de soja almacenado a -20°C sin aditivos (NoAd).

En la *figura 67* se muestran los cromatogramas a 254 nm, superpuestos, del extracto liofilizado inicial de proteína de soja sin aditivos a -20°C , del extracto liofilizado de proteína de soja con una concentración de antioxidante de 0,05% a los 12 meses de almacenamiento a temperatura ambiente (RT) y a -20°C ; en esta figura se observa la degradación de los derivados de gliciteína pero no del resto de isoflavonas estudiadas.

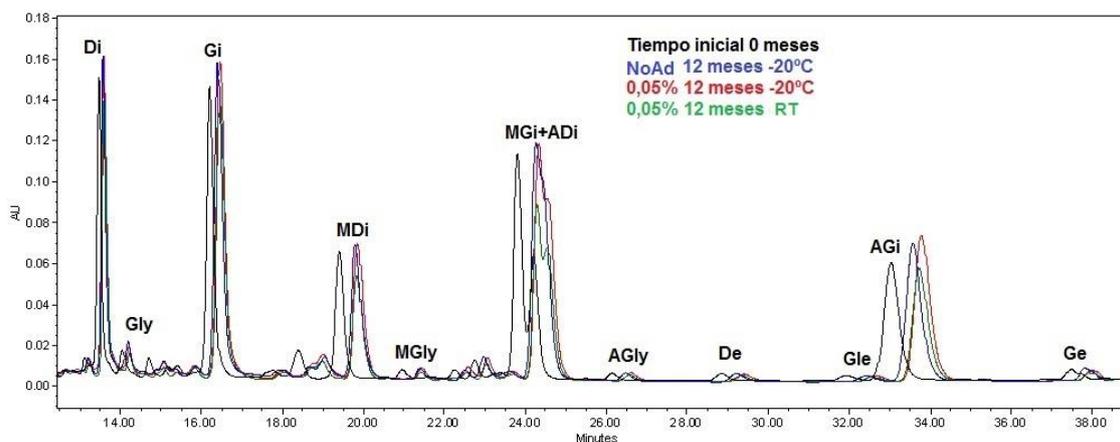


Figura 67. Cromatograma superpuesto de los extractos liofilizados de proteína de soja en el tiempo inicial (0 meses), en negro, y a los 12 meses de almacenamiento sin aditivos (NoAd) a -20°C , en azul, con antioxidante a una concentración de 0,05% a -20°C , en rojo, y a temperatura ambiente (RT), en verde.

4.4 COMPARACIÓN ENTRE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS DE PROTEÍNA DE SOJA LÍQUIDOS Y LIOFILIZADOS

En la *figura 68* se muestra la gráfica con los %Var para los extractos de proteína de soja que mejor se han conservado durante este estudio, pasados 12 meses de almacenamiento y también los extractos almacenados a temperatura ambiente después de esos 12 meses, tanto para el extracto líquido como para el liofilizado.

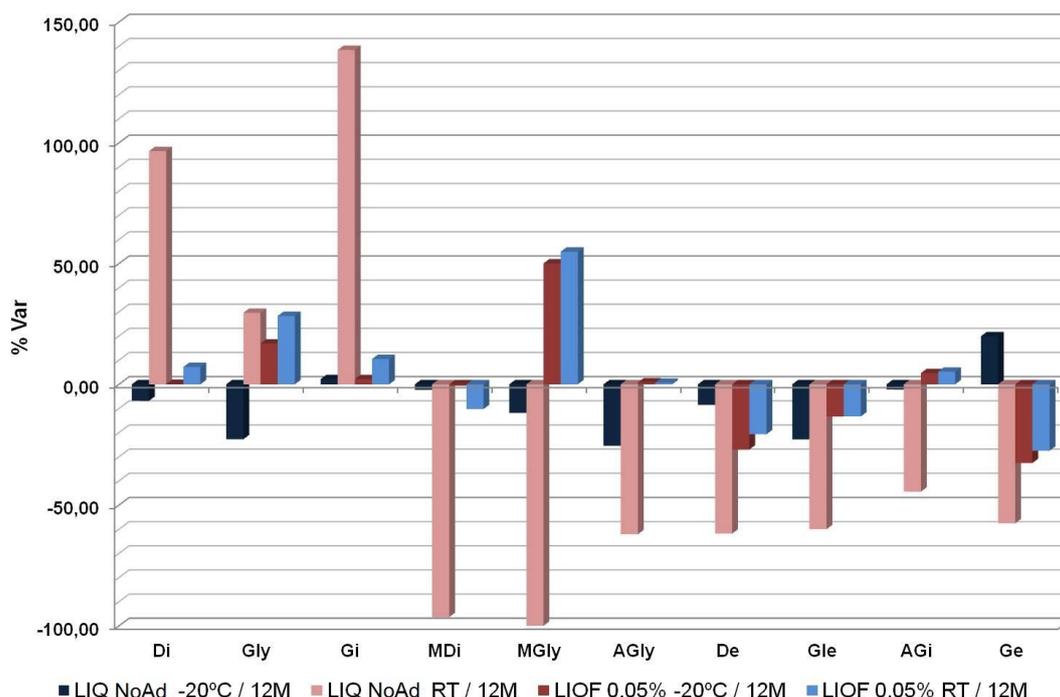


Figura 68. % Variación para los extractos de proteína de soja tanto líquido como liofilizado que mayor estabilidad han presentado a lo largo de este estudio, y los mismos almacenados a temperatura ambiente.

Como se puede observar los extractos liofilizados muestran la mejor conservación con respecto a su referencia, pero hay que tener en cuenta que la liofilización es un proceso que genera pérdidas en la mayoría de las isoflavonas estudiadas, como se pudo ver en la *tabla 39* del apartado 4.3.1 de este capítulo.

Aunque estas pérdidas son inferiores al 15%, hay que tenerlas en cuenta a la hora de almacenar los extractos según el fin último de los mismos.

Si lo que buscamos es la exactitud en el análisis de cada una de las isoflavonas estudiadas, el almacenamiento óptimo de los extractos etanólicos sería líquido y por supuesto a -20°C. Pero si lo que se busca es un extracto estable a cualquier temperatura para la adición a algún tipo de producto, lo más cómodo es la liofilización del extracto para su almacenaje, lo cual no genera pérdidas excesivas de las isoflavonas como se puede observar en la *figura 69*.

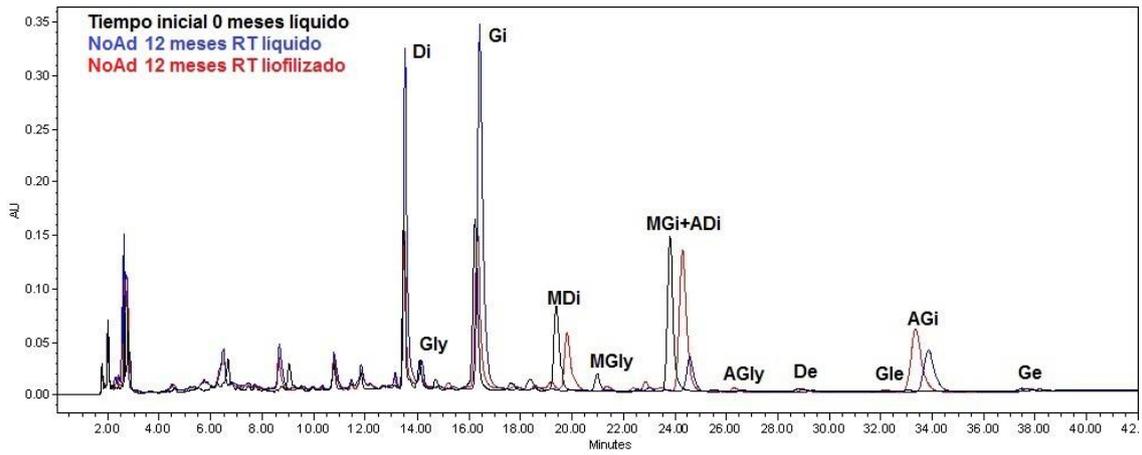


Figura 69. Cromatograma superpuesto de los extractos líquido de proteína de soja en el tiempo inicial (0 meses), en negro, y a los 12 meses de almacenamiento sin aditivos (NoAd) a temperatura ambiente (RT), en azul, y del extracto liofilizado de proteína de soja sin aditivos (NoAd) a temperatura ambiente (RT), en rojo.

5 CONCLUSIONES

Como hemos podido comprobar en este capítulo la conservación de los extractos etanólicos de isoflavonas es posible durante largos periodos de tiempo, hasta 12 meses, para la mayoría de las isoflavonas estudiadas, con variaciones inferiores al 20%.

Se ha comprobado una mayor labilidad de los derivados de gliciteína, que no se han conservado completamente en ninguno de los casos estudiados. Lo mismo ocurre con la acetil daidzina que se degrada completamente a los 12 meses de almacenamiento independientemente del tratamiento realizado al extracto.

El tipo de matriz de la que se extraen las isoflavonas influye en las condiciones óptimas de almacenamiento, ya que se ha podido comprobar que la presencia de diferentes formas de isoflavonas en el mismo extracto provocan comportamientos diferentes en la conservación, tal y como ocurre en el extracto de proteína de soja donde se han detectado acetiles que podrían provocar reacciones de degradación de la isoflavonas totales presentes en el extracto.

La adición de un antioxidante como el que hemos utilizado en este capítulo, el BHT, en una concentración del 0,05% o superior, permite la ralentización de las reacciones de degradación y/o interconversión comunes entre las isoflavonas de soja, pero no las evita en el caso de los derivados de gliciteína y en el caso de la acetil daidzina.

El almacenaje de los extractos líquidos a temperaturas bajas, como son -20°C, permite la completa conservación de la mayoría de las isoflavonas estudiadas hasta los 6 meses. A partir del medio año se deben tener en cuenta pérdidas en las isoflavonas más lábiles.

Por lo tanto, el factor más importante a tener en cuenta para la conservación de extractos líquidos de isoflavonas es la temperatura, siendo las temperaturas bajas las óptimas para la conservación.

La liofilización, aunque suponga una pérdida de un 15% en algunas isoflavonas por el proceso, es un tratamiento importante a tener en cuenta porque hace que la conservación de los extractos ya no esté condicionada por la temperatura de almacenaje y se puedan almacenar dichos extractos liofilizados a temperatura ambiente sin pérdidas importantes en la mayoría de las isoflavonas estudiadas.

6 BIBLIOGRAFÍA

1. *Wikipedia: Glycine max.* 2012 04/11/2012 [cited 01/12/2012]; Available from: http://es.wikipedia.org/wiki/Glycine_max.
2. Jian, L., *Soy, isoflavones, and prostate cancer.* *Molecular Nutrition & Food Research*, 2009. **53**(2): p. 217-226.
3. Rimbach, G., et al., *Dietary isoflavones in the prevention of cardiovascular disease – A molecular perspective.* *Food and Chemical Toxicology*, 2008. **46**(4): p. 1308-1319.
4. Tsuda, M., et al., *The effect of ipriflavone (TC-80) on bone resorption in tissue culture.* *Journal of Bone and Mineral Research*, 1986. **1**(2): p. 207-211.
5. Makela, S.I., et al., *Dietary soybean may be antiestrogenic in male mice.* *J Nutr*, 1995. **125**(3): p. 437-45.
6. Rostagno, M.A., et al., *Sample preparation for the analysis of isoflavones from soybeans and soy foods.* *Journal of Chromatography A*, 2009. **1216**(1): p. 2-29.
7. Anderson, J.W., B.M. Johnstone, and M.E. Cook-Newell, *Meta-Analysis of the Effects of Soy Protein Intake on Serum Lipids.* *New England Journal of Medicine*, 1995. **333**(5): p. 276-282.
8. *Soja y Salud.* 2012 2012 [cited 12/2012]; Available from: <http://www.sojaysalud.com/>.
9. Cano, A., M.A. Garcia-Perez, and J.J. Tarin, *Isoflavones and cardiovascular disease.* *Maturitas*. **67**(3): p. 219-26.
10. Hwang, H. and J.P. Konhilas, *Chapter 18 - Phytoestrogens and the Role in Cardiovascular Health: To Consume or Not to Consume?*, in *Bioactive Food as Dietary Interventions for Cardiovascular Disease*. 2013, Academic Press: San Diego. p. 283-302.
11. Arjmandi, B.H. and B.J. Smith, *Soy isoflavones: osteoprotective role in postmenopausal women: mechanism of action.* *The Journal of nutritional biochemistry*, 2002. **13**(3): p. 130-137.
12. Taku, K., et al., *Soy isoflavones for osteoporosis: An evidence-based approach.* *Maturitas*, 2011. **70**(4): p. 333-338.
13. Pérez Rovira, A. and N. Mach Casellas, *Efecto del consumo de soja en relación con los síntomas de la menopausia.* *Revista Española de Nutrición Humana y Dietética*, 2012. **16**(2): p. 69-76.
14. Maskarinec, G., *Soy Foods for Breast Cancer Survivors and Women at High Risk for Breast Cancer?* *Journal of the American Dietetic Association*, 2005. **105**(10): p. 1524-1528.
15. Mourouti, N. and D.B. Panagiotakos, *Soy food consumption and breast cancer.* *Maturitas*, 2013. **In Press**(0).
16. Messina, M.J., et al., *Soy intake and cancer risk: a review of the in vitro and in vivo data.* *Nutr Cancer*, 1994. **21**(2): p. 113-31.
17. Posadzki, P., et al., *Dietary supplements and prostate cancer: a systematic review of double-blind, placebo-controlled randomised clinical trials.* *Maturitas*, 2013. **75**(2): p. 125-130.
18. Peterson, G. and S. Barnes, *Genistein and biochanin A inhibit the growth of human prostate cancer cells but not epidermal growth factor receptor tyrosine autophosphorylation.* *Prostate*, 1993. **22**(4): p. 335-45.

19. Pagliacci, M.C., et al., *Growth-inhibitory effects of the natural phyto-oestrogen genistein in MCF-7 human breast cancer cells*. European Journal of Cancer, 1994. **30**(11): p. 1675-1682.
20. Peterson, G. and S. Barnes, *Genistein inhibition of the growth of human breast cancer cells: independence from estrogen receptors and the multi-drug resistance gene*. Biochem Biophys Res Commun, 1991. **179**(1): p. 661-7.
21. Peterson, G. and S. Barnes, *Genistein inhibits both estrogen and growth factor-stimulated proliferation of human breast cancer cells*. Cell Growth Differ, 1996. **7**(10): p. 1345-51.
22. Peterson, T.G., et al., *The role of metabolism in mammary epithelial cell growth inhibition by the isoflavones genistein and biochanin A*. Carcinogenesis, 1996. **17**(9): p. 1861-9.
23. So, F.V., et al., *Inhibition of human breast cancer cell proliferation and delay of mammary tumorigenesis by flavonoids and citrus juices*. Nutr Cancer, 1996. **26**(2): p. 167-81.
24. Clark, J.W., et al., *Effects of tyrosine kinase inhibitors on the proliferation of human breast cancer cell lines and proteins important in the RAS signaling pathway*. International Journal of Cancer, 1996. **65**(2): p. 186-191.
25. Zava, D.T. and G. Duwe, *Estrogenic and antiproliferative properties of genistein and other flavonoids in human breast cancer cells in vitro*. Nutr Cancer, 1997. **27**(1): p. 31-40.
26. Naik, H.R., J.E. Lehr, and K.J. Pienta, *An in vitro and in vivo study of antitumor effects of genistein on hormone refractory prostate cancer*. Anticancer Res, 1994. **14**(6B): p. 2617-9.
27. Kyle, E., et al., *Genistein-induced apoptosis of prostate cancer cells is preceded by a specific decrease in focal adhesion kinase activity*. Mol Pharmacol, 1997. **51**(2): p. 193-200.
28. Nadal-Serrano, M., et al., *Genistein modulates oxidative stress in breast cancer cell lines according to ER α /ER β ratio: Effects on mitochondrial functionality, sirtuins, uncoupling protein 2 and antioxidant enzymes*. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2013. **45**(9): p. 2045-2051.
29. Park, H.J., et al., *Daidzein causes cytochrome c-mediated apoptosis via the Bcl-2 family in human hepatic cancer cells*. Food and Chemical Toxicology, 2013. **In Press**(0).
30. Harjo, B., et al., *Development of Process Alternatives for Separation and Purification of Isoflavones*. Industrial & Engineering Chemistry Research, 2006. **46**(1): p. 181-189.
31. Kudou, S., et al., *MALONYL ISOFLAVONE GLYCOSIDES IN SOYBEAN SEEDS (GLYCINE-MAX MERRILL)*. Agricultural and Biological Chemistry, 1991. **55**(9): p. 2227-2233.
32. Kim, J.-A., et al., *Comparison of isoflavones composition in seed, embryo, cotyledon and seed coat of cooked-with-rice and vegetable soybean (Glycine max L.) varieties*. Food Chemistry, 2007. **102**(3): p. 738-744.
33. Saldivar, X., et al., *Changes in chemical composition during soybean seed development*. Food Chemistry, 2011. **124**(4): p. 1369-1375.
34. Rostagno, M.A., et al., *Sample preparation for the analysis of isoflavones from soybeans and soy foods*. Journal of Chromatography A, 2009. **1216**(1): p. 2-29.

35. Adlercreutz, H. and W. Mazur, *Phyto-oestrogens and Western diseases*. Ann Med, 1997. **29**(2): p. 95-120.
36. Wang, H. and P.A. Murphy, *Isoflavone Composition of American and Japanese Soybeans in Iowa: Effects of Variety, Crop Year, and Location*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1994. **42**(8): p. 1674-1677.
37. Simonne, A.H., et al., *Retention and changes of soy isoflavones and carotenoids in immature soybean seeds (Edamame) during processing*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2000. **48**(12): p. 6061-6069.
38. Vacek, J., et al., *Current trends in isolation, separation, determination and identification of isoflavones: A review*. Journal of Separation Science, 2008. **31**(11): p. 2054-2067.
39. Ungar, Y., O.F. Osundahunsi, and E. Shimoni, *Thermal stability of genistein and daidzein and its effect on their antioxidant activity*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003. **51**(15): p. 4394-4399.
40. Qin Yan, Z.H.U., et al., *Stability of green tea catechins*. Journal of agricultural and food chemistry (Print), 1997. **45**(12): p. 4624-4628.
41. Mathias, K., et al., *Heat and pH effects on the conjugated forms of genistin and daidzin isoflavones*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006. **54**(20): p. 7495-7502.
42. Chien, J.T., et al., *Kinetic model for studying the conversion and degradation of isoflavones during heating*. Food Chemistry, 2005. **91**(3): p. 425-434.
43. Matsuura, M. and A. Obata, *BETA-GLUCOSIDASES FROM SOYBEANS HYDROLYZE DAIDZIN AND GENISTIN*. Journal of Food Science, 1993. **58**(1): p. 144-147.
44. Wardhani, D.H., J.A. Vazquez, and S.S. Pandiella, *Kinetics of daidzin and genistin transformations and water absorption during soybean soaking at different temperatures*. Food Chemistry, 2008. **111**(1): p. 13-19.
45. Davies, C.G.A., et al., *Indication of the Maillard reaction during storage of protein isolates*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1998. **46**(7): p. 2485-2489.
46. Rostagno, M., et al., *Isoflavones: Biosynthesis, Occurrence and Health Effects.*, in *Prevention of Cardiovascular Diseases by Soy Protein and Isoflavones. Isoflavones: Biosynthesis, Occurrence and Health Effects.*, M.J. Thompson, Editor. 2010 - 3rd Quarter, Nova Science Publishers, Inc. p. 83-110.
47. Jackson, C.J.C., et al., *Effects of processing on the content and composition of isoflavones during manufacturing of soy beverage and tofu*. Process Biochemistry, 2002. **37**(10): p. 1117-1123.
48. Kao, T.H., et al., *Stability of isoflavone glucosides during processing of soymilk and tofu*. Food Research International, 2004. **37**(9): p. 891-900.
49. Prabhakaran, M.P. and C.O. Perera, *Effect of extraction methods and UHT treatment conditions on the level of isoflavones during soymilk manufacture*. Food Chemistry, 2006. **99**(2): p. 231-237.
50. Prabhakaran, M.P., C.O. Perera, and S. Valiyaveetil, *Effect of different coagulants on the isoflavone levels and physical properties of prepared firm tofu*. Food Chemistry, 2006. **99**(3): p. 492-499.
51. Otieno, D.O., J.F. Ashton, and N.P. Shah, *Stability of isoflavone phytoestrogens in fermented soymilk with Bifidobacterium animalis Bb12 during storage at*

- different temperatures*. International Journal of Food Science & Technology, 2006. **41**(10): p. 1182-1191.
52. Otieno, D.O., J.F. Ashton, and N.P. Shah, *Isoflavone phytoestrogen degradation in fermented soymilk with selected beta-glucosidase producing L-acidophilus strains during storage at different temperatures*. International Journal of Food Microbiology, 2007. **115**(1): p. 79-88.
53. Hayes Shelley, A., N. Unklesbay, and U. Grun Ingolf, *Isoflavone Stability in Chocolate Beverages*, in *Nutraceutical Beverages*. 2003, American Chemical Society. p. 189-199.
54. Anderson, R.L. and W.J. Wolf, *COMPOSITIONAL CHANGES IN TRYPSIN-INHIBITORS, PHYTIC ACID, SAPONINS AND ISOFLAVONES RELATED TO SOYBEAN PROCESSING*. Journal of Nutrition, 1995. **125**(3): p. S581-S588.
55. Wang, H.J. and P.A. Murphy, *Mass balance study of isoflavones during soybean processing*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1996. **44**(8): p. 2377-2383.
56. Hou, H.J. and K.C. Chang, *Interconversions of isoflavones in soybeans as affected by storage*. Journal of Food Science, 2002. **67**(6): p. 2083-2089.
57. Shimoni, E., *Stability and shelf life of bioactive compounds during food processing and storage: Soy isoflavones*. Journal of Food Science, 2004. **69**(6): p. R160-R166.
58. Kim, J.J., et al., *Changing soybean isoflavone composition and concentrations under two different storage conditions over three years*. Food Research International, 2005. **38**(4): p. 435-444.
59. Huang, R.-Y. and C.-C. Chou, *Stability of Isoflavone Isomers in Steamed Black Soybeans and Black Soybean Koji Stored under Different Conditions*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009. **57**(5): p. 1927-1932.
60. de Rijke, E., et al., *Determination of isoflavone glucoside malonates in Trifolium pratense L. (red clover) extracts: quantification and stability studies*. Journal of Chromatography A, 2001. **932**(1-2): p. 55-64.
61. Rostagno, M.A., M. Palma, and C.G. Barroso, *Short-term stability of soy isoflavones extracts: Sample conservation aspects*. Food Chemistry, 2005. **93**(3): p. 557-564.
62. Georgetti, S.R., et al., *Spray drying of the soybean extract: Effects on chemical properties and antioxidant activity*. Lwt-Food Science and Technology, 2008. **41**(8): p. 1521-1527.
63. Sobharaksha, P., R. Indranupakorn, and M. Luangtana-ananta, *Engineering of Soybean Extract Powder: Identification, Characterisation and Stability Evaluation*, in *Advanced Engineering Materials, Pts 1-3*, J.M. Zeng, et al., Editors. 2011, p. 507-510.
64. Rostagno, M.A., M. Palma, and C.G. Barroso, *Ultrasound-assisted extraction of soy isoflavones*. Journal of Chromatography A, 2003. **1012**(2): p. 119-128.
65. Rostagno, M.A., M. Palma, and C.G. Barroso, *Pressurized liquid extraction of isoflavones from soybeans*. Analytica Chimica Acta, 2004. **522**(2): p. 169-177.

**Capítulo 2: Desarrollo de métodos
cromatográficos rápidos para el análisis de
compuestos fenólicos**

1 INTRODUCCIÓN

1.1 COMPUESTOS FENÓLICOS Y SU IMPORTANCIA

Los compuestos fenólicos son compuestos que tienen uno o más grupos hidroxilos unidos directamente a un anillo aromático, tal y como se han presentado en la introducción de esta tesis. Son considerados metabolitos secundarios, que son sintetizados por las plantas y ciertas bacterias durante su desarrollo y en respuesta a condiciones de estrés como infecciones, heridas y radiación UV entre otras [1, 2]. Entre ellos se encuentran ácidos fenólicos, cumarinas, flavonoides, estilbenos, taninos condensados e hidrolizables, lignanos y ligninas (ver introducción).

En las plantas los compuestos fenólicos pueden actuar como pigmentos, antioxidantes y agentes protectores, por lo que estos compuestos juegan un papel importante en el crecimiento y reproducción de las plantas, así como en una eficiente protección contra patógenos y predadores. En los alimentos pueden contribuir al sabor, el color, el olor y la estabilidad (se comportan como antioxidantes) [1].

Los compuestos fenólicos se han convertido en parte de nuestra dieta debido a que se han asociado con diversas actividades que promueven la salud tales como la disminución del nivel del azúcar en la sangre, reducción del peso, además de presentar propiedades anticarcinogénicas, antiinflamatorias, antiedad y antitrombótica, entre otras; sin embargo, el efecto que más interés ha suscitado es su función como antioxidantes, siendo captadores de radicales libres [2-9].

En nuestra dieta hay muchos alimentos fuente de estos compuestos fenólicos como son el café (ácidos fenólicos [10, 11]), el té (flavanoles y flavonas [12, 13]) y la soja (isoflavonas [14-16]), entre otros. Con el objetivo de poder relacionar debidamente estos alimentos con sus efectos beneficiosos para nuestra salud, además de por el gran aumento en su consumo que se ha producido en los últimos años, existe un gran interés en la separación y cuantificación de los compuestos fenólicos presentes en dichos alimentos.

1.2 ANÁLISIS CUANTITATIVO DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS

Desde que en 1976 Fisher & Wheaton usaran por primera vez la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) para el análisis de flavonoides [17], ésta se ha convertido en la principal técnica analítica utilizada para la separación y caracterización de los compuestos fenólicos [1, 2, 18-21]. Entre las razones de su elección se incluye que es apropiada por el carácter polar de estos compuestos, que el tratamiento de muestra que se requiere es simple, y que es posible analizar varios compuestos fenólicos a la vez de una manera altamente eficaz y reproducible.

1.2.1 Cromatografía líquida

La cromatografía es un método de separación en el cual los distintos componentes de una muestra se distribuyen entre una fase estacionaria de mayor superficie y una fase móvil que atraviesa dicha fase estacionaria, arrastrando los compuestos objeto de análisis. Si la fase estacionaria es un sólido incluido en un tubo estrecho, columna, y la móvil es un líquido, se le denomina cromatografía líquida.

Para el análisis por cromatografía líquida de los compuestos fenólicos se utiliza la cromatografía líquida de alta eficacia (*High Performance Liquid Chromatography*, HPLC), que se trata de una cromatografía líquida en la que se reduce el tamaño de las partículas de la fase estacionaria para aumentar la eficacia en la separación. La eficacia en el análisis cromatográfico se define utilizando la teoría de platos, por la cual se considera que una columna cromatográfica está constituida por una serie de capas horizontales, platos teóricos, donde se dan los equilibrios de transferencia de masa entre la fase estacionaria y la fase móvil. Por lo tanto, se habla de mayor eficacia en una separación cromatográfica cuanto mayor es el número de platos teóricos, es decir, cuando se da un mayor número de equilibrios. La reducción del tamaño de partícula, pasando de 10 μm a 5 o 3 μm , hace que la transferencia de masa entre fase estacionaria y fase móvil sea mayor y por lo tanto mejora la separación [22].

El análisis mediante HPLC se produce mediante un mecanismo de adsorción/desorción de los compuestos en la fase estacionaria, cuando pasa a través de ella la fase móvil; este mecanismo se sustenta en la polaridad de ambas fases. Al pasar la fase móvil, se arrastra el analito a través de la fase estacionaria y se establecen tres fenómenos de difusión. Uno de ellos es la llamada difusión de Eddy que se debe a las distintas trayectorias que puede tomar la fase móvil a través de la fase estacionaria, esto está directamente relacionado con el relleno de la columna, el diámetro de las partículas, la homogeneidad y el grado de empaquetamiento. Otro de los fenómenos es la difusión longitudinal que es debida a la tendencia de las moléculas a migrar por el gradiente de concentración, de mayor a menor concentración; esta difusión está inversamente relacionada con la viscosidad de la fase móvil. Y por último está el fenómeno de transferencia de masa fuera del equilibrio, en el que algunas moléculas de analito avanzan más rápido o más despacio que las demás, y es directamente proporcional a la temperatura. Todos estos fenómenos de difusión contribuyen de forma directa a la eficacia de la separación, y van a depender tanto de la fase móvil, como de la fase estacionaria, por lo que es muy importante elegir las fases más adecuadas para cada analito [22].

Para el análisis de compuestos fenólicos se suelen usar fases estacionarias apolares, usando únicamente el análisis por cromatografía en fase reversa, con columnas C18, de entre 150 a 250 mm de longitud, con un diámetro interno en torno a 4,6 mm y un tamaño de partícula de 5 μm . Como fase móvil se usan mezclas binarias,

con disolventes más polares que la fase estacionaria; normalmente se usan distintos disolventes orgánicos (acetonitrilo o metanol) y agua con pequeñas cantidades de ácido, y se trabaja con elución en gradiente, es decir, cambiando con el tiempo la composición de la fase móvil, ya que el modo isocrático (sin cambiar composición) no es suficiente para separar todos los compuestos fenólicos, ya sea bien porque poseen una estructura muy similar, si son de la misma familia, o bien porque difieren mucho si son de familias diferentes. El sistema de detección más común es la detección espectrofotométrica UV-visible y UV-fluorescencia, aunque actualmente está muy extendido el acoplamiento de un espectrómetro de masas para la separación de muestras complejas [1, 2, 9, 23].

Como se ha comentado anteriormente, las fases estacionarias más comunes son las compuestas por partículas de sílica químicamente modificadas, conteniendo cadenas hidrocarbonadas de 18 átomos de carbono; son las denominadas columnas particuladas convencionales en fase reversa C18 (**CPC**). En ellas la interacción del analito con la superficie de la partícula es la que provoca la separación, en este caso concreto es una interacción hidrofóbica [24]. El tamaño de las partículas de sílica (5-2 μm) proporciona un tamaño de poro determinado que existe entre las mismas y dan lugar a una presión de trabajo al paso de la fase móvil, por lo tanto se debe tener en cuenta el flujo de la misma para poder trabajar en las condiciones óptimas del equipo y la columna. Una consecuencia de ello es el tiempo necesario para la separación, que en el caso del análisis de isoflavonas de soja para una columna particulada de 5 μm de tamaño de partículas y 250 mm de longitud con elución en gradiente, es de entre 30 y 60 minutos [25]; y en el caso del análisis de flavanoles de extractos de té de 25 minutos [26].

Estos tiempos de análisis es lo que limita el número de muestras que se pueden analizar al día. Además estas columnas tienen otra desventaja, puesto que si trabajamos fuera del rango óptimo de presión, intentando reducir ese tiempo de análisis, potenciamos la rápida degradación de la columna (y del equipo) pudiéndose dar pérdidas de relleno prematuras, lo cual inutiliza la columna.

La tendencia actual en el análisis cromatográfico es conseguir que los análisis sean rápidos, con elevada sensibilidad y eficacia.

1.3 NUEVAS TENDENCIAS EN EL ANÁLISIS RÁPIDO POR CROMATOGRAFÍA DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS

Existen varios enfoques modernos en los métodos de HPLC que pueden permitir la reducción del tiempo de análisis sin comprometer la eficiencia y resolución de la separación. Entre ellos se encuentran las nuevas tecnologías aplicadas tanto a los equipos (UHPLC) como a las columnas; en el caso de las columnas se encuentran las columnas con diámetro de partícula menor de 2 μm , y entre ellas se pueden

mencionar las realizadas con nuevos materiales, como las monolíticas, y las de partículas recubiertas.

A continuación se va a analizar cada una de las nuevas tendencias.

Se han desarrollado nuevos equipos cromatográficos, como el UHPLC (*Ultra-High Performance Liquid Chromatography*), sistema de cromatografía líquida de alta presión, que aguanta mayores presiones que los equipos cromatográficos de alta eficacia convencionales (HPLC) [27, 28]. En estos equipos se puede trabajar a 18000 psi frente a los 5000 psi de un equipo convencional. De esta manera, podemos aumentar el flujo de la fase móvil y así reducir el tiempo de análisis sin perder resolución y eficacia, siempre que la columna convencional soporte la alta presión que se alcanza al trabajar a flujos elevados.

Para poder trabajar en estos equipos se han desarrollado las columnas con menor tamaño de partículas que las convencionales, las columnas de partículas < 2 μm o sub-2 μm . Con estas columnas se consigue una alta eficacia y resolución, lo que permite la utilización de columnas más cortas, que se traduce en tiempos de análisis más cortos. Además se ha comprobado que la transferencia de un método optimizado para una columna convencional a un método para este tipo de columnas sub-2 μm , es sencilla de realizar [29]. Sin necesidad de cambiar de equipo cromatográfico, se está extendiendo el uso de otros materiales en las columnas que permiten conseguir el objetivo de la reducción del tiempo de análisis de los compuestos fenólicos sin reducir la eficiencia y la resolución [27, 28]. Entre ellas se encuentran las llamadas columnas monolíticas y columnas con partículas recubiertas, o *fused-core* [24].

1.3.1 Columnas monolíticas (CM)

Entre las nuevas tecnologías de columnas para la obtención de métodos rápidos de análisis para compuestos fenólicos encontramos las columnas rellenas con soportes monolíticos (**CM**). Estas columnas están hechas de una pieza completa de polímero entrecruzado poroso o sílica. Se realizan mediante un proceso de polimerización de polímeros orgánicos, como los polimetacrilatos o poliestirenos, o de polímeros inorgánicos, como la sílica. Los más usados en HPLC son los de sílica, una barra altamente porosa de sílica con una estructura bimodal de poros, macroporos y mesoporos (*figura 70*).

Cada macroporo tiene una media de 2 μm de diámetro, y juntos forman una densa red de poros a través de la cual la fase móvil puede pasar rápidamente a una baja presión (flujos de hasta de 9 mL/min) (*figura 71*), reduciendo así drásticamente el tiempo de separación sin afectar a la transferencia de masa, ya que los mesoporos crean una fina estructura porosa, de 130 Å, en el interior de la columna y da lugar a una amplia superficie de contacto, en la cual puede ocurrir la transferencia de masa de los compuestos de interés, aumentando la eficacia de la separación [30, 31].

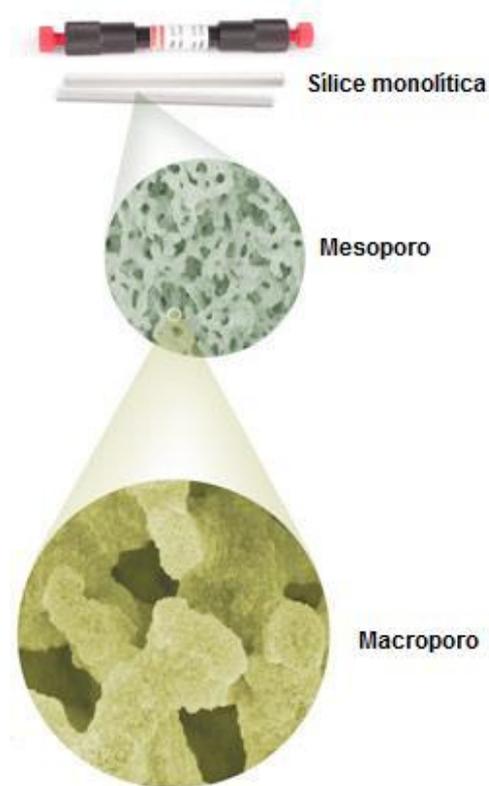


Figura 70. Estructura bimodal de poros de una columna monolítica (CM).

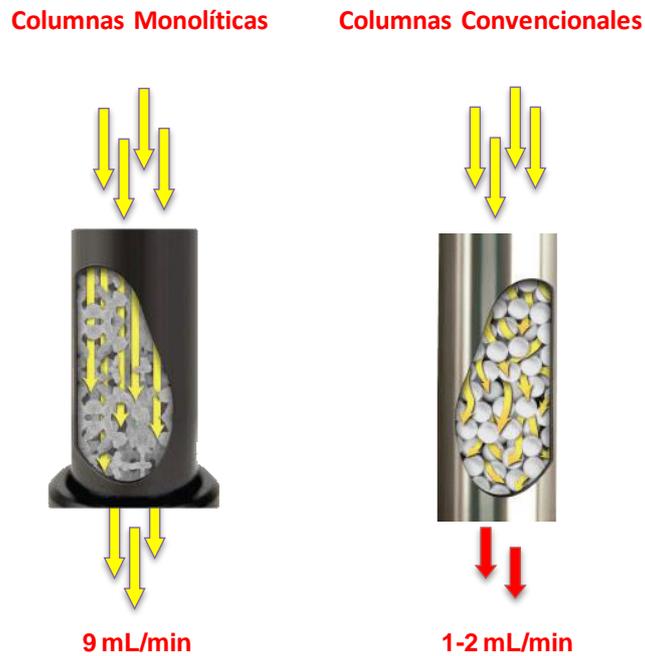


Figura 71. Comparación del paso de fase móvil por una columna monolítica y una convencional particulada.

Comparando la cromatografía con columna monolítica (CM) de sílica con la cromatografía con columnas particuladas convencionales (CPC) se observa que las propiedades de transferencia de masa de las columnas monolíticas en los mesoporos

es equivalente a una columna convencional con un tamaño de partícula de 3 μm (mayor eficacia y resolución), mientras que el sistema de paso de la fase móvil por el poro del macroporo es equivalente a un tamaño intersticial de paso de un sistema con un tamaño de partícula de 15 μm (menor presión). Por lo tanto, la combinación de ambos poros permite que las columnas monolíticas alcancen excelentes prestaciones en una fracción de tiempo más reducida, en comparación con las columnas particuladas convencionales, ya que la transferencia de masa es más eficaz, y la presión es menor y se puede aumentar el flujo y de este modo reducir el tiempo de análisis [32]. Existen estudios del análisis de distintos compuestos fenólicos con columnas monolíticas donde las separaciones complejas se desarrollan en un tiempo reducido [33-38]; como por ejemplo en el caso de las isoflavonas de soja donde su análisis con columnas monolíticas dura menos de 10 minutos [39]; o como para el análisis de 14 compuestos fenólicos diferentes en vino, entre ácidos fenólicos, flavanoles, flavonoides y resveratrol, donde se consigue la separación en menos de 36 minutos [40].

En el caso de muestras complejas donde la eficacia de la columna no es suficiente para la separación total, una de las posibilidades para conseguir la separación es acoplar varias columnas en serie. En el caso de columnas particuladas convencionales, esto aumenta mucho la presión de trabajo, por lo que se debe reducir el flujo de fase móvil, mientras que con las columnas monolíticas, al generar menor presión de trabajo, es posible acoplar varias columnas para aumentar la capacidad de la fase estacionaria de resolver una muestra compleja [35, 39].

Además, se ha de tener en cuenta que al trabajar a bajas presiones se pueden usar los equipos convencionales de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), que como máximo soportan 5000 psi, en comparación con las columnas de partículas sub-2 μm que necesitan un equipo de cromatografía que soporte mayor presión (UHPLC, 18000 psi).

Una de las desventajas de estas columnas monolíticas es que sólo unos pocos tipos de fases estacionarias están comercializadas y disponibles, lo cual limita la flexibilidad del análisis. Hay que tener en cuenta también que al usar flujos altos se consume gran cantidad de disolvente. Otra desventaja de estas columnas es que poseen poca estabilidad frente a variaciones de pH y temperatura, lo cual limita las condiciones de trabajo. Además se ha comprobado que la transferencia de métodos desde una columna convencional a una monolítica no siempre se puede realizar de forma directa, algo que es posible en el caso de columnas sub-2 μm [29, 41].

1.3.2 Columnas de partículas recubiertas (CPR) o de partículas *fused-core*

Actualmente se han desarrollado otras columnas para mejorar la eficacia de separación y aumentar la velocidad, son las columnas en las que las partículas no son totalmente porosas. Estas partículas están recubiertas por un material poroso y poseen un núcleo sólido de sílica no poroso. Son las llamadas columnas de partículas recubiertas (CPR) o de partículas *fused-core*.

Para la fabricación de este tipo de columnas se utilizan técnicas sólido-gel, una tecnología nanoestructural que incorpora una capa porosa homogénea sobre un núcleo sólido de sílica, por lo que no son totalmente porosas como las partículas convencionales (figura 72 y 73).

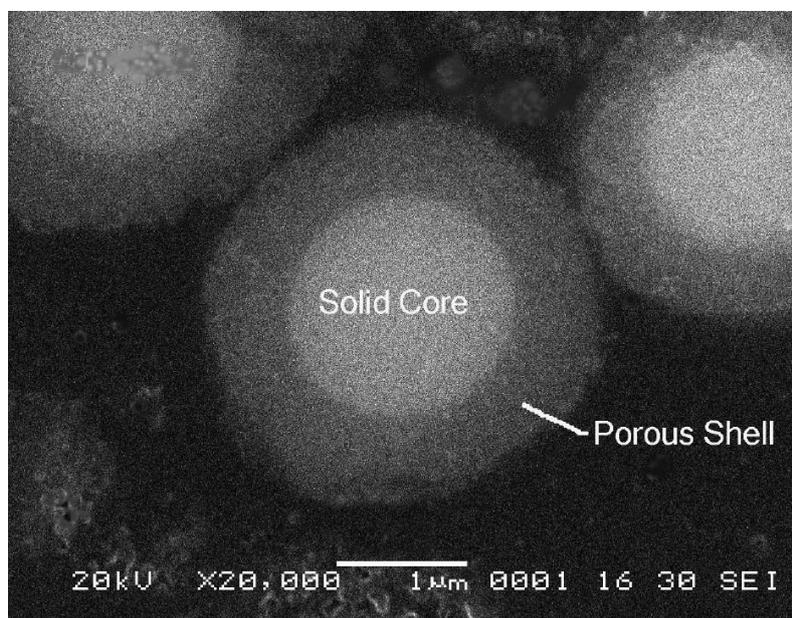


Figura 72. Micrografía electrónica de la sección transversal de una partícula recubierta (*fused-core*) de 9 nm poro, DeStefano y col. 2008 [42].

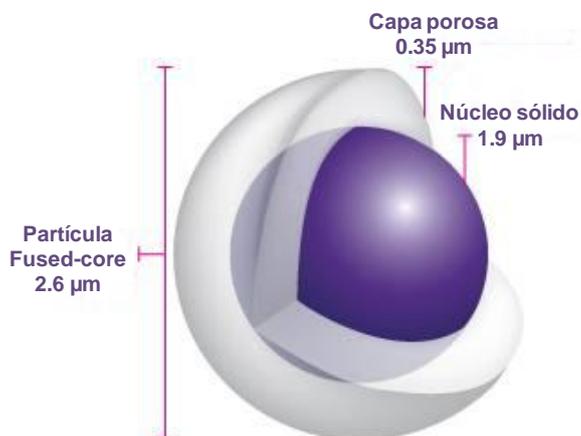


Figura 73. Diagrama de la estructura de una partícula recubierta, *fused-core*.

Sólo poseen una capa porosa de $0,35\ \mu\text{m}$, y ésta es la zona por la que atraviesa la fase móvil (distancia de difusión), no por toda la partícula como en las convencionales, haciendo que el camino de la fase móvil sea más directo y los analitos inviertan menos tiempo en entrar y salir del poro mientras recorren la columna, acelerando la transferencia de masa entre sólido y líquido obteniendo picos más estrechos, así como una mayor eficacia (figura 74).

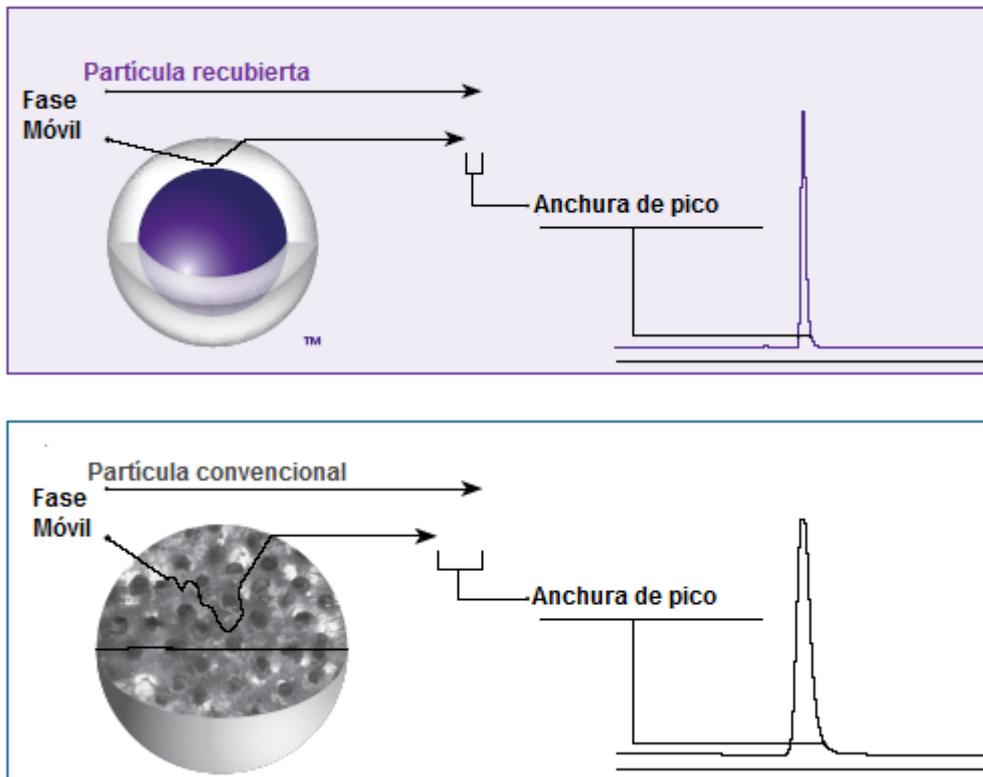


Figura 74. Paso de la fase móvil a través de las partículas de las columnas y sus consecuencias.

Debido a su tecnología de fabricación, todas las partículas recubiertas poseen el mismo tamaño, prácticamente monodispersas. Esta calidad reduce el efecto de la difusión de Eddy, siendo más directo el trayecto de la fase móvil a través de la fase estacionaria porque el espacio intersticial entre las partículas es homogéneo (figura 75). Esto produce una alta eficacia y una excelente reproducibilidad [43].

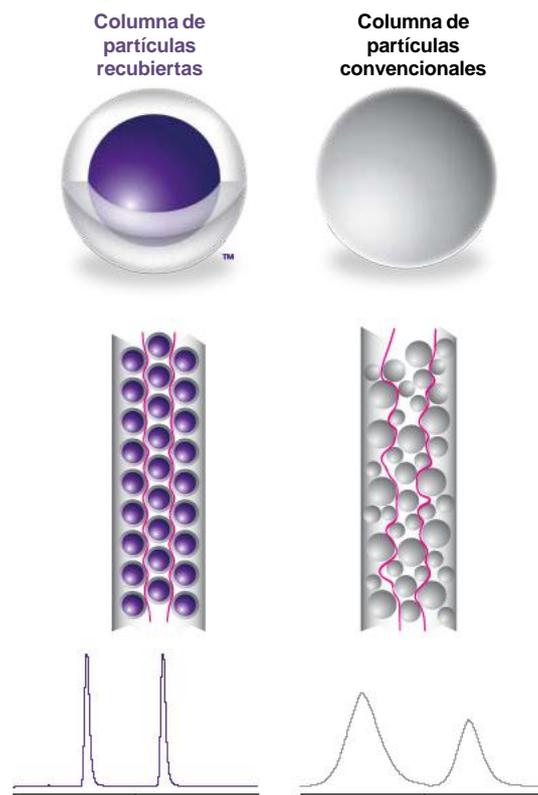


Figura 75. Paso de la fase móvil a través de las columnas particuladas y sus consecuencias.

Estas nuevas columnas generan una eficacia similar a las columnas de partículas sub-2 μm , pero con presiones de trabajo comparables a las obtenidas con las columnas de partículas convencionales, porque el tamaño de partícula es mayor. Por lo tanto nos permite alcanzar la misma eficacia y resolución que las sub-2 μm sin tener que cambiar el equipo de cromatografía.

Además, al contrario que ocurría en el caso de las columnas monolíticas, existen numerosas columnas con partículas recubiertas comerciales que soportan mayores presiones que las columnas monolíticas y que las convencionales, lo cual las hace también óptimas para trabajar con equipos de UHPLC [29]. Existen varias aplicaciones de este tipo de columnas tanto en equipos de UHPLC como de HPLC donde se reflejan las ventajas de trabajar con ellas [29, 43-47]. Algunas de las aplicaciones de las columnas *fused-core* en el análisis de compuestos fenólicos han mostrado una elevada sensibilidad, resolución, selectividad y rapidez; un ejemplo es el análisis de 8 compuestos fenólicos en aceite de oliva siendo su separación tres veces más rápida que su análisis con una columna particulada convencional [48]; o el análisis de 17 flavonoides y ácidos fenólicos en verduras y frutas en menos de 18 minutos [49].

1.3.3 Resumen de las tendencias en cromatografía líquida

En la *tabla 50* se muestran las características más importantes de cada una de las posibilidades de análisis cromatográfico descritos anteriormente y de la cromatografía convencional.

Tabla 50. Comparación de las posibilidades del análisis cromatográfico de los compuestos fenólicos.

Columna particulada convencional	Columna sub-2 μm particulada	Columna de partículas recubiertas	Columna monolítica
<ul style="list-style-type: none"> • Partículas individuales de sílice • Alta resistencia al flujo • Alta presión del sistema • Tiempos de análisis largos • Gran consumo de disolvente • Puede existir pérdida de relleno (poca vida útil y baja reproducibilidad) 	<ul style="list-style-type: none"> • Partículas individuales de sílice. • Alta eficacia y resolución • Alta presión del sistema, necesita un equipo de UHPLC • Tiempos de análisis reducidos por mayor eficacia de separación • Menor consumo de disolvente • Gran variedad de rellenos comerciales 	<ul style="list-style-type: none"> • Partículas individuales recubiertas de material poroso • Alta eficacia y resolución • Baja presión del sistema • Tiempos de análisis reducidos • Gran variedad de rellenos comerciales 	<ul style="list-style-type: none"> • Bastón de sílice monolítica porosa • Flujos altos por la gran porosidad • Baja presión del sistema • Tiempos de análisis reducidos • Poca variedad de rellenos comerciales • Posibilidad de acoplar varias columnas sin cambiar a un equipo de UHPLC

2 OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo es evaluar y obtener métodos de análisis cromatográficos rápidos, eficaces y versátiles de compuestos fenólicos utilizando las nuevas tecnologías existentes en la fabricación de columnas cromatográficas para su uso en equipos convencionales de HPLC. Para ello nos centramos inicialmente en obtener un método de análisis mediante HPLC de las 12 principales isoflavonas presentes en la soja.

Inicialmente se realizó un estudio comparativo, en términos de los parámetros cromatográficos y su eficacia con muestras reales, con tres fases estacionarias distintas: una columna particulada convencional de 3,5 μm de tamaño de partícula (CPC), una columna monolítica (CM) y una columna de partículas recubiertas de 2,6 μm de tamaño de partícula (CPR).

Para explorar al máximo el rendimiento de los distintos tipos de fases estacionarias, también se estudiaron distintas composiciones de fase móvil, distintas temperaturas y distintos flujos de trabajo.

Una vez comparadas las tres fases estacionarias se optimizaron métodos de análisis utilizando las dos columnas con fases estacionarias no convencionales. Para cada columna estudiada se seleccionó un método diferente de optimización:

- Columna monolítica (CM): se estudiaron diferentes sistemas de fase móvil tanto en isocrático como en gradiente lineal, así como diferentes composiciones de fase móvil, adicionando diferentes cantidades de ácido; se seleccionó el mejor de entre todos ellos.
- Columna de partículas recubiertas (CPR): se optimizó el método utilizado en la comparación de fases estacionarias variando temperatura, flujo y tiempo de re-equilibrado.

Una vez optimizados los métodos para el análisis de las 12 isoflavonas de soja estudiadas, se utilizó la fase estacionaria que mostró mejores resultados para el análisis de 19 compuestos fenólicos diferentes, entre los que se encuentran ácidos fenólicos, flavanoles, flavonas y flavonoles, además del alcaloide cafeína.

3 EXPERIMENTAL

3.1 MATERIALES Y REACTIVOS

3.1.1 Reactivos y disolventes

Etanol, metanol y acetonitrilo de grado HPLC se adquirieron en VWR (West Chester, PA, USA). El ácido acético del 96% y el ácido fosfórico 98% utilizados fueron de Merck (Darmstadt, Germany) y el agua ultrapura empleada durante las extracciones y el análisis ha sido obtenida por un sistema de purificación Milli-Q water Advantage A10 de Millipore (Bedford, MA, USA). En este sistema el agua se somete a una desionización en dos etapas a través de resinas de intercambio iónico. Todos los disolventes fueron sometidos a una desgasificación, previa a su utilización, en un baño de ultrasonidos.

3.1.2 Sustancias patrón

Los patrones de compuestos fenólicos y alcaloide utilizados se muestran en las *tablas 51, 52, 53 y 54* junto con su proveedor. Todos se almacenaron antes de su uso a -20 °C. Sus estructuras químicas, familias y sus abreviaturas se muestran en las *figuras 76, 77, 78 y 79*.

La pureza de los patrones de derivados glucósidos y agluconas de las isoflavonas es superior al 99%, mientras que la pureza de los derivados acetiles y maloniles es mayor del 90%. Las disoluciones madre de cada una de las isoflavonas se prepararon en metanol y se almacenaron a -80 °C.

Los patrones del alcaloide, ácidos fenólicos, flavanoles, flavonas y flavonoles son de calidad grado HPLC con purezas superiores al 90%. Las disoluciones madre de cada uno de estos compuestos se prepararon en metanol acuoso al 80% y se almacenaron a -80 °C.

Flavona de pureza 99 % de Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA) se usó como referencia para la corrección de volumen en la preparación de las muestras en el análisis de isoflavonas.

Tabla 51. Patrones de las isoflavonas utilizadas en este estudio y su proveedor.

Compuesto	Proveedor
Daidzina	LC Labs (Woburn, MA, USA)
Glicitina	
Genistina	
Daidzeína	
Gliciteína	
Genisteína	Wako Chemicals (Neuss, Alemania)
Malonil daidzina	
Malonil glicitina	
Malonil genistina	
Acetil daidzina	
Acetil glicitina	
Acetil genistina	

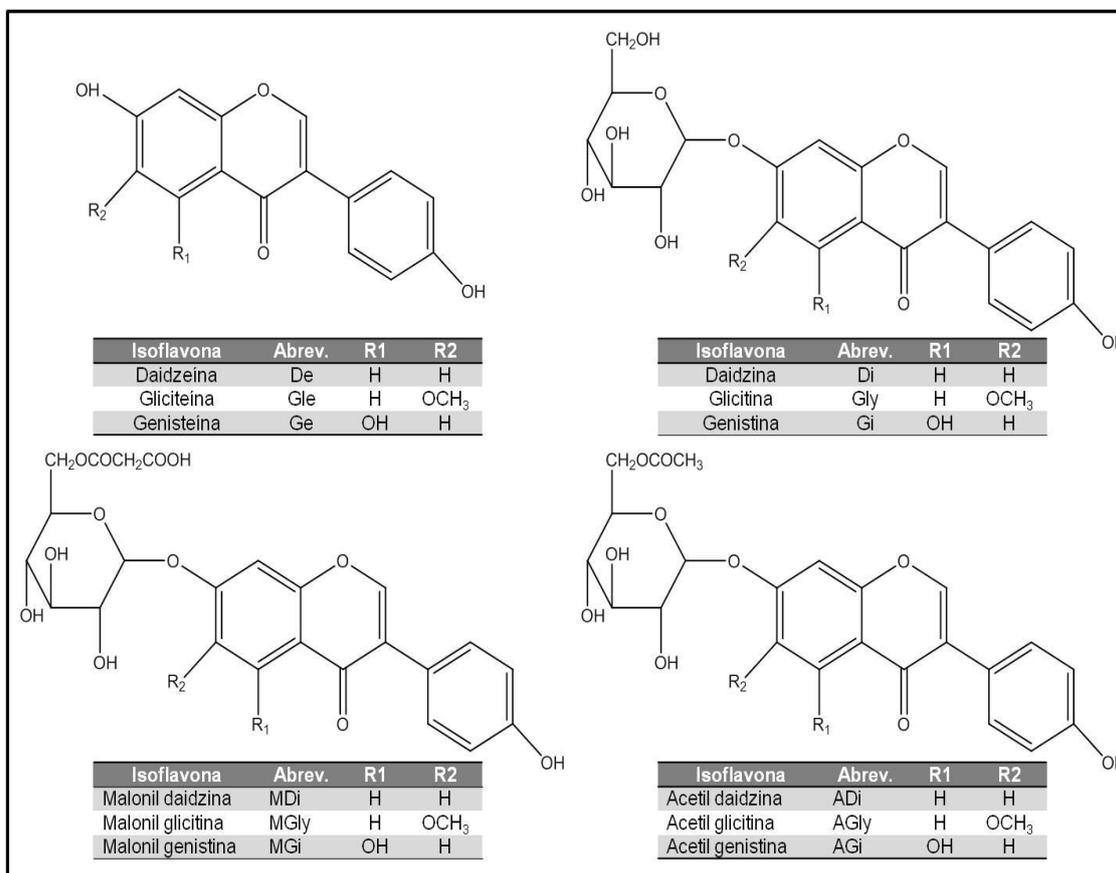


Figura 76. Estructura química y abreviaturas de las isoflavonas utilizadas en este estudio.

Tabla 52. Patrones del alcaloide y los ácidos fenólicos utilizados en este estudio y su proveedor.

Compuesto		Proveedor
Cafeína		
Ácido gálico		
Ácido protocatéquico		Sigma Chemical Co.
Ácido clorogénico		(St. Louis, MO, USA)
Ácido cafeico		
Ácido p-cumárico		

Ácidos Fenólicos					Alcaloide
Ácido Cafeico CafAc	Ácido p-cumárico CouAc	Ácido Clorogénico ChlAc	Ácido gálico GalAc	Ácido protocatéquico PrtAc	Cafeína Caf

Figura 77. Estructura química y abreviaturas del alcaloide y los ácidos fenólicos utilizados en este estudio

Tabla 53. Patrones de los flavanoles utilizados en este estudio y su proveedor.

Compuesto		Proveedor
(-)-galocatequina galato		Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)
(-)-epicatequina		
(-)-catequina		
(-)-epigallocatequina		Extrasynthese (Genay Cedex, Francia)
(-)-galocatequina		
(-)-epigallocatequina galato		
(-)-epicatequina galato		

Flavanoles			
(-)-Catequina CAT	(-)-Epicatequina EC	(-)-Epigallocatequina EGC	(-)-Galocatequina GC
(-)-Gallocatequina Gallato GCG	(-)-Epicatequina galato ECG	(-)-Epigallocatequina galato EGCG	

Figura 78. Estructura química y abreviaturas de los flavanoles utilizados en este estudio.

Tabla 54. Patrones de las flavonas y los flavonoles utilizados en este estudio y su proveedor.

Compuesto	Proveedor
Miricetina-3-O-ramnósido	Extrasynthese (Genay Cedex, Francia)
Quercetina-3-O-rutinósido	
Quercetina-3-O-glucopiranósido	
Kaempferol-3-O-rutinósido	
Kaempferol-3-O-glucósido	
Apigenina-7-O-glucósido	
Luteolina-7-O-glucósido	

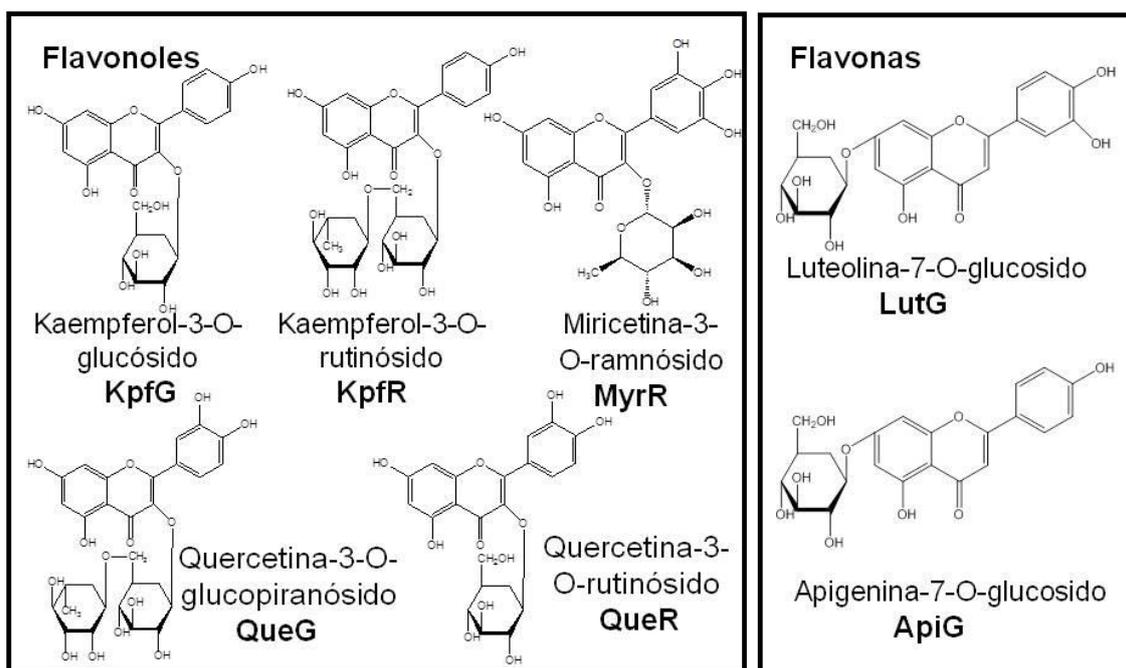


Figura 79. Estructura química y abreviaturas de los flavonoles y las flavonas utilizados en este estudio.

3.1.3 Muestras

Para este estudio se han utilizado dos muestras de soja amarilla, dos muestras de proteína texturizada de soja, tres muestras de tés comerciales (*Camellia sinensis*) (uno negro, uno verde y uno blanco), una muestra de comprimidos de té verde y guaraná, una muestra de mate (*Ilex paraguariensis*), una muestra de café soluble, un refresco y una bebida energética. Todas las muestras utilizadas en este estudio fueron adquiridas en un supermercado en la localidad de Soria y almacenadas antes de su uso, a -20°C las muestras de soja y proteína de soja, y a temperatura ambiente el resto de muestras.

3.2 INSTRUMENTACIÓN

3.2.1 Baño de ultrasonidos

Las extracciones se realizaron en un baño de ultrasonidos Transsonic TH-I-55 (Elma Hans Schmidbauer GmbH & Co. KG, Singen, Alemania), que cuenta con variación de frecuencia (25 y 45 KHz, y modo *sweep* que combina ambas) y posibilidad de trabajar a temperaturas de hasta 80 °C. Ver *figura 22* del capítulo 1.

3.2.2 Centrífuga

Después de las extracciones en el baño de ultrasonidos los extractos son centrifugados en una centrífuga Universal 320R (Andreas Hettich GMBH & Co. KG, Tutlingen, Alemania) (*figura 80*), que cuenta con variación de las revoluciones por minuto y control de la temperatura de centrifugación, pudiendo trabajar a temperaturas menores a la ambiente.



Figura 80. Centrífuga utilizada durante este estudio.

3.2.3 Liofilizador

Para el estudio de comparación de las distintas fases estacionarias se utiliza un extracto estandarizado liofilizado de isoflavonas de soja, que es un extracto igual que las muestras, pero escalado a mayor cantidad, que se liofiliza para poder usar cantidad equivalentes durante el estudio del efecto del disolvente de la muestra. Para la liofilización se utiliza un liofilizador Cryodos -80 (IMA-Telstar S.L., Terrassa, Barcelona, España). Ver *figura 23* del capítulo 1.

3.2.4 Cromatógrafo líquido de alta resolución

El análisis mediante cromatografía líquida de alta resolución con detección ultravioleta (HPLC-UV) de las isoflavonas se realizó en un sistema Waters (Waters

Corp., Milford, Massachusetts, USA) formado por un módulo de separación (2695), con un horno de columna integrado, un inyector de muestra automático y un detector de fila de fotodiodos (2998) conectado en línea a un detector de fluorescencia multifrecuencia (2475) (*figura 24* del capítulo 1).

3.3 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

La mayor parte de este estudio se realiza determinando isoflavonas en muestras de soja. Sólo al final del estudio se desarrolla un método cromatográfico para otro tipo de compuestos fenólicos, presentes en otro tipo de muestras que se preparan de forma ligeramente distinta.

Para la extracción de los compuestos en las muestras se utilizó un método de extracción asistida por ultrasonidos basado en las condiciones optimizadas por Rostagno y col. 2003 y 2007 [50, 51].

3.3.1 Muestras de soja y alimentos derivados

Las muestras de soja y proteína de soja fueron molidas en un molinillo de café hasta conseguir un polvo fino y homogéneo.

Para la extracción en soja y proteína de soja se pesaron aproximadamente 0,5 gramos de muestra, por duplicado, que se extraen con 25 mL de etanol acuoso al 50%. La mezcla se introduce en el baño de ultrasonidos a una frecuencia de 25 KHz, al 100% de intensidad, durante 20 minutos a 60°C [50]. Una vez finalizada la extracción se deja enfriar, se centrifuga durante 10 min a 4000 rpm y 10 °C, y se enrasa el sobrenadante a 50 mL con metanol acuoso al 50%. Finalmente, el extracto se filtra por un filtro de jeringa de nylon de 0,2 µm de tamaño de poro (VWR, West Chester, PA, USA) para proceder a su análisis cromatográfico.

Para el estudio del efecto del disolvente de reconstitución de los extractos de isoflavonas en el análisis cromatográfico con los distintos métodos desarrollados se prepara un extracto liofilizado que lo denominamos extracto estandarizado de proteína de soja que no se cambia en todo el estudio para tener como única variable el disolvente de reconstitución. Para estos extractos liofilizados la extracción se realiza de igual manera pero escalado a mayor cantidad, y sin enrasar al final [39, 52]. El sobrenadante se congela a -20°C y se liofiliza. El extracto estandarizado liofilizado obtenido se almacenó a -20°C.

De este extracto se prepararon distintas disoluciones con 0,1 gramos del extracto estandarizado de soja redissuelto en 10 mL de distintos disolventes para realizar los estudios de la influencia del disolvente de la muestra en el análisis cromatográfico. Los disolventes estudiados fueron etanol acuoso al 50% y al 75%, metanol acuoso al 50% y al 75%, y acetonitrilo acuoso al 50% y al 75%. Para el

análisis cromatográfico se filtraron por filtro de jeringa de nylon de 0,2 μm de tamaño de poro.

Para la optimización de métodos rápidos de análisis de isoflavonas con una columna monolítica se utiliza una muestra de soja dopada para poder tener una muestra con todas las isoflavonas de estudio a la concentración apropiada para poder determinar los parámetros de optimización del método y evitar interferencias con la matriz. Para ello se pesan 4 gramos de soja y se extraen con 20 mL de metanol acuoso al 50%. Se introduce en el baño de ultrasonidos a una frecuencia de 25 KHz, al 100% de intensidad, durante 30 minutos a 60°C [50]. Una vez finalizada la extracción se deja enfriar y se centrifuga durante 10 min a 4000 rpm y 10 °C. A una alícuota de 3 mL de este extracto se le adicionan 60 mL de agua destilada y se procede a su purificación mediante extracción en fase sólida (SPE). Se acondiciona un cartucho de extracción en fase sólida OASIS HLB de 60 mg (Waters Corporation, Milford, MA, USA) adicionando 3 mL de agua, seguidos de 3 mL de metanol a un flujo de 10 mL/min. Una vez acondicionado se carga la muestra en el cartucho a un flujo de 10 mL/min y se eluye con 3 mL de una mezcla de varias isoflavonas con concentraciones conocidas a modo de dopaje. El extracto dopado, ya purificado se filtra por un filtro de jeringa de nylon de 0,2 μm de tamaño de poro (VWR, West Chester, PA, USA) para el análisis cromatográfico.

En la aplicación del método de análisis de isoflavonas con una columna *fused-core* se han utilizado muestras sólidas, como soja frita y en conserva, galletas, hamburguesas y tofu entre otras, y muestras líquidas como leches, zumos, yogures, salsas y preparados de soja cuya extracción es ligeramente diferente a la comentada anteriormente.

Para las muestras líquidas se tomaron 5 mL de muestra por duplicado y se añadieron 25 mL de metanol. Se realiza la extracción en el baño de ultrasonidos con las mismas condiciones anteriores, pero a 45 °C [39]. Una vez finalizada la extracción por ultrasonidos se le añade al extracto el corrector de volumen (flavona) y se filtró por un filtro de jeringa de nylon de 0,2 μm de tamaño de poro (VWR, West Chester, PA, USA) para el análisis cromatográfico. Para las muestras de salsa de soja se utilizaron 5 mL de muestras y 10 mL de metanol en la extracción, procediendo de igual forma que en el resto de muestras líquidas.

Para llevar a cabo la extracción en las muestras sólidas se pesaron 0,2 g, en el caso de la soja frita y soja en conserva, y 5,0 g, para el resto, realizando una primera extracción con 25 mL de metanol acuoso al 50 % en ultrasonidos con una frecuencia de 25 kHz, 100 % de intensidad, durante 20 min a 60 °C [32]. Se añadió la flavona como corrector del volumen final; se centrifugó y filtró la muestra para llevar a cabo su análisis cromatográfico.

3.3.2 Resto de muestras

Las muestras sólidas, entre las que se encuentran té verde, té blanco, té negro, té rojo, mate, café soluble y té verde con guaraná, fueron molidas en un molinillo de café hasta conseguir un polvo fino y homogéneo, al igual que se hizo con las muestras de soja y proteína de soja.

Para la extracción de las muestras sólidas se pesaron aproximadamente 0,5 g de muestra, por duplicado, y se realizan tres extracciones secuenciales por ultrasonidos; primero se extraen con 15 mL de metanol acuoso al 50%, luego con 15 mL de metanol acuoso al 75%, y finalmente con 15 mL de metanol puro. Las muestras junto con el disolvente de extracción se introducen en el baño de ultrasonidos a una frecuencia de 25 KHz, al 100% de intensidad, durante 20 minutos a 60°C [50]. Después de cada paso de la extracción la muestra se centrifuga durante 10 min a 4000 rpm y 10 °C, se recoge el sobrenadante y el sólido se somete al siguiente paso de extracción. Después de la última extracción se combinan todos los sobrenadantes y se enrasa a 100 mL con agua. Finalmente, el extracto se filtra por un filtro de jeringa de nylon de 0,2 µm de tamaño de poro (VWR, West Chester, PA, USA) para su análisis cromatográfico.

Las muestras líquidas (refresco y bebida energética) se desgasifican en el baño de ultrasonidos durante 10 minutos y se filtran por un filtro de jeringa de nylon de 0,2 µm de tamaño de poro para el análisis cromatográfico.

3.4 ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO

3.4.1 Análisis cromatográfico de las isoflavonas

Para el análisis cromatográfico de las isoflavonas de soja se utilizó el cromatógrafo de líquidos con detección UV (DAD). Se utilizaron tres columnas cromatográficas distintas:

- Columna particulada convencional C18 (**CPC**): Xbridge™ C18, 3,5 µm de tamaño de poro, dimensiones de 150x4,6 mm (Waters Corporation, Milford, MA, USA).
- Columna monolítica (**CM**): Chromolith® Performance RP-18 *endcapped*, dimensiones de 100x3 mm (Merck, Darmstadt, Alemania).
- Columna de partículas recubiertas, *fused-core* (**CPR**): Kinetex™ C18, 2,6 µm de tamaño de poro, 100 Å, dimensiones de 100x4,6 mm (Phenomenex, Torrance, California, USA).

La absorbancia para la detección fue monitorizada entre 200 y 400 nm. El volumen de inyección se fijó en 10 µL. El software utilizado para el control del equipo y la recogida de datos fue Empower 2 versión 6.10.01.00.

Para determinar las condiciones cromatográficas óptimas para cada una de las columnas, excepto en el estudio individual de la columna monolítica (apartado 4.2)), se preparó una mezcla estándar, a partir de los patrones comerciales, de las 12 isoflavonas objeto de estudio con las concentraciones que se indican en la *tabla 55*.

Tabla 55. Concentración de las isoflavonas estudiadas en la mezcla estándar utilizada en el desarrollo de métodos cromatográficos.

Isoflavona	Concentración mg/L
Di	7,96
Gly	8,01
Gi	8,65
MDi	6,25
MGly	6,81
ADi	7,96
AGly	17,59
MGi	4,87
De	12,57
Gle	11,64
AGi	6,97
Ge	4,86

Esta mezcla estándar se utilizó también para determinar los parámetros cromatográficos óptimos para cada uno de los métodos desarrollados.

En el caso concreto de la optimización de los métodos cromatográficos rápidos con una columna monolítica (apartado 4.2) no se utilizó esta mezcla de patrones sino dos muestras dopadas con los patrones de isoflavonas (apartado 3.3.1) debido a que la muestra de soja disponible para el estudio no poseía en su perfil todas las isoflavonas de interés en el estudio o no se encontraban en una concentración suficiente para evitar posibles errores de detección por los interferentes de la matriz.

Se utilizaron a lo largo del estudio dos tipos de muestra dopadas, ya que se comenzó con una primera (muestra dopada 1), en la que se aumentaba la concentración de la mayoría de las isoflavonas, menos daidzina, glicitina y malonil genistina que se encontraban en el extracto inicial en una concentración adecuada. Una vez agotada esta primera muestra se preparó una segunda muestra dopada en la que tampoco se aumentaba la concentración de los derivados maloniles de la daidzina y glicitina, además de las que no se aumentaban en la primera, ya que se comprobó a lo largo del estudio que su concentración en el extracto inicial era suficiente para su detección. Las adiciones de patrón y las concentraciones finales de las muestras se muestran en la *tabla 56*.

Tabla 56. Concentración de las isoflavonas estudiadas en las muestras dopadas usadas para la obtención de métodos rápidos de análisis cromatográfico utilizando una columna monolítica.

Isoflavona	Concentración muestra de soja inicial	Concentración final de la muestra dopada 1	Concentración final de la muestra dopada 2
	µg/g	µg/g	µg/g
Di	210	210	210
Gly	31,2	52,1	52,1
Gi	257	257	257
MDi	141	227	141
MGly	27,3	54,7	27,3
ADi	0,00	47,4	47,4
AGly	0,00	47,4	47,4
MGi	231	231	231
De	29,4	50,6	50,6
Gle	0,00	54,7	54,7
AGi	17,4	64,8	64,8
Ge	15,4	73,4	73,4

Se realizó un estudio de la influencia del disolvente de la muestra con cada uno de los métodos desarrollados durante la comparación de fases estacionarias. Para ello, se redisolvió el extracto estandarizado de proteína de soja en distintos disolventes (ver apartado 3.3.1).

Para hacer el estudio de reproducibilidad con cada uno de los métodos se utilizó la muestra de proteína de soja, que contiene las 12 isoflavonas objeto de estudio.

La identificación de las isoflavonas fue llevada a cabo comparando los tiempos de retención y los espectros ultravioleta de cada uno de los compuestos con los correspondientes a los patrones individuales de cada una de las isoflavonas inyectadas con el mismo método y en las mismas condiciones.

La cuantificación por cada uno de los métodos desarrollados se realizó mediante las áreas obtenidas para cada pico cromatográfico a 254 nm, utilizando el método del patrón externo. La curva de calibrado para cada isoflavona se realizó con 7 puntos representando la concentración frente al área. Las ecuaciones de regresión y coeficientes de correlación (R^2) se calcularon usando el software Microsoft Excel 2007, y se muestran en el apartado correspondiente.

Los límites de detección y cuantificación fueron determinados considerando el valor de 3 y 10 veces la desviación estándar del blanco, obtenido a partir de blancos

de muestra (n=10), dividido por la pendiente de la curva de calibrado para cada una de las isoflavonas [53].

3.4.2 Análisis cromatográfico de otros compuestos fenólicos

La columna utilizada para el análisis simultáneo de veinte compuestos entre ellos compuestos fenólicos y alcaloides es la columna de partículas recubiertas (**CPR**), Kinetex™ C18, 2,6 µm de tamaño de poro, 100 Å, dimensiones de 100x4,6 mm (Phenomenex, Torrance, California, USA).

El método fue desarrollado variando distintas condiciones cromatográficas tales como los disolventes utilizados como fase móvil, las cantidades de ácido añadidas a la fase móvil, temperaturas, flujos, gradientes de la fase móvil y tiempo de re-equilibrado.

La absorbancia para la detección UV fue monitorizada entre 200 y 400 nm. Para la detección por fluorescencia se utilizaron como longitudes de onda de excitación y de emisión 280 y 340 nm, respectivamente. En la *tabla 57* se muestra la longitud de onda usada para la detección de cada uno de los compuestos.

Tabla 57. Concentración y longitud de onda de detección para los compuestos estudiados en la mezcla estándar utilizada para el desarrollo de distintos métodos cromatográficos.

Compuesto	Detección nm	Concentración mg/L
GalAc	270	8,80
GC	270	13,4
PrtAc	260	10,4
EGC	270	15,7
CAT	270 y Fluorescencia	10,2
ChIAc	320	9,79
Caf	270	9,02
CafAc	320	10,1
EC	270 y Fluorescencia	14,5
EGCG	270	9,16
GCG	270	9,39
CouAc	320	10,4
ECG	270	12,7
MyrR	260	29,1
QueR	260	21,2
QueG	260	8,43
LutG	260	9,32
KpfR	260	9,23
KpfG	260	13,1
ApiG	260	5,57

El volumen de inyección se fijó en 10 μL . La temperatura de la columna fue de 55 $^{\circ}\text{C}$ y el flujo de 2,2 mL/min. El tiempo de equilibrado entre inyecciones fue de 3 minutos [54]. El software utilizado para el control del equipo y la recogida de datos fue Empower 2 versión 6.10.01.00.

En este caso para determinar los parámetros cromatográficos y establecer la reproducibilidad del método se preparó una mezcla estándar de los 20 compuestos objeto de análisis con las concentraciones que se indican en la *tabla 57*.

La identificación de los compuestos estudiados en las muestras fue llevada a cabo comparando los tiempos de retención y los espectros ultravioleta de cada uno de los compuestos con los correspondientes a los patrones individuales de cada una de las isoflavonas inyectadas con el mismo método y en las mismas condiciones. Los espectros de los 20 compuestos analizados se muestran en la *figura 81*.

La cuantificación se realizó por medio de las áreas obtenidas para cada pico cromatográfico a la longitud de onda de detección utilizada (*tabla 57*), utilizando el método del patrón externo. La curva de calibrado para cada compuesto se realizó con 7 puntos representando la concentración frente al área. Las ecuaciones de regresión y coeficientes de correlación (R^2) se calcularon usando el software Microsoft Excel 2007, y se muestran en el apartado correspondiente.

Los límites de detección y cuantificación fueron determinados considerando el valor de 3 y 10 veces la desviación estándar del blanco, obtenido a partir de blancos de muestra ($n=10$), dividido por la pendiente de la curva de calibrado para cada una de las isoflavonas [53].

Para el estudio de distribución de las muestras analizadas se han utilizado cálculos quimiométricos, como es el análisis de componentes principales (PCA). Para llevar a cabo este estudio quimiométrico diversas matrices de datos se formaron para diferenciar las bebidas analizadas en términos de su composición química. El programa estadístico The Unscrambler 7.5 (Camo Asa, Oslo, Norway) ha sido utilizado para el análisis de componentes principales.

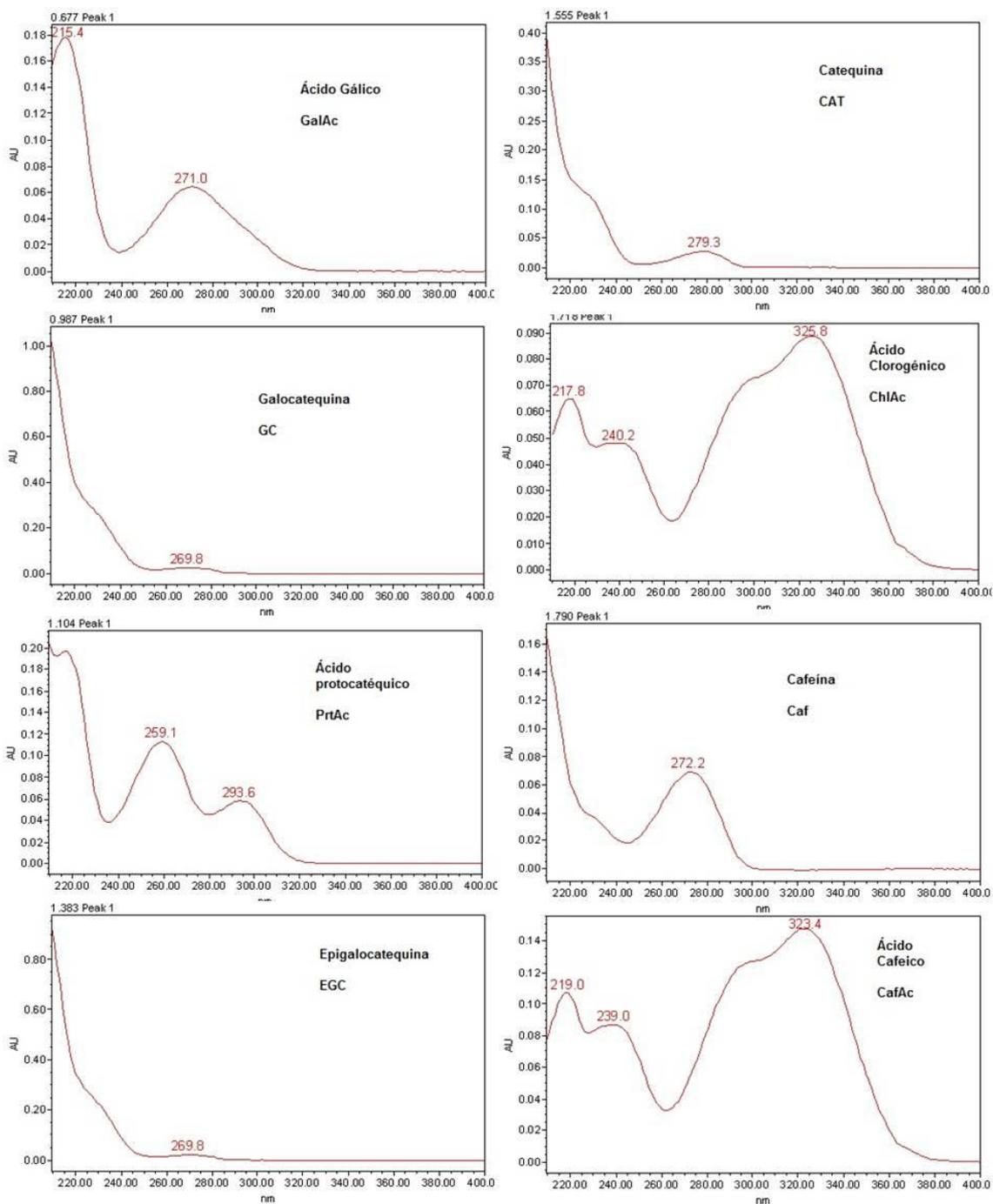


Figura 81. Espectros UV de los 20 compuestos determinados en este estudio.

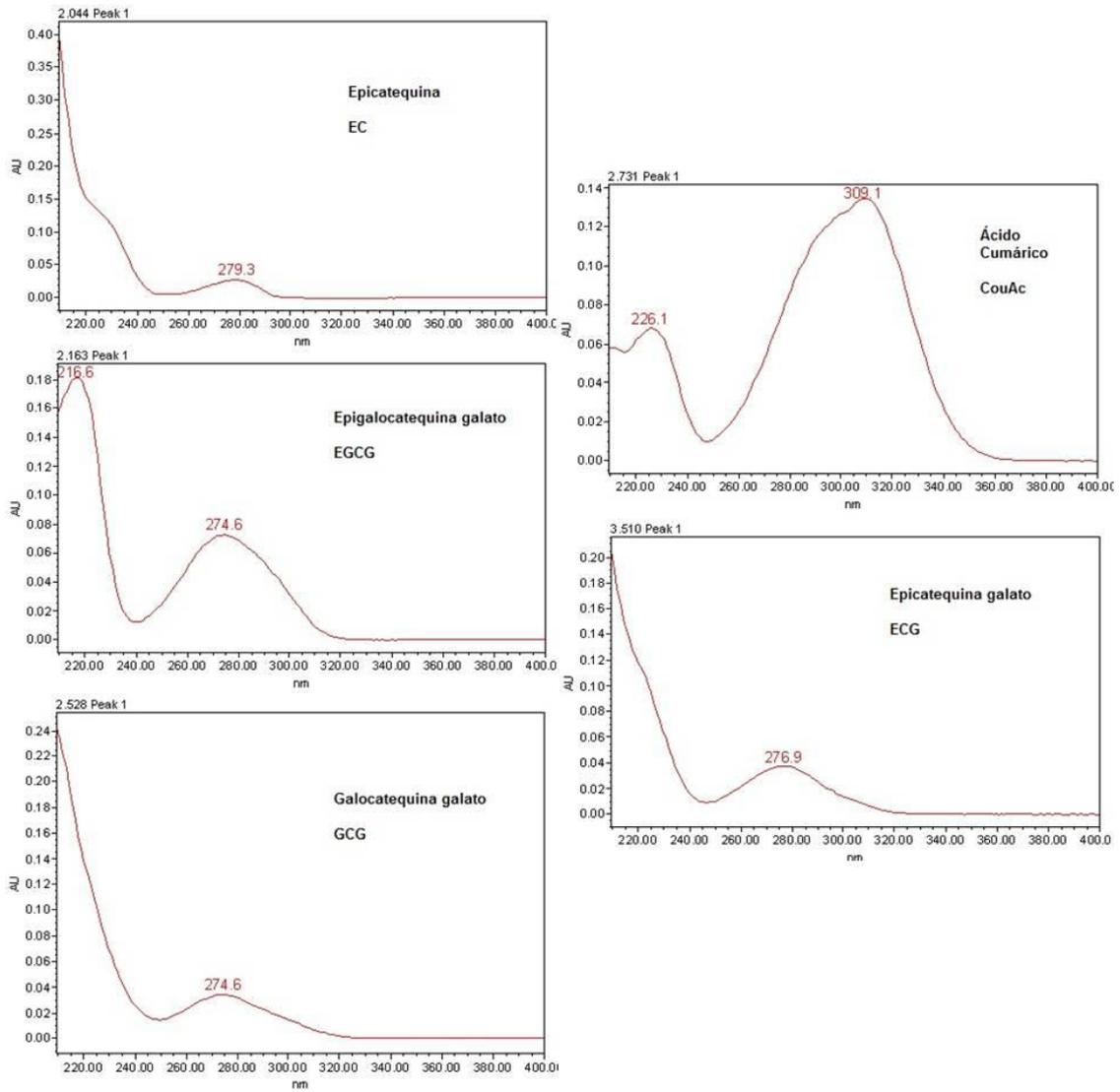


Figura 81 (cont.). Espectros UV de los 20 compuestos determinados en este estudio.

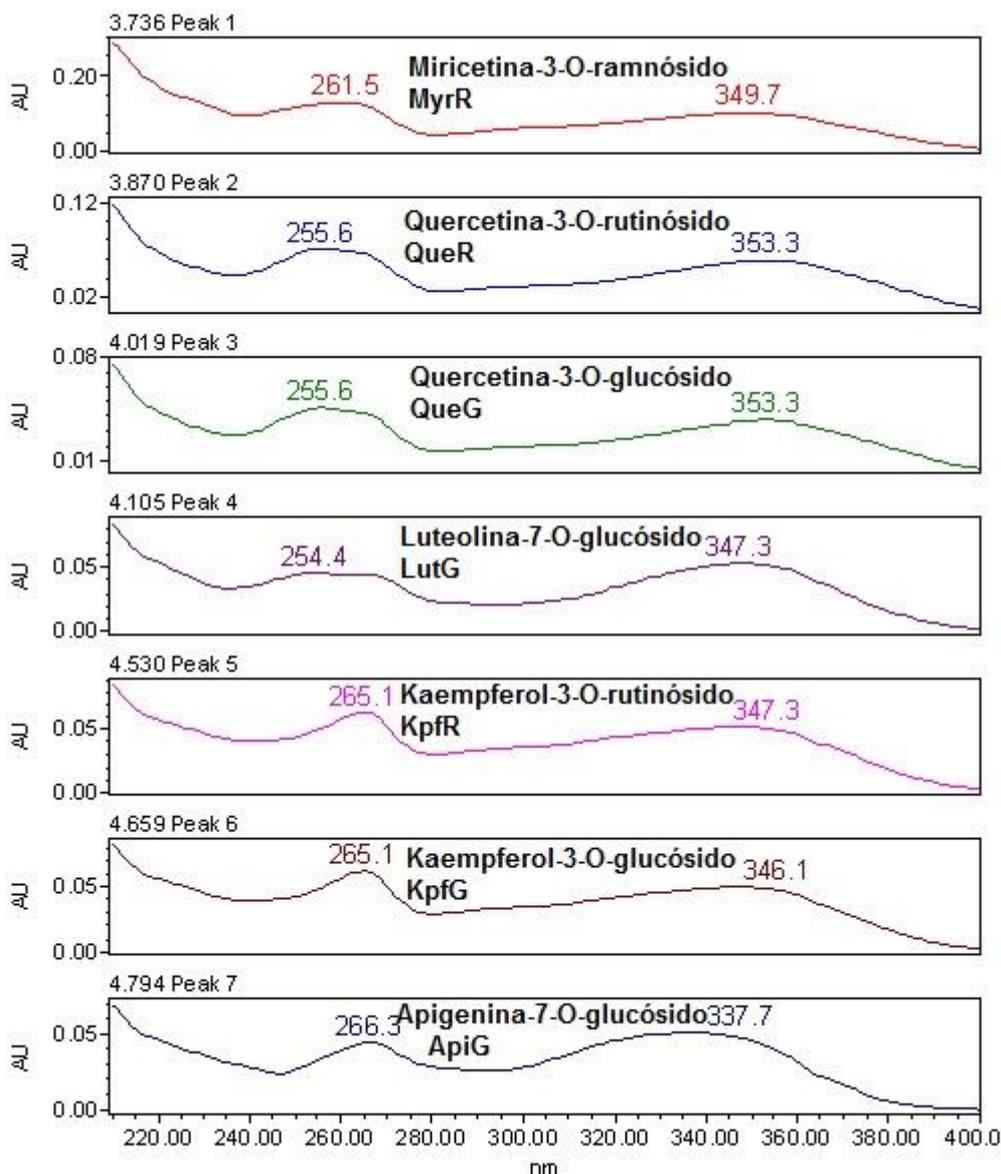


Figura 81 (cont.). Espectros UV de los 20 compuestos determinados en este estudio.

3.5 ESTUDIO DE LA EFICACIA CROMATOGRÁFICA

La eficacia de las columnas cromatográficas utilizadas se evalúa en base al tiempo de retención, la anchura de pico, el número de platos teóricos (N), el factor de retención (K'), el factor de selectividad (α), la resolución (Rs) y la asimetría de pico (A). Todos estos datos fueron calculados usando las definiciones de la Farmacopea Europea (EP), siendo éstas las siguientes:

- Resolución (Rs):

$$Rs = 2 \cdot \frac{t_{next} - t_r}{w_{50\% next} + w_{50\% r}}$$

Siendo t_{next} el tiempo de retención del pico contiguo al analizado, t_r el tiempo de retención del pico analizado, $w_{50\% \text{ next}}$ es el ancho de pico a mitad de altura del pico contiguo (el 50 %) y $w_{50\% r}$ es el ancho de pico a mitad de altura del pico analizado. (Figura 82)

- Factor de retención (K'):

$$K' = \frac{t_r - t_0}{t_0}$$

Siendo t_r el tiempo de retención del pico analizado y t_0 el tiempo de retención del pico no retenido, o tiempo muerto.

- Factor de selectividad (α):

$$\alpha = \frac{K'_2}{K'_1}$$

Siendo K'_2 y K'_1 el factor de retención para el pico contiguo al analizado y el del pico analizado respectivamente.

- Asimetría de pico (A):

$$A = \frac{W_{R\ 5\%} + W_{L\ 5\%}}{2 \cdot W_{L\ 5\%}}$$

Siendo $W_{R\ 5\%}$ y $W_{L\ 5\%}$ la anchura al 5 % de altura del pico analizado a la derecha y a la izquierda del centro del mismo respectivamente. Un pico simétrico posee una asimetría de pico de valor la unidad.

- Número de platos teóricos (N):

$$N = 5,54 \cdot \left(\frac{t_r}{w_{50\%}} \right)^2$$

Siendo $w_{50\%}$ la anchura del pico a la mitad de altura.

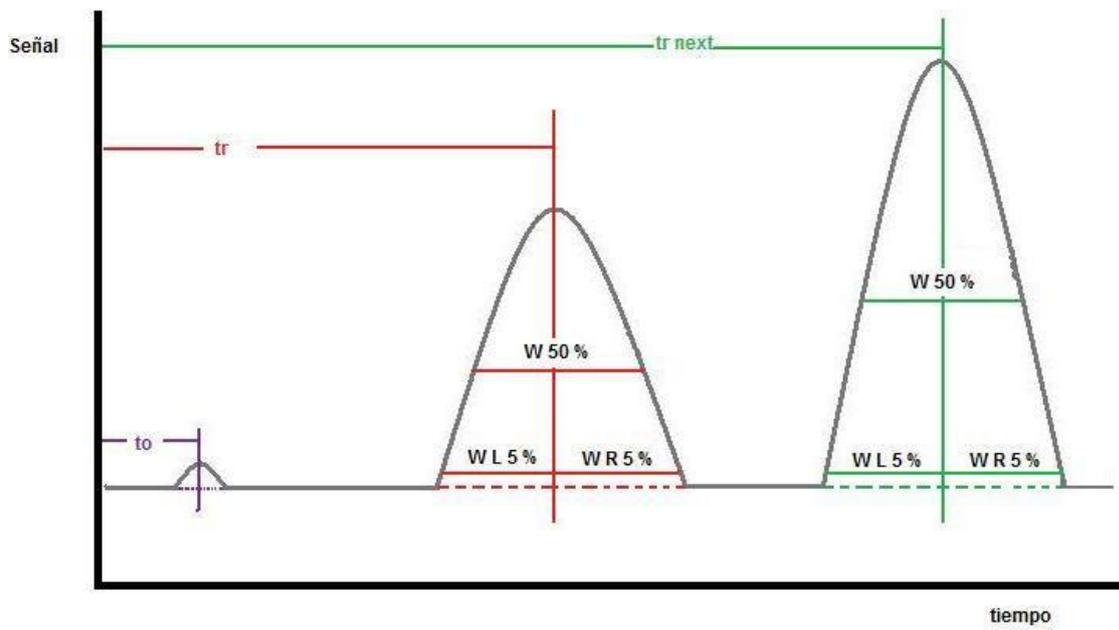


Figura 82. Representación de los datos usados para el cálculo de los parámetros cromatográficos.

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 COMPARACIÓN DE DIFERENTES TIPOS DE FASES ESTACIONARIAS PARA EL ANÁLISIS DE ISOFLAVONAS DE SOJA MEDIANTE HPLC

4.1.1 Métodos cromatográficos iniciales

Para comparar las tres fases estacionarias evaluadas se trabaja utilizando dos métodos cromatográficos desarrollados previamente, cada uno con un tipo de fase móvil, y así evaluar las tres fases estacionarias en igualdad de condiciones.

Para la comparación de las tres fases estacionarias utilizando como fase móvil metanol se parte de un método de rutina usado en el laboratorio con una columna particulada convencional, basado en el método desarrollado por Rostagno y col. 2004 [55], al que se ajustó el gradiente para mejorar la separación de las 12 isoflavonas.

Utilizando como fase móvil acetonitrilo se parte de un método desarrollado por Zhang y col. 2004 [56]. Se realizan las modificaciones de flujo y gradiente necesarias para obtener una mejora en la separación. Todas estas optimizaciones se realizan con la mezcla estándar cuyas concentraciones se muestran en la *tabla 55*.

En principio, los métodos desarrollados con la columna particulada convencional se traspasan a las otras dos columnas objeto de estudio. Para adecuar los métodos a las nuevas columnas se tienen en cuenta tanto la longitud, la columna convencional particulada mide 150 mm de longitud, mientras que la monolítica y la de partículas recubiertas, miden 100 mm, como el resto de características de la columna.

El tiempo de re-equilibrado, que es el tiempo necesario para que las condiciones iniciales del método sean estables antes de inyectar la siguiente muestra, se fijó en 20 minutos para todos los métodos desarrollados.

Los métodos cromatográficos desarrollados para las 3 fases estacionarias distintas usando las distintas fases móviles son los que se muestran en la *tabla 58*.

Para establecer los parámetros cromatográficos óptimos en cada uno de los métodos y evaluar la eficacia en la separación, se inyectó la mezcla estándar de las 12 isoflavonas. Los cromatogramas obtenidos mediante la inyección de esta mezcla estándar con cada uno de los métodos y con cada una de las columnas son los que se muestran en la *figura 83*.

Tabla 58. Métodos cromatográficos con fase móvil acetronitrilo (A) y fase móvil metanol (B) desarrollados para la comparación de las tres fases estacionarias estudiadas: columna particulada convencional (CPC), columna monolítica (CM) y columna particulada recubierta (CPR).

PARTICULADA CONVENCIONAL (CPC)			
Método Acetonitrilo (A)			
1,2 mL/min			
25 °C			
Flujo			
Temperatura			
Fases móviles	Fase A	Agua 1% ácido acético	
	Fase B	Acetonitrilo	
	Tiempo (min)	% B	
	0,00	8	
	3,50	15	
	12,00	17	
	23,00	24	
Gradiente	30,00	50	
	33,00	100	
	38,00	100	
	40,00	8	
Método Metanol (B)			
0,8 mL/min			
30 °C			
Flujo			
Temperatura			
Fases móviles	Fase A	Agua 1% ácido acético	
	Fase B	Metanol 0,1% ácido acético	
	Tiempo (min)	% B	
	0,00	0	
	10,00	30	
	12,00	30	
	20,00	33	
	35,00	33	
	38,75	35	
	50,00	50	
	52,00	100	
	57,00	100	
	59,00	0	
Gradiente			

MONOLÍTICA (CM) Y PARTICULADA RECUBIERTA (CPR)			
Método Acetonitrilo (A)			
1,2 mL/min			
25 °C			
Flujo			
Temperatura			
Fases móviles	Fase A	Agua 1% ácido acético	
	Fase B	Acetonitrilo	
	Tiempo (min)	% B	
	0,00	8	
	2,33	15	
	8,00	17	
	15,33	24	
Gradiente	20,00	50	
	23,00	100	
	28,00	100	
	30,00	8	
Método Metanol (B)			
0,8 mL/min			
30 °C			
Flujo			
Temperatura			
Fases móviles	Fase A	Agua 1% ácido acético	
	Fase B	Metanol 0,1% ácido acético	
	Tiempo (min)	% B	
	0,00	0	
	6,67	30	
	10,00	30	
	13,33	33	
	23,33	33	
	25,83	35	
	33,33	50	
	35,00	100	
	40,00	100	
	42,00	0	
Gradiente			

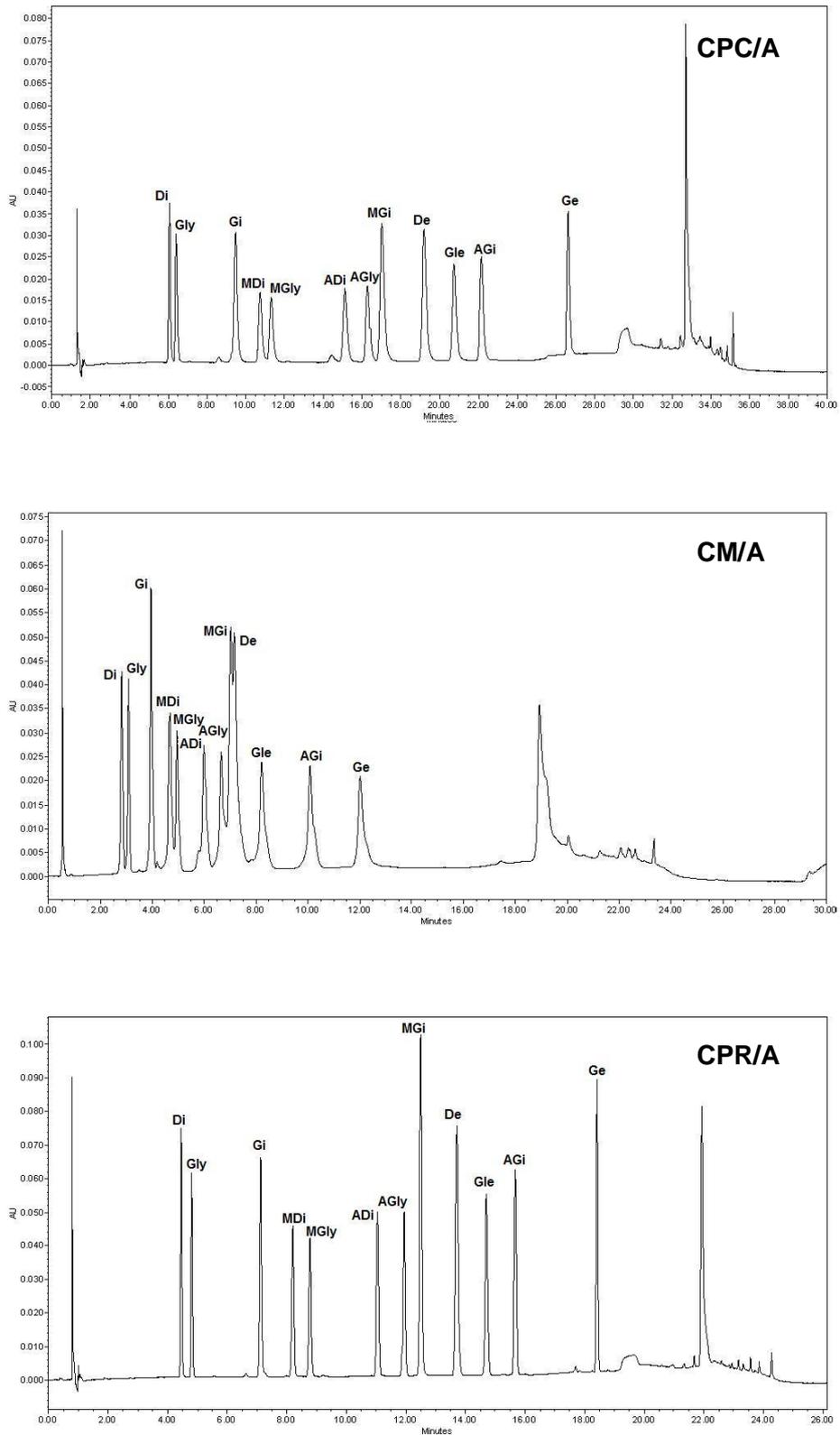


Figura 83. Cromatogramas de la mezcla patrón obtenidos con cada método cromatográfico desarrollado para cada columna. CPC/A: columna particulada convencional usando acetonitrilo como fase móvil; CM/A: columna monolítica usando acetonitrilo como fase móvil; CPR/A: columna de partículas recubiertas usando acetonitrilo como fase móvil.

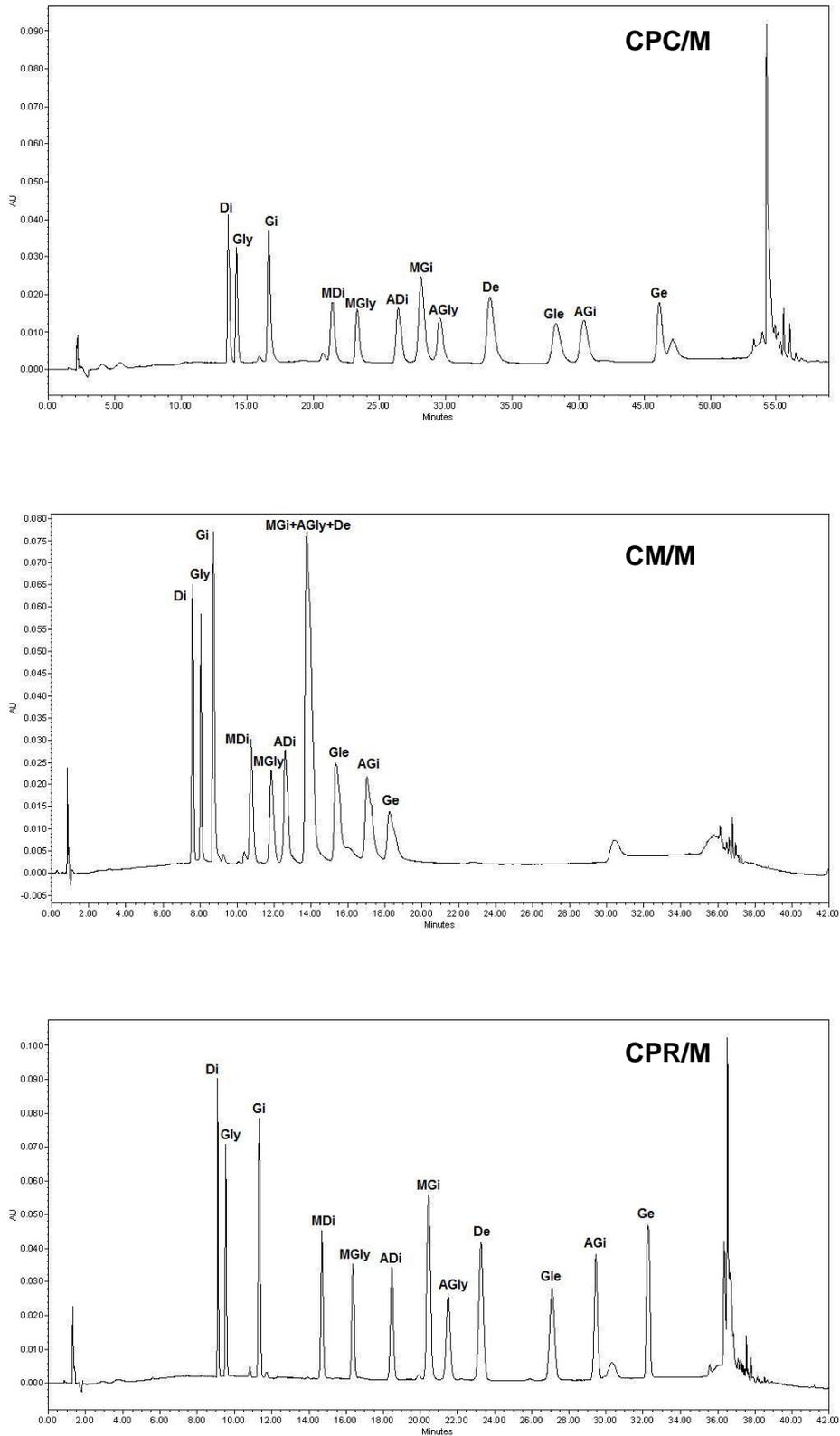


Figura 83 (cont). Cromatogramas de la mezcla patrón obtenidos con cada método cromatográfico desarrollado para cada columna. CPC/M: columna particulada convencional usando metanol como fase móvil; CM/M: columna monolítica usando metanol como fase móvil; CRP/M: columna de partículas recubiertas usando metanol como fase móvil.

Durante la optimización de los gradientes de elución para cada una de las fases móviles se observó que las isoflavonas que eluían en el centro del cromatograma, ADi, AGly, MG_i y De, son las más difíciles de separar, seguido de los dos primeros picos, Di y Gly, resultados que concuerdan con los encontrados por Rostagno y col. 2007 [39] en un primer estudio de separación de estas isoflavonas usando columnas monolíticas, donde ya se sugirió que la separación de estos compuestos es crítico para conseguir separaciones rápidas.

Para determinar el efecto del disolvente de la muestra en el desarrollo cromatográfico se utilizó el extracto estandarizado de proteína de soja (apartado 3.3.1) disuelto en distintos disolventes; todas las disoluciones se prepararon por duplicado.

Para estudiar la reproducibilidad del método cromatográfico se preparó una muestra de proteína de soja (5 réplicas) tal y como se indica en el apartado 3.3.1 de este capítulo.

4.1.2 Presión de trabajo

La presión de trabajo generada por las columnas de cromatografía es un parámetro crítico puesto que determina el tiempo de análisis al limitar el flujo de la fase móvil que puede ser utilizado, lo que puede llegar a impedir el desarrollo de métodos cromatográficos más rápidos.

La presión de trabajo se ve afectada por varios factores tales como la longitud de la columna, el tamaño de partícula, la temperatura, la composición de la fase móvil y el flujo de trabajo. En nuestro estudio de comparación se seleccionaron dos de las columnas que, por la presión de trabajo que generaban (según los estudios previos), permitían conseguir separaciones más rápidas utilizando sistemas HPLC convencionales. Durante el estudio realizado se evaluó cómo influye en la presión de trabajo generada, en cada una de las tres fases estacionarias estudiadas, la composición de la fase móvil, la velocidad de flujo y la temperatura.

Como era de esperar, uno de los aspectos más importantes es la influencia de la fase móvil, en cada una de las fases estacionarias, en la presión. Se ha estudiado esta influencia a dos temperaturas, 25°C y 35°C, como se puede observar en la *figura 84 A y B*. La presión máxima se ha fijado en 2500 psi.

Se observa que a mayor temperatura se reduce la presión de trabajo, permitiendo aumentar el flujo de la fase móvil, independientemente de la fase estacionaria utilizada, lo que se debe a que una temperatura de trabajo más elevada reduce la viscosidad de la fase móvil, generando menor presión en el sistema cromatográfico. En este caso, incrementando la temperatura de 25°C a 35°C se consigue una reducción de presión media de un 8% y un 10%, según se utilice como fase móvil metanol o acetonitrilo, respectivamente. Además, para un mismo flujo, el

acetonitrilo genera menor presión de trabajo que el metanol, lo cual permite mayores aumentos de flujo y, por consiguiente, permite acortar los tiempos de análisis.

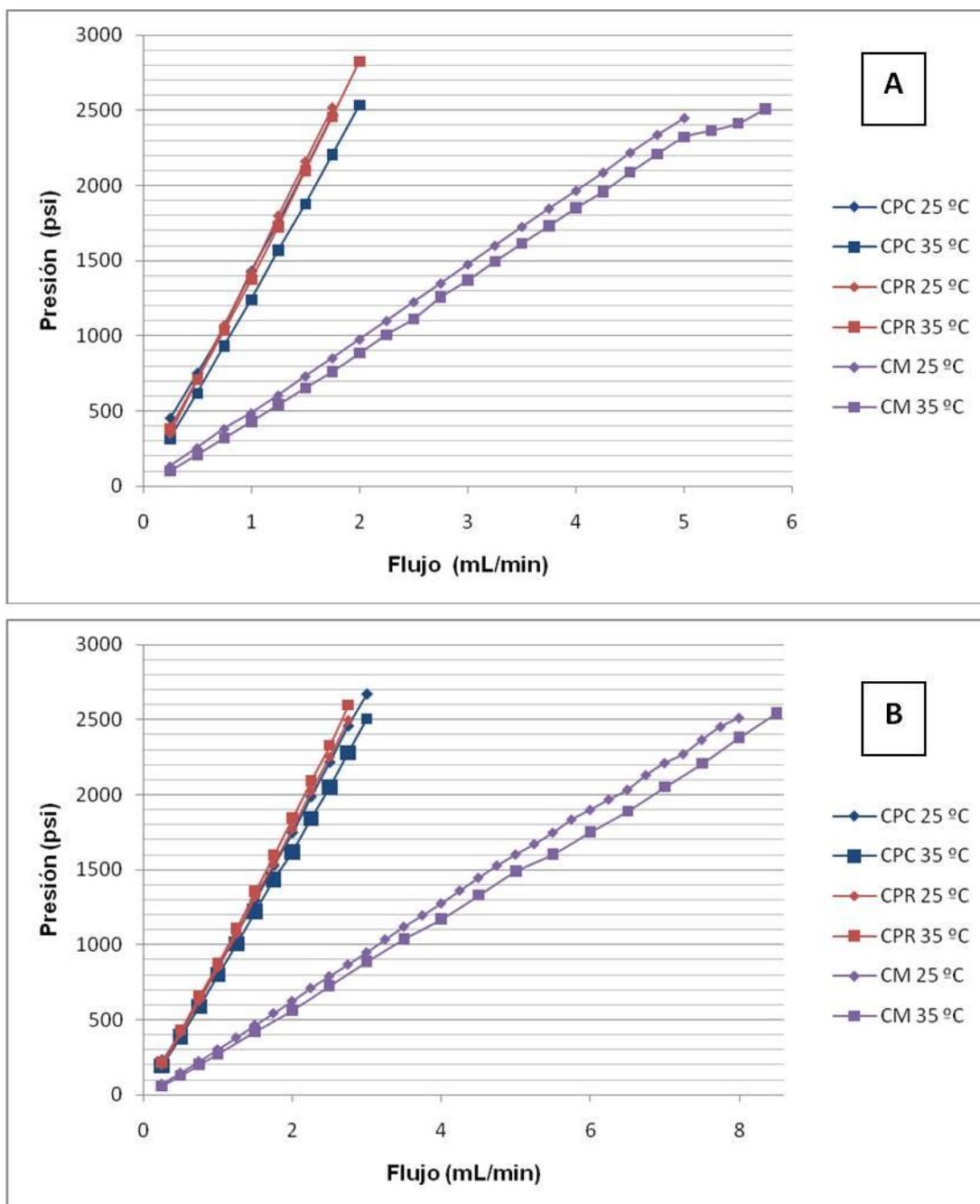


Figura 84. Presión generada por las diferentes columnas ensayadas a diferentes temperaturas utilizando metanol (A) y acetonitrilo (B) como disolventes de la fase móvil. CPC: columna particulada convencional; CPR: columna de partículas recubiertas; CM: columna monolítica.

Comparando las columnas, con ambos disolventes, la columna monolítica proporciona la menor presión, aunque también es la columna que menos presión soporta, siendo su límite de trabajo de 3000 psi, frente a los 4000 psi de la columna particulada convencional o los 8700 psi de la columna de partículas recubiertas. Pero

dentro de ese límite se pueden alcanzar flujos trabajando con 100 % de acetonitrilo de hasta 8,5 mL/min, y de 6,0 mL/min usando 100% de metanol como fase móvil. Por tanto, utilizando la columna monolítica (CM) se puede trabajar con flujos tres veces superiores a los que permiten trabajar las columnas particuladas (CPC y CPR).

La columna fabricada con partículas recubiertas como fase estacionaria presenta presiones similares a la columna convencional particulada, pero hay que tener en cuenta que la columna con partículas recubiertas posee un tamaño de partícula de 2,6 μm frente a los 3,5 μm de la convencional. Por lo tanto, la columna de partículas recubiertas con igual tamaño de partícula que la convencional proporcionaría menos resistencia al flujo, generando una presión más baja. Además, debido al compactamiento de la columna, la de partículas recubiertas soporta mayores presiones que la convencional, y los equipos de HPLC pueden soportar 5000 psi de presión, por lo que se pueden utilizar flujos más elevados con la columna de partículas recubiertas que con la convencional. Lo cual indica que la tecnología de partículas *fused-core* supone un importante avance en la fabricación de materiales utilizados como fase estacionaria que permiten el desarrollo de métodos cromatográficos más rápidos.

Todo lo expuesto hasta el momento se ha llevado a cabo utilizando como fase móvil el 100% de disolvente orgánico sin embargo, el uso de gradientes es necesario para el análisis de la mayoría de los compuestos. Utilizando gradiente, la composición de la fase móvil varía en el tiempo, lo que puede dar lugar a incrementos en la presión de trabajo y exceder las limitaciones de presión soportadas por la columna, aspecto que ha de ser tenido en cuenta especialmente en las columnas monolíticas cuyo límite de presión de trabajo es el más bajo de todas las fases estacionarias evaluadas en este trabajo. Por lo tanto se estudió el comportamiento de la presión utilizando diferentes porcentajes de disolvente orgánico (de 0 a 100% de disolvente orgánico) en la fase móvil a flujo constante (un flujo de 2 mL/min para la columna monolítica y de 0,8 mL/min para las columnas particuladas), utilizando metanol y acetonitrilo como disolventes orgánicos (*figura 85 A y B*).

En general, los perfiles de presión generados por el cambio de composición de la fase móvil son similares para todas las columnas estudiadas, sin embargo, el rango de presiones alcanzadas depende de cada columna. Se obtienen presiones más altas cuando la fase móvil contiene un 20% de acetonitrilo o un 40% de metanol, independientemente de la fase estacionaria utilizada. Sin embargo se observó que el metanol utilizado como fase móvil proporciona mayores diferencias de presión entre un porcentaje de metanol y otro, en cambio el acetonitrilo proporciona perfiles de presión más planos, con menores variaciones de presión con el cambio de porcentaje de acetonitrilo en la fase móvil.

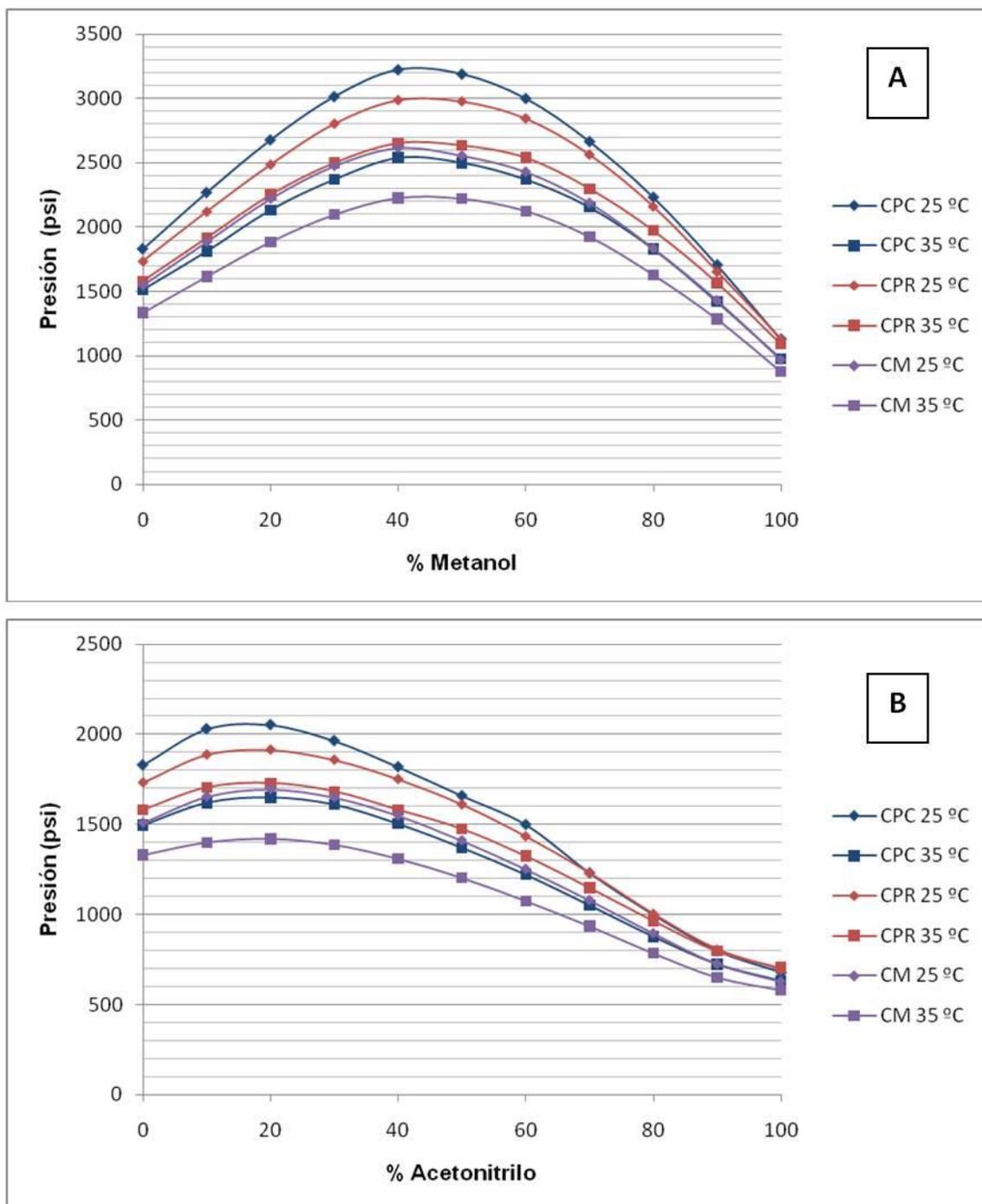


Figura 85. Comportamiento de cada columna utilizando diferentes porcentajes de disolvente orgánico (A: metanol; B: acetonitrilo) en la fase móvil, a distintas temperaturas. CPC: columna particulada convencional; CM: columna monolítica; CPR: columna de partículas recubiertas.

La columna monolítica, que trabaja a 2 mL/min en este estudio, es la que menor presión proporciona. En cambio las otras dos columnas que trabajan a 0,8 mL/min tienen un comportamiento parecido entre ellas.

Dejando a un lado los aspectos económicos y ambientales asociados al uso de acetonitrilo como disolvente, la menor presión de trabajo y los perfiles de variación

más planos obtenidos con las mezclas acetonitrilo/agua son los aspectos más deseables a la hora de elegir una fase móvil para el desarrollo de métodos rápidos de análisis.

4.1.3 Columna particulada convencional (CPC)

Los parámetros cromatográficos obtenidos con los dos métodos desarrollados, usando acetonitrilo y metanol como fase móvil y la columna de partículas convencional (CPC) (*tabla 58 y figura 83-CPC/A y CPC/M*), son los que se presentan en la *tabla 59*.

Lo primero que se observa es que el orden de elución es distinto cuando se utiliza metanol o acetonitrilo como fase móvil, siendo el orden de elución para el método que utiliza metanol como fase móvil, primero MG_i seguido de AG_{ly}.

En el caso del método que utiliza metanol como fase móvil se consigue la separación de las 12 isoflavonas con una buena resolución en menos de 46 minutos, siendo el tiempo total de análisis de 59 minutos, además de 20 minutos de tiempo de re-equilibrado. Utilizando como fase móvil acetonitrilo se consigue acortar el tiempo de análisis a menos de 27 minutos, consiguiendo una buena resolución de todos los picos, siendo la resolución media incluso superior a la obtenida utilizando metanol como fase móvil. El tiempo total de análisis usando como fase móvil acetonitrilo es de 40 minutos, más 20 minutos de tiempo de re-equilibrado. Utilizando acetonitrilo como fase móvil se consigue la separación de las 12 isoflavonas de soja estudiadas un 24 % más rápido que usando metanol como fase móvil.

La reproducibilidad para el tiempo de retención es menor del 2 % para ambos métodos, siendo menor en el método donde se utiliza metanol como fase móvil, pero siendo aceptable también para el método que utiliza acetonitrilo como fase móvil. La anchura de pico es mayor cuando se utiliza metanol que en el caso del acetonitrilo, por lo que este último disolvente proporciona picos más estrechos. Además el acetonitrilo proporciona mayor valor medio de platos teóricos por metro de columna, sin embargo analizando los valores individualmente para cada isoflavona no se encuentra una tendencia clara, ya que en algunos casos ese valor es menor para el método de metanol, sobre todo en las isoflavonas que eluyen antes, como son los glucósidos (Di, Gly y Gi). Sin embargo, en ambos casos se obtienen picos relativamente asimétricos, con valores de asimetría mayores de uno. No obstante, los picos están bien resueltos utilizando ambos métodos, siendo los valores de resolución mayores de 1,5 para todas las isoflavonas estudiadas.

Tabla 59. Parámetros cromatográficos obtenidos con la columna particulada convencional (CPC) con cada uno de los métodos cromatográfico desarrollados. RSD: desviación estándar relativa en %; tr: tiempo de retención.

METANOL								
Isoflavona	Tiempo de retención	RSD	Anchura de pico	Platos teóricos/metro	Asimetría	Factor de Retención	Factor de Selectividad	Resolución
	(minutos)	tr	(segundos)	(N/m)	A	K'	α	Rs
Di	13,59	0,21	38,44	87,6	1,42	8,51		
Gly	14,23	0,30	58,80	82,0	1,52	8,96	1,05	2,47
Gi	16,68	0,36	84,56	52,8	1,50	10,7	1,19	7,38
MDi	21,55	0,42	90,14	51,4	1,50	14,1	1,32	10,7
MGly	23,49	0,38	58,3	42,3	1,38	15,4	1,10	3,40
ADi	26,49	0,39	108,44	47,4	1,28	17,6	1,14	4,70
MGi	28,13	0,40	89,76	36,4	1,47	18,7	1,07	2,25
AGly	29,61	0,42	146,44	36,9	1,43	19,7	1,06	1,80
De	33,24	0,39	153,66	30,4	1,49	22,3	1,13	3,89
Gle	38,22	0,45	135,34	28,6	1,39	25,8	1,16	4,40
AGi	40,29	0,42	176,84	35,0	1,34	27,2	1,06	1,72
Ge	45,99	0,20	166,08	102	1,48	31,2	1,15	5,85
Media		0,36	108,90	52,8	1,43	18,3	1,13	4,42
ACETONITRILLO								
Isoflavona	Tiempo de retención	RSD	Anchura de pico	Platos teóricos/metro	Asimetría	Factor de Retención	Factor de Selectividad	Resolución
	(minutos)	tr	(segundos)	(N/m)	A	K'	α	Rs
Di	5,96	0,72	21,10	41,6	1,43	5,56		
Gly	6,31	0,86	33,13	46,6	1,32	5,95	1,07	2,23
Gi	9,24	1,20	57,28	28,5	1,80	9,17	1,54	12,9
MDi	10,45	1,54	34,78	31,1	1,42	10,5	1,15	3,92
MGly	10,98	1,58	36,38	33,3	1,30	11,1	1,06	1,64
ADi	14,75	1,45	41,03	40,8	1,31	15,2	1,37	10,4
AGly	15,95	1,28	43,00	56,5	1,25	16,6	1,09	3,16
MGi	16,64	1,25	59,68	49,5	1,37	17,3	1,05	1,79
De	18,84	0,99	70,93	57,6	1,38	19,7	1,14	5,29
Gle	20,41	0,85	79,18	86,7	1,29	21,5	1,09	3,91
AGi	21,81	0,75	72,33	142,6	1,24	23,0	1,07	4,08
Ge	26,42	0,29	42,18	246,8	1,05	28,1	1,22	15,3
Media		1,06	49,25	71,8	1,35	15,3	1,17	5,87

Para ambos métodos se realizó el calibrado, con respuesta lineal entre 0,1 y 50 mg/L para las 12 isoflavonas, con una curva de 6 puntos, obteniendo valores de coeficientes de regresión (R^2) mayores de 0,9820. Las curvas de calibración para cada isoflavona se muestran en la *tabla 60*.

Tabla 60. Curvas de calibración obtenidas con la columna particulada convencional (CPC) para cada isoflavona y con cada método cromatográfico desarrollado.

Isoflavona	METANOL			Isoflavona	ACETONITRILLO		
	Ordenada	Pendiente	R ²		Ordenada	Pendiente	R ²
Di	-1191	83768	0,9999	Di	1737	54115	0,9998
Gly	-13312	76653	0,9993	Gly	-4381	50059	0,9991
Gi	-78895	121027	0,9960	Gi	-22663	78185	0,9997
MDi	-1438	101108	0,9999	MDi	2097	65317	0,9998
MGLy	-15881	91447	0,9993	MGLy	-5227	59721	0,9991
ADi	-1312	92229	0,9999	ADi	1913	59581	0,9998
MGi	-94595	145112	0,9960	AGLy	-4793	54765	0,9991
AGLy	-14563	83858	0,9993	MGi	-27172	93744	0,9997
De	-8444	83975	0,9994	De	-16167	55402	0,9998
Gle	-23351	59291	0,9820	Gle	-24934	41516	0,9873
AGi	-86548	132767	0,9960	AGi	-24861	85769	0,9997
Ge	-21001	115259	0,9993	Ge	-6489	73060	1,0000

Se realizó el estudio de reproducibilidad (n=5) con una muestra de extracto de proteína; los datos obtenidos con cada uno de los métodos se muestran en la *tabla 61* y los cromatogramas denominados CPC/M en el caso del metanol () y CPC/A en el caso del acetonitrilo, se muestran en la *figura 86*.

Tabla 61. Datos de reproducibilidad en el tiempo de retención y en la concentración para los extractos de proteína de soja analizados con la CPC mediante los dos métodos estudiados. RSD: desviación estándar relativa en %.

Isoflavona	METANOL				Isoflavona	ACETONITRILLO			
	Tiempo de retención		Concentración media			Tiempo de retención		Concentración media	
	minutos	RSD*	µg/g	RSD*		minutos	RSD*	µg/g	RSD*
Di	13,79	0,69	226	0,90	Di	6,27	0,88	230	2,51
Gly	14,45	0,83	32,9	3,89	Gly	6,66	0,87	39,7	2,75
Gi	17,04	0,82	284	1,41	Gi	9,77	0,71	263	1,38
MDi	22,09	0,74	39,2	3,96	MDi	11,09	0,41	41,4	3,09
MGLy	24,86	0,38	24,8	2,12	MGLy	11,37	0,36	18,9	2,48
ADi	27,26	0,51	152	3,33	ADi	15,44	0,37	166	2,03
MGi	29,12	0,47	79,7	1,24	AGLy	16,60	0,34	21,8	2,51
AGLy	30,59	0,46	23,2	1,68	MGi	17,25	0,31	69,1	3,89
De	34,67	0,24	44,5	2,97	De	19,42	0,25	32,9	2,77
Gle	39,92	0,22	40,0	1,75	Gle	20,97	0,24	32,6	0,29
AGi	41,72	0,19	219	2,61	AGi	22,29	0,16	212	0,93
Ge	46,94	0,04	24,0	1,49	Ge	26,68	0,22	25,0	1,04
Total			1189		Total			1152	

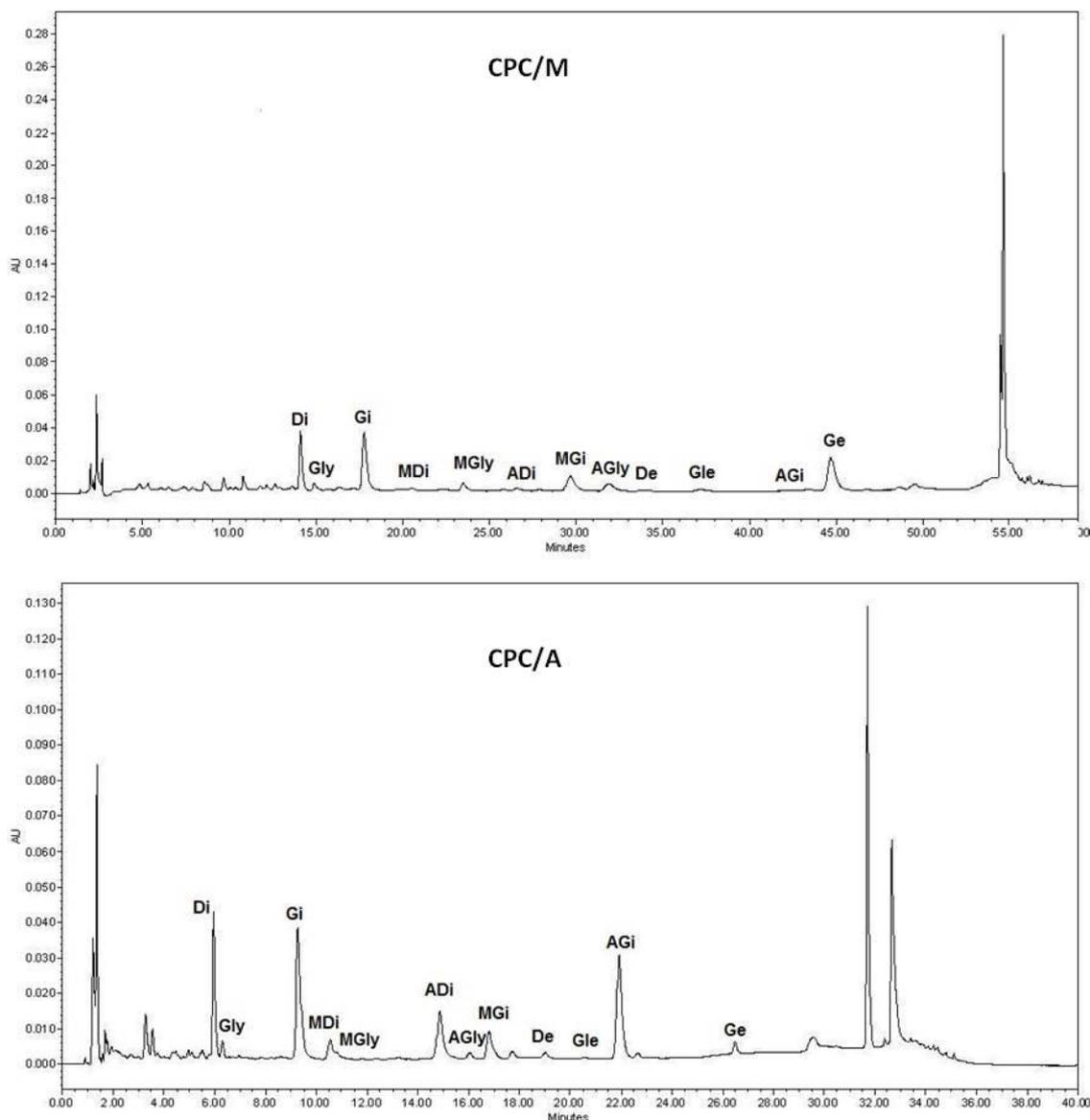


Figura 86. Cromatogramas de los extractos de proteína de soja obtenidos con la columna particulada convencional (CPC) con los dos métodos estudiados: CPC/M (metanol) y CPC/A (acetonitrilo).

La variabilidad obtenida en el tiempo de retención es inferior al 1 % para todas las isoflavonas en ambos métodos. En cuanto a la variabilidad de la concentración obtenida para algunas isoflavonas es superior al 3 %, pero si observamos los parámetros cromatográficos para esas isoflavonas, esta variabilidad corresponde a aquellas peor separadas (con menor valor de resolución), lo que unido a la asimetría de los picos, dificulta la integración de los mismos.

Teniendo en cuenta estos resultados se puede concluir que estos métodos son aceptables para el análisis de las 12 isoflavonas, aunque el tiempo de análisis continúa siendo largo, lo que hace que el número de muestras que se pueden analizar al día sea relativamente bajo.

Además la simetría de los picos en esta columna es baja, tanto en el método que utiliza metanol como en el que utiliza acetonitrilo, lo cual puede condicionar los límites de detección y cuantificación, especialmente cuando se trabaja con muestras en las que pueden aparecer interferencias, puesto que la asimetría da lugar a picos más anchos y consecuentemente, genera menor altura de pico.

4.1.4 Columna monolítica (CM)

El gradiente del método utilizado con la columna particulada convencional (CPC) se ajustó a la columna monolítica considerando el factor de la longitud de la columna, tal y como se puede observar en la *tabla 58*, sin embargo, el traspaso del método no se puede realizar de forma directa, ya que no se mantienen las condiciones de separación, aspecto que ya había sido observado van Nederkassel y col. 2003 [41]. En el caso de las 12 isoflavonas de soja estudiadas, no es posible la separación total de las mismas (*figura 83-CM/A y CM/M*), aunque con el método que utiliza acetonitrilo como disolvente se consigue una resolución pobre de los tres picos más conflictivos (AGly, MG_i, De) y su cuantificación es posible mediante la altura del pico en vez del área. Algo a tener en cuenta de estas isoflavonas poco resueltas, que son las isoflavonas que eluyen en el centro del cromatograma (AD_i, AGly, MG_i y De), es que son las isoflavonas más difíciles de separar junto con las que eluyen al principio (Di y Gly), según los estudios realizados con anterioridad con columnas monolíticas por Rostagno y col. 2007 [39], donde se sugirió que la separación de estos compuestos es crítica para conseguir separaciones cromatográficas rápidas.

A pesar de la falta de resolución, es posible evaluar los parámetros cromatográficos obtenidos utilizando la columna monolítica con ambos disolventes, fijándonos en las isoflavonas resueltas; estos parámetros se muestran en la *tabla 62*.

Tabla 62. Parámetros cromatográficos obtenidos con la columna monolítica (CM) con cada uno de los métodos cromatográficos desarrollados. n.r.: pico no resuelto; RSD: desviación estándar relativa en %; tr: tiempo de retención.

METANOL								
Isoflavona	Tiempo de retención	RSD	Anchura de pico	Platos teóricos/metro	Asimetría	Factor de Retención	Factor de Selectividad	Resolución
	(minutos)	tr	(segundos)	(N/m)	A	K'	α	Rs
Di	7,59	0,22	23,20	147,3	1,00	25,1		
Gly	8,00	0,20	21,12	192,7	1,15	26,5	1,06	3,28
Gi	8,69	0,19	60,88	174,6	1,32	28,9	1,09	5,28
MDi	10,75	0,31	51,80	82,0	0,94	36,0	1,24	10,6
MGly	11,80	0,42	36,64	64,0	1,09	39,6	1,10	3,76
ADi	12,55	0,40	58,20	68,9	1,09	42,1	1,06	2,38
MGi	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
AGly	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
De	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
Gle	15,27	0,35	90,82	72,0	1,14	51,5	n.r.	n.r.
AGi	16,90	0,45	59,56	57,3	1,20	57,1	1,11	3,85
Ge	18,10	0,39	78,00	47,5	1,34	61,2	1,07	2,34
Media		0,32	53,36	101	1,14	40,9	1,11	4,50
ACETONITRILO								
Isoflavona	Tiempo de retención	RSD	Anchura de pico	Platos teóricos/metro	Asimetría	Factor de Retención	Factor de Selectividad	Resolución
	(minutos)	tr	(segundos)	(N/m)	A	K'	α	Rs
Di	2,78	0,23	24,44	32,6	0,83	4,45		
Gly	3,04	0,19	14,80	56,2	0,84	4,96	1,12	2,81
Gi	3,94	0,37	19,72	77,7	0,86	6,72	1,35	10,0
MDi	4,67	0,46	18,98	84,6	0,82	8,14	1,21	7,25
MGly	4,95	0,47	21,88	66,0	0,75	8,70	1,07	2,40
ADi	6,04	0,42	44,60	64,8	0,89	10,8	1,25	7,62
AGly	6,70	0,47	28,82	63,6	0,86	12,1	1,12	3,92
MGi	7,09	0,41	81,00	57,6	0,95	12,9	1,06	2,13
De	7,33	0,40	75,00	51,6	0,77	13,4	1,04	1,13
Gle	8,36	0,36	51,70	59,1	0,79	15,4	1,15	4,68
AGi	10,23	0,30	55,64	82,3	0,76	19,0	1,24	8,00
Ge	12,24	0,43	58,50	96,1	0,99	23,0	1,21	8,06
Media		0,38	41,26	66,0	0,84	11,6	1,16	5,27

El método que utiliza acetonitrilo como fase móvil resuelve los 12 picos en menos de 12 minutos, pero la resolución no es adecuada para todos los picos. Los picos AGly, MGy y De están parcialmente solapados, pero se diferencian los tres picos, lo cual permite su cuantificación utilizando la altura del pico y no el área del mismo. En

el caso del método que utiliza metanol como fase móvil no se resuelven tres de las 12 isoflavonas objeto de estudio, por lo que el método no es apropiado para su cuantificación.

Sin embargo la variabilidad de los tiempos de retención utilizando ambos disolventes como fase móvil es inferior al 0,5 %, lo cual indica una alta reproducibilidad, mayor que la observada para la columna particulada convencional (CPC). Lo mismo se observa para la anchura de picos, siempre considerando únicamente los picos resueltos.

En cuanto a la simetría, se observa cierta simetría que depende de la isoflavona, sin embargo, la asimetría es inferior a la observada en la columna particulada convencional.

El calibrado realizado para cada uno de los métodos se muestra en la *tabla 63*, siendo los coeficientes de regresión para todas las isoflavonas resueltas mayores de 0,9844.

Tabla 63. Curvas de calibrado obtenidas con la columna monolítica (CM) para cada isoflavona y con cada método cromatográfico desarrollado.

Isoflavona	METANOL			Isoflavona	ACETONITRILLO		
	Ordenada	Pendiente	R ²		Ordenada	Pendiente	R ²
Di	-7039	86748	0,9998	Di	-1419	56777	0,9998
Gly	-14852	79800	0,9993	Gly	-7111	52326	0,9992
Gi	-66625	128997	0,9989	Gi	-26743	82436	0,9996
MDi	-8496	104705	0,9998	MDi	-1712	68530	0,9998
MGly	-17719	95201	0,9993	MGly	-8483	62426	0,9992
ADi	-7750	95509	0,9998	ADi	-1562	62511	0,9998
MGi	No resuelto			AGly	-7779	57245	0,9992
AGly	No resuelto			MGi	-32065	98841	0,9996
De	No resuelto			De	-23943	58349	0,9995
Gle	-128780	62848	0,9961	Gle	-25798	43263	0,9844
AGi	-73088	141510	0,9961	AGi	-29337	90433	0,9996
Ge	-73735	96282	0,9987	Ge	-10663	76981	0,9999

Tanto la concentración como los valores de reproducibilidad para la muestra de extracto de proteína analizada se muestran en la *tabla 64*.

Tabla 64. Datos de reproducibilidad para el tiempo de retención y la concentración para los extractos de proteína de soja analizados con la CM utilizando los dos métodos desarrollados. RSD: desviación estándar relativa en %.

Isoflavona	METANOL				Isoflavona	ACETONITRILLO			
	Tiempo de retención minutos	RSD*	Concentración media µg/g	RSD*		Tiempo de retención minutos	RSD*	Concentración media µg/g	RSD*
Di	7,65	0,12	239,1	1,02	Di	2,81	1,30	241	1,02
Gly	8,06	0,37	35,5	4,96	Gly	3,07	1,19	27,0	0,10
Gi	8,70	0,81	275	2,07	Gi	3,94	1,05	267	0,96
MDi	10,63	2,20	33,2	3,65	MDi	4,66	1,17	30,7	2,59
MGly	11,32	2,13	18,7	4,53	MGly	4,74	1,10	12,4	2,78
ADi	12,50	2,18	150	4,71	ADi	6,06	1,06	137	2,36
MGi	No resuelto				AGly	6,74	1,07	22,4	6,74
AGly	No resuelto				MGi	7,08	1,35	62,3	7,08
De	No resuelto				De	7,20	1,35	43,8	7,20
Gle	15,94	1,33	164	0,19	Gle	8,38	1,58	31,5	0,83
AGi	16,89	1,48	175	2,41	AGi	10,25	1,02	214	1,06
Ge	18,04	1,14	38,8	2,53	Ge	12,16	1,16	22,8	2,51
Total	1129				Total	1108			

La media de variabilidad en la concentración de cada isoflavona resuelta es menor del 8% para ambos métodos, mayor que la obtenida en los métodos usando una columna particulada convencional (CPC). Las mayores variabilidades en la concentración se observan para las isoflavonas peor resueltas (AGly, MGy y De), lo cual puede justificar la mayor variabilidad en su cuantificación.

Además, se observa que en la cuantificación de la isoflavona Gle con el método que utiliza como fase móvil metanol, se obtiene una concentración mayor a la obtenida con el método que utiliza acetonitrilo como fase móvil, y también superior a la obtenida con la columna particulada convencional (CPC). El análisis espectral de este pico cromatográfico indica que un compuesto no identificado co-eluye con esta isoflavona, por lo que la determinación de la misma con este método no es posible, ya que se estaría cometiendo un error sistemático por exceso.

Para el resto de las isoflavonas resueltas, las concentraciones obtenidas con ambos métodos utilizando la columna monolítica son similares, y también lo son si los comparamos con los obtenidos utilizando los métodos desarrollados con la columna particulada convencional. La concentración total obtenida en el caso del método que utiliza acetonitrilo como fase móvil, que es el que resuelve todas las isoflavonas objeto de estudio, es equivalente a la obtenida con la columna particulada convencional. Los cromatogramas obtenidos al analizar los extractos de proteína de soja utilizando la columna monolítica y las diferentes fases móviles, son los que se muestran en la *figura*

87; donde se observa la no resolución de la totalidad de los picos utilizando metanol como fase móvil (CM/M).

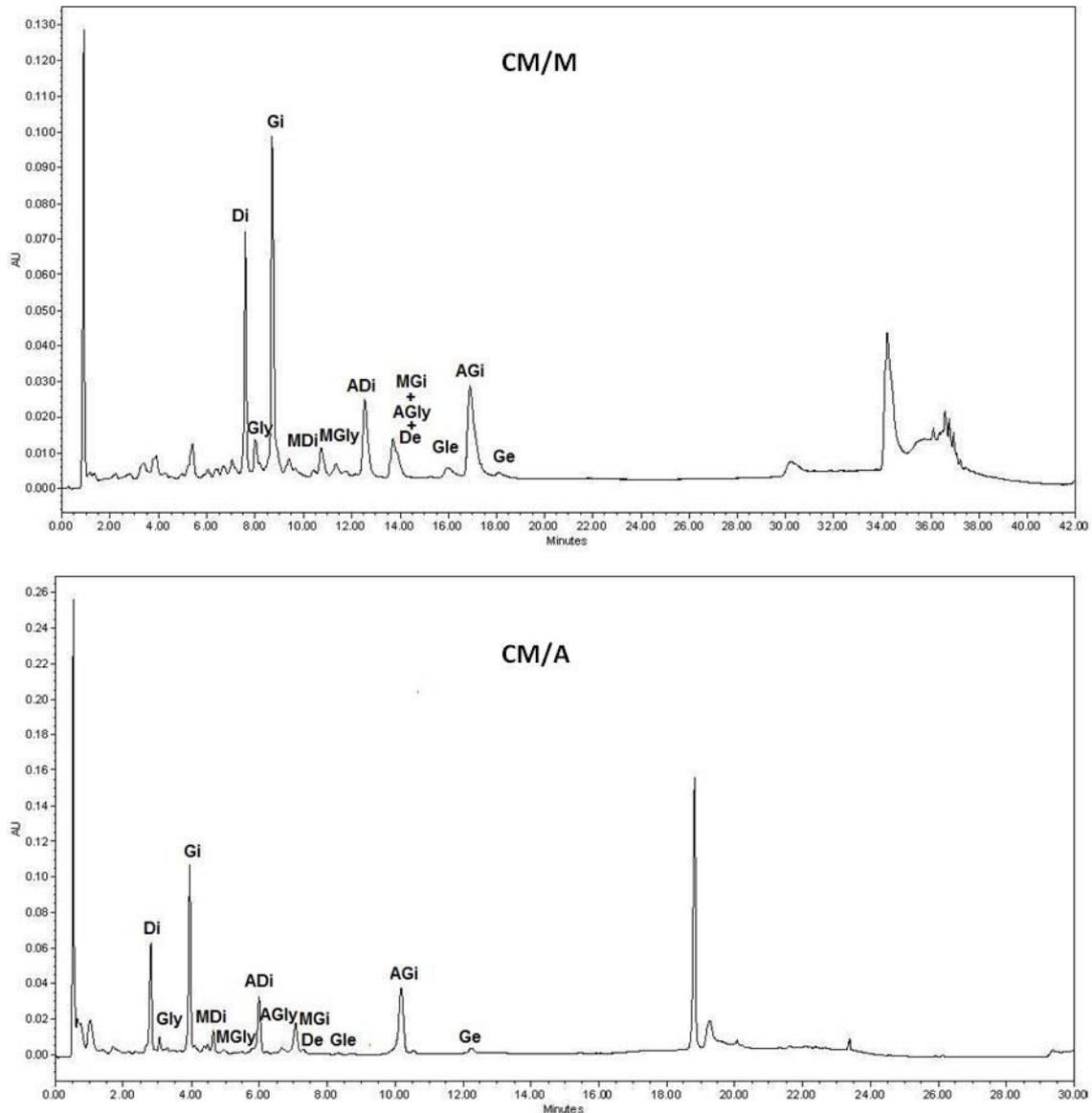


Figura 87. Cromatogramas de los extractos de proteína de soja obtenidos con la columna monolítica (CM): CM/M (metanol) y CM/A (acetonitrilo).

Por lo tanto, el método con la columna monolítica usando como fase móvil metanol para el análisis de las 12 isoflavonas es poco recomendable, ya que no se resuelven todos los picos.

En cambio el método que utiliza acetonitrilo como fase móvil realiza el análisis de las 12 isoflavonas en menos de 13 minutos. El método utilizado es de 30 minutos y se han utilizado 20 minutos de re-equilibrado, aunque las columnas monolíticas pueden equilibrarse en menos de 5 minutos, lo que acortaría el tiempo de análisis de forma considerable. Además como se ha comentado anteriormente, este tipo de columna, debido a su estructura, genera menor presión de trabajo; por lo tanto, otra

posibilidad para acortar el tiempo de análisis es aumentar el flujo, ya que el sistema no está trabajando a su máxima presión, algo que se tendrá en cuenta en la optimización del método cromatográfico de análisis de isoflavonas con una columna monolítica.

Sin embargo, hay que tener en consideración que es de suma importancia conseguir la separación de tres de los picos (AGly, MG_i y De), ya que un aumento del flujo, podría producir un solapamiento parcial de estos picos.

4.1.5 Columna de partículas recubiertas (CPR)

Se realiza el traspaso del método desde la columna particulada convencional (CPC) a la columna de partículas recubiertas (CPR) usando el factor de longitud de la columna (*tabla 58*). Como se puede observar en los cromatogramas obtenidos con esta columna (*figura 83*), los picos son más estrechos y más simétricos que con las otras columnas estudiadas, aspecto que se ve reflejado en la mejora de los parámetros cromatográficos que se muestran en la *tabla 65*.

Se observa el mismo cambio en el orden de elución que en la columna particulada convencional y en la columna monolítica; según se utilice acetonitrilo o metanol como fase móvil se observa un cambio en el orden de elución de MG_i y AGly.

En el caso del método que utiliza metanol como fase móvil se consigue una alta resolución en la separación de todas las isoflavonas, en comparación con el resto de métodos cromatográficos que utilizan metanol como fase móvil de este estudio. El tiempo de retención para la última isoflavona (Ge) es de 32,95 minutos. Por otro lado, utilizando acetonitrilo como fase móvil, la separación de todas las isoflavonas se consigue en menos de 19 minutos (tiempo de retención para Ge, 18,29 minutos), con una resolución superior a la conseguida con el método que utiliza metanol. De hecho, la resolución con el método que utiliza acetonitrilo como fase móvil en la columna de partículas recubiertas es la más elevada entre todos los métodos desarrollados con ambos disolventes y las distintas columnas (convencional, CPC, y monolítica, CM).

El tiempo total de análisis cromatográfico para las 12 isoflavonas con total separación para una columna de partículas recubiertas es, en este caso, de 42 minutos utilizando acetonitrilo y de 59 minutos utilizando metanol como fase móvil.

Los picos cromatográficos obtenidos para cada una de las isoflavonas son más estrechos que los observados utilizando la columna particulada convencional (CPC) y la monolítica (CM). Además, se observa que para ambos métodos los picos son más simétricos, con valores de asimetría muy próximos a uno para la mayoría de las isoflavonas estudiadas.

Tabla 65. Parámetros cromatográficos obtenidos con la columna de partículas recubiertas (CPR) con cada uno de los métodos cromatográficos desarrollados. RSD: desviación estándar relativa en %; tr: tiempo de retención.

METANOL								
Isoflavona	Tiempo de retención	RSD	Anchura de pico	Platos teóricos/metro	Asimetría	Factor de Retención	Factor de Selectividad	Resolución
	(minutos)	tr	(segundos)	(N/m)	A	K'	α	Rs
Di	10,09	0,08	19,20	278	1,15	11,9		
Gly	10,86	0,10	16,22	283	1,03	12,9	1,08	5,90
Gi	13,01	0,10	32,16	260	1,12	15,6	1,21	14,0
MDi	16,68	0,14	16,90	266	1,03	20,3	1,30	19,1
MGly	18,76	0,17	17,50	144	1,36	22,9	1,13	7,65
ADi	20,86	0,16	31,84	169	1,00	25,6	1,12	6,32
MGi	23,02	0,20	22,56	152	0,98	28,4	1,11	5,94
AGly	24,41	0,21	16,42	130	1,01	30,1	1,06	3,29
De	25,31	0,18	21,46	106	0,98	31,3	1,04	1,87
Gle	29,00	0,13	27,60	288	0,97	36,0	1,15	8,41
AGi	30,74	0,08	29,58	687	1,00	38,2	1,06	5,75
Ge	32,95	0,05	16,62	950	0,98	41,0	1,07	9,39
Media		0,13	22,34	310	1,05	26,2	1,12	7,97
ACETONITRILLO								
Isoflavona	Tiempo de retención	RSD	Anchura de pico	Platos teóricos/metro	Asimetría	Factor de Retención	Factor de Selectividad	Resolución
	(minutos)	tr	(segundos)	(N/m)	A	K'	α	Rs
Di	4,37	0,22	16,80	152	0,97	12,5		
Gly	4,72	0,30	23,61	154	1,00	13,6	1,09	4,54
Gi	6,92	0,35	32,00	161	0,85	20,4	1,50	22,6
MDi	7,90	0,54	87,38	142	1,04	23,5	1,15	7,77
MGly	8,45	0,60	45,56	167	0,92	25,1	1,07	3,94
ADi	10,69	0,41	52,14	223	0,90	32,1	1,28	15,6
AGly	11,62	0,33	51,64	363	1,03	34,9	1,09	6,63
MGi	12,17	0,30	57,84	244	1,02	36,7	1,05	3,78
De	13,40	0,23	69,56	296	0,98	40,5	1,10	7,55
Gle	14,40	0,17	60,04	372	0,92	43,6	1,08	6,20
AGi	15,36	0,09	82,40	635	0,96	46,5	1,07	6,73
Ge	18,29	0,08	33,20	1483	1,04	55,6	1,19	25,7
Media		0,30	51,01	366	0,97	32,1	1,15	10,1

El número de platos teóricos y la resolución para esta columna de partículas recubiertas, o *fused-core*, son mayores que los obtenidos con la columna particulada convencional o la columna monolítica. Estas diferencias con la columna particulada convencional pueden ser debidas a la menor longitud de la columna y a la mayor

capacidad de separación debida al menor tamaño de las partículas que componen la columna *fused-core*.

En las curvas de calibración para las isoflavonas estudiadas, realizadas con seis puntos, se han obtenido coeficientes de regresión (R^2) mayores de 0,9830, y se muestran en la *tabla 66*.

Tabla 66. Curvas de calibración obtenidas con la columna de partículas recubiertas (CPR) para cada isoflavona y con cada método cromatográfico desarrollado.

Isoflavona	METANOL			Isoflavona	ACETONITRILLO		
	Ordenada	Pendiente	R^2		Ordenada	Pendiente	R^2
Di	-5088	85999	0,9999	Di	-2728	57445	0,9997
Gly	-14313	78799	0,9992	Gly	-9456	52704	0,9991
Gi	-37655	123347	0,9994	Gi	-32245	84021	0,9994
MDi	-6141	103800	0,9999	MDi	-3293	69336	0,9997
MGly	-17076	94007	0,9992	MGly	-11281	62876	0,9991
ADi	-5602	94684	0,9999	ADi	-3003	63247	0,9997
MGi	-45148	147893	0,9994	AGly	-10345	57659	0,9991
AGly	-15659	86206	0,9992	MGi	-38661	100742	0,9994
De	-28615	87972	0,9994	De	-23735	59145	0,9995
Gle	-41005	65770	0,9858	Gle	-20689	42944	0,9830
AGi	-41307	135312	0,9994	AGi	-35372	92171	0,9994
Ge	-7565	116722	0,9996	Ge	-13503	76875	0,9999

En la *tabla 67* se muestran los valores de reproducibilidad ($n=5$) y el cromatograma del extracto de proteína inyectado con ambos métodos, es el que se muestra en la *figura 88*.

La variabilidad en el tiempo de retención es inferior al 0,30 % para ambos métodos, aunque es ligeramente menor para el método que utiliza metanol como fase móvil. La variabilidad en las concentraciones es inferior al 4 % para ambos métodos y para todas las isoflavonas. Los valores de reproducibilidad son los menores obtenidos en todos los métodos estudiados hasta el momento.

Las concentraciones individuales y totales de las isoflavonas son equivalentes a las obtenidas con las otras dos columnas, para ambos métodos. También se observó una menor variabilidad en los resultados obtenidos con la columna de partículas recubiertas que con los otros tipos de fases estacionarias. Por lo tanto, los dos métodos pueden ser utilizados para el análisis de las isoflavonas.

Tabla 67. Datos de reproducibilidad para el tiempo de retención y la concentración para los extractos de proteína de soja analizados con la CPR con los dos métodos estudiados. RSD: desviación estándar relativa en %.

Isoflavona	METANOL				Isoflavona	ACETONITRILLO			
	Tiempo de retención		Concentración media			Tiempo de retención		Concentración media	
	minutos	RSD*	µg/g	RSD*		minutos	RSD*	µg/g	RSD*
Di	10,09	2,29	214	0,45	Di	4,48	0,39	224	1,45
Gly	10,81	2,64	41,4	0,79	Gly	4,85	0,42	31,7	1,17
Gi	12,94	2,45	266	1,34	Gi	7,02	0,62	259	1,44
MDi	16,50	1,89	38,0	2,14	MDi	8,01	0,77	53,6	2,02
MGLy	18,65	1,64	30,0	1,77	MGLy	8,59	0,72	15,0	0,39
ADi	20,57	1,58	154	0,90	ADi	10,87	0,57	151	1,40
MGi	22,68	1,43	73,3	3,53	AGly	11,80	0,49	28,1	3,97
AGly	23,96	1,40	26,1	0,82	MGi	12,20	0,55	68,8	0,40
De	25,15	1,13	31,2	1,20	De	13,37	0,43	38,2	0,43
Gle	29,45	0,51	43,6	0,36	Gle	14,44	0,37	25,1	1,33
AGi	30,53	0,35	228	3,79	AGi	15,47	0,31	207	1,12
Ge	32,82	0,19	22,3	1,59	Ge	18,26	0,16	26,9	1,96
Total			1167		Total			1128	

Por otro lado, estos métodos siguen siendo largos, 59 minutos para el metanol y 42 minutos para el acetonitrilo, más 20 minutos del re-equilibrado, aunque, al igual que antes, el re-equilibrado se puede optimizar y así acortar el análisis, ya que al ser la columna de menor longitud es necesario menor tiempo. Sin embargo, estos métodos son el mismo método desarrollado para una columna particulada convencional, al que se le ha aplicado un factor de cambio debido a la longitud de la columna; comparando la resolución de los compuestos en ambas columnas se observa que con la columna de partículas recubiertas, o *fused-core*, es posible una reducción drástica del tiempo de análisis. Por tanto, observando la mejora obtenida en prácticamente todos los parámetros cromatográficos, es posible modificar el gradiente para separar en menos tiempo los compuestos. Además con este tipo de columnas es posible reducir el tiempo de análisis porque es posible un aumento del flujo, con un riesgo menor de falta de resolución, ya que este tipo de columnas soportan mayores presiones que las convencionales y su resolución es elevada.

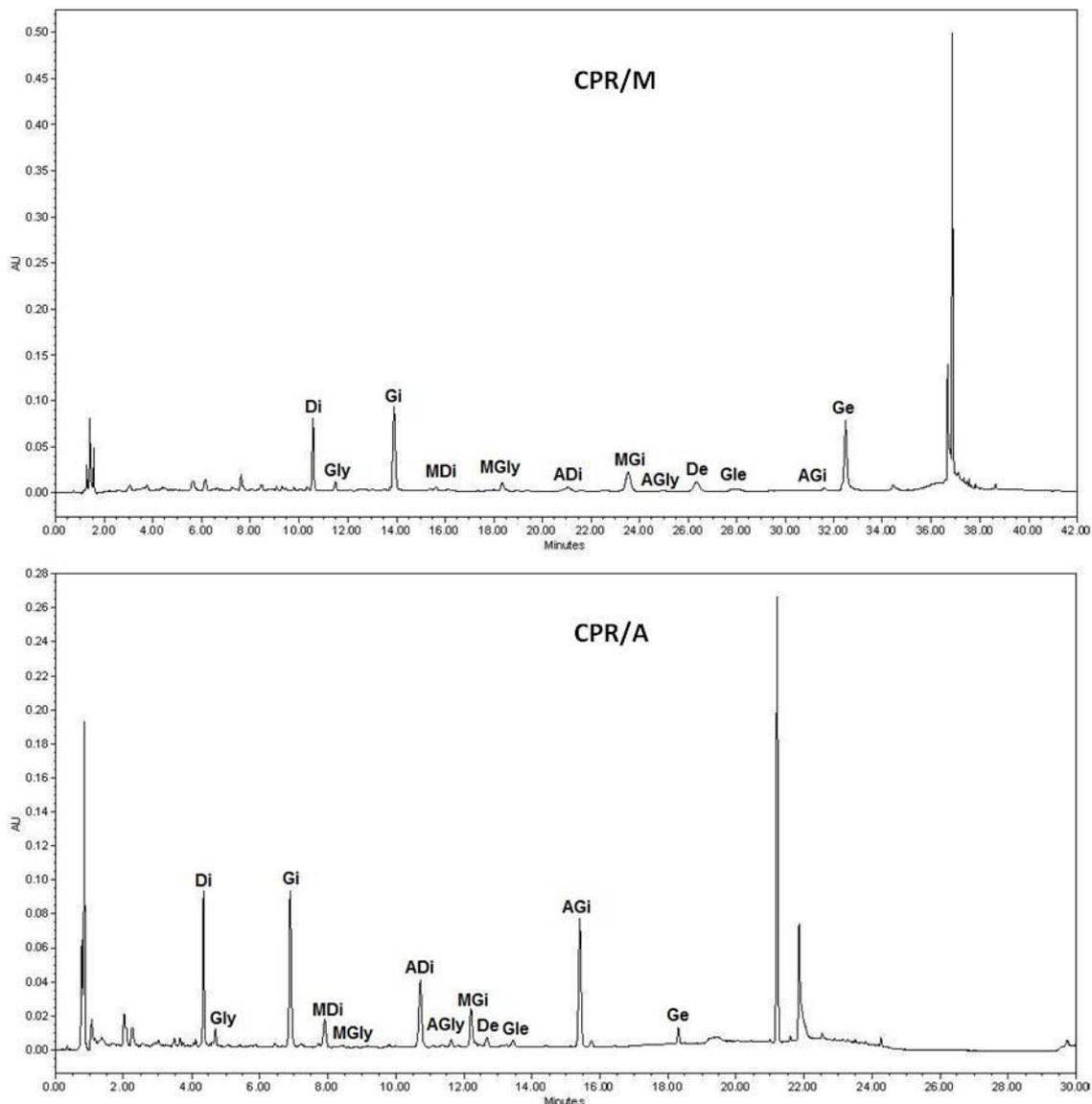


Figura 88. Cromatogramas de los extractos de proteína de soja obtenidos con la columna de partículas recubiertas (CPR), o *fused-core*, con los dos métodos estudiados: CPR/M (metanol) y CPR/A (acetonitrilo).

Por otro lado, la capacidad de poder aplicar exactamente las mismas condiciones cromatográficas que se desarrollasen para una columna particulada convencional es una característica excelente ya que permite transferir un método de rutina sin la necesidad de cambiar las condiciones, y aun así reducir el tiempo de análisis, consiguiendo mayor resolución y una reproducibilidad similar.

En general, las columnas de partículas recubiertas (CPR), o *fused-core*, muestran mejores propiedades cromatográficas que las columnas particuladas convencionales (CPC) o las columnas monolíticas (CM) para todas las isoflavonas estudiadas.

4.1.6 Efecto del disolvente de la muestra

Un factor importante y a menudo olvidado en la selección de una fase estacionaria o fase móvil es el disolvente en el que se encuentra la muestra que va a ser inyectada en el sistema cromatográfico. El disolvente de la muestra puede producir distorsión en los picos, especialmente cuando se inyectan muestras con alta concentración de acetonitrilo en una columna cromatográfica equilibrada con un baja concentración de dicho disolvente [57].

Rostagno y col. 2007 [39] estudiaron el efecto del disolvente de la muestra en la separación cromatográfica de las isoflavonas acoplando dos columnas monolíticas, no encontrando ningún efecto significativo. Sin embargo, el alto flujo utilizado en este estudio, 5 mL/min, podría haber sido el responsable de no observar el efecto debido al disolvente de la muestra. Además se estudiaron concentraciones relativamente bajas de disolvente orgánico en la muestra. Aunque la mayor razón de que no se observara el efecto es que el método cromatográfico que se desarrollaba utilizaba metanol como fase móvil.

Por lo tanto en este estudio, se ha considerado interesante evaluar el efecto de la alta concentración de disolvente orgánico en la muestra. Para ello se redisolvió extracto estandarizado de proteína de soja liofilizada (apartado 3.3.1) en distintas mezclas acuosas de disolventes orgánicos: 50% y 75% etanol (EtOH), 50% y 75% metanol (MeOH) y 50% y 75% acetonitrilo (AcCN). Cada muestra fue inyectada con los diferentes métodos en las diferentes fases estacionarias. En la *figura 89* se muestran la sección de las 4 isoflavonas que eluyen en primer lugar (Di, Gly, Gi y MDi) de los cromatogramas solapados de las muestras disueltas en los distintos disolventes acuosos para cada uno de los métodos cromatográficos desarrollados.

Como se puede observar, en este caso el disolvente en que se carga la muestra ejerce importantes efectos en los picos cromatográficos, sobre todo cuando se utiliza acetonitrilo como fase móvil -CPC/A, CM/A, CPR/A-. Esto ocurre especialmente cuando las concentraciones de acetonitrilo en la muestra son superiores al 75 % y afecta sobre todo a las isoflavonas con índice de polaridad más alto (las primeras del cromatograma; Di, Gly y Gi). Además se observa que el uso de altas concentraciones de etanol o acetonitrilo en la muestra incrementan la anchura del pico cromatográfico, y en el caso de la columna particulada convencional usando acetonitrilo como fase móvil (CPC/A) afecta también a los tiempos de retención.

Por otro lado cuando se usa metanol como fase móvil, los efectos del disolvente son menores, independientemente de la fase estacionaria utilizada; afecta menos a la forma del pico e incluso algunas isoflavonas no se ven afectadas.

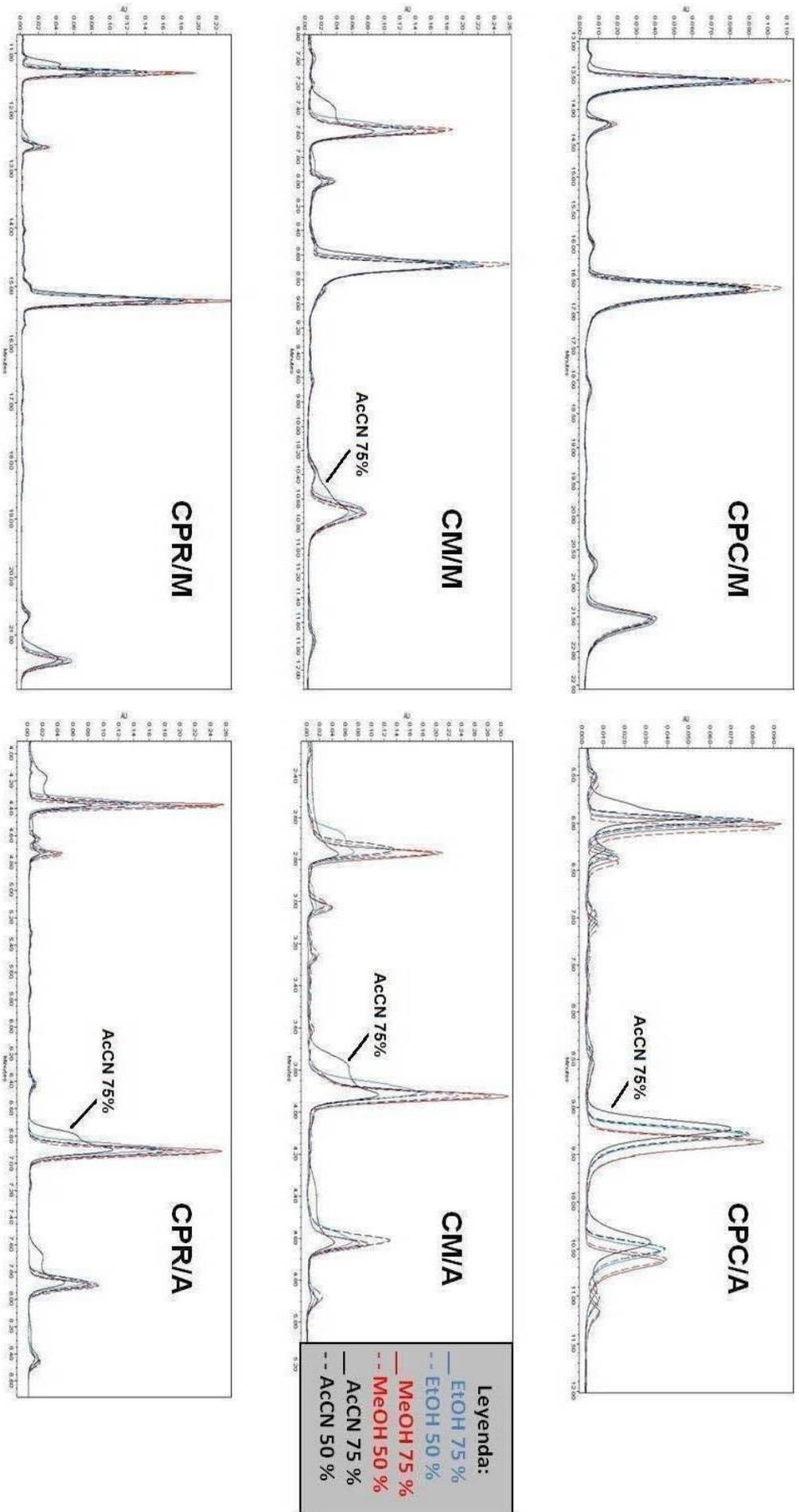


Figura 89. Cromatogramas superpuestos con cada método desarrollado para las inyecciones de muestras disueltas en distintos disolventes. CPC: columna particulada convencional; CM: columna monolítica; CPR: columna de partículas recubiertas. M: método utilizando como fase móvil metanol. A: método utilizando como fase móvil acetonitrilo.

En la columna monolítica es en la que más afecta el disolvente en el que se carga la muestra, ya que se observan picos cromatográficos con anchuras mayores, e incluso desdoblados, usando como disolvente de la muestra etanol y acetonitrilo acuosos al 75%. En cambio el efecto es menor en la columna particulada convencional y en la columna de partículas recubiertas. La columna particulada convencional (CPC) es la que mayor resistencia presenta a los efectos de las altas concentraciones de acetonitrilo en el disolvente de la muestra, no presentando distorsión alguna en la forma de los picos cromatográficos.

Estos resultados indican que, si es posible, se debe evitar el uso de elevadas concentraciones de etanol o acetonitrilo como disolventes de extracción, para así eliminar la necesidad de utilizar pasos adicionales de preparación de muestra tales como la evaporación y redisolución de la muestra, para evitar la distorsión de los picos cromatográficos durante el análisis. Además estas etapas adicionales pueden promover la degradación de los derivados malonil e incrementar las pérdidas, la variabilidad y los errores debidos a la manipulación de las muestras. Por lo tanto, el uso de metanol acuoso como disolvente para la inyección de la muestra, ya sea al 50% o al 75%, es el que menos afecta a los picos cromatográficos y puede ser una buena opción para evitar pasos adicionales de post-extracción en el análisis.

En general, el uso de columnas particuladas y metanol como fase móvil para el análisis cromatográfico evita el no deseable efecto del disolvente de la muestra, de modo que no es necesario evaporar y redissolver las muestras antes de su análisis cromatográfico, lo cual asegura la estabilidad de las isoflavonas objeto de estudio, siendo más precisa su cuantificación.

4.1.7 Metanol vs. acetonitrilo como fases móviles

Una visión general de las separaciones obtenidas con acetonitrilo y metanol como fases móviles indica un mayor rendimiento cromatográfico del acetonitrilo como fase móvil, independientemente de la columna utilizada (*figura 83*).

Con ambos disolventes se obtuvo una separación similar de las 12 isoflavonas, pero utilizando acetonitrilo como fase móvil se consiguió dicha separación en menos tiempo y obteniendo picos más simétricos. Por ejemplo, el tiempo de retención de Ge, isoflavona que eluye en último lugar, es de aproximadamente 32 minutos usando metanol como fase móvil (CPR/M); con la columna de partículas recubiertas (CPR), o *fused-core*, mientras que usando acetonitrilo como fase móvil fue de aproximadamente 18,5 minutos (CPR/A). Estas diferencias pueden ser debidas a que el metanol como fase móvil genera mayor presión, (*figura 84*), limitando el flujo a 0,8 mL/min; el acetonitrilo permite utilizar un flujo de 1,2 mL/min, reduciendo de este modo el tiempo de análisis.

Aunque el metanol se utiliza cada vez más como una alternativa al acetonitrilo por ser más económico y más respetuoso con el medio ambiente, el consumo de disolvente usando metanol como fase móvil resulta muy superior al consumo usando acetonitrilo, por lo que se debe tener en cuenta a la hora de seleccionar un disolvente u otro como fase móvil.

Una de las diferencias más importantes observadas entre el uso de acetonitrilo o metanol fue el cambio en el orden de elución en algunas isoflavonas, independientemente de la fase estacionaria utilizada. MG_i y AG_{ly} cambian su orden de elución, dependiendo de la fase móvil utilizada, ya sea acetonitrilo o metanol. Esta puede ser una herramienta de selectividad atractiva que se puede utilizar para resolver problemas de separación cromatográfica de estos compuestos en matrices complejas.

Además el metanol como fase móvil mostró una mayor resistencia a las variaciones debidas al disolvente en que se encuentra disuelta la muestra, lo cual puede ser utilizado para reducir en general el método de determinación analítica, que incluye tanto la preparación de muestras como el análisis.

4.1.8 Conclusiones

En base a los resultados expuestos en este capítulo, la columna particulada convencional (CPC) proporciona resultados aceptables, pero el tiempo de análisis es relativamente largo con ambas fases móviles (metanol o acetonitrilo). Para la obtención de un método rápido debemos tener en cuenta la limitación del flujo, y por lo tanto del tiempo de análisis, por las altas presiones que genera. Usando acetonitrilo como fase móvil, existen problemas de deformación en los picos cromatográficos cuando se inyecta la muestra disuelta en un medio con altas concentraciones de disolvente orgánico.

De todas las fases estacionarias evaluadas, la columna monolítica (CM) genera las menores presiones de trabajo, lo cual puede ser de gran utilidad para el desarrollo de un método cromatográfico donde se aumente el flujo de fase móvil y en consecuencia se reduzca el tiempo de análisis. Pero es la fase estacionaria más afectada por la concentración de disolvente orgánico en la muestra. Además hay que destacar la imposibilidad de transferir un método cromatográfico desarrollado previamente en una columna particulada a una columna monolítica para el análisis de isoflavonas, lo cual hace que sea necesario el desarrollo de un método nuevo de cromatografía, requiriendo un estudio más complejo y específico.

La columna de partículas recubiertas, o fused-core (CPR), es la que muestra el mejor comportamiento cromatográfico de todas las columnas evaluadas en este estudio, para estos analitos, excepto en su resistencia a las variaciones debidas a altas concentraciones de disolvente orgánico en la muestra. El uso como fase estacionaria de una columna de partículas recubiertas da lugar a picos más estrechos,

mayor resolución y menores tiempos de análisis, lo cual hace que sea la columna más apropiada para la optimización de un método rápido de análisis de las 12 isoflavonas objeto de estudio.

En general, e independientemente de la fase estacionaria utilizada, el uso de acetonitrilo como fase móvil muestra un mayor rendimiento cromatográfico para el análisis de las isoflavonas y un gran potencial para ser usado en el desarrollo de métodos cromatográficos más rápidos, debido en parte a la baja presión de trabajo que genera, que permite utilizar flujos más altos. Sin embargo, el efecto en la forma del pico cromatográfico debido al disolvente de inyección de la muestra se incrementa.

Por otro lado, el metanol como fase móvil presenta una atractiva alternativa para resolver problemas de selectividad, pero también para eliminar la necesidad de etapas de post-extracción, puesto que utilizando esta fase móvil afecta menos en qué disolvente se carga la muestra. Teniendo este aspecto en cuenta, se puede evitar la distorsión de los picos durante el análisis cromatográfico, sin añadir etapas al método durante la preparación de la muestra.

4.2 DESARROLLO DE MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS RÁPIDOS PARA EL ANÁLISIS DE ISOFLAVONAS DE SOJA USANDO UNA COLUMNA MONOLÍTICA

Para el desarrollo de un método de análisis de las 12 isoflavonas de soja usando una columna monolítica aplicamos los principios que presentan Kromidas y col. 2008 [58], debido a que el traspaso de un método cromatográfico desarrollado en una columna particulada convencional no ha sido posible (apartado 4.1).

Partimos de las fases móviles usadas en el apartado anterior, que son las comúnmente utilizadas para el análisis cromatográfico de isoflavonas [25], agua con 0,1% de ácido acético y metanol o acetonitrilo con 0,1% de ácido acético. La temperatura de trabajo es 35°C. Como flujo usamos 2,2 mL/min; el máximo flujo que nos permite trabajar por debajo del límite de presión de la columna con la composición de fase móvil 60:40 (agua:metanol), que era la mezcla de fase móvil que mayor presión ejercía a esa temperatura de trabajo (apartado 4.1.2). Para el desarrollo del método se utiliza inicialmente la muestra de soja dopada 1, cuya concentración se muestra en la *tabla 56*.

4.2.1 Modo isocrático vs. modo gradiente

Se inicia la optimización del método cromatográfico realizando una serie de métodos con la elución en isocrático que se muestran en la *tabla 68* y las *figuras 90*, *91* y *92*.

Tabla 68. Métodos cromatográficos isocráticos evaluados para ambos disolventes orgánicos, para el desarrollo de un método de análisis de isoflavonas de soja con una columna monolítica.

Isocráticos %A / %B	% H ₂ O 0,1% ácido acético (A)	% MeOH o AcCN 0,1% ácido acético (B)
Método 1	80	20
Método 2	77,5	22,5
Método 3	75	25
Método 4	72,5	27,5
Método 5	70	30
Método 6	67,5	32,5
Método 7	65	35
Método 8	62,5	37,5
Método 9	60	40

En la *figura 90* podemos observar que se consigue más separación de picos con menores porcentajes de acetonitrilo en la fase móvil; por ello, se estudian 4

mezclas más (*figura 91*) con porcentajes de fase orgánica en la fase móvil menores del 20%. Tras este estudio se encuentra que es posible la separación de todas las isoflavonas estudiadas sin variar la composición de la fase móvil en todo el análisis siendo la composición de la misma 87,5% acuoso y 12,5% orgánico; de este modo el tiempo de análisis se alarga hasta 14 minutos, y los picos presentan un mayor ensanchamiento.

La numeración de cada uno de los picos se corresponde con una isoflavona concreta que se muestra en la *tabla 69*.

Tabla 69. Correlación entre isoflavona y numeración utilizada durante el estudio.

Isoflavona	Número asignado
Daidzina	1
Glicitina	2
Genistina	3
Malonil daidzina	4
Malonil glicitina	5
Acetil daidzina	6
Acetil glicitina	7
Malonil genistina	8
Daidzeína	9
Gliciteína	10
Acetil genistina	11
Genisteína	12

Esta numeración se utiliza a lo largo de esta sección en la mayoría de los cromatogramas sin embargo, en aquellos en los que hemos considerado que los números entorpecían el gráfico, se ha decidido no incluirlos y sólo destacar el número de picos que se resuelven para simplificar la presentación de los resultados del estudio de optimización del método cromatográfico.

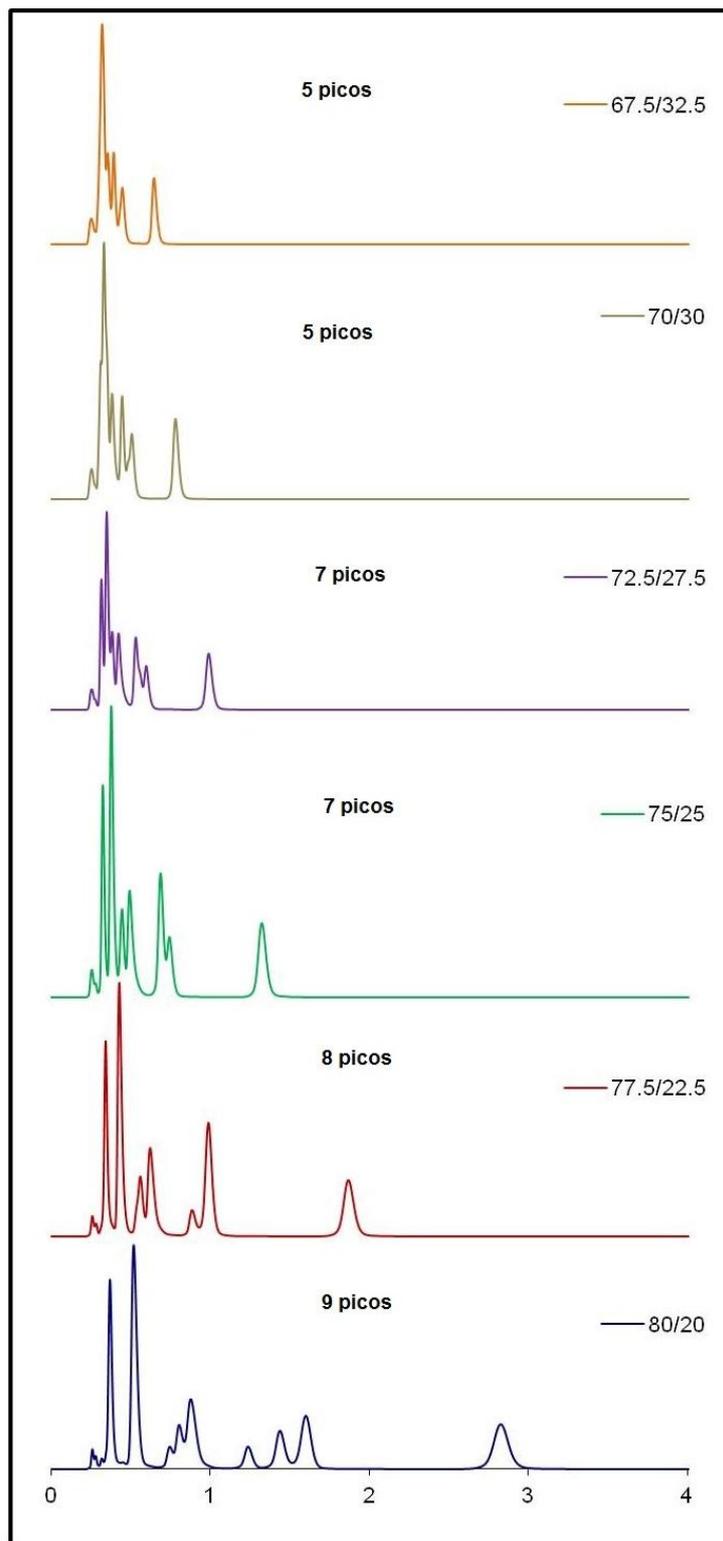


Figura 90. Cromatogramas obtenidos con elución en isocrático utilizando como fases móviles agua 0,1% ácido acético y acetonitrilo 0,1% ácido acético.

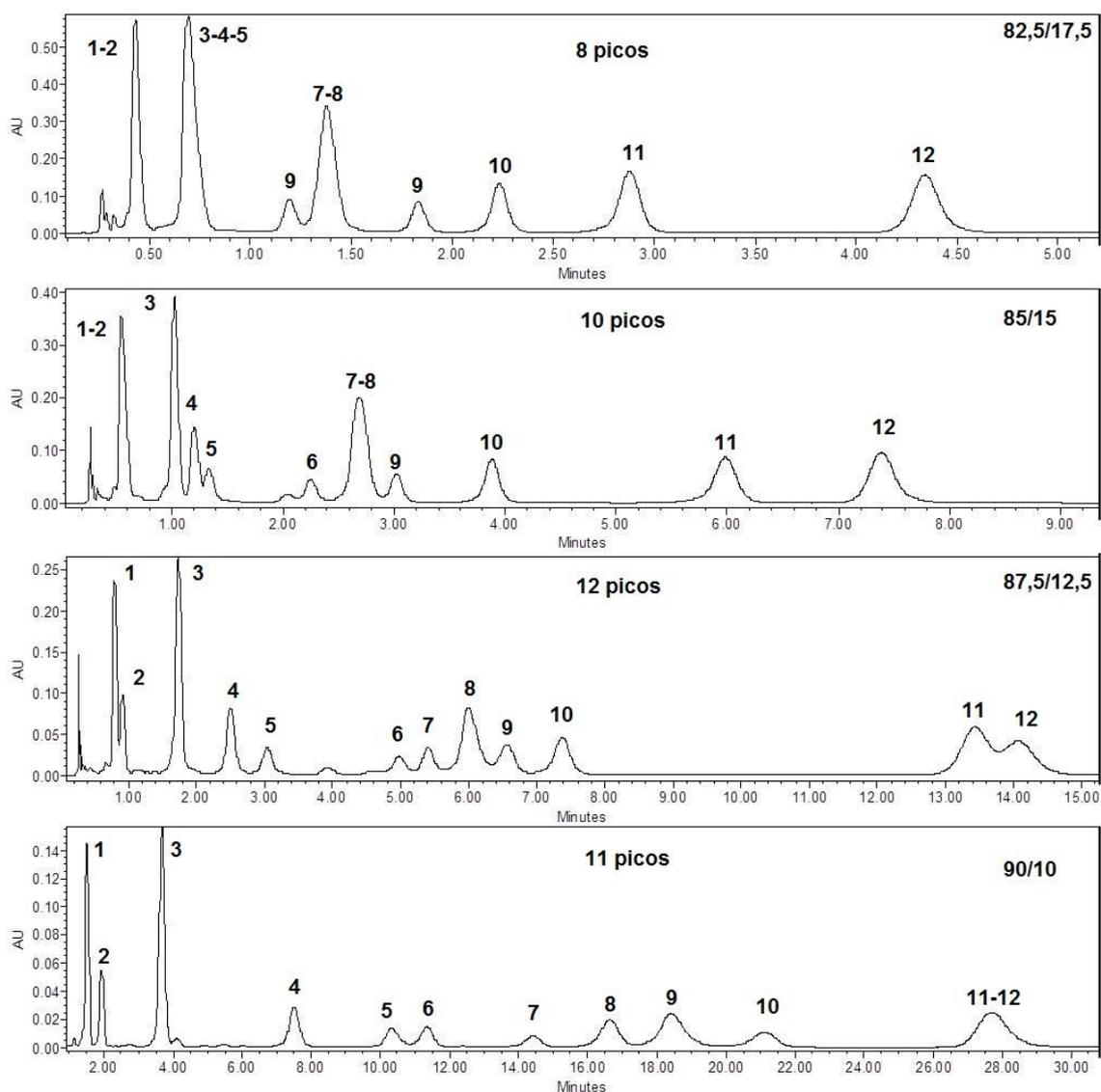


Figura 91. Cromatogramas de los nuevos métodos en isocrático con fases móviles agua 0,1% ácido acético y acetonitrilo 0,1% ácido acético. La numeración de los picos corresponde a cada una de las isoflavonas detectadas (ver tabla 69).

En la figura 92 se muestran los cromatogramas obtenidos utilizando métodos en isocrático con la fase móvil compuesta por metanol 0,1% ácido acético. Los picos están menos definidos que con acetonitrilo, poseen mayor anchura. Al igual que con el acetonitrilo, se consigue la mayor separación de picos a mayores porcentajes de agua, pero el análisis se alarga demasiado llegando a casi los 40 minutos (para la mezcla 80/20), y no se consigue la separación total de las 12 isoflavonas objeto de estudio.

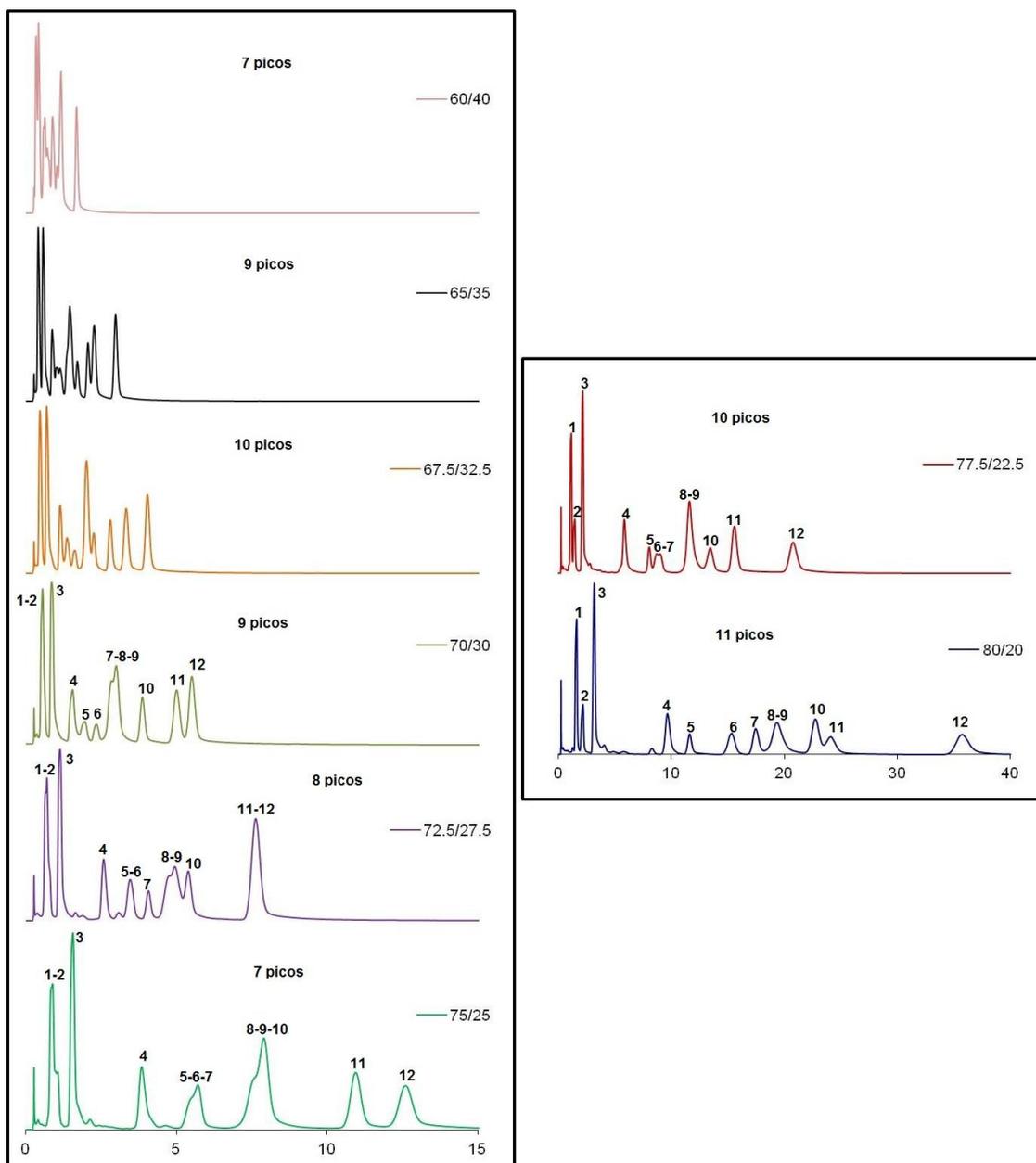


Figura 92. Cromatogramas de los métodos en isocrático con fases móviles agua 0,1% ácido acético y metanol 0,1% ácido acético. La numeración de los picos corresponde a cada una de las isoflavonas detectadas (ver tabla 69).

Debido a que los resultados obtenidos con elución en isocrático no son del todo satisfactorios, se decide evaluar métodos de elución en gradiente, es decir, modificando la composición de la fase móvil con el tiempo durante el análisis de las 12 isoflavonas de soja objeto de estudio. Para ambas fases móviles se estudian los métodos de elución en gradiente de 0 a 100% de disolvente orgánico en 5, 10, 15, 20 y 25 minutos; los cromatogramas obtenidos con estos métodos se muestran en las figuras 93 y 94.

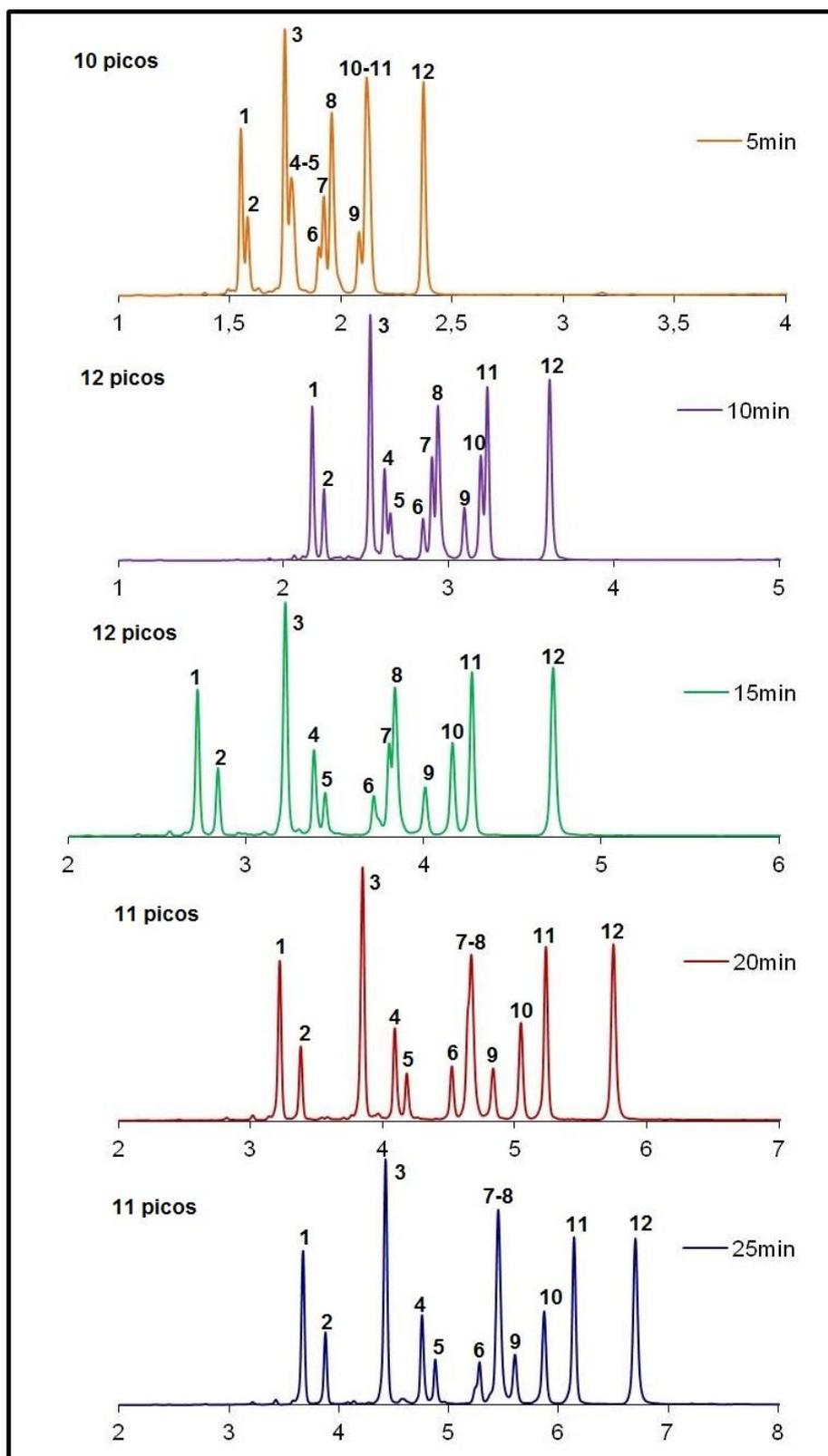


Figura 93. Cromatogramas obtenidos con la inyección de la muestra utilizando métodos de elución en gradiente de 0 a 100% de acetonitrilo 0,1% ácido acético en 5, 10, 15, 20 y 25 minutos (min). La numeración de los picos corresponde a cada una de las isoflavonas detectadas (ver tabla 69).

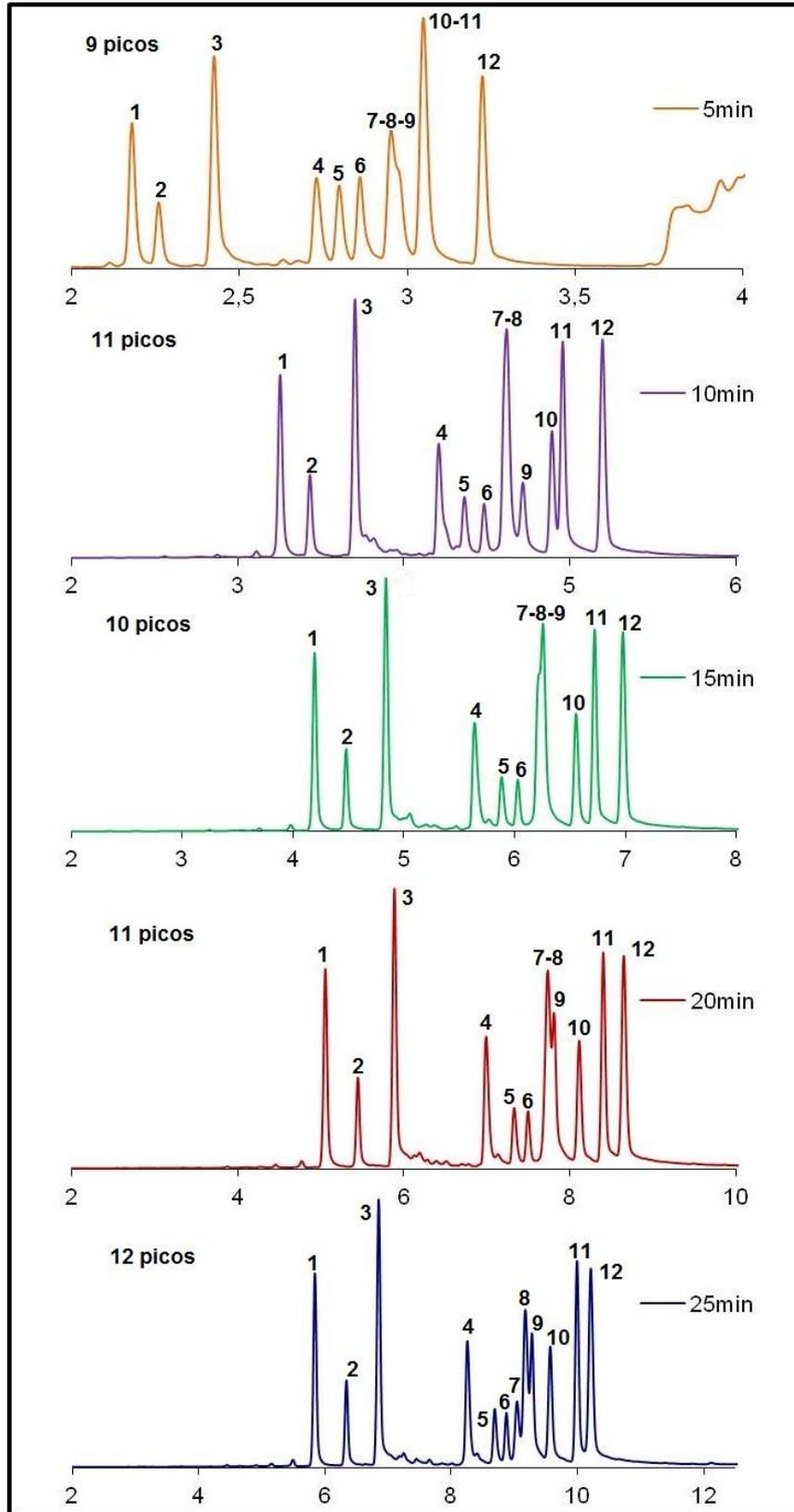


Figura 94. Cromatogramas obtenidos con los métodos de elución en gradiente de 0 a 100% de metanol 0,1% ácido acético en 5, 10, 15, 20 y 25 minutos (min). Cada pico corresponde a una o varias isoflavonas detectadas. La numeración de los picos corresponde a cada una de las isoflavonas detectadas (ver tabla 69).

Como era de esperar, en las *figuras 93 y 94* se observa que los métodos en gradiente, utilizando tanto metanol como acetonitrilo, resuelven mejor los 12 picos de interés que los métodos de elución en isocrático descritos anteriormente.

En concreto en la *figura 93* se muestra que un gradiente de 10 minutos o 15 minutos de acetonitrilo acidificado es capaz de separar cromatográficamente las 12 isoflavonas, en 4 y 5 minutos respectivamente, pero no con una buena resolución, que se conseguiría ajustando el método. Lo mismo se observa en la *figura 94* correspondiente a los métodos en gradiente estudiados utilizando metanol acidificado como fase móvil; en este caso en 25 minutos se resuelven las 12 isoflavonas en menos de 11 minutos.

Se estudiaron nuevos métodos de elución ampliando los gradientes a 30 y 35 minutos (*figura 95*), pero no se mejoran los resultados.

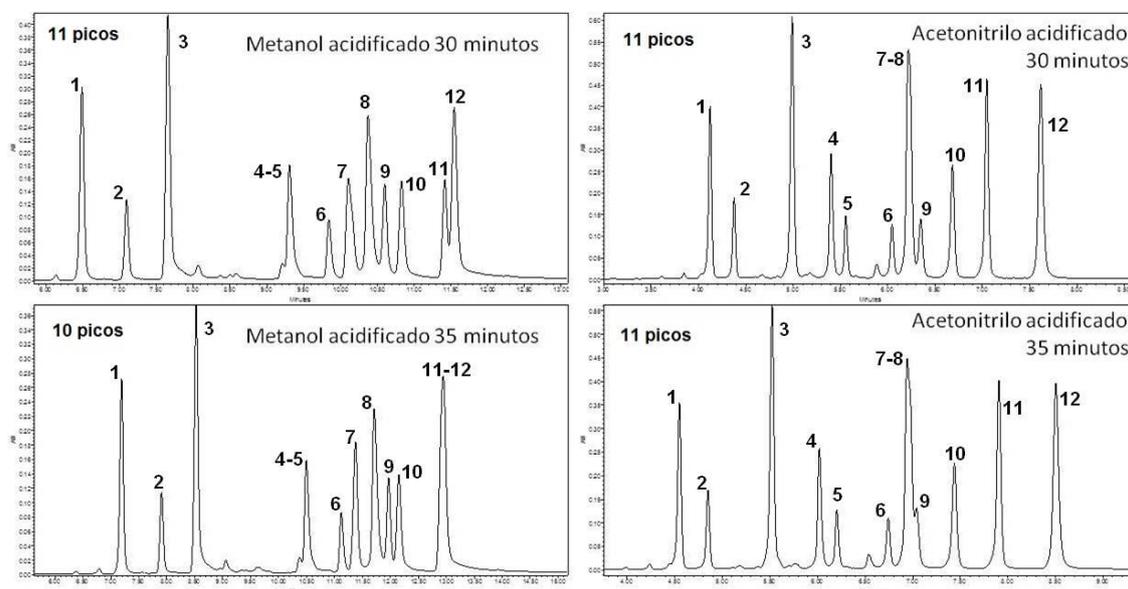


Figura 95. Cromatogramas obtenidos con los métodos en gradiente de 0 a 100% de metanol o acetonitrilo 0,1% ácido acético en 30 y 35 minutos. Cada pico corresponde a una o varias isoflavonas detectadas. La numeración de los picos corresponde a cada una de las isoflavonas detectadas (ver tabla 69).

Analizados los resultados expuestos se puede concluir que un método de elución con un gradiente lineal para ambas fases, es más efectivo en la separación cromatográfica de las 12 isoflavonas que los métodos de elución en isocrático estudiados anteriormente. Esto puede deberse a que los compuestos analizados poseen una estructura muy similar, al pertenecer a la misma familia, lo cual dificulta su separación con la misma composición de fase móvil durante todo el análisis. En los casos en que sí es posible la separación con una elución en isocrático, el tiempo necesario es demasiado largo, tiempo que se puede reducir optimizando un método de elución en gradiente.

Por todo ello, se decide continuar con el desarrollo de un método cromatográfico rápido para el análisis de las 12 isoflavonas utilizando gradientes de fase móvil en la elución.

4.2.2 Acidificación de la fase móvil

Una vez decidido el uso de gradiente para el análisis de las 12 isoflavonas se optimiza la composición de la fase móvil para mejorar la separación. Inicialmente se varía la cantidad de ácido en la fase orgánica para ver el efecto del mismo en la separación con gradientes de 0 a 100% de fase orgánica en diferentes tiempos.

En la *tabla 70* se muestran las composiciones de fase móvil para los gradientes evaluados en este apartado.

Tabla 70. Composiciones de fase móvil evaluadas para la elución con gradientes de 0 a 100% de fase orgánica en 5, 10, 15, 20, 25, 30 y 35 minutos.

GRADIENTES ACETONITRILLO		GRADIENTES METANOL	
% ácido acético en el agua	% ácido acético en el acetonitrilo	% ácido acético en el agua	% ácido acético en el metanol
0,1	1	0,1	1
0,1	2	0,1	2
1	0,1	1	0,1
2	0,1	2	0,1
1	1	1	1
2	2	2	2
0,1	0	2	0

En el apartado 4.2.1 los gradientes que mejores resultados han mostrado fueron el de 10 y el de 15 minutos para el acetonitrilo y el de 25 minutos para el metanol por ello, aunque se ha realizado el estudio desde los 5 hasta los 35 minutos (en intervalos de 5 minutos) para todas las composiciones planteadas, sólo se mostrarán en este apartado los resultados obtenidos utilizando gradientes de 10, 15, 20 y 25 minutos, que son con los que se han obtenido los mejores resultados.

En la *figura 96* se muestran los gradientes de 10, 15, 20 y 25 minutos para la fase móvil de acetonitrilo con diferentes porcentajes de ácido y con agua con un 0,1% de ácido acético.

Como se puede observar, con ninguno de los gradientes evaluados mejora la separación de las 12 isoflavonas al aumentar la concentración de ácido acético en el acetonitrilo; ocurre todo lo contrario puesto que se consigue menor resolución en todos los casos evaluados. Por lo tanto, la adición de ácido al acetonitrilo no facilita la separación de las isoflavonas utilizando una columna monolítica como fase estacionaria.

En la *figura 97* se muestran los cromatogramas obtenidos utilizando los mismos gradientes, pero siendo la fase móvil orgánica metanol con diferentes porcentajes de ácido; la otra fase móvil continúa siendo agua con un 0,1% de ácido acético.

En el caso de los gradientes con metanol el efecto de adición del ácido es distinto al observado con el acetonitrilo. A mayor porcentaje de ácido acético mejor separación, aunque la separación es similar cuando los porcentajes varían entre 1% y 2% de ácido acético. En todos los casos el gradiente que va de 0 a 100% de disolvente orgánico en 25 minutos es el que permite separar las 12 isoflavonas con suficiente resolución.

Por lo tanto la adición de cantidades mayores de ácido en la fase móvil orgánica da lugar a interacciones que mejoran las separaciones cuando esta fase es metanol; en cambio, cuando el acetonitrilo es la fase orgánica, la mayor adición de ácido a la misma empeora la separación.

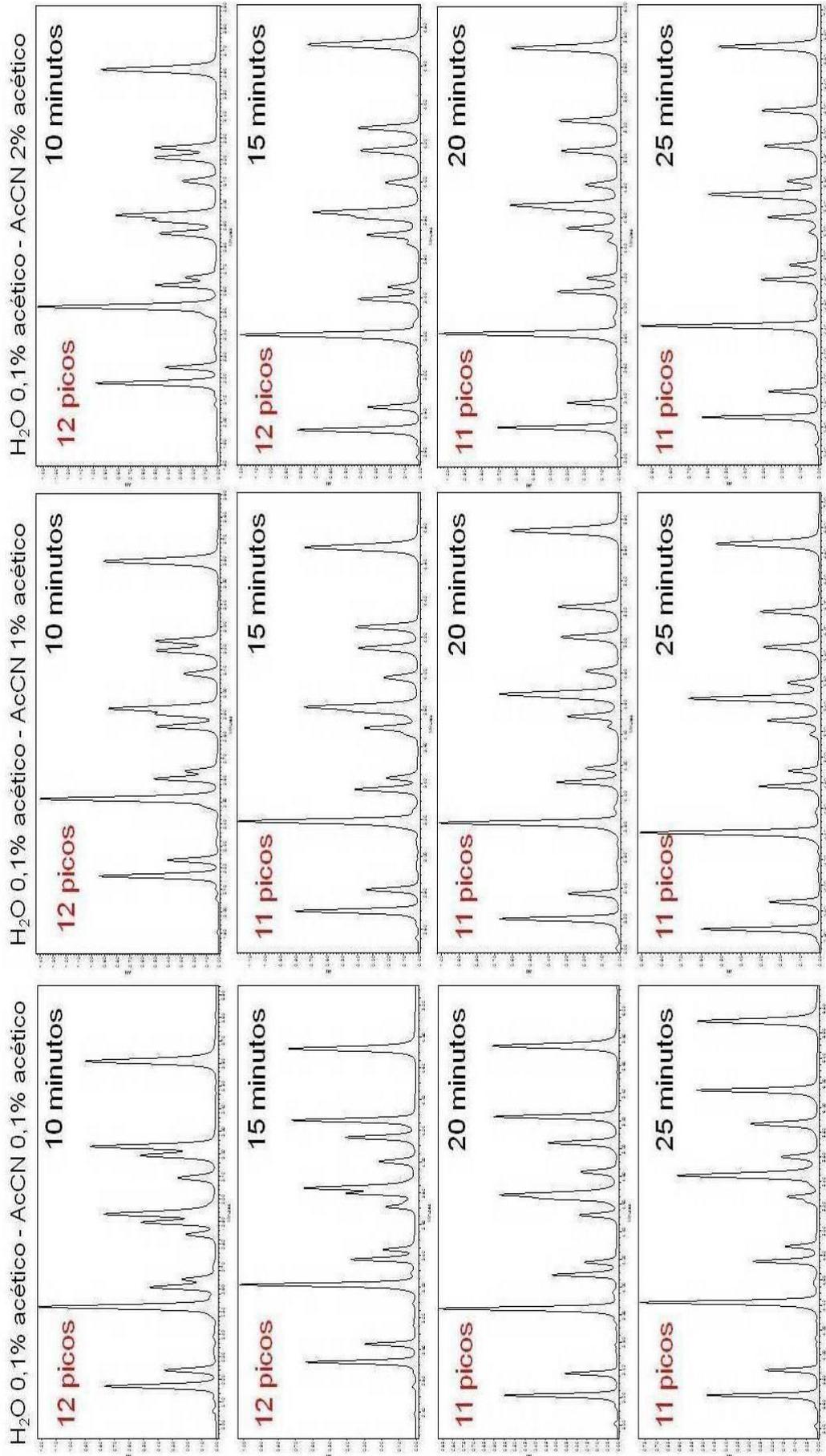


Figura 96. Cromatogramas obtenidos con los métodos de elución en gradiente de 0 a 100% de acetonitrilo (AcCN) con diferentes porcentajes de ácido acético y agua 0,1% ácido acético en 10, 15, 20 y 25 minutos. Cada pico es una o varias isoflavonas detectadas. El número de picos son una o varias isoflavonas detectadas.

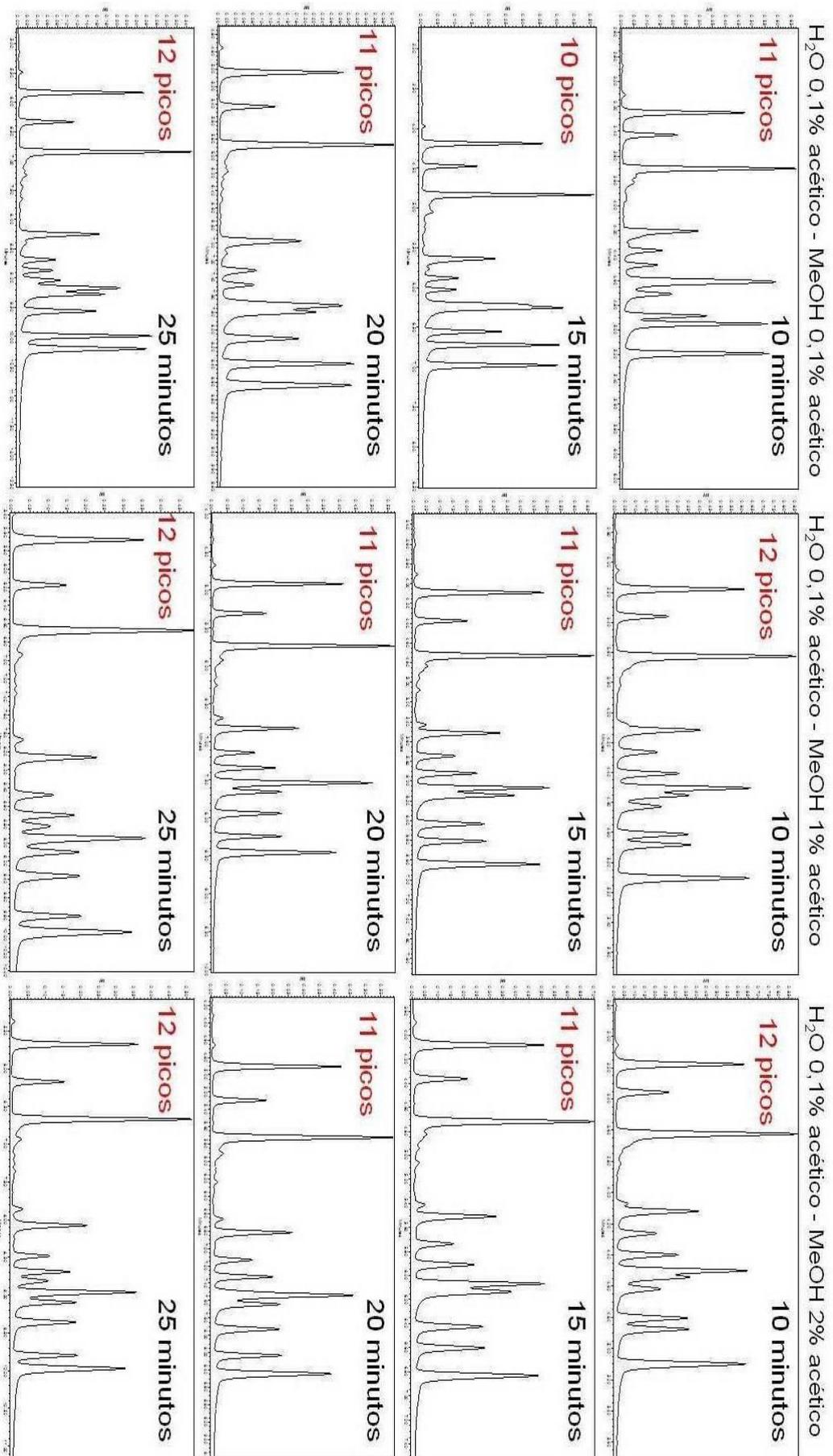


Figura 97. Cromatogramas obtenidos con los métodos de elución en gradiente de 0 a 100% de metanol (MeOH) con diferentes porcentajes de ácido acético y agua 0,1% ácido acético en 10, 15, 20 y 25 minutos. Cada pico es una o varias isoflavonas detectadas. El número de picos son una o varias isoflavonas detectadas.

Una vez estudiado el porcentaje de ácido en la fase orgánica, se varía la concentración de ácido en la fase acuosa; los resultados obtenidos con estas variaciones se muestran en las *figuras 98 y 99*.

En la *figura 98* se muestran los cromatogramas obtenidos al variar el porcentaje de ácido acético en la fase acuosa y utilizando como fase orgánica acetonitrilo 0,1% ácido acético. Al aumentar el ácido en la fase acuosa empeora la separación de las isoflavonas analizadas, sobre todo las que eluyen en el medio del cromatograma. Por lo tanto, porcentajes de ácido mayores de 0,1% no mejoran la separación cuando la fase móvil orgánica está compuesta por acetonitrilo.

En el caso de la fase móvil de metanol (*figura 99*) al aumentar el porcentaje de ácido acético en la fase acuosa mejora la separación de las 12 isoflavonas estudiadas. En concreto el gradiente con fase móvil compuesta por agua 2% ácido acético y metanol 0,1% ácido acético, utilizando un gradiente de 25 minutos, mejora la separación de todas las isoflavonas, siendo esta separación mejor que la obtenida cuando sólo se adicionaba más ácido acético al metanol (*figura 97*).

Por lo tanto utilizando acetonitrilo como fase orgánica la adición de un porcentaje mayor de ácido, ya sea en la fase acuosa o en la fase orgánica, no mejora la separación de las isoflavonas. En cambio para el caso del metanol, la adición de un mayor porcentaje de ácido, tanto en la fase acuosa como en la orgánica, mejora la separación de las isoflavonas y en concreto, la mejor separación se obtiene al adicionar un 2% de ácido acético a la fase acuosa.

Otros gradientes que se evaluaron fueron con 1 o 2% de ácido acético en ambos disolventes de la fase móvil, es decir, tanto en la fase orgánica, como en la acuosa. Los resultados no mostraron ninguna mejora con respecto a los evaluados anteriormente, por lo que se descartaron esas composiciones.

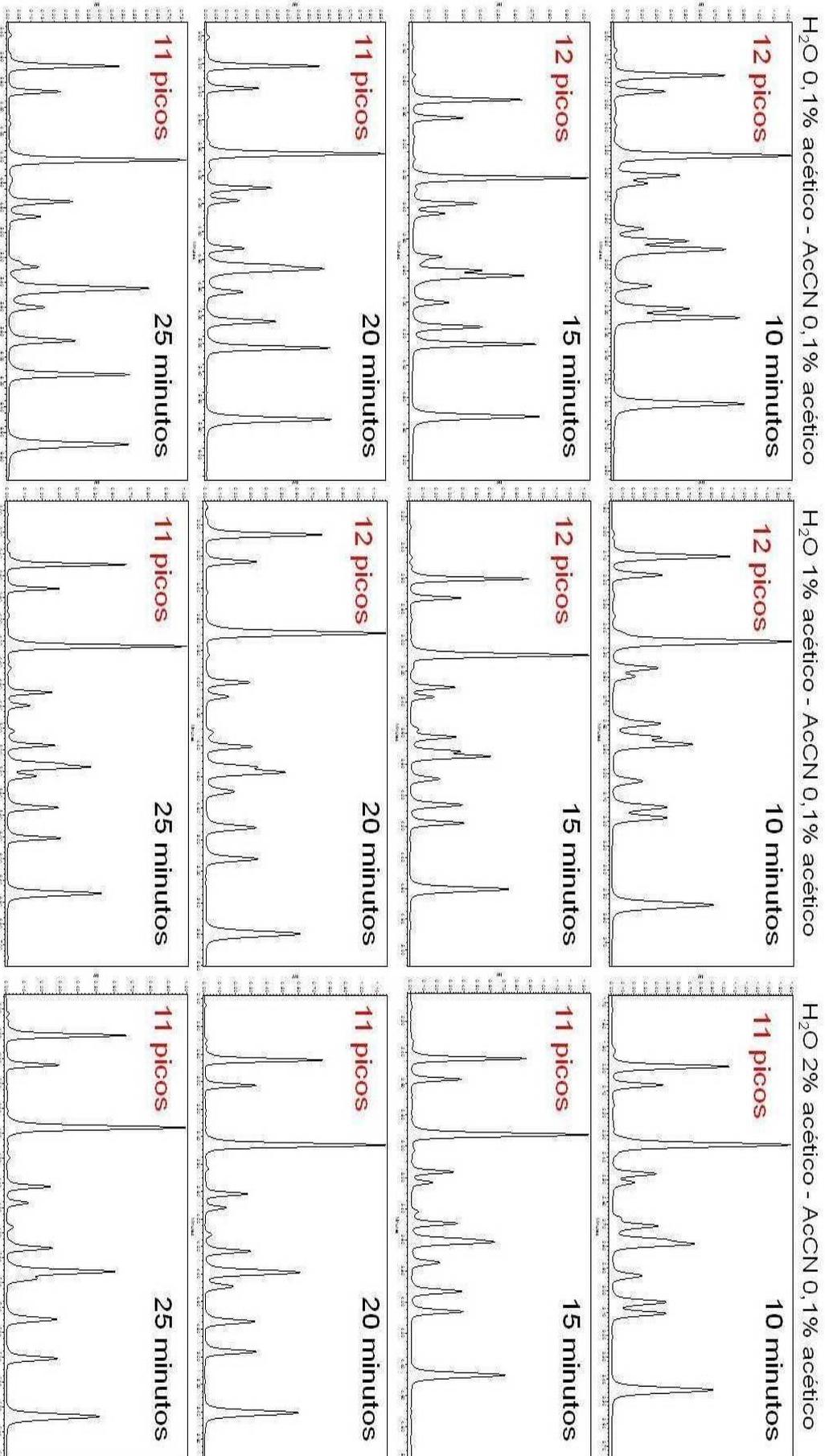


Figura 98. Cromatogramas obtenidos con los métodos en gradiente de 0 a 100% de acetonitrilo (AcCN) con 0,1% ácido acético y agua con diferentes porcentajes de ácido acético en 10, 15, 20 y 25 minutos. Cada pico es una o varias isoflavonas detectada. El número de picos son una o varias isoflavonas detectadas.

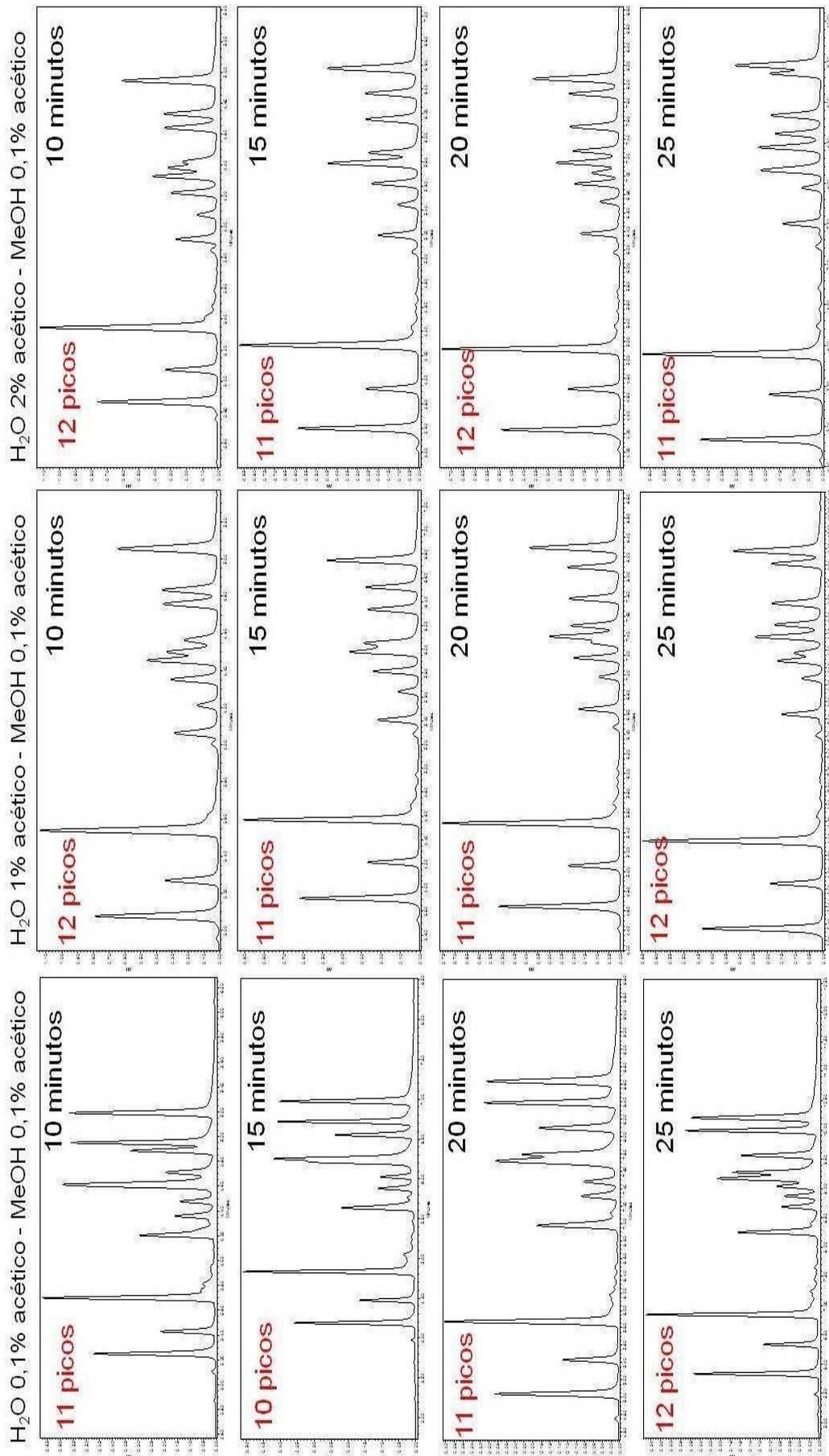


Figura 99. Cromatogramas obtenidos con los métodos en gradiente de 0 a 100% de metanol (MeOH) con 0,1% ácido acético y agua con diferentes porcentajes de ácido acético en 10, 15, 20 y 25 minutos. Cada pico es una o varias isoflavonas detectada. El número de picos son una o varias isoflavonas detectadas.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos hasta el momento en el caso del método cromatográfico utilizando acetonitrilo como fase móvil se ha comprobado que la adición de mayores porcentajes de ácido acético, tanto al agua como al acetonitrilo, no mejora la separación cromatográfica, por ello se evalúa la separación cromatográfica para un gradiente de 0 a 100% de acetonitrilo sin adición de ácido y agua con 0,1% ácido acético, ya que según los estudios de Murphy y col. 2002 [59] la acidificación de la fase móvil acuosa protona las formas malonil y favorecen su separación haciéndolas más solubles en la fase móvil y menos en la estacionaria. Los resultados obtenidos con este gradiente se muestran en la *figura 100*.

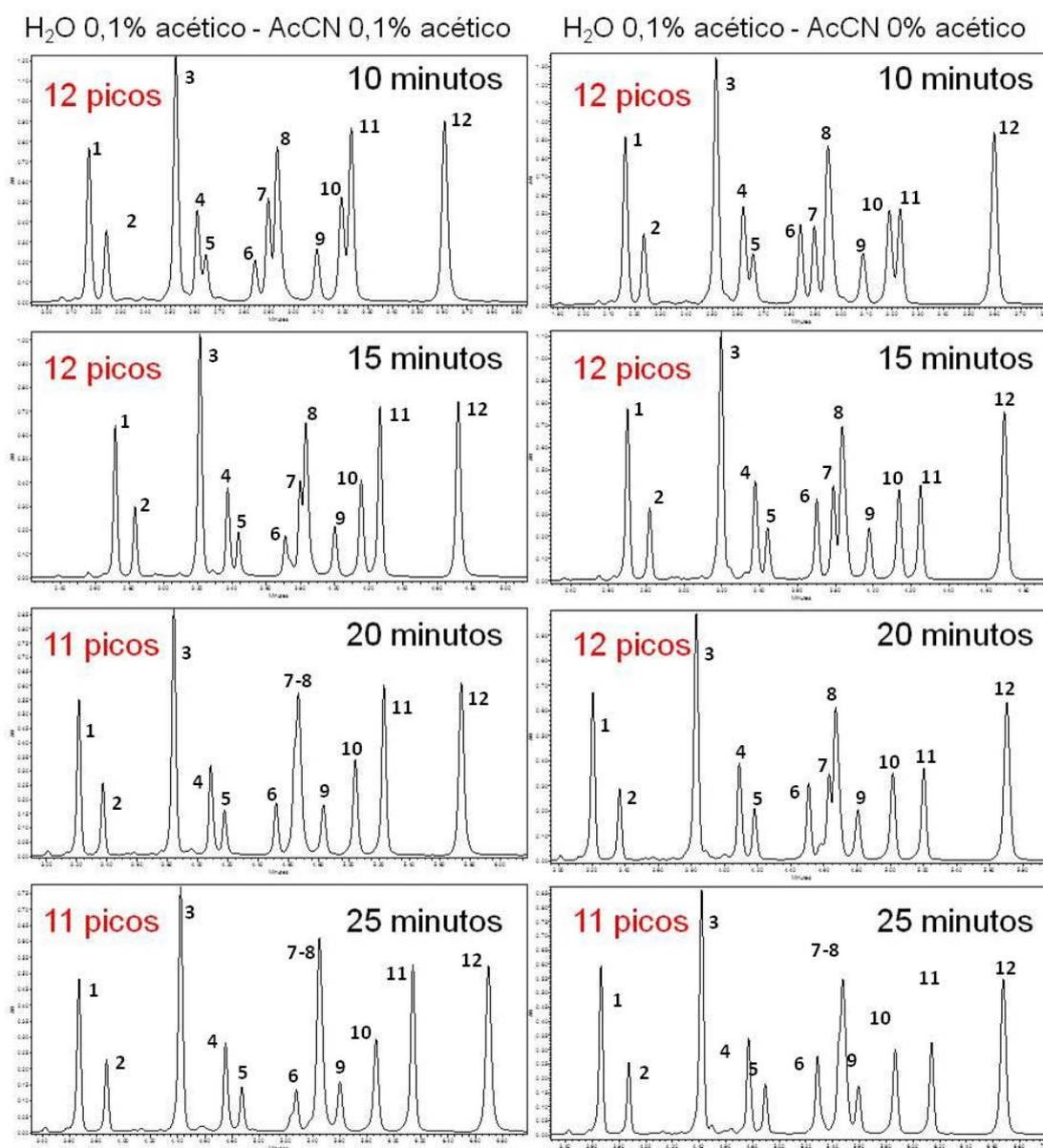


Figura 100. Cromatogramas obtenidos utilizando los métodos en gradiente de 0 a 100% de acetonitrilo (AcCN) con 0% ácido acético y agua con 0,1% ácido acético en 10, 15, 20 y 25 minutos, comparados con los de acetonitrilo con 0,1% ácido acético y agua 0,1% ácido acético. La numeración de los picos corresponde a cada una de las isoflavonas detectadas (ver tabla 69).

Como se puede observar en esta figura la separación mejora considerablemente entre 10, 15 y 20 minutos, consiguiendo la separación de las 12 isoflavonas objeto de estudio. De todos los gradientes evaluados éste, en el que sólo se acidifica el agua y el acetonitrilo no, es el que mejores resultados muestra.

En cambio para los gradientes estudiados utilizando metanol como fase móvil orgánica, la adición de ácido tanto en la fase acuosa como en la orgánica mejora la separación. Se observa en la *figura 99* que al adicionar un 2% de ácido acético en la fase acuosa se consigue la separación de las 12 isoflavonas en gradientes de menor tiempo que al adicionar el mismo porcentaje en la fase orgánica, que también mejora la separación pero en tiempos mayores. Por ello se evalúa la separación cromatográfica con gradientes de 0 a 100% de metanol 0% ácido acético y agua 2% ácido acético (*figura 101*).

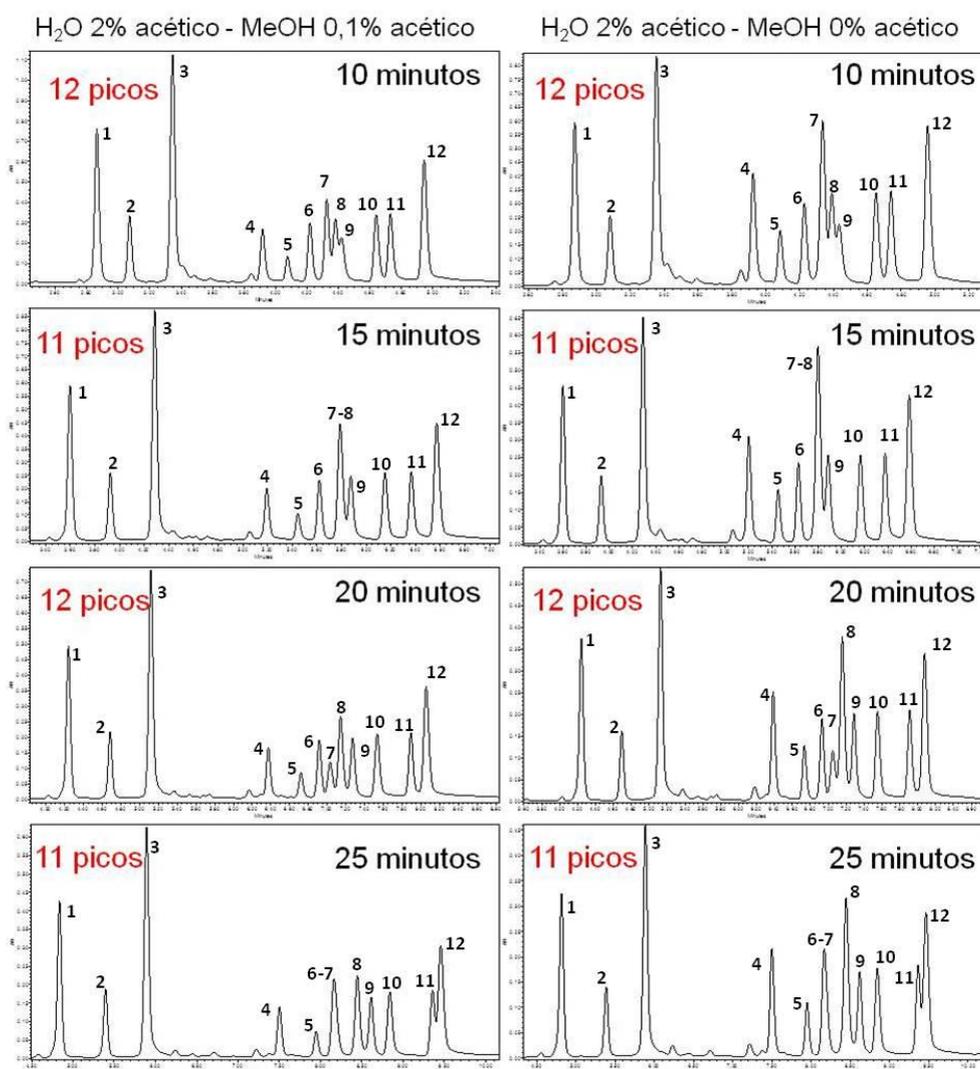


Figura 101. Cromatogramas obtenidos con los métodos en gradiente de 0 a 100% de metanol (MeOH) con 0% ácido acético y agua con 2% ácido acético en 10, 15, 20 y 25 minutos, comparados con los de metanol con 0,1% ácido acético y agua 2% ácido acético. La numeración de los picos corresponde a cada una de las isoflavonas detectadas (ver tabla 69).

Como se puede comprobar la separación con el nuevo gradiente, donde no se adiciona ácido al metanol es aceptable, pero comparándolo con la separación conseguida cuando se adiciona ácido al metanol es peor; para mejorar la separación cromatográfica de las isoflavonas utilizando metanol en la fase móvil es necesaria su ligera acidificación.

Por lo tanto, una vez evaluados todos los gradientes podemos fijar dos gradientes para la separación de las 12 isoflavonas (*tabla 71*), aunque es recomendable evaluar bien los tiempos de gradiente ya que varios tiempos dan buenos resultados en ambos casos.

Tabla 71. Gradientes que proporcionan los mejores resultados para el análisis cromatográfico de las 12 isoflavonas de soja después de la optimización de la cantidad de ácido en los disolventes de la fase móvil.

GRADIENTE ACETONITRILLO AcCN			GRADIENTE METANOL MeOH		
Temperatura	35°C		Temperatura	35°C	
Flujo	2,2 mL/min		Flujo	2,2 mL/min	
Fases móviles	A: H ₂ O 0,1% ácido acético B: AcCN		Fases móviles	A: H ₂ O 2% ácido acético B: MeOH 0,1% ácido acético	
	minutos	%B		minutos	%B
Gradiente	0	0	Gradiente	0	0
	15	100		20	100

4.2.3 La temperatura, el flujo de trabajo y el tiempo de gradiente

Una vez optimizada la composición de los disolventes de la fase móvil se trabaja en la optimización de la temperatura, el flujo de trabajo y el tiempo de gradiente para obtener un método más rápido que permita la separación de las isoflavonas.

Metanol y acetonitrilo se comportan de manera distinta con respecto a la presión de trabajo, que es la que limita la optimización (apartado 4.1.2), por lo que se va a abordar de manera diferente la optimización para cada uno de los disolventes.

En esta batería de experimentos la muestra dopada utilizada es diferente, se trata de la muestra de soja dopada 2 (*tabla 56*), en la que varía ligeramente el perfil de isoflavonas, en concreto las isoflavonas malonil daidzina y malonil glicitina se encuentran en concentración más baja.

4.2.3.1 Metanol

Debido a que con el metanol se trabaja en condiciones muy próximas al límite de presión, se intenta ajustar el gradiente sólo modificando el tiempo del mismo. Se realizan los gradientes cercanos al tiempo fijado en la *tabla 71*, 17,5 minutos y 22,5 minutos (*figura 102*), consiguiendo una mejora en la separación con el gradiente de 22,5 minutos para la mayoría de los compuestos, aunque los picos acetil daidzina y acetil glicitina empeoran su resolución.

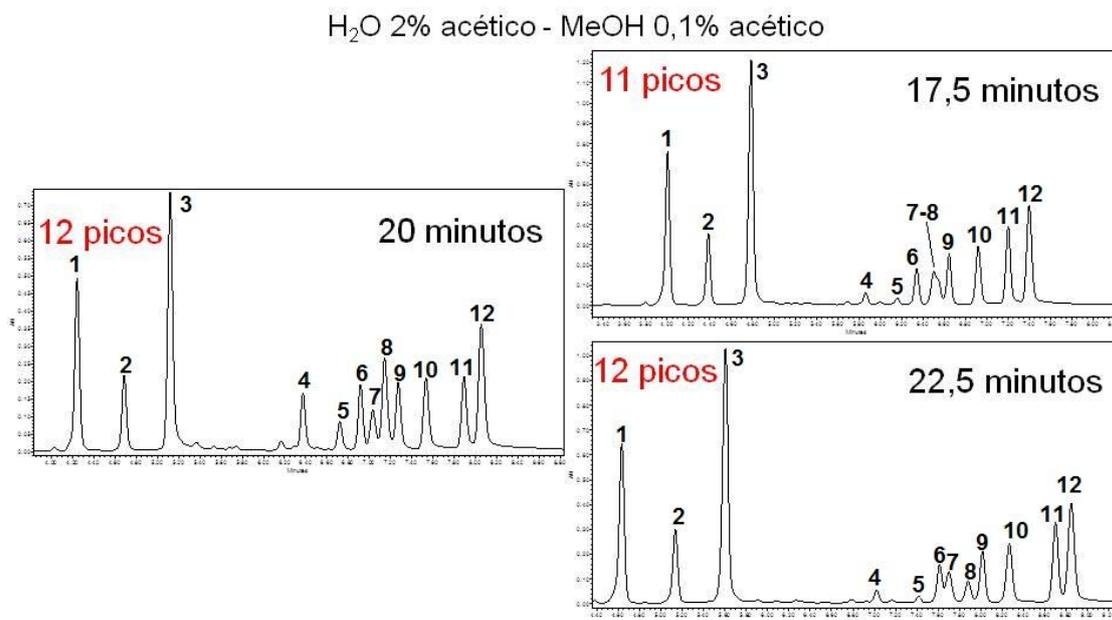


Figura 102. Cromatogramas obtenidos con los métodos en gradiente de 0 a 100% de metanol 0,1% ácido acético y agua 2% ácido acético en 17,5, 20 y 22,5 minutos. La numeración de los picos corresponde a cada una de las isoflavonas detectadas (ver tabla 69).

A la vista de los resultados se intenta mejorar la separación por medio de la variación de la temperatura. Al aumentar la temperatura la presión de trabajo disminuye, pero al disminuir la temperatura la presión aumenta, algo que hay que tener en cuenta si se va a evaluar la temperatura porque con el flujo que trabajamos, la presión está muy cerca del límite de presión de trabajo que soporta la columna. En este caso vamos a evaluar temperaturas menores de 35°C y para evitar problemas de exceso de presión se trabaja a 2,1 mL/min. En la figura 103 se muestran los cromatogramas obtenidos con las siguientes temperaturas: 35°C, 30°C y 25°C.

La disminución de la temperatura empeora la separación de los picos, en cambio trabajar a 30°C mejora la separación de algunos picos y otros la empeora. Se observa que no varía mucho la separación al cambiar de flujo por lo que se evalúa la separación a 30°C a un flujo de 2,2 mL/min (figura 104).

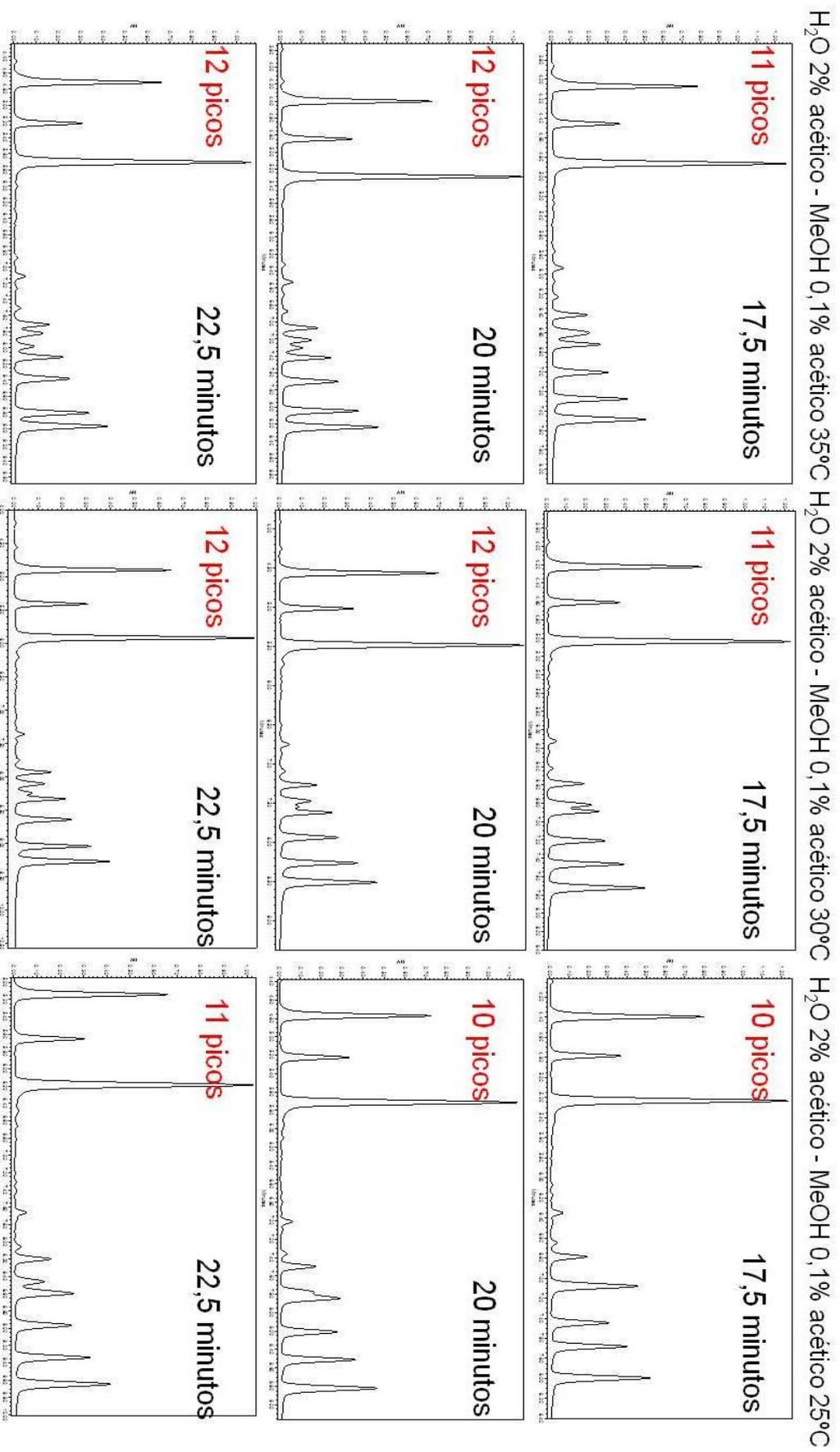


Figura 103. Cromatogramas obtenidos con los métodos en gradiente de 0 a 100% de metanol 0,1% ácido acético y agua 2% ácido acético en 17,5, 20 y 22,5 minutos con un flujo de 2,1mL/min y distintas temperaturas: 35°C, 30°C y 25°C. Cada pico es una o varias isoflavonas detectada. El número de picos son una o varias isoflavonas detectadas.

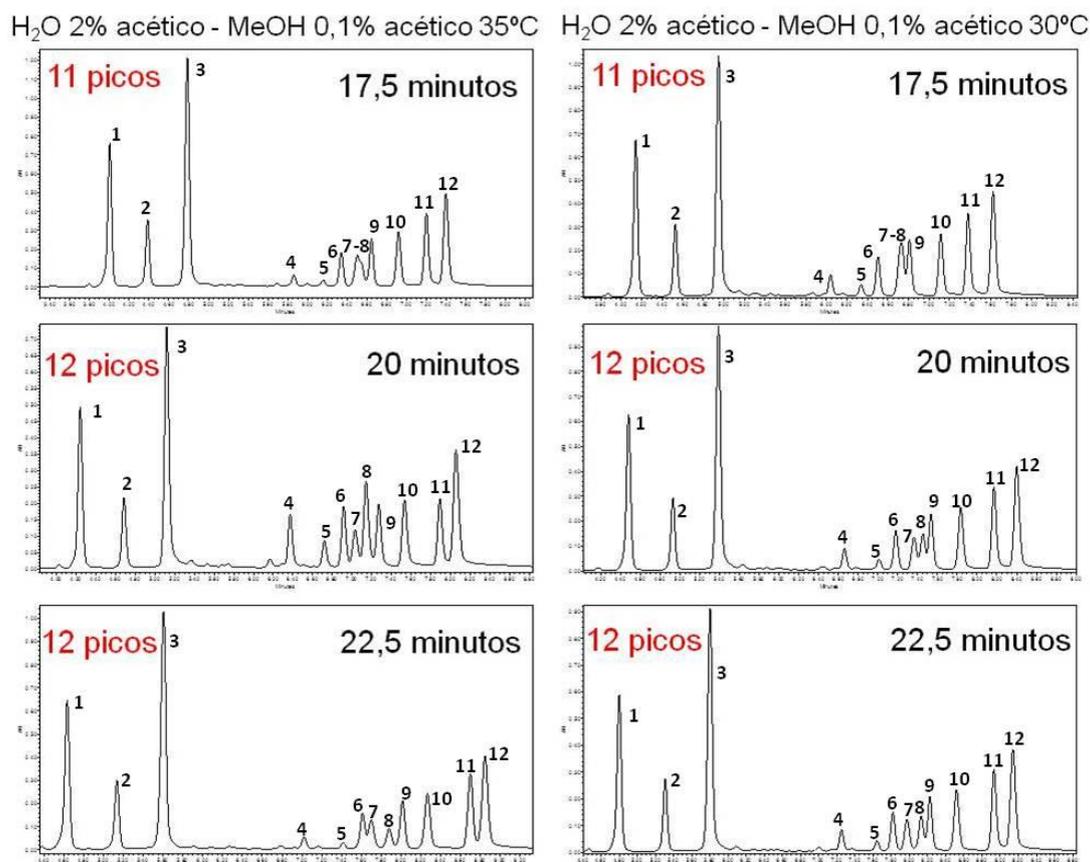


Figura 104. Cromatogramas obtenidos con los métodos en gradiente de 0 a 100% de metanol 0,1% ácido acético y agua 2% ácido acético en 17,5, 20 y 22,5 minutos a 35°C y 30°C con flujo 2,2 mL/min. El número de picos son una o varias isoflavonas detectadas. La numeración de los picos corresponde a cada una de las isoflavonas detectadas (ver tabla 69).

Como se puede observar la mejor separación se obtiene trabajando a 2,2 mL/min, a 30°C y con un tiempo de gradiente de 22,5 minutos, por lo tanto este va a ser el gradiente elegido para la separación de las 12 isoflavonas usando metanol como fase móvil. El tiempo total del gradiente es de 22,5 minutos pero la última isoflavona eluye a menos de 10 minutos, por lo que para acortar el método de análisis se acorta el método reduciendo el gradiente de 0 a 50% de fase orgánica en 11,25 minutos y añadiendo dos minutos de limpieza con 100% de fase orgánica. El paso del 50% al 100% se realiza en 2 minutos, ya que el cambio aumenta la presión y para evitar el posible deterioro de la columna al realizar variaciones bruscas de concentración, se determinó no realizar el cambio en un tiempo muy reducido.

4.2.3.2 Acetonitrilo

En el caso del método que utiliza acetonitrilo como fase móvil no tenemos el problema del aumento de presión al disminuir la temperatura, por lo que se evalúan los gradientes en 10, 15 y 20 minutos a 30°C y 25°C a un flujo 2,2 mL/min (figura 105).

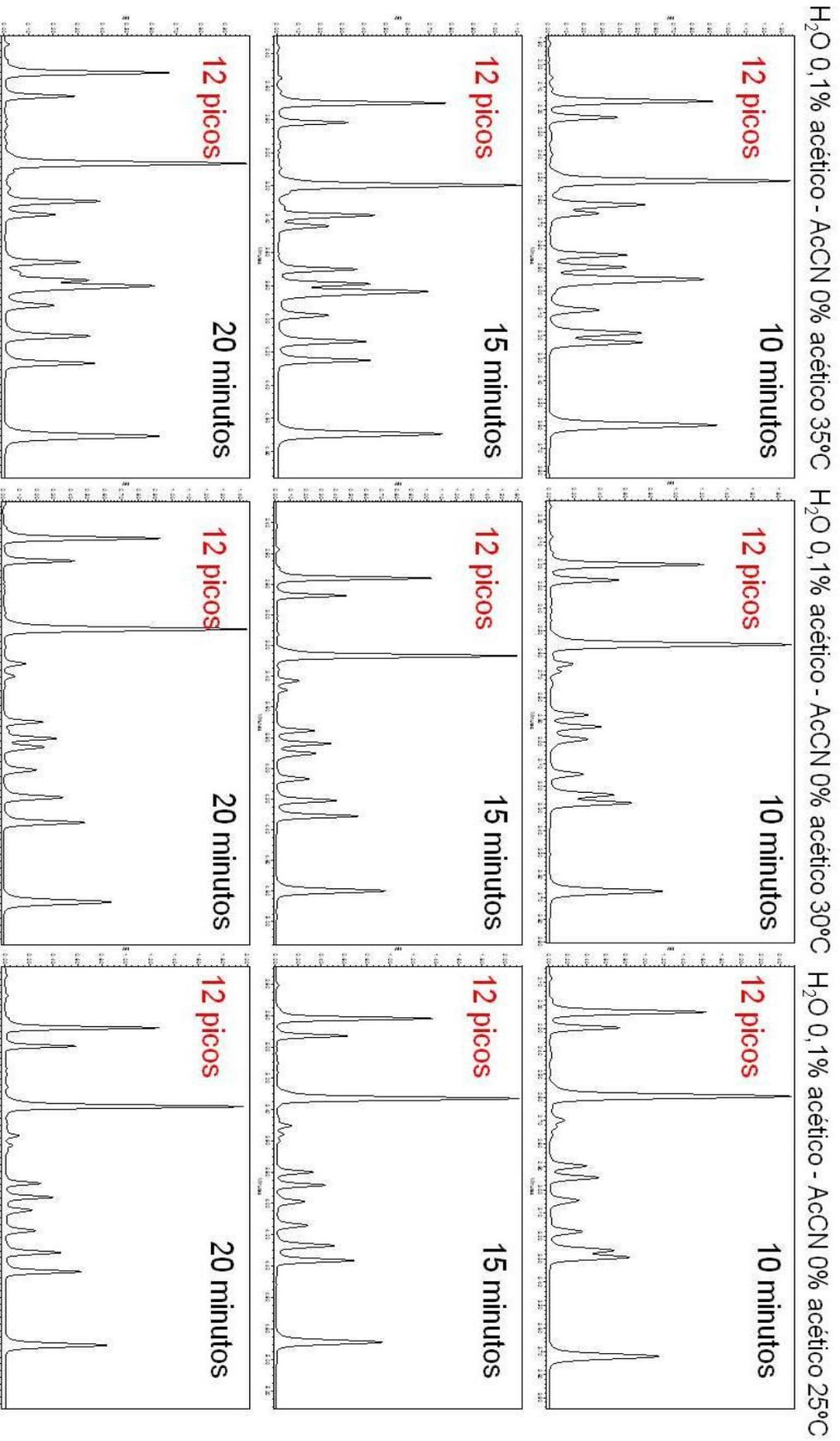


Figura 105. Cromatogramas obtenidos con los métodos en gradiente de 0 a 100% de acetonitrilo (AcCN) y agua 0,1% ácido acético en 10, 15 y 20 minutos con un flujo de 2,2mL/min y distintas temperaturas: 35°C, 30°C y 25°C. Cada pico es una o varias isoflavonas detectadas.

Con 15 y 20 minutos de gradiente la reducción de la temperatura a 25°C aumenta considerablemente la separación de las isoflavonas, por lo que esa es la temperatura a utilizar en el análisis para el análisis cromatográfico usando acetonitrilo como fase móvil.

Una vez seleccionada la temperatura se ajusta el gradiente en torno a los tiempos que mejores resultados mostraban. En la *figura 106* se muestran los cromatogramas obtenidos a una temperatura de 25°C a 15, 17,5, 20 y 22,5 minutos de gradiente.

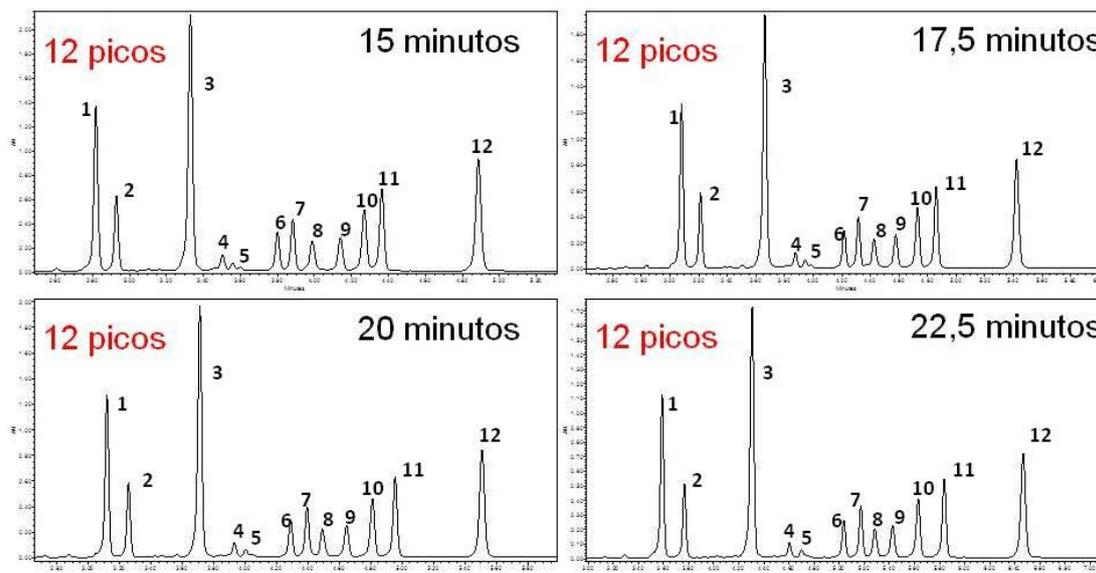


Figura 106. Cromatogramas obtenidos con los métodos en gradiente de 0 a 100% de acetonitrilo y agua 0,1% ácido acético en 15, 17,5, 20 y 22,5 minutos a 25°C con flujo 2,2 mL/min. El número de picos son una o varias isoflavonas detectadas. La numeración de los picos corresponde a cada una de las isoflavonas detectadas (ver tabla 20).

La mejor separación para todas las isoflavonas se obtiene para el gradiente de 22,5 minutos. Cuando la fase móvil está compuesta por acetonitrilo la última isoflavona eluye antes de los 7 minutos por lo tanto, podemos acortar el gradiente y realizar un gradiente de 0 a 50% de fase orgánica en 11,25 minutos.

Una vez seleccionada la temperatura y el gradiente, y debido a que se trabaja con acetonitrilo, que genera menor presión de trabajo, se puede aumentar el flujo y así obtener un análisis más rápido. Por ello se estudió a qué flujo se obtenía la máxima presión posible de trabajo sin riesgo para la columna, según las especificaciones de la misma. Ese flujo fue de 2,9 mL/min; por lo tanto se aplicó el factor de cambio de flujo al gradiente optimizado, es decir, se multiplicó al tiempo por el flujo antiguo (2,2) y se dividió por el nuevo flujo (2,9) siendo el nuevo tiempo final de gradiente 8,52 minutos. Inyectando la muestra con este método cromatográfico se obtiene el cromatograma que se muestra en la *figura 107*, donde se consigue la separación total de las 12 isoflavonas de estudio en menos de 6 minutos.

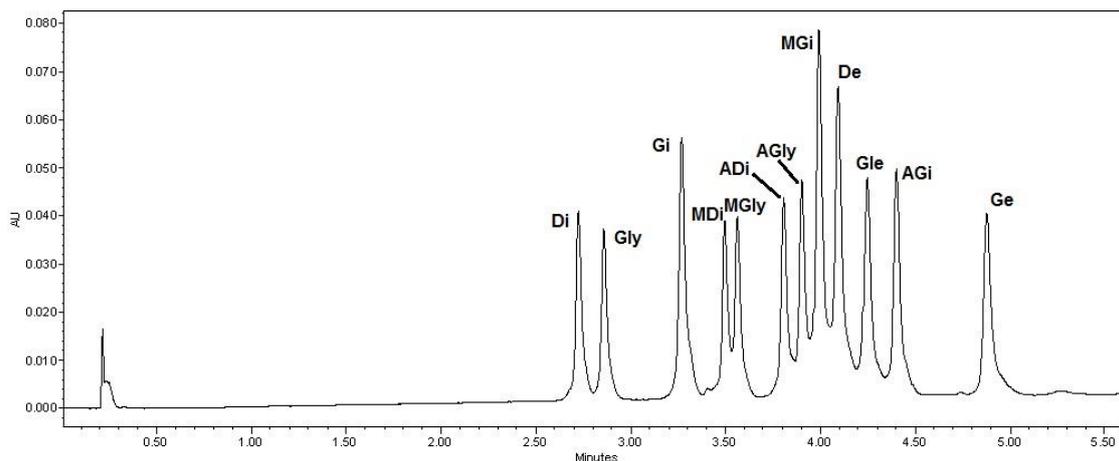


Figura 107. Cromatograma de las 12 isoflavonas con el método cromatográfico usando agua 0,1% ácido acético y acetonitrilo a 25°C y un flujo de 2,9 mL/min.

Por lo tanto, el nuevo método consiste en 8,52 minutos de gradiente de 0 a 50% de acetonitrilo seguido de un cambio brusco al 100% de acetonitrilo y 2 minutos de lavado de columna con esa composición. Al contrario que con el metanol, en el caso del acetonitrilo la variación de presión con la composición de la fase móvil en mezclas acuosas es menor, tal y como se ha comprobado en el apartado 4.1.2, y por ello no se producen esos deterioros de la columna.

4.2.4 Tiempo de re-equilibrado

El análisis cromatográfico incluye tanto el tiempo de separación, como la limpieza de la columna y el tiempo de re-equilibrado, que es el tiempo necesario para que la columna quede en las condiciones iniciales necesarias para realizar una nueva inyección. En este estudio el tiempo de separación para ambos disolventes es de 11,25 minutos y 8,52 minutos, respectivamente, y se han utilizado 2 minutos con un 100% de la fase orgánica como tiempo de lavado; como tiempo de re-equilibrado se han utilizado 20 minutos. Por lo tanto el tiempo total de análisis es superior a 30 minutos, pero ese tiempo se puede reducir con la optimización del tiempo de re-equilibrado ya que según las especificaciones del fabricante y los estudios anteriores con columnas monolíticas [31, 32, 38, 39, 41] el tiempo utilizado es excesivo.

Para la optimización del tiempo de re-equilibrado se estudian tiempos de re-equilibrado menores, siendo estos tiempos de 1, 2, 3, 4 y 5 minutos ($n=3$); los valores de variabilidad obtenidos se muestran en la *tabla 72*.

Según los resultados obtenidos para el método donde se usa acetonitrilo como fase móvil, el tiempo de re-equilibrado que menores porcentajes de variabilidad produce tanto para el área de pico, como para el tiempo de retención de todas las isoflavonas estudiadas, es 4 minutos. En cambio para el método que utiliza metanol como fase móvil el tiempo de re-equilibrado que menor variabilidad proporciona es de 1 minuto. El fabricante del sistema cromatográfico (Waters) establece que el rango de

precisión normal de distribución de disolvente (incluyendo mezcla de disolventes y flujo) está entre 0,5 y 1% (desviación estándar relativa). Este valor depende del flujo y del volumen de la bomba sistólica (establecido en 100 µL en este caso), pero la variabilidad observada para los dos métodos está dentro del rango de variabilidad del sistema cromatográfico.

Tabla 72. Desviaciones estándar relativas (RSD) (n=3) en porcentaje de áreas y tiempos de retención para las 12 isoflavonas estudiadas con varios tiempos de re-equilibrado (1, 2, 3, 4 y 5 minutos (min)) con los distintos métodos optimizados.

ACETONITRILLO											
tiempo de equilibrado	5 min		4 min		3 min		2 min		1 min		
isoflavona	tiempo de retención										
	RSD	área RSD									
Di	0,33	1,93	0,33	0,44	0,16	2,17	0,05	2,07	0,32	0,37	
Gly	0,29	1,89	0,38	0,47	0,19	2,12	0,03	2,03	0,28	0,28	
Gi	0,16	1,90	0,34	0,36	0,18	2,10	0,03	2,12	0,24	2,82	
MDi	0,10	1,59	0,24	0,39	0,18	2,15	0,02	1,97	0,20	0,28	
MGly	0,08	2,36	0,20	0,89	0,18	2,81	0,03	1,50	0,20	0,20	
ADi	0,03	1,67	0,14	0,26	0,13	2,13	0,03	1,85	0,19	0,12	
AGly	0,02	9,68	0,12	0,44	0,10	2,15	0,03	1,96	0,19	0,21	
MGi	0,10	1,69	0,13	0,27	0,10	2,07	0,03	1,74	0,17	0,41	
De	0,13	2,50	0,12	0,43	0,09	2,08	0,02	1,81	0,19	0,20	
Gle	0,07	1,78	0,10	0,32	0,09	2,10	0,01	1,91	0,17	0,13	
AGi	0,04	1,35	0,06	0,40	0,09	2,04	0,02	1,91	0,14	0,18	
Ge	0,13	1,87	0,06	0,38	0,09	2,13	0,02	2,53	0,13	0,29	

METANOL											
tiempo de equilibrado	5 min		4 min		3 min		2 min		1 min		
isoflavona	tiempo de retención										
	RSD	área RSD									
Di	0,09	1,24	0,27	1,72	0,02	0,72	0,07	0,59	0,12	0,34	
Gly	0,07	1,18	0,24	1,68	0,06	0,58	0,08	0,34	0,11	0,17	
Gi	0,07	1,41	0,20	1,74	0,07	0,68	0,07	0,40	0,07	0,37	
MDi	0,09	0,78	0,13	1,02	0,14	5,59	0,15	5,40	0,16	0,26	
MGly	0,08	0,99	0,12	1,19	0,14	1,34	0,16	1,05	0,15	1,10	
ADi	0,08	0,86	0,11	1,45	0,15	0,32	0,13	0,65	0,15	0,63	
AGly	0,09	1,02	0,12	1,64	0,10	0,27	0,11	0,75	0,13	0,95	
MGi	0,07	0,81	0,12	0,93	0,13	0,17	0,10	0,33	0,14	0,18	
De	0,06	0,60	0,12	1,70	0,15	0,22	0,10	0,31	0,14	0,92	
Gle	0,06	1,17	0,12	1,48	0,12	0,29	0,09	0,61	0,14	0,74	
AGi	0,03	0,93	0,11	1,49	0,13	0,04	0,10	0,24	0,14	0,42	
Ge	0,04	1,19	0,11	1,80	0,10	0,22	0,09	0,36	0,13	0,36	

Que el tiempo de re-equilibrado para el método que usa acetonitrilo sea mayor que el que usa metanol concuerda con el mayor flujo que se usa para el método

de acetonitrilo y que necesita un tiempo mayor para que se establezcan las condiciones iniciales del análisis.

De esta manera el método cromatográfico para la separación de las 12 isoflavonas que utiliza acetonitrilo como fase móvil dura 15,01 minutos en total, mientras que el método que utiliza metanol son 16,01 minutos, tal y como se puede comprobar en el siguiente apartado.

4.2.5 Método optimizado y reproducibilidad

En la *tabla 73* se muestran los métodos con gradientes lineales optimizados en este capítulo; en ellos están incluidos los tiempos de gradiente necesarios para la separación, el tiempo de lavado y el de re-equilibrado. Los cromatogramas obtenidos con estos métodos al analizar una muestra de soja dopada son los que se muestran en la *figura 108*.

Tabla 73. Métodos cromatográficos optimizados para el análisis cromatográfico de las 12 isoflavonas con una columna monolítica.

GRADIENTE ACETONITRILIO AcCN			GRADIENTE METANOL MeOH		
Temperatura	25°C		Temperatura	30°C	
Flujo	2,9 mL/min		Flujo	2,2 mL/min	
Fases móviles	A: H ₂ O 0,1% ácido acético B: AcCN		Fases móviles	A: H ₂ O 2% ácido acético B: MeOH 0,1% ácido acético	
	minutos	%B		minutos	%B
	0,00	0		0,00	0
	8,52	50		11,25	50
Gradiente	8,53	100	Gradiente	13,00	100
	11,00	100		15,00	100
	11,01	0		15,01	0
	15,01	0		16,01	0

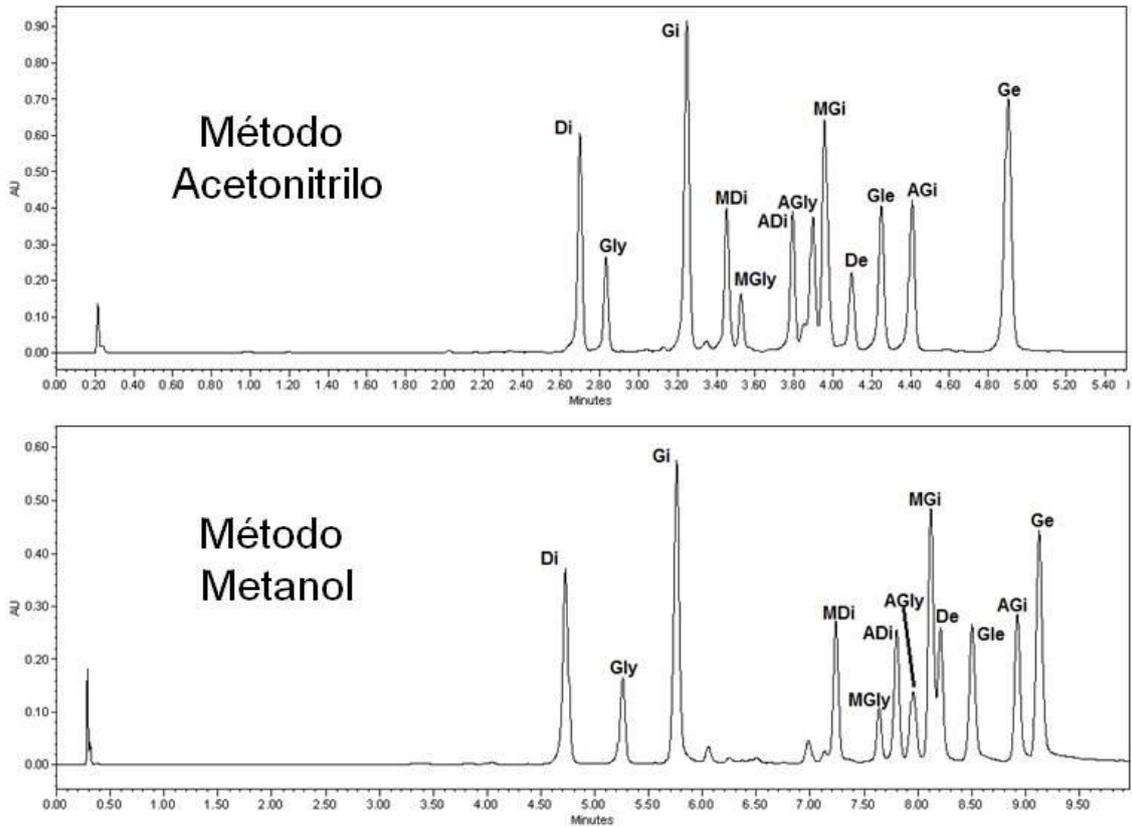


Figura 108. Cromatogramas obtenidos al analizar la muestra de soja dopada con los métodos cromatográficos optimizados para la columna monolítica.

Usando la mezcla patrón de 12 isoflavonas (apartado 3.4.1) se han calculado los parámetros cromatográficos obtenidos con cada uno de los métodos (tabla 74).

Tabla 74. Parámetros cromatográficos obtenidos con la columna monolítica con cada uno de los métodos cromatográficos desarrollados en este apartado. RSD: desviación estándar relativa en %; tr: tiempo de retención.

ACETONITRILLO								
Isoflavona	Tiempo de retención	RSD	Anchura de pico	Platos teóricos/metro	Asimetría	Factor de Retención	Factor de Selectividad	Resolución
	(minutos)	tr	(segundos)	(N/m)	A	K'	α	Rs
Di	2,68	0,44	5,65	110	0,84	11,5		
Gly	2,82	0,42	6,22	155	0,85	12,1	1,05	3,29
Gi	3,23	0,37	9,46	159	0,96	14,1	1,16	9,36
MDi	3,44	0,28	6,67	315	0,88	15,0	1,07	4,42
MGly	3,52	0,26	3,98	332	1,05	15,4	1,02	1,70
ADi	3,78	0,22	7,92	329	0,93	16,6	1,08	5,95
AGly	3,88	0,21	3,39	248	1,14	17,1	1,03	2,16
MGi	3,94	0,21	5,77	317	1,19	17,4	1,02	1,18
De	4,08	0,26	5,60	282	0,95	18,0	1,04	2,55
Gle	4,23	0,21	9,68	296	0,86	18,7	1,04	2,91
AGi	4,39	0,17	11,76	383	0,80	19,5	1,04	3,13
Ge	4,89	0,22	15,26	301	0,95	21,8	1,12	8,84
Media		0,27	7,61	269	0,95	16,4	1,06	4,14
METANOL								
Isoflavona	Tiempo de retención	RSD	Anchura de pico	Platos teóricos/metro	Asimetría	Factor de Retención	Factor de Selectividad	Resolución
	(minutos)	tr	(segundos)	(N/m)	A	K'	α	Rs
Di	4,72	0,18	19,51	192	0,85	16,2		
Gly	5,24	0,16	21,72	211	0,89	18,1	1,12	5,70
Gi	5,74	0,14	9,68	206	1,14	20,0	1,10	5,41
MDi	7,22	0,15	9,35	243	0,95	25,4	1,27	16,27
MGly	7,62	0,16	10,45	276	1,01	26,8	1,06	4,61
ADi	7,79	0,15	9,28	316	0,97	27,4	1,02	1,90
AGly	7,93	0,15	8,25	275	1,03	28,0	1,02	1,49
MGi	8,10	0,16	12,57	218	0,92	28,6	1,02	1,64
De	8,19	0,15	13,89	269	1,24	28,9	1,01	0,96
Gle	8,48	0,15	13,11	296	1,14	30,0	1,04	2,80
AGi	8,90	0,13	19,42	335	1,25	31,5	1,05	4,21
Ge	9,10	0,14	19,51	287	1,11	32,2	1,02	1,97
Media		0,15	14,44	260	1,04	26,1	1,07	4,27

Con el método desarrollado con acetonitrilo como fase móvil la última isoflavona eluye en menos de 5 minutos. La variación en el tiempo de retención es menor del 1% y la resolución entre los picos es mayor de 1,5 para la mayoría; la peor

resolución es para la acetil glicitina que sale junto a la malonil genistina sin embargo, ambos compuestos son perfectamente cuantificables.

En cambio para el método que utiliza metanol como fase móvil la última isoflavona en eluir lo hace a los 9,10 minutos, el doble de tiempo que en el método con acetonitrilo. Se comprueba que usando metanol como fase móvil los picos son más anchos y la resolución para las isoflavonas que eluyen en el medio, como la acetil glicitina y la malonil genistina, es menor; en concreto se observan resoluciones menores de 1,5 para la acetil daidzina con la acetil glicitina y para la malonil genistina con la daidzeína. El resto de parámetros son similares en ambos métodos.

Algo a tener en cuenta comparándolo con los parámetros cromatográficos obtenidos en el apartado 4.1.4, *tabla 62*, donde se traspasaban dos métodos de una columna particulada convencional a una columna monolítica, es que en estos métodos desarrollados se consigue la separación de las 12 isoflavonas objeto de estudio obteniendo buenos valores de los parámetros cromatográficos; en concreto, el número de platos teóricos/metro es mucho mayor en estos nuevos métodos y los picos obtenidos son más simétricos.

El calibrado realizado para ambos métodos se muestra en la *tabla 75*, siendo los coeficientes de regresión (R^2) para todas las isoflavonas resueltas mayores de 0,9723.

Tabla 75. Curvas de calibrado obtenidas con la columna monolítica (CM) para cada isoflavona con cada uno de los métodos cromatográficos desarrollados.

Isoflavona	METANOL			Isoflavona	ACETONITRILLO		
	Ordenada	Pendiente	R^2		Ordenada	Pendiente	R^2
Di	-3711	31177	0,9998	Di	-6509	23824	0,9996
Gly	-10006	28745	0,9988	Gly	-12022	22019	0,9988
Gi	-29426	44196	0,9976	Gi	-20126	33877	0,9982
MDi	-2736	8930	0,9789	MDi	-1270	6834	0,9782
MGly	-6312	9053	0,9856	MGly	-8612	6617	0,9983
ADi	-1312	92229	0,9999	ADi	-19433	16053	0,9892
AGly	-35282	52991	0,9976	AGly	-24132	40618	0,9982
MGi	6797	11708	0,9968	MGi	3118	9072	0,9975
De	-36684	31517	0,9985	De	-15592	24278	0,9995
Gle	-31488	27016	0,9732	Gle	-46303	21409	0,9723
AGi	-1968	16292	1,0000	AGi	4167	12407	0,9997
Ge	-84321	41125	0,9930	Ge	-10516	31746	0,9997

La concentración y los valores de reproducibilidad en los tiempos de retención obtenidos en el análisis de la muestra de extracto de proteína, se muestran en la *tabla 76*.

Tabla 76. Datos de reproducibilidad para el tiempo de retención y concentración de cada uno de los compuestos en la muestra de extracto de proteína de soja analizados con los dos métodos desarrollados con la columna monolítica. RSD: desviación estándar relativa en %.

Isoflavona	METANOL				Isoflavona	ACETONITRILLO			
	Tiempo de retención		Concentración media			Tiempo de retención		Concentración media	
	minutos	RSD*	µg/g	RSD		minutos	RSD*	µg/g	RSD
Di	4,76	0,18	217	0,81	Di	2,67	0,45	199	7,76
Gly	5,28	0,16	34,0	0,27	Gly	2,80	0,44	42,7	4,02
Gi	5,78	0,14	272	0,35	Gi	3,22	0,39	240	3,87
MDi	7,25	0,15	95,2	6,75	MDi	3,45	0,30	177	1,51
MGly	7,55	0,16	41,9	3,90	MGly	3,52	0,27	68,5	2,54
ADi	7,80	0,15	50,2	0,25	ADi	3,79	0,23	74,8	7,92
AGly	7,94	0,15	34,7	2,20	AGly	3,90	0,22	38,1	1,23
MGi	8,13	0,16	137	9,45	MGi	3,99	0,22	161	8,81
De	8,18	0,15	80,6	7,41	De	4,04	0,28	54,6	0,85
Gle	8,52	0,14	95,6	4,97	Gle	4,11	0,23	123	0,93
AGi	8,91	0,13	552	0,83	AGi	4,43	0,19	528	9,11
Ge	9,12	0,14	105	0,68	Ge	4,93	0,23	29,3	0,71
Total			1715		Total			1736	

Para ambos métodos las variabilidades en los tiempos de retención son menores del 0,5%, siendo mayores las del método de acetonitrilo que las del método con metanol. Esta diferencia puede ser debida al mayor flujo que puede hacer más variable el tiempo de retención de los compuestos al ser menor su tiempo de equilibrio entre las fases. Pero a pesar de ello son variabilidades muy pequeñas.

En cambio las variabilidades en la concentración son mayores del 10% para ambos métodos, siendo mayor para el método de acetonitrilo. Estas variabilidades son debidas tanto al método de extracción como al método de análisis. Se observan diferencias entre algunos compuestos según el método de análisis utilizado, como por ejemplo entre las concentraciones de la malonil genistina y la daidzeína. Estas diferencias pueden ser debidas a la baja resolución observada en el método utilizando metanol como fase móvil (tabla 74) que puede dar lugar a errores en la cuantificación de los mismos.

4.2.6 Conclusiones

En este capítulo se han desarrollado dos métodos cromatográficos rápidos y reproducibles con una columna monolítica para el análisis de las 12 isoflavonas de soja. Para ello se han optimizado los métodos atendiendo a cada uno de los parámetros cromatográficos por separado: modo de elución isocrático o en gradiente, composición de la fase móvil, temperatura, flujo y tiempo de re-equilibrado.

Mediante el método desarrollado usando como fase móvil metanol, se consigue la separación de las 12 isoflavonas en 9,10 minutos y un tiempo total de análisis, incluyendo limpieza de columna y tiempo de re-equilibrado, de 16,01 minutos. El método muestra buenas características cromatográficas para casi todas las isoflavonas estudiadas en términos de sus parámetros cromatográficos como resolución, asimetría, reproducibilidad...

El método desarrollado usando como fase móvil acetonitrilo muestra mejores condiciones de separación puesto que se consigue la separación de las 12 isoflavonas en menos de 5 minutos y con un tiempo total de análisis de 15,01 minutos.

Ambos métodos permiten el análisis de las 12 isoflavonas de soja en tiempos cortos que permiten agilizar los trabajos en el laboratorio y aumentar el número de muestras que se pueden analizar al día sin perder eficacia ni reproducibilidad en los mismos.

4.3 DESARROLLO DE UN MÉTODO DE ANÁLISIS RÁPIDO DE ISOFLAVONAS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICACIA USANDO UNA COLUMNA DE PARTÍCULAS RECUBIERTAS, O FUSED-CORE

Como se ha comprobado en el apartado 4.1 la columna de partículas recubiertas, o *fused-core*, es, de las columnas evaluadas, la que mejor comportamiento cromatográfico mostraba, dando lugar a los picos más estrechos, la mayor resolución y los tiempos de análisis más cortos.

Por tanto, se va a optimizar el método cromatográfico de análisis de las 12 principales isoflavonas de soja partiendo del obtenido en el apartado 4.1 y utilizando una estrategia de optimización paso a paso, para cada una de las condiciones cromatográficas.

4.3.1 Condiciones iniciales

Una vez conseguidas unas condiciones cromatográficas que permiten la separación de todas las isoflavonas en la columna de partículas recubiertas (apartado 4.1 de este capítulo: *tabla 58* y *figura 83*), se usa la estrategia de aumentar tanto la temperatura como el flujo para reducir el tiempo de análisis.

Para ello se van a estudiar distintas temperaturas de trabajo (25-50°C), distintos flujos (1,2-2,7 mL/min) y distintos tiempos de re-equilibrado (1-5 minutos) utilizando para ello la mezcla de patrones de las 12 isoflavonas objeto de estudio (*tabla 55*).

El método inicial con el que se comienza la optimización se muestra en la *tabla 77*, y el cromatograma de las 12 isoflavonas obtenido con dicho método inicial en la *figura 109*. Se conseguía la separación de las 12 isoflavonas de soja en 18,49 minutos aproximadamente, con un tiempo de equilibrado que se puede reducir de 20 a 5 minutos (según fabricante de la columna), siendo el tiempo total del análisis, con limpieza de columna y re-equilibrado incluido de 35 minutos. Los parámetros cromatográficos que se obtienen con este método se muestran en la *tabla 59* del apartado 4.1 de este capítulo.

Tabla 77. Condiciones cromatográficas del método inicial para el análisis de 12 isoflavonas de soja utilizando una columna de partículas recubiertas, fused-core, y acetonitrilo como fase móvil.

COLUMNA DE PARTÍCULAS RECUBIERTAS, FUSED-CORE		
Kinetex™ C18, 2,6 µm, 100x4,6 mm		
Flujo	1,2 mL/min	
Temperatura	25 °C	
Fases móviles	Fase A	Agua 1% ácido acético
	Fase B	Acetonitrilo
Gradiente	Tiempo (min)	% B
	0,00	8
	2,33	15
	8,00	17
	15,33	24
	20,00	50
	23,00	100
	28,00	100
	30,00	8

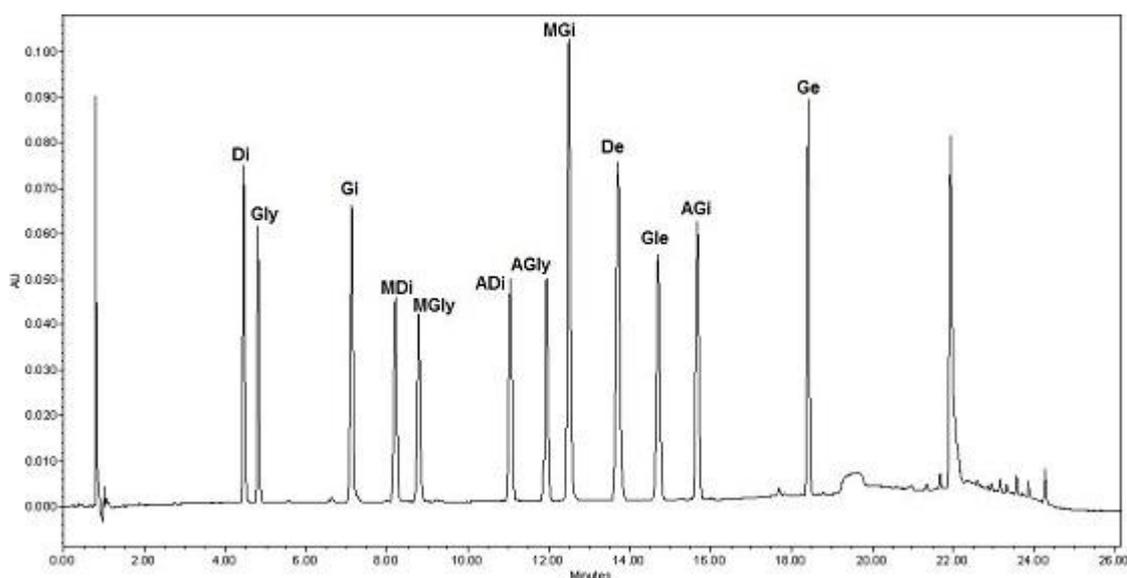


Figura 109. Cromatograma de la mezcla de patrones de las 12 isoflavonas de soja estudiadas con el método cromatográfico inicial usando una columna de partículas recubiertas, fused-core, y acetonitrilo como fase móvil.

4.3.2 Temperatura de la columna

El uso de altas temperaturas es una forma útil de reducir el tiempo de análisis debido a que la viscosidad de la fase móvil se reduce significativamente, lo cual reduce la presión a través de la columna permitiendo elevadas velocidades lineales de la fase móvil [60]. La difusión es directamente proporcional a la temperatura e inversamente proporcional a la viscosidad. La baja viscosidad y la alta difusividad de la fase móvil a altas temperaturas producen menos resistencia a la transferencia de

masas, lo cual hace que aumente la eficacia de la columna y además que se puedan utilizar flujos lineales altos sin afectar la eficacia [29]. Por lo tanto, al incrementar la temperatura de la columna se consigue una mejor resolución debido al aumento del coeficiente de difusión de la fase móvil y a la baja resistencia a la transferencia de masas. Sin embargo, también es importante no exceder la temperatura máxima de operación de la columna utilizada (60°C en este caso concreto), ya que esto podría reducir la vida de la misma. Por lo tanto, 50°C fue seleccionado como la máxima temperatura de trabajo posible.

Basado en estos principios y limitaciones, la temperatura de la columna es gradualmente incrementada desde 25°C a 50°C, en intervalos de 5°C (*figura 110*). Incrementando la temperatura hasta 30, 35, 40, 45 y 50°C desde 25°C se observa una reducción del tiempo de retención medio de 8,08, 13,23, 18,12, 21,87 y 26,77%, respectivamente, de todos los analitos respecto de las condiciones iniciales. El tiempo de retención del último pico eluído (Ge) utilizando estas temperaturas fue de 17,93, 16,50, 15,64 y 14,66 minutos, respectivamente. En este contexto, la menor reducción del tiempo de retención causado por el incremento de la temperatura se observa para la isoflavona Ge, mientras que la mayor reducción de tiempo es la de la isoflavona MDi. Esto se puede explicar no sólo por el efecto de la temperatura en la viscosidad de la fase móvil, sino también por la solubilidad de cada isoflavona en la fase móvil y el efecto acoplado de la reducción de tiempo y concentración relativa del disolvente orgánico de la fase móvil en el gradiente.

Además, el incremento de la temperatura de la columna muestra otros efectos particularmente interesantes. El incremento de la temperatura afecta al tiempo de retención de algunas de las isoflavonas más que a otras, hasta el punto de que a 35°C algunos picos se solapan, y por encima de esta temperatura cambian el orden de elución que se observaba a otras temperaturas más bajas. Como se ilustra en la *figura 112*, de 25 a 30°C, MG_i eluye después de AG_{ly}, entre 35 y 40°C estos picos están solapados, y por encima de 40°C MG_i eluye antes que AG_{ly}. Durante el incremento de temperatura, se observa que la reducción media del tiempo de retención para MG_i es un 23,6% mayor que la reducción de AG_{ly}. Este efecto puede atribuirse también al incremento de la solubilidad de MG_i en la fase móvil en comparación con la de AG_{ly}. Estas observaciones pueden tener aspectos prácticos para el análisis de las isoflavonas. Anteriormente ya se comentó que la separación de AD_i, AG_{ly} y MG_i pueden ser problemáticas [39], y para resolver problemas de selectividad, en concreto la separación de estas isoflavonas, incrementar la temperatura de la columna puede ser una alternativa atractiva. También se observa que dependiendo de las condiciones cromatográficas, el orden de elución puede cambiar y por lo tanto se debe tener cuidado cuando sólo se utiliza la información bibliográfica en la identificación de picos.

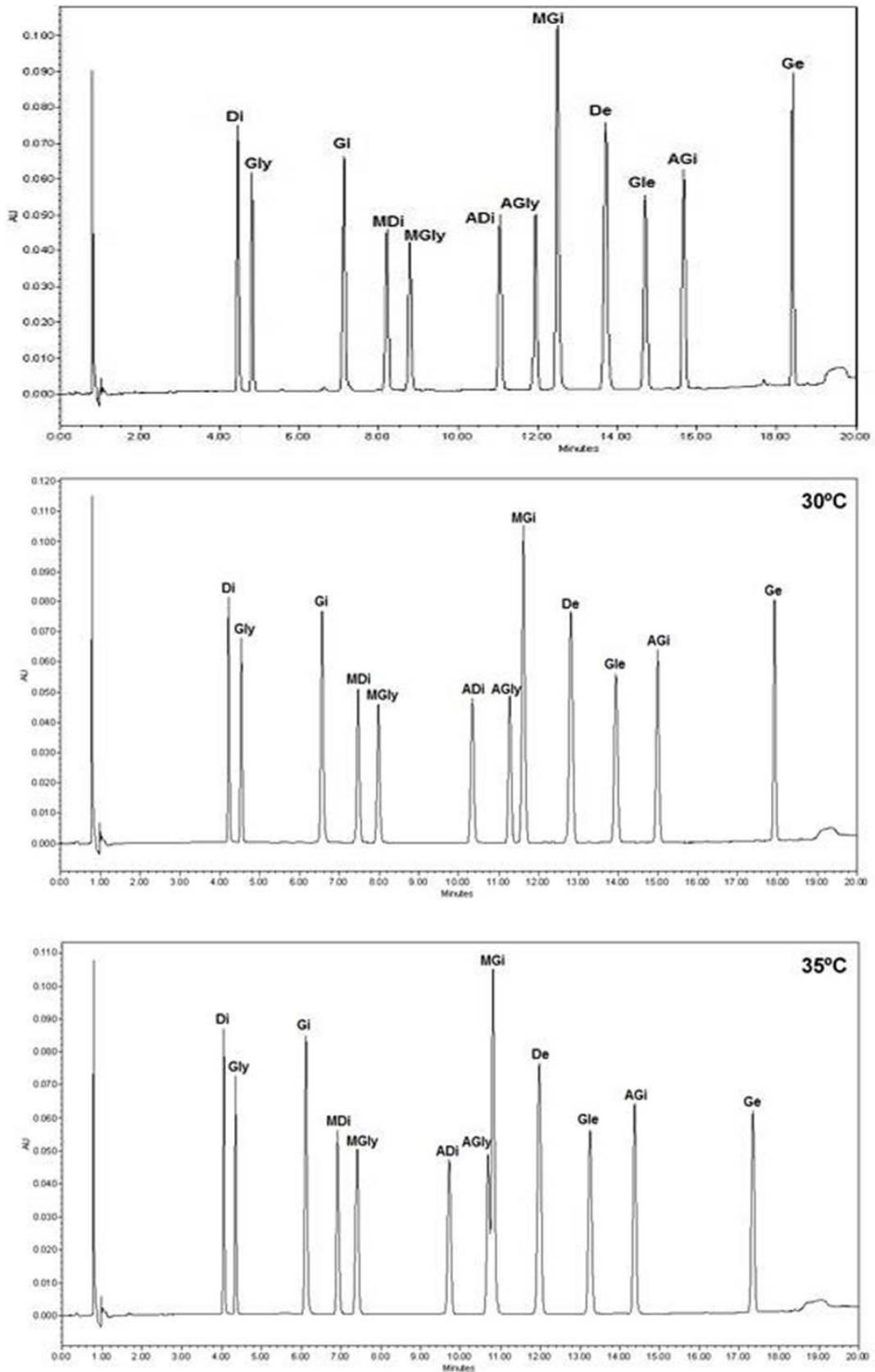


Figura 110. Cromatogramas obtenidos al inyectar la mezcla de patrones de las 12 isoflavonas de soja a distintas temperaturas con el método a optimizar con una columna de partículas recubiertas, fused-core.

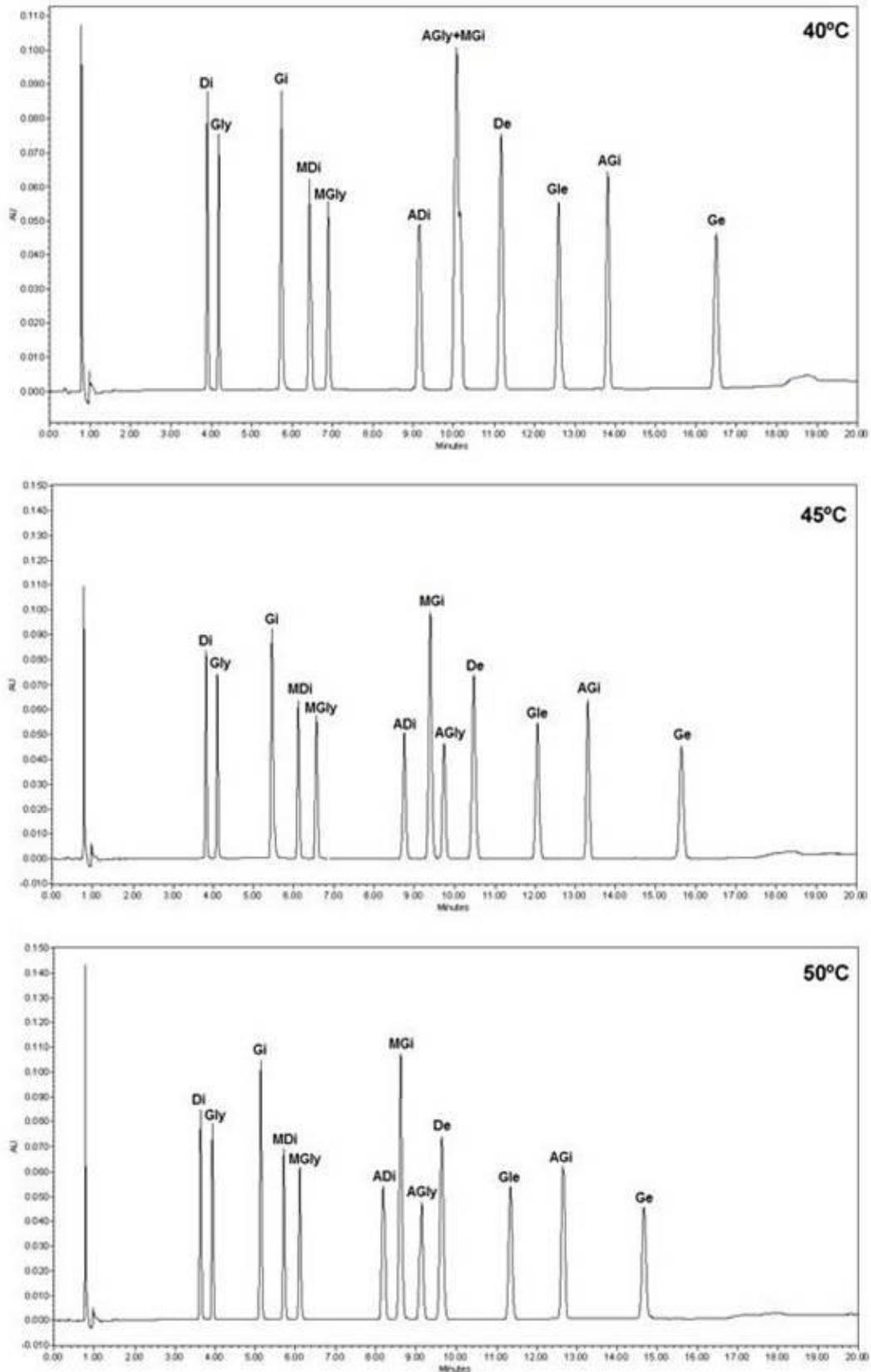


Figura 110 (cont.). Cromatogramas obtenidos al inyectar la mezcla de patrones de las 12 isoflavonas de soja a distintas temperaturas con el método a optimizar con una columna de partículas recubiertas, fused-core.

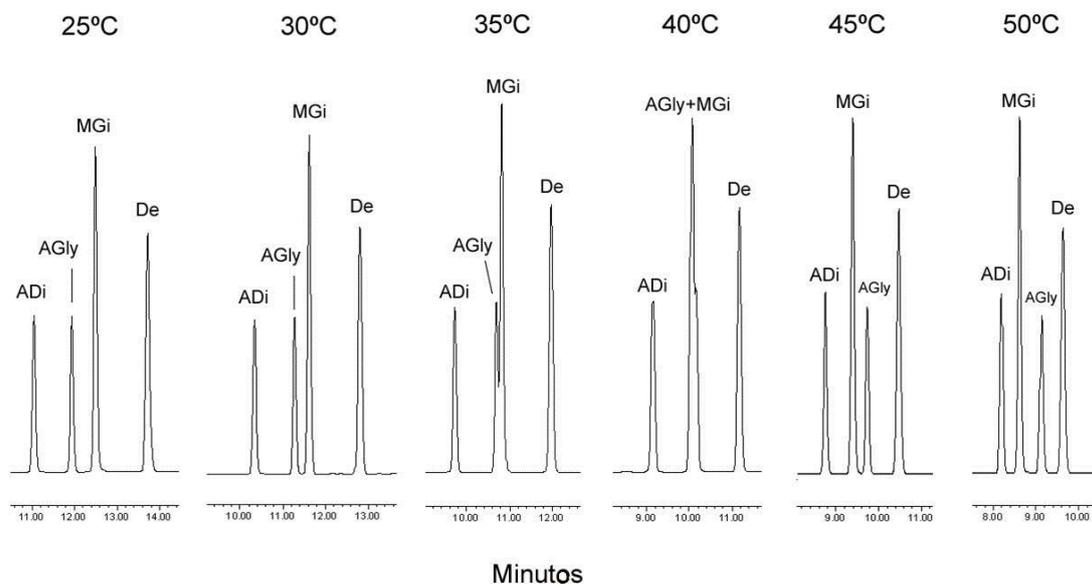


Figura 111. Efecto del incremento de la temperatura en el orden de elución cromatográfico de algunas de las isoflavonas objeto de estudio con el método a optimizar con una columna de partículas recubiertas, fused-core.

Respecto a la anchura y altura de pico (figura 110) se observó una respuesta variable dependiendo de la isoflavona y la temperatura, sin mostrar una tendencia clara. En general al aumentar la temperatura se reduce la anchura de pico y aumenta la altura de las isoflavonas más polares, mientras que se observa un efecto menor para las menos polares, especialmente a temperaturas más elevadas. Sin embargo, hay que tener en cuenta que el gradiente utilizado se mantuvo constante, por lo tanto el aumento en la velocidad de transferencia de masa y la reducción del tiempo de retención y anchura de pico (e indirectamente el aumento de la altura de pico) debido al aumento de la temperatura, puede ser disminuido por la baja concentración del disolvente orgánico en el momento en que los analitos son liberados por la fase estacionaria. Esto último produce un incremento del coeficiente de difusión y una alta resistencia a la transferencia de masa debido a la alta polaridad relativa de la fase móvil. La alta difusión del analito y la resistencia a la transferencia de masa se traduce en picos más anchos y menos altos. Esto es especialmente importante para las isoflavonas menos polares, observándose claramente en el pico de Ge. En este caso, la anchura de pico de Ge aumenta y la altura disminuye más a medida que se aumenta la temperatura y se reduce su tiempo de retención. Este efecto negativo sobre los últimos picos eluidos, puede ser resuelto ajustando el gradiente proporcionalmente a la reducción del tiempo de retención causado por el incremento de la temperatura.

Otro efecto observado al incrementar la temperatura fue la reducción en la separación de picos, es decir, la separación en minutos entre picos. Al incrementar la temperatura de 25°C a 30, 35, 40, 45 y 50°C se da una reducción de la separación de

picos de 6,52, 6,67, 8,98, 20,91 y 22,88%, respectivamente. Estos rangos se refieren sólo a los picos separados en las temperaturas entre 30 y 50°C. Esto era esperable, ya que como se reduce el tiempo de análisis, la separación entre picos debe ser menor. Sin embargo, el efecto de la temperatura en la separación es variable y depende de cada compuesto. En general, la separación de las isoflavonas menos polares, De, Gle, AGi y Ge, aumentó con el incremento de la temperatura, mientras que hubo una reducción de la separación de las isoflavonas que eluían cercanas. Esta tendencia puede ser explicada, al menos en parte, por mantener el mismo gradiente con las diferentes temperaturas. Como la retención de los compuestos se reduce por el incremento de la temperatura, hay una menor concentración de disolvente orgánico en la fase móvil cuando cada pico eluye de la fase estacionaria. Cuanto menos polar es la isoflavona, mayor es la influencia de la composición de la fase móvil sobre su retención, y por lo tanto, la separación entre picos aumenta. Sin embargo, dado que el efecto de la reducción de la separación por el aumento de la temperatura para las isoflavonas más polares es más pronunciado que sobre la separación de las menos polares, la separación media entre picos se reduce, y se refleja en los valores de reducción medios más altos.

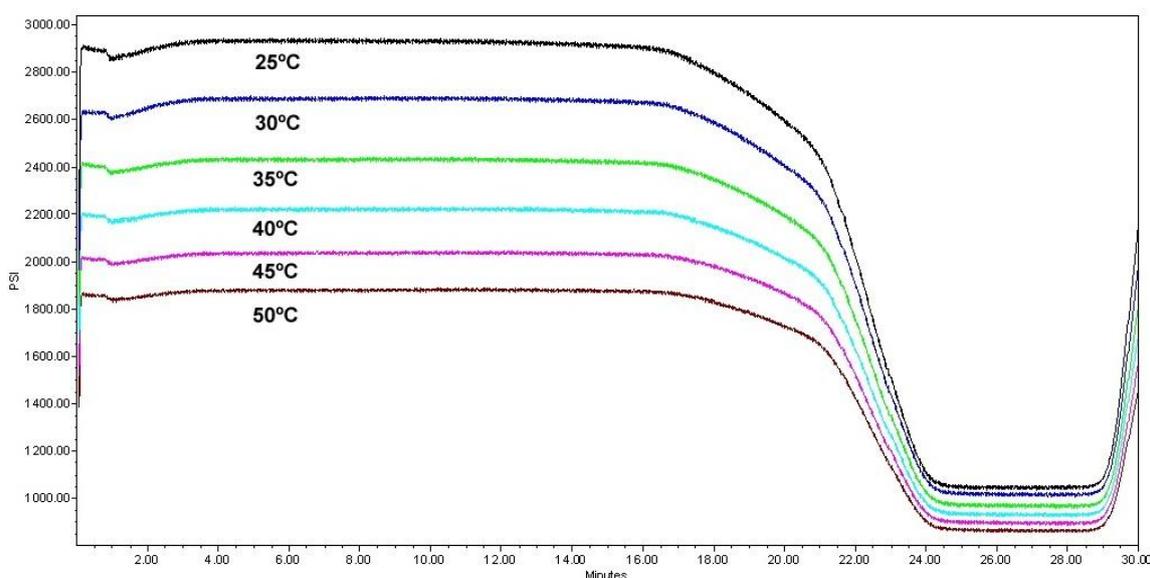


Figura 112. Representación gráfica de la presión del sistema durante el método cromatográfico utilizando distintas temperaturas de trabajo.

Por otro lado, se observa una correlación directa entre el incremento de temperatura y la presión de la columna (figura 112). El incremento de la temperatura de 25 a 30, 35, 40, 45 y 50°C da lugar a una reducción de la presión de la columna en 8,47, 16,95, 24,58, 30,51 y 35,59%, respectivamente. Estas reducciones no son lineales siendo mayores a menores temperaturas, entre 25 y 30°C y entre 30 y 35°C. Sin embargo, se puede considerar que cada grado de temperatura incrementado puede dar lugar a una reducción de la presión de un 1,42%. La importancia de la reducción de la presión debida a la temperatura se encuentra en que permite usar

mayores velocidades lineales de la fase móvil, lo cual se puede utilizar para reducir el tiempo de análisis.

Por lo tanto, teniendo en cuenta esta reducción del tiempo de retención, de la anchura de pico y la presión, manteniendo una excelente separación de todas las isoflavonas y la simetría de pico, se puede considerar que altas temperaturas (como por ejemplo 50°C) son las más apropiadas para el desarrollo de métodos rápidos de análisis usando una columna de partículas recubiertas, *fused-core*.

4.3.3 Flujo

Una vez elegidos 50°C como temperatura de trabajo, se estudió llevar a cabo un aumento del flujo para obtener tiempos de análisis más cortos. Para ello, el flujo fue incrementándose paso a paso desde 1,2 a 2,7 mL/min. El máximo flujo fue determinado por los límites de presión del sistema cromatográfico (5000 psi).

Como el flujo fue incrementado, se aplicó una reducción proporcional del gradiente para mantener la separación de todos los picos. Por ejemplo, si el flujo se duplicó, el tiempo del gradiente fue reducido a la mitad manteniendo el mismo porcentaje de disolventes de la fase móvil. Los incrementos del flujo y, como consecuencia, el incremento de la presión se representan gráficamente en la *figura 113*.

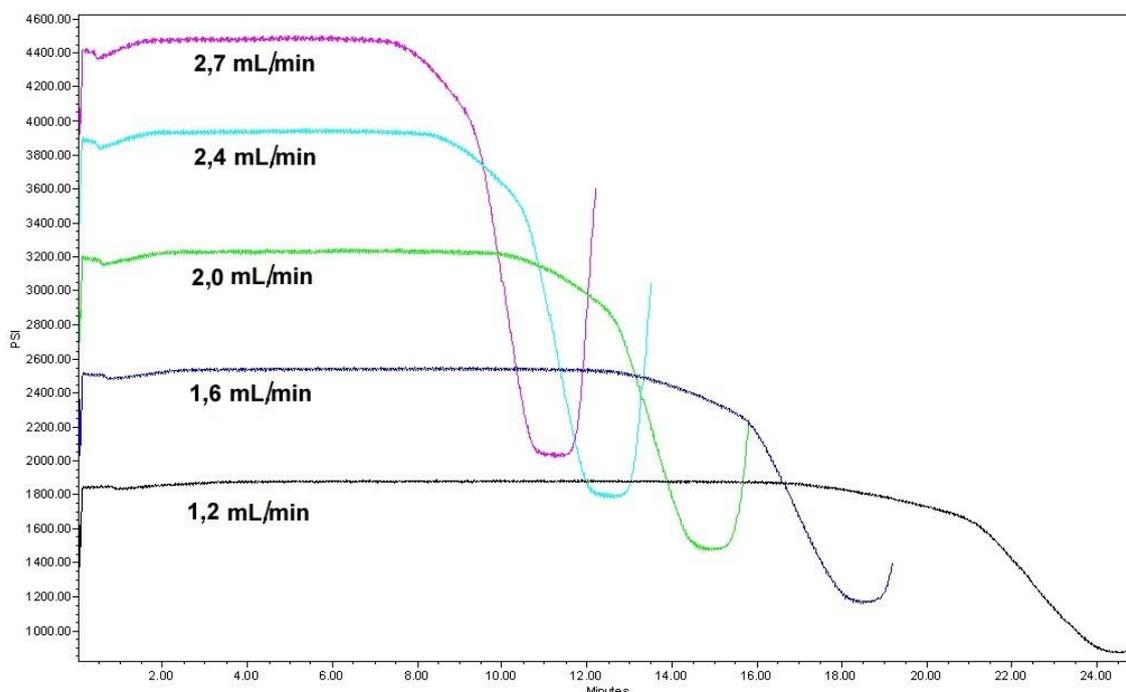


Figura 113. Representación gráfica de la presión del sistema durante el método cromatográfico utilizando distintos flujos de trabajo.

El perfil de presión representado incluye el ajuste de gradiente y el tiempo requerido para limpiar la columna (1 minuto). Un ajuste proporcional del gradiente al

incrementar el flujo mantiene la separación entre los compuestos, sin embargo la separación entre picos fue menor, debido al menor tiempo de análisis.

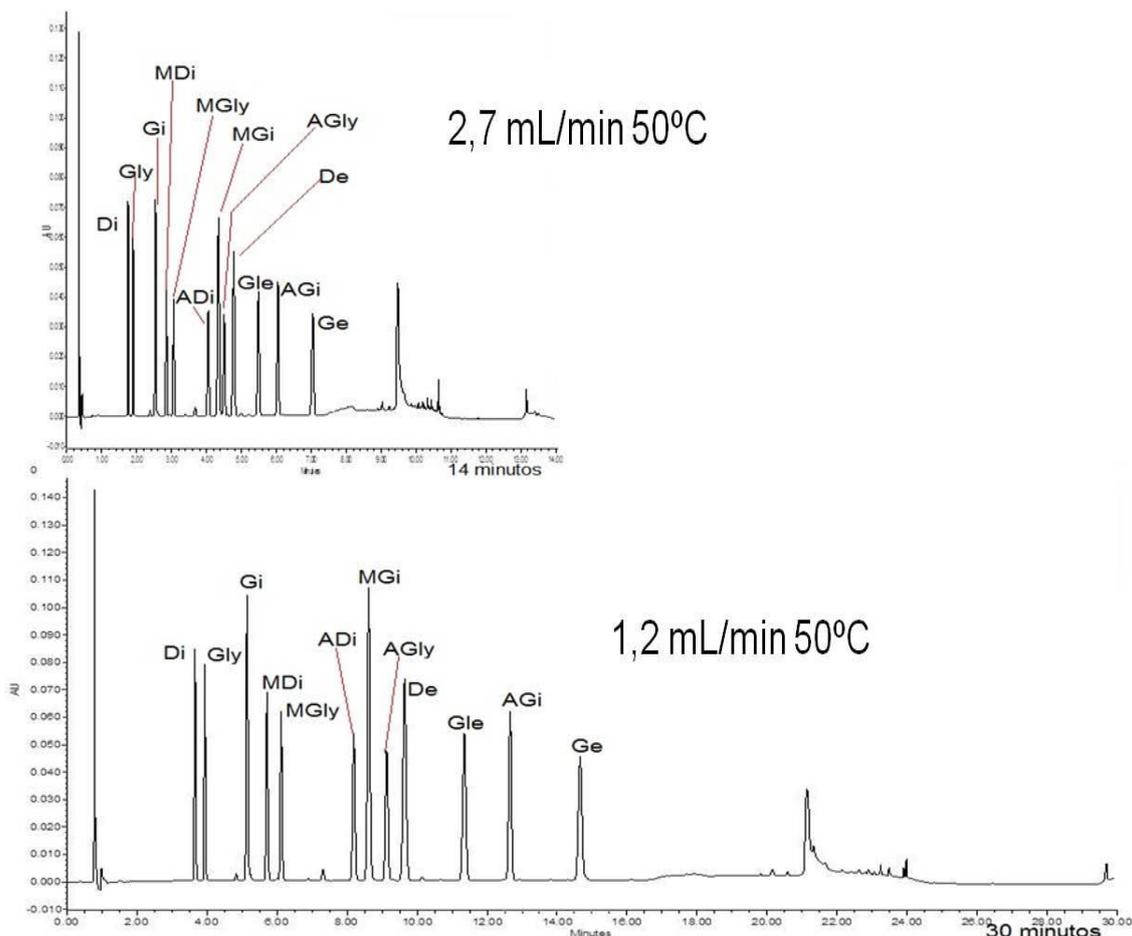


Figura 114. Cromatogramas obtenidos al analizar las 12 isoflavonas a 50°C utilizando como flujo 1,2 mL/min y 2,7 mL/min con una columna de partículas recubiertas, fused-core.

Comparando con el cromatograma obtenido inyectando la muestra con las condiciones iniciales (50 °C, 1,2 mL/min), figura 114, la media del tiempo de retención, anchura de pico y separación de picos se redujeron en 51,76, 38,38 y 52,24%, respectivamente utilizando un flujo más alto (2,7 mL/min). El tiempo de retención de la última isoflavona (Ge) fue de 6,15 minutos, unas 2,38 veces menos que en las condiciones iniciales, lo cual es proporcional al incremento en 2,25 veces el flujo (de 1,2 a 2,7 mL/min).

Como el último pico que eluye (Ge) está alejado del pico anterior (AGi), la parte final del gradiente se ajusta para reducir el tiempo de análisis. Este proceso se realiza con una etapa de incremento del porcentaje del disolvente B en el tiempo de retención del pico previo. Sin embargo, si se aumenta demasiado el porcentaje se produce una elevación de la línea base y por ello se opta por una opción intermedia, donde el tiempo de análisis se reduce sin afectar gravemente a la línea base.

Por lo tanto, el gradiente optimizado fue el que se muestra en la tabla 78:

Tabla 78. Gradiente optimizado para el análisis de 12 isoflavonas de soja utilizando una columna de partículas recubiertas, fused-core, y acetonitrilo como fase móvil.

COLUMNA DE PARTÍCULAS RECUBIERTAS, FUSED-CORE		
Kinetex™ C18, 2,6 µm, 100x4,6 mm		
Fases móviles	Fase A	Agua 1% ácido acético
	Fase B	Acetonitrilo
Gradiente	Tiempo (min)	% B
	0,00	8
	1,04	15
	3,56	17
	4,56	24
	5,50	50
	6,50	100
	7,50	100
	8,50	8

El gradiente incluye un minuto con 100% de fase móvil B para la limpieza de la columna (6,50-7,50 minutos) y 1 min para volver a las condiciones iniciales (7,50-8,50 minutos). El cromatograma obtenido con este nuevo gradiente se muestra en la figura 115.

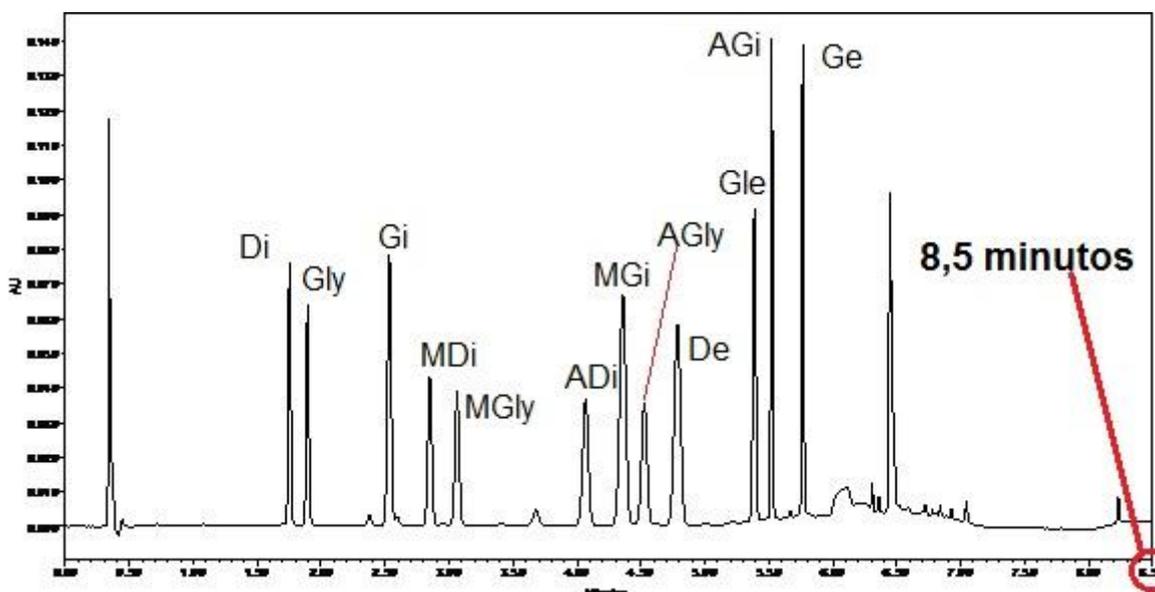


Figura 115. Cromatograma obtenido al inyectar la mezcla de los patrones de las 12 isoflavonas con el nuevo gradiente optimizado a 2,7 mL/min y 50°C con una columna de partículas recubiertas, fused-core.

4.3.4 Tiempo de re-equilibrado

El tiempo total de análisis es la cantidad de tiempo que transcurre desde que se inyecta una muestra hasta que se inyecta la siguiente, e incluye el tiempo de análisis, el tiempo de limpieza de columna y el tiempo de re-equilibrado. El tiempo de

re-equilibrado es necesario en los análisis mediante HPLC utilizando un método en gradiente para asegurar que la columna vuelve a las condiciones iniciales de forma estable, ya que la diferencia entre la composición orgánica de la fase móvil inicial y final es significativa.

La importancia del tiempo de equilibrado es aún mayor, ya que el no optimizar el tiempo de re-equilibrado puede suponer una extensión innecesaria del tiempo de análisis, con el incremento del coste y la reducción del número de muestras analizadas por día. Normalmente, el tiempo de equilibrado recomendado por los fabricantes depende del volumen de columna y del flujo. Una recomendación estándar es aproximadamente 10 veces el volumen de columna, aunque depende de la aplicación y más importante, de la fase móvil y el gradiente usado.

Todos los experimentos anteriores fueron realizados usando 5 minutos de equilibrado entre inyecciones, que es el equivalente al 40 % del total de la duración del método (incluyendo tiempos de elución, limpieza y re-equilibrado) y el equivalente a 14,8 volúmenes de columna. Por lo tanto, este tiempo es importante puesto que se ha de tener en cuenta a la hora de considerar la duración total del método; se va a estudiar qué ocurre con menores tiempos de re-equilibrado (1-4 minutos). El tiempo de equilibrado fue incluido como tiempo adicional después de que la fase móvil volviera a las condiciones iniciales; este tiempo se fijó en 8,50 min, después de los cuales se inyectó de nuevo la muestra (mezcla patrón) en la columna. Los resultados de las variabilidades obtenidas con cada uno de los tiempos de re-equilibrado estudiados se muestran en la *tabla 79*.

Tabla 79. Desviaciones estándar relativas (RSD) (n=3) en porcentaje de áreas y tiempos de retención para las 12 isoflavonas estudiadas con varios tiempos de re-equilibrado, 1, 2, 3, 4 y 5 minutos (min) con el método optimizado para una columna de partículas recubiertas, fused-core.

ESTUDIO DEL TIEMPO DE RE-EQUILIBRADO										
tiempo	5 min		4 min		3 min		2 min		1 min	
	tiempo de retención	área								
isoflavona	RSD	RSD								
Di	0,21	0,08	0,30	0,05	0,23	0,16	0,34	0,37	0,38	0,15
Gly	0,23	0,06	0,34	0,18	0,19	0,11	0,36	0,30	0,27	0,19
Gi	0,27	0,09	0,27	0,18	0,14	0,42	0,40	0,38	0,27	0,11
MDi	0,25	0,12	0,25	0,23	0,21	0,20	0,41	0,25	0,30	0,53
MGly	0,24	0,21	0,19	0,22	0,20	0,25	0,39	0,21	0,28	0,81
ADi	0,10	0,02	0,20	0,09	0,30	0,22	0,30	0,24	0,24	0,71
MGi	0,02	0,22	0,22	0,28	0,28	0,19	0,29	0,19	0,22	0,62
AGly	0,01	0,08	0,21	0,05	0,24	0,13	0,29	0,18	0,21	0,42
De	0,02	0,18	0,15	0,03	0,17	0,14	0,23	0,23	0,14	0,29
Gle	0,04	0,16	0,06	0,16	0,07	0,23	0,14	0,05	0,11	0,51
AGi	0,06	0,13	0,08	0,06	0,07	0,14	0,11	0,12	0,12	0,62
Ge	0,06	0,16	0,09	0,10	0,06	0,08	0,10	0,23	0,11	0,22
MEDIA	0,13	0,13	0,20	0,14	0,18	0,19	0,28	0,23	0,22	0,43

Usar 5 minutos para re-equilibrar la columna entre inyecciones proporciona una media (intra e interdía) de variabilidad de área y tiempo de retención menor de 0,27% y 0,22%, respectivamente. Reduciendo el tiempo de re-equilibrado a 4, 3, 2 y 1 minutos se obtiene una variabilidad de área media menor de 0,28, 0,43, 0,38 y 0,81%, y una variabilidad de tiempo de retención medio inferior a 0,34, 0,30, 0,41 y 0,38%, respectivamente.

Por otro lado, no se observa una tendencia clara entre cada isoflavona individual de mayor o menor variabilidad. Con 5 minutos, por ejemplo, la mayor variabilidad en el tiempo de retención se observó para Gi y la menor para AGly, mientras que usando 4 minutos fueron para Gly y Ge, respectivamente; usando 3 min la mayor variabilidad observada fue para ADi y la menor para Ge, mientras que con 2 min la mayor fue para MDi y la menor para Ge y con 1 min fueron para Di y Gle. Estos resultados indican que la variabilidad puede atribuirse a la capacidad del sistema cromatográfico para proporcionar una mezcla de disolventes reproducible a flujos relativamente altos (2,7 mL/min) más que a la variabilidad intrínseca a la fase estacionaria propiamente.

El fabricante del sistema cromatográfico (Waters) establece que el rango de precisión normal de distribución de disolvente (incluyendo mezcla de disolventes y flujo) está entre 0,5 y 1% (desviación estándar relativa). Por supuesto este valor depende del flujo y del volumen de la bomba sistólica (establecido en 100 μ L en este caso), pero la variabilidad observada está razonablemente dentro del rango de variabilidad del sistema cromatográfico.

Aunque usando tiempos muy cortos de re-equilibrado la variabilidad se encuentra dentro del rango normal, una reproducibilidad ligeramente mayor se observa para algunas isoflavonas usando tiempos de re-equilibrado mayores de 2 minutos. Por lo tanto, 3 minutos se puede considerar como el tiempo más apropiado para conseguir la mayor reproducibilidad posible sin extender demasiado el tiempo de análisis. Este tiempo de equilibrado es equivalente a 8,90 veces el volumen de la columna, un poco menor que lo recomendado. Sin embargo, dependiendo de la aplicación y los requisitos de reproducibilidad del análisis que nos ocupa, es posible incrementar el número de muestras que pueden ser analizadas usando tiempos de re-equilibrado entre 1 y 3 minutos consiguiendo resultados de buena calidad.

4.3.5 Método optimizado

En la *figura 116* se muestra un cromatograma representativo de las 12 isoflavonas de soja utilizando para la inyección de la disolución patrón el método optimizado donde se incluye el tiempo de análisis, el lavado y el tiempo de re-equilibrado (11,50 minutos en total).

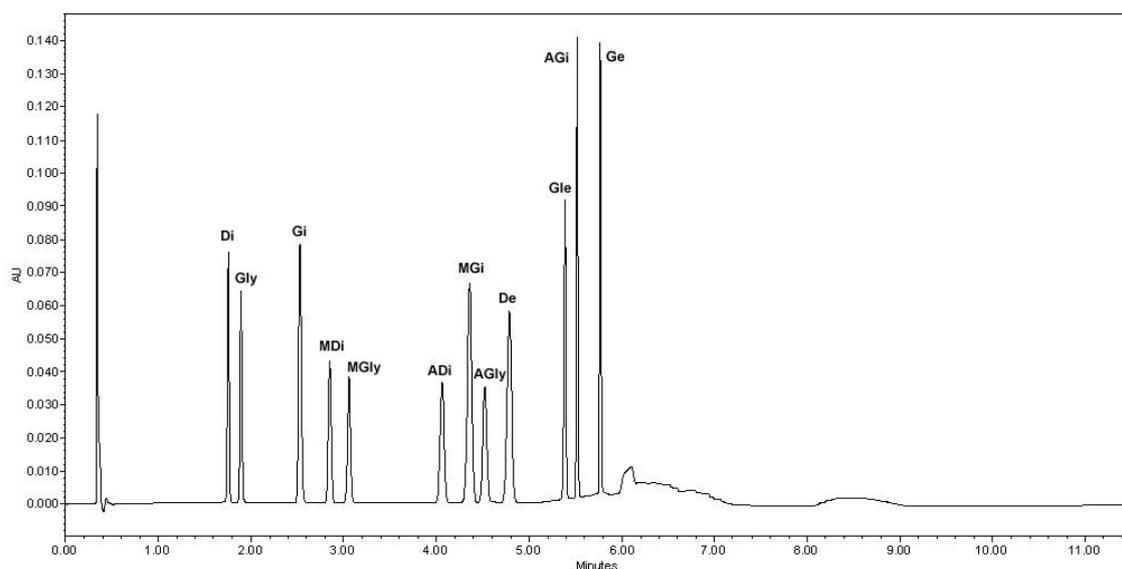


Figura 116. Cromatograma de la mezcla de los patrones de las 12 isoflavonas de soja analizadas con el método optimizado con una columna de partículas recubiertas, fused-core.

En la *tabla 80* se muestran las condiciones cromatográficas finales, con el tiempo de equilibrado incorporado, y en la *tabla 81* los parámetros cromatográficos obtenidos al inyectar la muestra patrón en dichas condiciones.

Tabla 80. Condiciones cromatográficas optimizadas para el análisis de las 12 isoflavonas de soja con una columna de partículas recubiertas, fused-core.

Flujo	2,7 mL/min	
Temperatura	50°C	
Fases móviles	Fase A	Agua 1% ácido acético
	Fase B	Acetonitrilo
Gradiente	Tiempo (min)	% B
	0,00	8
	1,04	15
	3,56	17
	4,56	19,2
	5,50	50
	6,50	100
	7,50	100
	8,50	8
	11,50	8

Tabla 81. Parámetros cromatográficos obtenidos al inyectar la muestra patrón con el método optimizado para el análisis de las 12 isoflavonas de soja con una columna de partículas recubiertas. RSD: desviación estándar relativa en porcentaje; tr: tiempo de retención; LOD: límite de detección; LOQ: límite de cuantificación.

Isof.	Tiempo de retención (minutos)	RSD tr	Platos teóricos /metro (N/m)	Asimetría A	Factor de retención K'	Factor de selectividad α	Resolución Rs	LOD ($\mu\text{g/L}$)	LOQ ($\mu\text{g/L}$)
Di	1,75	0,33	101	1,08	4,14			23,1	77,1
Gly	1,89	0,34	110	1,04	4,56	1,10	3,82	22,6	75,3
Gi	2,53	0,28	96,4	1,01	6,46	1,42	14,0	25,0	83,3
MDi	2,85	0,26	102	1,04	7,40	1,15	5,65	12,6	42,1
MGly	3,07	0,23	103	0,98	8,04	1,09	3,51	31,8	106
ADi	4,07	0,19	110	0,96	11,0	1,37	14,0	239	797
MGi	4,36	0,18	107	0,96	11,9	1,08	3,37	25,3	84,2
AGly	4,52	0,16	147	0,94	12,4	1,04	1,98	5,95	19,8
De	4,78	0,12	117	0,94	13,1	1,06	2,95	11,9	39,7
Gle	5,39	0,06	590	0,95	14,9	1,13	8,52	17,3	57,6
AGi	5,52	0,07	1951	1,06	15,3	1,03	3,65	3,34	11,1
Ge	5,76	0,07	2082	1,04	16,0	1,05	9,22	60,3	201

El tiempo de retención de las isoflavonas de soja oscila entre 1,75 min (Di) y 5,76 min (Ge), reduciendo diez veces el tiempo de análisis comparado con los métodos convencionales. De manera ilustrativa, el tiempo de retención al que aparece la Ge en un método reciente propuesto por la AOAC (Association of Official Analytical Chemists) es aproximadamente de 51 minutos [32]. Por otro lado, cuando comparamos las características cromatográficas del método desarrollado con el método más rápido descrito hasta ahora [16, 29] que se obtiene usando una columna monolítica, la reducción del tiempo de análisis fue de 2 veces. Además, el tiempo total de análisis (de muestra a muestra), incluyendo la limpieza, el retorno a las condiciones iniciales y el tiempo de re-equilibrado, es de tan sólo 11,5 min, con una baja variabilidad en el tiempo de retención y en el área (0,33 y 0,69%, respectivamente), picos estrechos (anchura media de pico de 7,48 segundos) y simétricos (media de asimetría de 1). La anchura de pico oscila entre 5,07 (AGi) y 10,9 segundos (AGly), con una variabilidad inferior al 3,90%. También se observa que las primeras y últimas isoflavonas eluidas (Di, Gly, AGi, Ge) dan lugar a picos más estrechos y simétricos que las isoflavonas que eluyen en el medio del cromatograma (ADi, AGly, MGy y De), lo cual, al menos en parte, puede explicar la dificultad de su separación.

En general, el método desarrollado presenta buenas características cromatográficas, dando lugar a un número de platos elevado, y buenos factores de retención, selectividad y resolución. Los valores medios para estos parámetros cromatográficos son 468 platos, 10,4 como factor de retención, 1,14 es el valor de selectividad α y 6,42 la resolución obtenida.

Por último, la respuesta fue lineal entre 0,05 y 50 mg/L (curva de calibración de siete puntos) para todas las isoflavonas y con coeficientes de regresión (R^2) mayores de 0,9955 (tabla 82). También se obtuvieron límites de detección y cuantificación muy bajos, en el rango de 3,34 (AGi) a 239 (ADi) y de 11,1 (AGi) a 797(ADi) $\mu\text{g/L}$, respectivamente.

Tabla 82. Curvas de calibración para las 12 isoflavonas de soja objeto de estudio obtenidas con el método cromatográfico optimizado para una columna de partículas recubiertas, fused-core.

Isoflavona	Ordenada	Pendiente	R^2
Di	-7702	13836	0,9955
Gly	-7310	12174	0,9901
Gi	-2297	18542	0,9996
MDi	-9296	16700	0,9955
MGly	-8720	14524	0,9901
ADi	-8479	15234	0,9955
MGi	-7997	13318	0,9901
AGly	-2754	22231	0,9996
De	-433	16324	0,9993
Gle	-3571	12805	0,9993
AGi	-2520	20340	0,9996
Ge	-13928	31713	0,9976

4.3.6 Aplicación del método optimizado a muestras reales

La optimización del método fue realizada usando una mezcla estándar de las 12 isoflavonas, por lo que es de importancia crítica aplicar este método optimizado con distintas muestras reales. La importancia de esta aplicación reside en que las muestras reales son matrices complejas y los métodos de extracción normalmente no son selectivos y otros compuestos pueden co-eluir o interferir en la separación de las isoflavonas con el método optimizado.

Por lo tanto, los extractos de dos sojas (S1 y S2) y dos muestras de proteína de soja texturizada (PTS1 y PTS2) fueron analizadas con el método desarrollado. Los cromatogramas de estas muestras se ilustran en la figura 117 (A-D), respectivamente y las concentraciones de cada isoflavona en estas muestras se recogen en la tabla 83. El tiempo de retención y el espectro UV de cada isoflavona coincide con el obtenido en la inyección de sus respectivos patrones y el análisis de la pureza de pico indica que otros compuestos no co-eluyen con los picos de las isoflavonas.

Tabla 83. Concentración de las isoflavonas analizadas en las muestras con el método optimizado ($n=2$) para una columna de partículas recubiertas, fused-core. Los resultados de concentración están dados en $\mu\text{g/g}$. RSD: desviación estándar relativa en porcentaje; n.d.: isoflavona no detectada ($< LOD$) S1: muestra de soja 1; S2: muestra de soja 2; PTS1: muestra de proteína texturizada de soja 1; PTS2: muestra de proteína texturizada de soja 2.

Isoflavones	S1		S2		PTS1		PTS2	
	$\mu\text{g/g}$	RSD	$\mu\text{g/g}$	RSD	$\mu\text{g/g}$	RSD	$\mu\text{g/g}$	RSD
Di	458	0,71	405	0,09	404	2,88	501	1,03
Gly	99,1	3,05	71,0	0,87	177	2,41	87,5	0,89
Gi	484	0,75	484	0,02	492	3,74	540	1,85
MDi	341	0,14	408	0,19	211	2,50	137	1,01
MGly	83,1	0,08	76,1	0,39	106	3,04	64,8	1,52
ADi	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	136	1,18	349	0,82
MGi	476	0,40	538	0,07	329	3,92	163	1,40
AGly	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	72,5	0,76	61,4	2,88
De	n.d.	n.d.	20,1	1,20	96,6	3,17	72,2	3,60
Gle	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	35,6	2,74	n.d.	n.d.
AGi	n.d.	n.d.	13,5	4,35	174	3,53	452	1,22
Ge	n.d.	n.d.	29,4	4,14	65,6	2,42	32,6	0,89
Total	1942		2044		2299		2461	

La concentración total de las isoflavonas varía entre 1941,53 (S1) y 2460,84 mg/Kg (PTS2).

La variabilidad en las concentraciones para todas las muestras (sojas y proteínas) es inferior al 5 %. Las mayores variabilidades se observan para las muestras de proteína texturizadas de soja en conjunto, aunque las mayores variabilidades son para las isoflavonas que eluyen en último lugar en la muestra de soja 2 (S2), AGi y Ge.

Como se puede observar, los derivados maloniles y glucósidos son los predominantes, e incluso en alguna de las muestras son los únicos derivados (S1). Los derivados de la genisteína son los predominantes en todas las muestras.

En el caso de las proteína texturizada de soja (PTS1 y PTS2) los derivados acetil de las isoflavonas se encuentran en una concentración elevada, lo cual indica que ambas muestras de proteína fueron sometidas a tratamientos secos de alta temperatura en su procesado [16].

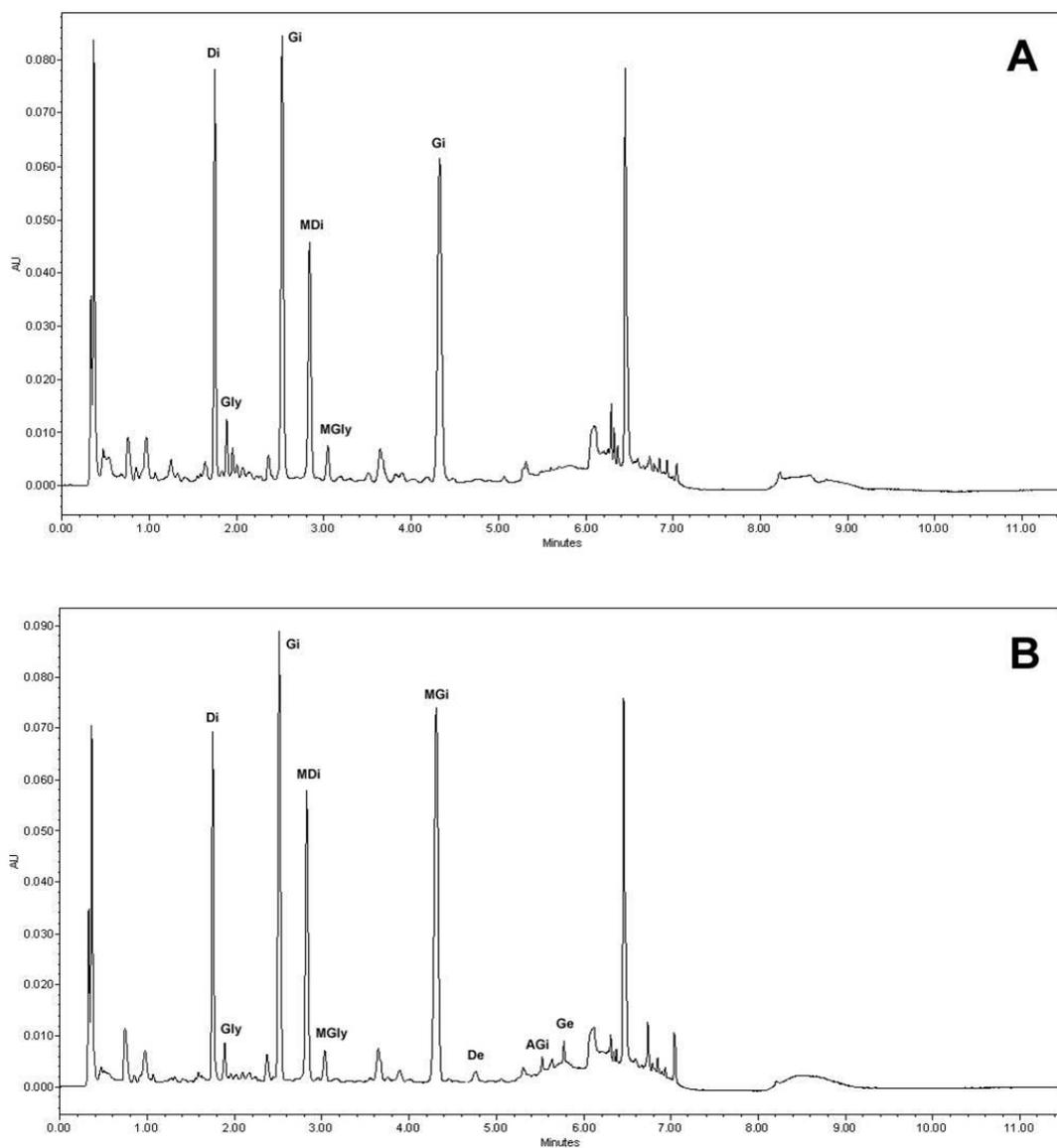


Figura 117. Cromatogramas obtenidos en el análisis de las isoflavonas en las muestras con el método optimizado para una columna de partículas recubiertas, fused-core. A: muestra de soja 1; B: muestra de soja 2.

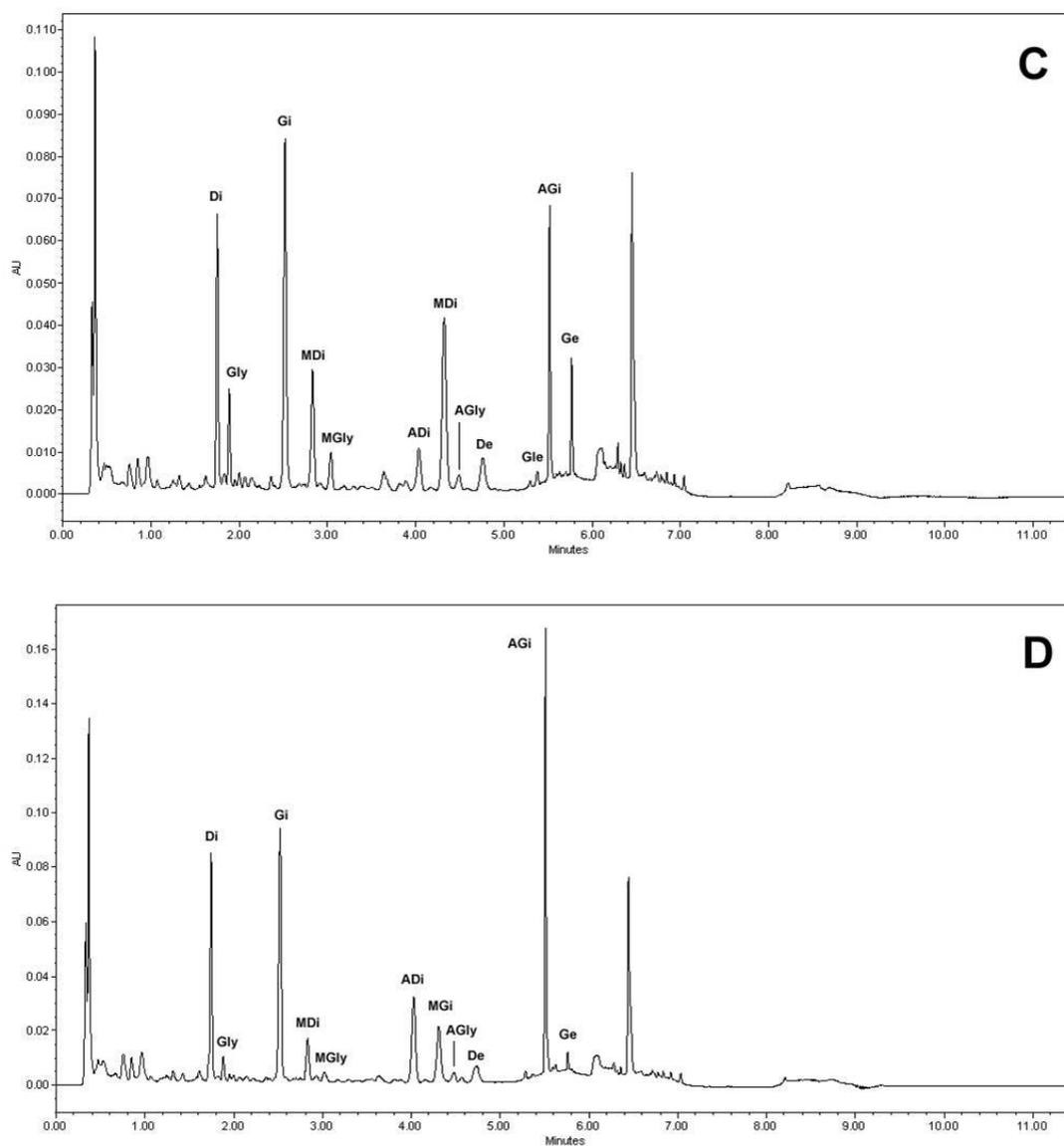


Figura 117 (cont.). Cromatogramas obtenidos en el análisis de las isoflavonas en las muestras con el método optimizado para una columna de partículas recubiertas, fused-core. C: muestra de proteína texturizada de soja 1; D: muestra de proteína texturizada de soja 2.

4.3.7 Distribución de concentración y perfil de isoflavonas en alimentos derivados de soja

En el mercado existen diversos alimentos de soja y derivados de soja que contienen isoflavonas; se puede encontrar desde soja, proteína texturizada de soja, soja frita y soja en conserva, hasta bebidas de soja, leche con isoflavonas añadidas, zumos de soja, tofu y derivados, productos de repostería... Cada muestra posee un perfil y concentración distinta de las isoflavonas, existe una gran variabilidad. El conocimiento de las isoflavonas presentes en cada muestra ha cobrado gran interés en los consumidores y profesionales de la salud por la posible relación entre las isoflavonas y sus efectos beneficiosos sobre la salud.

Por ello se han analizado, utilizando el método cromatográfico optimizado con una columna de partículas recubiertas (*fused-core*), un amplio número de muestras características de lo que se puede encontrar en los supermercados españoles. Las muestras analizadas se recogen en la *tabla 84* y los resultados obtenidos se muestran en la *tabla 85*.

Tanto el tiempo de retención, como el espectro de UV de las isoflavonas separadas coincidieron con sus respectivos patrones. Así mismo, el análisis de la pureza de pico indicó que no co-eluían los picos de las isoflavonas con otros compuestos.

4.3.7.1 Soja (S)

La concentración total de las isoflavonas encontradas en soja oscila desde 386 mg/Kg (S4) hasta 3563 mg/Kg (S3) (*tabla 85*). En todas las muestras se observa que los derivados de genistina son los predominantes, seguido de los de daidzina y glicitina.

Los perfiles entre las muestras de soja, S1 y S2, son similares, siendo los derivados de genistina y daidzina los compuestos predominantes. En la soja S2 se detectaron agluconas en cantidades relativamente pequeñas, mientras que en la soja S1 no se detectaron. Esto puede deberse a la interconversión de las distintas formas de las isoflavonas a agluconas por las condiciones de transporte o almacenamiento, o también, puede ser debido a la variabilidad natural que supone la variedad de soja [61].

Tabla 84. Alimentos derivados de soja empleadas en el estudio y sus características según su etiquetado.

Muestras	Tipo	Marca	Descripción
S1	Soja	1	Soja de Ecuador
S2	Soja	2	Soja Amarilla
S3	Soja Frita	3	Soja, sal y aceite
S4	Soja (en conserva)	4	Soja (no transgénica), agua y sal.
PTS1	Soja Texturizada Fina	5	Proteína texturizada fina. Proteína de soja.
PTS2	Hijas del Sol. Proteína de Soja Texturizada.	6	Proteína de soja texturizada. Contiene un derivado de soja.
SS1	Salsa de soja	7	45 % Semillas de soja
SS2	Salsa de soja	8	12% Extracto soja
SS3	Salsa de soja	9	25% Extracto soja
L1	Bebida de Soja Calcio	10	13% Semillas de soja
L2	Bebida de Soja_ALPRO SOJA	11	6% Semillas de soja descascarillada
L3	Bebida de Soja_ALPRO SOJA_Chocolate	11	6,4% Semillas de soja descascarillada
L4	Bebida de Soja_ALPRO SOJA_Vainilla	11	6,3% Semillas de soja descascarillada
L5	Bebida de Soja Calcio y Vit D	12	12% Soja descascarillada
L6	Bebida de Soja Ecológica	13	13,6% Soja descascarillada
L7	Bebida de Soja Ecológica_Chocolate	13	14% Soja descascarillada
L8	Bebida de Soja Ecológica_Cereales	13	14% Soja descascarillada
L9	Bebida de Soja Ecológica_Canela y limón	13	12% Soja descascarillada
L10	Bebida de Soja Nature	14	6.8% granos de soja
L11	Bebida de Soja_Calcio	15	6.8% Habas de soja
L12	Bebida de Soja_Manzana y lima	15	6% Habas de soja
L13	Bebida de Soja_Chocolate	15	7.2% Habas de soja
L14	Bebida de Soja_Croissance	16	5% Habas de soja
L15	Bebida de Soja_VIVE SOY	17	13% Habas de soja
L16	Bebida de Soja_VIVE SOY_Chocolate	17	11% Habas de soja
L17	Bebida de Soja_VIVE SOY_Vainilla	17	11% Habas de soja
L18	Bebida de Soja_Calcio	18	12% Habas de soja descascarillada
L19	Bebida de Soja_Calcio	19	12.8% Habas de soja descascarillada
L20	Bebida de Soja_Avellanas	19	12.4% Habas de soja descascarillada
L21	Leche con Calcio e Isoflavonas_desnatada	20	0.025% Extracto Soja=0.01%isoflavonas=10mg por 100mL de leche
L22	Leche con Calcio e Isoflavonas semidesnatada	20	0.025% Extracto Soja=0.01%isoflavonas=10mg por 100mL de leche

Tabla 84 (cont.). Alimentos derivados de soja empleadas en el estudio y sus características según su etiquetado.

Muestras	Tipo	Marca	Descripción
Z1	Zumo de Soja_VIVE SOY_Papaya-Mango	17	2.7% Habas de soja
Z2	Zumo de Soja_VIVE SOY_Melocotón	17	2.7% Habas de soja
Z3	Zumo de Soja_VIVE SOY_Naranja	17	2.7% Habas de soja
Y1	Yogurt_Bifidus	16	No figura % bebida de soja
Y2	Yogurt_Savia	21	83.1% Bebida de Soja
Y3	Yogurt_SojaVit	18	88% Licuado de soja
Y4	Yogurt_Chocolate	14	77% (agua + granos de soja (8%))
Y5	Yogurt_Activia	21	1.8% Extracto de Soja (81% Proteína)
Y6	Yogurt_VIVE SOY_Natural	17	86% Bebida de soja
R1	Galletas Soja_Naranja	19	7% Copos de Soja
R2	Galletas Soja_Higo	19	10.1% Copos de Soja
R3	DIET-FIBRA_Galletas Soja y Manzana	22	4% Copos de Soja
R4	Marie-Lú_Galletas	23	5% Semillas de Soja Tostada
R5	Galletas Soja_Naranja	23	4.5% Trozos de soja caramelizada
R6	Rosquillas de Soja	24	2.1% Granillo de soja
R7	Tortitas de arroz y soja con semilla de lino	19	8.5% Copos de Soja
R8	SojaExtrose_Biscotes	13	20% Soja
T1	Hamburguesa Vegetal de Quinoa	13	Tofu fresco+Soyu
T2	Paté Vegetal con tofu_Oriental	13	35% Tofu + Soyu
T3	Paté Vegetal con tofu y semillas	13	30% Tofu
T4	Paté Vegetal con tofu_Jardinera	13	30% Tofu
T5	Tofu natural	13	100% Tofu fresco
T6	Quefu Curado	13	No figura % Bebida de soja
O1	Preparado Soja (Nata)	14	53% Jugo Soja (12% granos de soja)

Tabla 85. Concentración de las isoflavonas en las muestras analizadas con el método optimizado con una columna de partículas recubiertas (fused-core). n.d.: no detectado; LOQ: límite de cuantificación.

Muestras	Isoflavonas														TOTAL mg/kg											
	Di	Gly	Gi	MDi	MGly	ADi	MGi	AGly	De	Gle	Agi	Ge														
	mg/kg	%RSD	mg/kg	%RSD	mg/kg	%RSD	mg/kg	%RSD	mg/kg	%RSD	mg/kg	%RSD	mg/kg	%RSD	mg/kg	%RSD	mg/kg	%RSD								
S1	458	0,71	99,1	3,05	484	0,75	341	0,14	83,1	0,08	n.d.	n.d.	476	0,40	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1942							
S2	405	0,09	71,0	0,87	484	0,02	408	0,19	76,1	0,39	n.d.	n.d.	538	0,07	n.d.	20,1	1,20	n.d.	n.d.	13,5	4,35	29,4	4,14	2044		
S3	629	5,40	137	1,29	712	9,25	180	4,65	89,8	0,52	497	6,29	474	7,33	46,7	0,95	117	5,37	38,6	1,14	572	7,41	70,6	4,99	3563	
S4	112	6,34	24,8	3,85	191	7,23	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	125	5,49	n.d.	n.d.	23,7	9,96	9,04	1,21	0,72	0,14	12,8	4,40	386		
PTS1	404	2,88	177	2,41	492	3,74	211	2,50	106	3,04	136	1,18	329	3,92	72,4	0,76	96,6	3,17	35,6	2,74	174	3,53	65,6	2,42	2299	
PTS2	501	1,03	87,5	0,89	540	1,85	137	1,01	64,8	1,52	349	0,82	163	1,40	61,4	2,88	72,2	3,60	n.d.	n.d.	452	1,22	32,6	0,89	2461	
SS1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
SS2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
SS3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
L1	97,2	3,58	9,25	3,27	121	3,80	12,1	2,10	n.d.	n.d.	4,70	0,64	32,6	3,12	n.d.	n.d.	6,48	2,84	n.d.	n.d.	4,01	4,80	5,22	1,25	293	
L2	43,1	2,71	n.d.	n.d.	58,4	3,94	5,65	1,05	3,66	3,71	n.d.	n.d.	16,0	3,17	n.d.	n.d.	1,87	4,18	n.d.	n.d.	1,05	3,25	3,45	0,10	133	
L3	62,1	4,72	n.d.	n.d.	78,3	4,98	5,98	1,16	3,58	0,86	<LOQ	<LOQ	12,7	2,61	n.d.	n.d.	1,98	2,02	n.d.	n.d.	1,55	3,00	3,45	2,04	170	
L4	76,3	4,03	n.d.	n.d.	93,2	2,98	4,75	0,10	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	10,1	0,36	n.d.	n.d.	2,69	4,78	n.d.	n.d.	0,73	0,44	4,05	0,98	192	
L5	80,4	1,12	10,2	0,87	96,5	0,52	4,79	2,10	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	9,8	2,04	n.d.	n.d.	2,19	0,58	1,67	0,80	0,75	4,27	3,44	0,42	210	
L6	102	2,02	10,4	4,64	105	2,29	15,3	2,49	3,75	0,61	4,28	0,83	36,3	0,42	n.d.	n.d.	1,10	4,60	1,49	0,45	2,34	2,74	2,51	1,91	284	
L7	64,7	4,83	8,98	4,36	73,0	6,92	5,96	0,35	3,23	3,88	n.d.	n.d.	14,1	4,47	n.d.	n.d.	2,44	4,36	1,57	2,93	1,35	4,29	3,52	4,34	179	
L8	79,0	2,28	14,6	1,87	73,8	1,85	4,79	0,88	3,38	0,90	3,93	2,33	12,6	0,82	n.d.	n.d.	2,36	2,52	1,65	0,26	1,98	0,94	3,06	0,01	201	
L9	89,9	2,37	11,6	1,47	92,9	1,87	12,2	1,50	3,51	2,68	n.d.	n.d.	27,0	1,44	n.d.	n.d.	4,04	3,68	1,50	0,17	1,54	0,49	4,19	0,63	248	
L10	19,7	1,66	n.d.	n.d.	24,1	1,69	9,11	2,09	n.d.	n.d.	4,08	0,96	27,9	0,30	n.d.	n.d.	0,95	1,04	1,78	3,87	2,71	0,16	2,61	1,11	93,0	
L11	94,4	4,04	12,0	4,30	110	2,44	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	10,2	3,58	n.d.	n.d.	8,19	2,25	1,85	4,89	n.d.	n.d.	6,01	2,16	237	
L12	72,2	2,94	10,0	2,13	80,7	1,82	4,40	0,51	3,24	0,47	<LOQ	<LOQ	4,28	1,82	n.d.	n.d.	2,14	2,90	n.d.	n.d.	1,91	2,62	3,43	0,24	188	
L13	107	0,15	12,8	1,01	121	0,30	4,37	0,46	4,01	0,38	n.d.	n.d.	10,5	0,38	n.d.	n.d.	4,49	3,32	n.d.	n.d.	1,07	1,94	5,50	1,18	271	
L14	23,8	3,33	3,43	0,42	41,7	3,31	3,59	0,73	3,59	0,62	n.d.	n.d.	6,77	1,35	n.d.	n.d.	1,90	2,11	n.d.	n.d.	1,07	1,17	4,06	1,39	89,9	
L15	25,1	4,20	7,05	1,41	28,0	3,21	5,88	0,49	4,28	1,56	<LOQ	<LOQ	15,8	2,42	n.d.	n.d.	1,35	4,16	1,95	0,01	2,11	2,22	2,76	1,91	94,3	
L16	85,1	3,73	13,4	0,90	92,2	3,51	16,7	2,03	5,15	1,24	4,93	1,40	41,0	1,61	n.d.	n.d.	1,71	0,21	2,08	0,39	4,65	0,90	3,13	0,29	270	
L17	73,0	4,56	12,5	4,97	76,7	4,72	16,6	3,03	5,37	2,54	4,80	4,21	36,7	2,84	n.d.	n.d.	1,55	5,35	1,86	4,69	4,09	2,93	2,90	3,92	236	
L18	63,9	2,14	7,81	0,98	78,1	2,66	7,36	0,37	n.d.	n.d.	<LOQ	<LOQ	24,1	0,52	n.d.	n.d.	2,45	0,74	2,35	1,85	3,12	0,40	3,59	1,04	193	
L19	128	4,51	10,9	4,10	131	3,66	4,74	4,51	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	9,49	2,79	n.d.	n.d.	2,45	2,88	1,88	2,98	1,21	2,70	3,56	2,25	294	
L20	93,6	2,82	7,36	4,12	126	3,62	4,88	1,91	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	13,1	0,64	n.d.	n.d.	1,22	2,39	1,81	0,20	1,10	1,78	2,83	1,41	252	
L21	53,6	2,32	3,19	2,12	13,2	2,34	2,88	2,74	3,83	4,00	<LOQ	<LOQ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,66	3,06	1,82	4,63	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	109	
L22	53,6	3,21	3,15	3,32	13,2	4,05	n.d.	n.d.	3,75	0,77	<LOQ	<LOQ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,85	3,21	1,40	0,87	1,79	3,85	0,74	3,31	n.d.	107

Tabla 85 (cont.). Concentración de las isoflavonas en las muestras analizadas con el método optimizado con una columna de partículas recubiertas (fused-core). n.d.: no detectado; LOQ: límite de cuantificación.

Muestras	Isoflavonas																							
	Di	Gly	Gi	MDi	MGly	ADi	MGi	AGly	De	Gle	AGi	Ge	TOTAL											
	mg/Kg	%RSD	mg/Kg	%RSD	mg/Kg	%RSD	mg/Kg	%RSD	mg/Kg	%RSD	mg/Kg	%RSD	mg/Kg											
Z1	19,1	3,56	5,12	1,39	19,0	4,62	6,03	2,01	3,59	0,92	<LOQ	12,0	3,37	n.d.	0,52	4,12	1,58	0,91	1,25	1,11	2,50	0,53	70,7	
Z2	20,0	2,98	4,76	2,80	20,5	3,66	5,30	1,38	n.d.	n.d.	<LOQ	10,1	3,63	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,21	3,98	n.d.	n.d.	61,8	
Z3	19,0	2,68	5,19	0,98	17,6	2,96	8,02	1,21	n.d.	n.d.	<LOQ	14,1	1,72	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,29	2,84	2,45	0,89	67,7	
R1	61,2	4,67	14,6	3,76	56,6	5,79	n.d.	n.d.	25,8	4,96	16,8	3,82	n.d.	n.d.	3,19	0,81	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	21,2	4,74	199	
R2	73,7	4,39	16,3	4,99	70,5	2,18	11,7	4,36	n.d.	n.d.	31,0	5,00	2,84	2,94	3,28	3,95	3,53	n.d.	30,2	4,83	n.d.	n.d.	259	
R3	42,8	0,11	n.d.	n.d.	43,7	0,71	13,6	2,85	n.d.	n.d.	22,2	3,41	22,6	4,08	2,87	1,13	3,10	5,58	n.d.	19,3	9,49	n.d.	n.d.	170
R4	35,7	0,73	13	6,47	37,5	8,23	13,1	2,27	21,6	2,27	17,1	0,12	13,8	1,40	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	17,4	4,05	n.d.	n.d.	169	
R5	50,8	0,15	n.d.	n.d.	38,3	0,28	13,9	5,99	n.d.	n.d.	n.d.	16,2	6,52	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	13,7	4,10	n.d.	n.d.	133	
R6	38,4	6,52	13	4,50	45,7	8,50	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	18,3	7,38	20,1	8,20	n.d.	5,37	6,82	n.d.	15,4	7,38	n.d.	n.d.	156	
R7	54,2	1,52	18	5,40	55,2	1,48	n.d.	n.d.	13,0	12,87	27,2	5,25	n.d.	3,50	7,12	n.d.	10,1	6,66	27,1	1,19	n.d.	n.d.	209	
R8	21,0	2,90	1,19	5,59	16,2	1,44	14,9	6,90	0,95	5,48	13,3	8,49	22,4	7,39	0,51	9,31	5,15	1,55	0,52	6,86	7,14	5,32	0,62	7,05
Y1	19,1	0,11	n.d.	n.d.	26,4	1,07	8,61	0,56	n.d.	n.d.	n.d.	22,5	0,42	n.d.	2,58	3,44	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	4,81	3,14	84,1	
Y2	7,42	4,80	3,97	0,65	10,2	6,89	4,83	3,41	3,75	0,14	n.d.	10,6	4,26	n.d.	4,46	0,79	45,3							
Y3	42,5	0,06	7,72	1,07	51,0	0,63	39,0	0,55	n.d.	n.d.	n.d.	85,0	0,50	n.d.	2,03	5,30	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	3,93	0,50	231	
Y4	46,0	3,12	n.d.	n.d.	48,4	1,73	14,2	4,62	n.d.	n.d.	4,98	3,32	37,7	4,26	n.d.	1,12	0,54	2,20	4,36	4,59	4,58	3,08	0,85	162
Y5	60,9	1,33	8,45	4,17	73,1	0,26	25,5	1,61	5,87	3,24	<LOQ	n.d.	n.d.	36,1	1,73	3,23	5,13	n.d.	0,79	5,52	4,27	3,54	218	
Y6	71,9	1,81	9,22	0,94	61,5	1,29	36,6	2,86	6,76	2,17	n.d.	84,3	1,66	n.d.	1,80	1,96	n.d.	n.d.	1,05	4,89	4,25	1,92	277	
T1	38,3	0,37	12,5	1,96	54,2	6,24	11,5	0,05	n.d.	n.d.	12,6	2,05	7	6,27	n.d.	4,15	0,35	n.d.	1,48	8,18	3,04	2,34	145	
T2	15,9	0,51	1,89	7,58	30,6	0,83	3,43	8,35	6,13	0,75	3,92	0,66	n.d.	8,76	3,69	n.d.	n.d.	5,69	3,17	0,32	9,81	3,10	5,06	79,8
T3	22,0	1,93	4,85	1,73	39,1	2,23	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<LOQ	n.d.	n.d.	n.d.	7,05	7,14	n.d.	n.d.	2,78	1,06	n.d.	n.d.	75,8	
T4	79,0	4,57	9,11	2,85	116	7,44	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	8,77	3,68	n.d.	n.d.	10,9	8,27	0,56	3,57	6,00	7,92	n.d.	n.d.	230	
T5	7,97	3,48	4,98	2,34	5,06	3,77	18,8	7,78	5,89	6,33	<LOQ	45,2	9,36	n.d.	27,4	4,84	7,22	2,97	2,33	8,70	4,87	5,29	130	
T6	428	3,90	43,9	2,64	495	6,28	120	3,00	14,7	1,03	18,7	8,72	268	3,64	n.d.	8,67	8,21	5,03	8,37	15,7	3,61	n.d.	1418	
O1	46,0	3,26	6,64	3,16	48,9	3,61	15,8	1,46	4,28	0,41	n.d.	43,3	1,30	n.d.	2,63	1,39	1,92	3,12	3,11	4,07	3,60	0,16	176	

En el caso de la muestra de soja frita (S3), la concentración total de isoflavonas es superior a la soja (S1 y S2). Esto se puede explicar parcialmente por la pérdida de humedad que sufre durante el procesado; nos puede indicar que se realiza un tratamiento de calor seco. Además se observan altos niveles en las concentraciones de los derivados acetil, lo que también puede ser debido al tratamiento térmico seco que es posible que provoque la interconversión de formas malonil a acetil.

La muestra S4, soja en conserva, es la muestra con menor concentración total de isoflavonas. Se detectan concentraciones de malonil inferiores que en las anteriores muestras, y concentraciones superiores de glucósidos y agluconas. Este hecho puede indicar que se produce una interconversión de las formas malonil a glucósidos y agluconas durante el proceso de obtención de la conserva, ya que se realiza un tratamiento térmico húmedo. Es previsible que si se hubiera realizado el análisis del agua de la conserva se hubieran detectado isoflavonas, ya que se puede producir un proceso de extracción; lo que podría explicar que se observen las menores concentraciones debido a la presencia de isoflavonass en el agua de la conserva.

4.3.7.2 Proteína Texturizada de Soja (PTS)

La proteína texturizada de soja es un concentrado de proteína, que se obtiene a partir de soja descascarillada y desgrasada por extracción con agua, agua con álcali diluido (pH entre 7 y 9) o soluciones acuosas de cloruro sódico (0,5-2 M), sometido a un tratamiento mínimo de calor. Posteriormente el producto obtenido se somete a una extracción acuosa o alcohólica para eliminar los carbohidratos solubles y obtener un producto con alrededor de un 70 % de proteína. El término "texturización" significa la obtención de una estructura física en un producto, de modo que al ser ingerido produzca la sensación de estar comiendo carne. El concepto de la textura de carne es complejo y compromete factores tanto visuales como de masticabilidad, elasticidad y jugosidad. Los principales aspectos físicos de la carne que crea esta textura compleja son las fibras musculares y el tejido conectivo [46]; para obtener esta textura en la proteína de soja, se convierte en un producto hidratable, laminado y masticable, sin poseer fibras. Para ello pueden utilizarse dos procesos diferentes: la extrusión termoplástica y la texturización por vapor [62].

Con el método propuesto se analizaron dos tipos distintos de proteína texturizada de Soja, PTS1 y PTS2 (*tabla 84*); las concentraciones de cada isoflavona en cada una de las muestras se recogen en la *tabla 85*.

La concentración total de isoflavonas es similar para cada una de las muestras, 2299 mg/Kg (PTS1) y 2461 mg/Kg (PTS2), y superior a la concentración observada en las muestras de soja. Las elevadas concentraciones observadas indicarían que en ambos casos los concentrados de proteína se obtuvieron

por extracción acuosa y no por extracción hidroalcohólica, ya que no se observan las pérdidas de isoflavonas que se podrían esperar con la extracción alcohólica. Los derivados glucósidos son los más abundantes, seguidos de los derivados acetil. Los niveles de derivados acetil indican que posiblemente las dos muestras fueron sometidas a un tratamiento térmico seco durante el procesado, provocando la posible transformación de los derivados malonil a acetil [6]. Que en la muestra PTS1 la concentración sea menor que en la muestra PTS2, puede deberse a que el procesado de la primera sea menos enérgico que el de la segunda, o simplemente a la variabilidad natural de la variedad de soja.

4.3.7.3 Salsa de Soja (SS)

Este alimento se produce por fermentación de granos de soja, trigo tostado, agua y sal [48]. Los resultados obtenidos para las tres muestras de salsa de soja analizadas, SS1, SS2 y SS3 (*tabla 84*), nos muestran que no se ha detectado ninguna de las isoflavonas estudiadas (*tabla 85*). Por lo tanto, es posible que el tratamiento de fermentación provoque la degradación de isoflavonas, hasta tal punto, que con el método de análisis utilizado no seamos capaces de detectar ninguna de las isoflavonas objeto de estudio.

4.3.7.4 Bebidas de Soja y leche con isoflavonas añadidas (L)

Se analizaron 21 bebidas de soja (L1-L20) y dos leches de origen animal con isoflavonas añadidas (L21 y L22) (*tabla 84*).

La bebida de soja es un alimento líquido producido por agitación de semillas de soja en agua durante 12 horas a temperatura ambiente, finalmente se separa la fase líquida y la soja se muele. Esta soja molida forma una papilla que primero se cuece a 100 °C, luego se enfría a temperatura ambiente y seguidamente se filtra separando el sólido del líquido, el cual es la leche de soja [48]. En la *tabla 85*, podemos observar los resultados de concentración obtenidos.

Las dos muestras de leche de origen animal a las que se ha añadido un extracto de soja que contiene isoflavonas, presentaron las concentraciones de isoflavonas que se muestran

La concentración total de isoflavonas en las bebidas de soja (L1 - L20) oscila entre 89,9 mg/L (L14) a 294 mg/L (L19). Se da una posible correlación entre la concentración total de isoflavonas y el porcentaje de soja utilizado para su obtención, ya que las muestras que poseen concentraciones superiores son las que, en su elaboración, se ha utilizado mayor porcentaje de soja en el procesado, y lo contrario con las muestras en las que se han utilizado porcentajes inferiores. Si observamos las muestras L6 a L9 existe una variabilidad relativa en la concentración total de isoflavonas, aún siendo de la misma marca comercial y teniendo porcentajes similares de semilla de soja en su composición; es posible que esta variabilidad esté

relacionada con los distintos tipos de soja utilizada, con pérdidas durante el almacenamiento o con diferencias en el procesado. Las isoflavonas predominantes, independientemente de la muestra, son los glucósidos seguido de los derivados malonil, lo que nos puede indicar que la temperatura utilizada en el procesado no es tan intensa como para provocar la interconversión de los derivados malonil a las formas acetil o glucósido.

En el caso de las muestras de leche a las que se añaden isoflavonas, poseen valores inferiores de concentración total de isoflavonas comparado con las bebidas de soja. Si observamos el perfil de isoflavonas de las muestras de leche, prevalecen los glucósidos, siendo bajas las concentraciones de las otras isoflavonas detectadas, por lo que podemos pensar que el extracto que se adiciona a la leche está compuesto sobre todo por glucósidos. El fabricante indica en su información que contiene 10 mg/100mL de isoflavonas, lo cual concuerda con los valores obtenidos, 109 (L21) y 107 mg/L (L22).

4.3.7.5 Zumos de Soja (Z)

Los zumos de soja son zumos de frutas a las que se añade bebida de soja. Su porcentaje de semillas de soja en los ingredientes es inferior al porcentaje de las bebidas de soja. Las muestras analizadas de zumo de soja se ilustran en la *tabla 84*, y los resultados obtenidos se muestran en la *tabla 85*.

La concentración total de isoflavonas en las tres muestras es similar y menor que la encontrada en las bebidas de soja. Las concentraciones determinadas están entre 61,8 mg/L (Z2) y 70,7 mg/L (Z1). Al igual que en las bebidas de soja, las isoflavonas predominantes son los derivados malonil y los glucósidos, pero siendo menor la diferencia entre las concentraciones que se observaba antes, por lo que se prevé que el grado de interconversión entre las formas de las isoflavonas es inferior al observado con las bebidas de soja. En el caso de las muestras Z2 y Z3 el perfil de isoflavonas es muy similar, en cambio la muestra Z1 tiene mayor diversidad de las formas químicas derivados de las isoflavonas, aunque las isoflavonas que no se detectan en las otras muestras están en cantidades relativamente bajas.

4.3.7.6 Yogures de Soja (Y)

En este grupo se incluyeron los yogures hechos con bebida de soja (Y1-Y4 y Y6) y aquellos yogures con extracto de soja (Y5) (*tabla 84*). Los resultados obtenidos se muestran en la *tabla 85*.

Las concentraciones totales de isoflavonas oscilan entre 45,3 mg/L (Y2) y 277 mg/L (Y6). Las concentraciones y perfiles de isoflavonas son muy variables según la muestra, hecho que viene determinado, probablemente, por el procesado de cada uno de los productos y por la materia prima de partida. Las isoflavonas predominantes en concentración son glucósidos y maloniles, siendo en algunos casos el mayoritario la

isoflavona MGi. Esto indica posiblemente que los productos no fueron sometidos a un proceso térmico agresivo, lo que se refleja en la alta concentración de derivados malonil y en que los derivados acetil sólo se detecten en algunas muestras.

4.3.7.7 Repostería y panadería de soja (R)

Este grupo está compuesto por productos de repostería elaborados con soja, como son las galletas (R1-R6), que son galletas a las que se añade soja como semilla, y productos de panadería dietética elaborados con soja, como son las tortitas de arroz (R7) (a las que también se añade soja como semilla) y el pan tostado tipo biscote (R8) (*tabla 84*). Los resultados se muestran en la *tabla 85*.

En las muestras de galletas (R1-R6) los valores de concentración de isoflavonas encontrados oscilan entre 133 mg/Kg (R5) y 259 mg/Kg (R2). La muestra R2 es la que mayor porcentaje de copos de soja tiene en sus ingredientes y también en la que se encontraron niveles más altos de isoflavonas. En el caso de la muestra R5 el ingrediente añadido es soja caramelizada, y la cantidad de soja añadida es menor en comparación con el resto de las galletas, lo que puede explicar las menores concentraciones de isoflavonas encontradas. En este grupo de muestras no se encuentran grandes diferencias en el perfil, aunque sí se encuentra variabilidad en la concentración. Las formas de isoflavonas predominantes son los glucósidos seguidos de los derivados acetil, por lo que es posible que en el procesado las muestras fueran sometidas a un tratamiento térmico seco que pudiera provocar la interconversión de las formas malonil en acetil.

En el caso de las tortitas de arroz (R7), el perfil de isoflavonas es muy similar y la concentración total de las mismas está dentro del rango de las galletas. En el pan tostado (R8) la concentración encontrada es mucho menor, por lo que se puede pensar que en el procesado se han degradado las isoflavonas, ya que si tenemos en cuenta la composición dada por el fabricante, el producto tiene un 20% de soja y, de este bloque de muestras, es la que menos concentración total de isoflavonas presenta. El perfil encontrado en el pan es distinto; hay mayor diversidad de formas químicas derivadas de las isoflavonas, siendo predominantes los derivados malonil.

4.3.7.8 Tofu y derivados (T)

El tofu (T5) se produce por coagulación de la bebida de soja, seguido de un compactamiento por presión de la cuajada resultante. La coagulación consiste en la precipitación de proteína por desnaturalización de la misma eliminando la repulsión de sus cargas eléctricas mediante reducción del pH (disoluciones débilmente ácidas) provocando su agregación por interacciones hidrofóbicas [63]. Una vez conseguido el tofu, una forma de conservarlo es por medio de la pasteurización.

Otras muestras incluídas en este grupo son una hamburguesa vegetal con soja (T1), que es un preparado vegetal con tofu fresco y salsa de soja, tres patés

variados con soja (T2, T3, T4), en los que se utiliza para su preparación tofu y salsa de soja, y también un queso curado de soja (T6), realizado con leche de soja (*tabla 84*).

Las concentraciones obtenidas para estas muestras se muestran en la *tabla 85*.

En este grupo de muestras se encuentran concentraciones totales de isoflavonas que van desde 75,8 mg/Kg (T3) hasta 1418 mg/Kg (T6). La gran diversidad de tipos de muestras se refleja en la gran variabilidad observada en la concentración de las isoflavonas. La muestra de tofu (T5) tiene un perfil en el que predominan los derivados malonil y las agluconas.

En el caso de las muestras T1 a T4 encontramos que las isoflavonas predominantes son los glucósidos, seguidos de los derivados acetil y malonil, aunque también se observan agluconas. Comparándolo con la materia prima utilizada para la elaboración de estas muestras, que nos indica el fabricante que es el tofu (T5), es posible que en algún punto del procesado se utilice un tratamiento térmico seco, capaz de provocar la interconversión de los derivado malonil en glucósidos, e incluso la degradación de las agluconas. En la muestra T4 hay un perfil similar pero en concentración superior, según el fabricante se realiza con la misma cantidad de materia prima (tofu) que las muestras T2 y T3; esta diferencia puede ser debida a diferencias en el procesado del producto. La variabilidad observada se puede asociar a la variedad de la materia prima, la intensidad del procesado y el almacenamiento y conservación de las muestras.

La muestra T6 tiene una alta concentración total de isoflavonas y un perfil muy similar a las bebidas de soja, lo cual puede estar relacionado con que su ingrediente principal sea bebida de soja. Las isoflavonas predominantes son los glucósidos y luego los derivados malonil y acetil. La concentración de la isoflavona MG_i es relativamente superior a la observada en las bebidas de soja, lo que podría indicar que el tratamiento para obtener la muestra, el almacenamiento y conservación de la misma, provoca menores interconversiones entre las distintas formas de las isoflavonas, o simplemente que sea por la propia variabilidad de la materia prima.

4.3.7.9 Otros alimentos derivados (O)

En este grupo de muestras se incluyeron aquellas muestras que no se pueden incluir en otros grupos porque no coinciden ni en procesado ni en materia prima con los demás. La muestra que incluye este grupo es un preparado de soja tipo nata (O1), realizado a partir de jugo de soja. Las concentraciones encontradas para esta muestra de las isoflavonas son las de la *tabla 85*. La concentración total y el perfil son similares a las bebidas de soja, siendo predominantes los glucósidos y los derivados malonil.

4.3.8 Conclusiones

En este estudio, se ha aplicado una estrategia de cambio de condiciones cromatográficas (temperatura, flujo, gradiente y tiempo de re-equilibrado) una a una para la optimización de un método de análisis rápido y reproducible para la determinación de las 12 principales isoflavonas presentes en soja.

La separación de todos los compuestos se consiguió en 5,8 minutos y en un tiempo total de análisis, incluyendo limpieza de la columna y tiempo de re-equilibrado, menor de 12 minutos (11,50 minutos).

El método optimizado muestra unas excelentes características cromatográficas en términos de resolución, simetría de picos, reproducibilidad, cuantificación y límites de detección, que ha permitido su aplicación con éxito al análisis de un gran número de muestras reales.

La combinación de las nuevas tecnologías en columnas y la optimización de las condiciones cromatográficas permiten incrementar considerablemente el número de muestras que se pueden procesar al día en un equipo convencional de HPLC, si lo comparamos con los métodos más tradicionales.

El análisis de muestras confirma que el contenido total y perfil de isoflavonas en soja y alimentos derivados de la soja es bastante variable, siendo el rango de la concentración total de isoflavonas, en las muestras analizadas en este estudio, entre 45,3 mg/Kg y 3562 mg/Kg. Entre los posibles factores que pueden influenciar la concentración y perfil de las isoflavonas en las muestras están la variedad de soja utilizada, su época y lugar de cultivo, la cantidad de materia prima, las condiciones del procesado del alimento y del almacenamiento de las muestras.

Basándonos en los datos obtenidos durante este estudio se puede concluir que las columnas de partículas recubiertas, *fused-core*, poseen un gran potencial para la obtención de métodos de análisis más rápidos y sensibles para la determinación de isoflavonas, y también para otro tipo de compuestos naturales.

4.4 DESARROLLO DE UN MÉTODO DE ANÁLISIS RÁPIDO Y SIMULTÁNEO DE COMPUESTOS FENÓLICOS Y CAFEÍNA EN MUESTRAS DE TÉ, MATE, CAFÉ SOLUBLE, REFRESCOS Y BEBIDAS ENERGÉTICAS MEDIANTE CROMATOGRFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICACIA USANDO UNA COLUMNA DE PARTÍCULAS RECUBIERTAS, *FUSED-CORE*

Una vez comprobado que se puede conseguir un método rápido de análisis para determinar las doce isoflavonas principales presentes en la soja, se decide utilizar la columna *fused-core* para la optimización de un método de análisis de 20 compuestos fenólicos, simultáneamente, en diferentes productos de uso cotidiano como son el té y el café.

Por lo tanto, el objetivo de este estudio es la obtención de un método de análisis rápido y simultáneo para la determinación de ácidos fenólicos, flavanoles, flavonas, flavonoles y cafeína en un amplio rango de alimentos y bebidas utilizando una columna de partículas recubiertas, *fused-core*, y un equipo convencional de HPLC.

4.4.1 Desarrollo del método cromatográfico

Utilizando una mezcla de patrones de todos los compuestos a analizar (*tabla 86*) se evalúan varias condiciones cromatográficas para la optimización del método.

Tabla 86. Compuestos analizados con el nuevo método cromatográfico usando una columna de partículas recubiertas, fused-core. Núm.pico: número del pico cromatográfico; Abrev.: abreviatura del compuesto.

Núm. pico	Compuesto	Abrev.	Familia	Núm. pico	Compuesto	Abrev.	Familia
1	Ácido gálico	GalAc	Ácido fenólico	11	(-)-galocatequina galato	GCG	Flavanoles
2	(-)-galocatequina	GC	Flavanoles	12	Ácido p-cumárico	CouAc	Ácido fenólico
3	Ácido protocatéquico	PrtAc	Ácido fenólico	13	(-)-epicatequina galato	ECG	Flavanoles
4	(-)-epigalocatequina	EGC	Flavanoles	14	Miricetina-3-O-ramnósido	MyR	Flavonol
5	(-)-catequina	CAT	Flavanoles	15	Quercetina-3-O-rutinósido	QueR	Flavonol
6	Ácido clorogénico	ChlAc	Ácido fenólico	16	Quercetina-3-O-glucopiranosido	QueG	Flavonol
7	Cafeína	CAF	Alcaloide	17	Luteolina-7-O-glucósido	LutG	Flavona
8	Ácido cafeico	CafAc	Ácido fenólico	18	Kaempferol-3-O-rutinósido	KpfR	Flavonol
9	(-)-epicatequina	EC	Flavanoles	19	Kaempferol-3-O-glucósido	KpfG	Flavonol
10	(-)-epigalocatequina galato	EGCG	Flavanoles	20	Apigenina-7-O-glucósido	ApiG	Flavona

Los parámetros que se evaluaron fueron: diferentes disolventes para la fase móvil (agua y acetonitrilo o metanol), distintas cantidades de ácido (0-2% de ácido fosfórico), temperaturas (25-55°C), flujos (1-2,2 mL/min), gradientes de la fase móvil y tiempo de re-equilibrado (1-5 minutos).

El primer paso para la optimización es la evaluación de varios gradientes lineales utilizando diferentes disolventes como fase móvil orgánica, acetonitrilo o metanol, con diferentes cantidades de ácido, utilizando un flujo bajo de 1 mL/min y a temperatura ambiente (25°C). La fase móvil acuosa contiene la misma cantidad de ácido que la orgánica. Se comprueba con estos gradientes que ninguno de los dos disolventes es capaz de conseguir la separación.

Los compuestos que muestran mayor dificultad para su separación son ChIAc/CAF/CafAc y QueG/LutG. Según los resultados obtenidos, bajas cantidades de ácido en ambos disolventes muestran una mejor separación en general para la separación crítica de estos compuestos.

El uso de metanol como fase móvil da lugar a picos más anchos y mayor asimetría, además de una presión 40% mayor que con el acetonitrilo. Estos datos concuerdan con los observados en el apartado 4.1 de este capítulo. Que el metanol genere mayor presión de trabajo es un aspecto muy importante ya que debido a esa mayor presión se limita la posibilidad de aumentar el flujo para reducir el tiempo de análisis.

Por lo tanto, se selecciona acetonitrilo con 0,1% de ácido fosfórico para continuar con la optimización del método cromatográfico debido a que ha mostrado mayor capacidad para la separación de los picos críticos, mejor forma de pico y menor presión de trabajo.

Se continúa la optimización siguiendo las tendencias observadas hasta ahora con los experimentos de gradientes lineales y se modifica la composición de la fase móvil con el fin de mejorar la separación de los compuestos.

Además con el mismo gradiente se evalúa el aumento de temperatura de la columna, de 25°C a 35°C, 45°C y 55°C, para conseguir mayor separación, ya que afecta a la liberación de los analitos de la fase estacionaria y a su solubilidad en la fase móvil, por lo tanto se reduce también el tiempo de análisis. Utilizando el mismo flujo y aumentando la temperatura se obtienen picos más estrechos y más simétricos, además el tiempo de retención se redujo para todos los compuestos. El aumento de temperatura también afecta a la viscosidad de la fase móvil disminuyendo la presión a través de la columna y permitiendo mayores flujos de trabajo [60]. Incrementando la temperatura de 25°C a 55°C se reduce la presión en un 40% permitiendo el uso de mayores flujos en el análisis.

Por lo tanto aumentando la temperatura a 55°C evaluamos el aumento de flujo de 1,0 mL/min a 2,5 mL/min (próximo al límite de presión del sistema) en intervalos de 0,25 mL/min. Para cada incremento de flujo se ajustó el gradiente proporcionalmente para mantener la separación. Como era de esperar, los tiempos de retención se reducen al aumentar el flujo, además como se aumenta el flujo, la transferencia de masas es más rápida y se obtienen picos más estrechos. Sin embargo, los flujos mayores de 2,2 mL/min afectaron a la retención de algunos compuestos en mayor medida que otros. La cafeína, por ejemplo, fue menos retenida por la fase estacionaria que ChIAc y CafAc al incrementar el flujo, y como consecuencia dio lugar a un solapamiento parcial entre la cafeína y estos compuestos al aumentar el flujo a más de 2,2 mL/min.

Como consecuencia de todas las condiciones evaluadas, usando 2,2 mL/min como flujo, 55°C como temperatura y realizando ajustes del gradiente se consigue la separación de todos los compuestos analizados en menos de 5 minutos (*figura 118*), utilizando las condiciones que se muestran en la *tabla 87*.

Tabla 87. Condiciones cromatográficas optimizadas para el análisis de los 20 compuestos con una columna de partículas recubiertas, fused-core.

Flujo	2,2 mL/min	
Temperatura	55°C	
Fases móviles	Fase A	Agua 0,1% ácido fosfórico
	Fase B	Acetonitrilo 0,1% ácido fosfórico
Gradiente	Tiempo (min)	% B
	0,00	5
	0,50	10
	2,00	12,5
	3,00	15
	4,00	80
	5,00	100
	6,00	100
7,00	5	

En la última parte de la optimización se estudió el tiempo de re-equilibrado entre análisis. Esto es un aspecto importante para la obtención de separaciones rápidas ya que este tiempo, unido al necesario para volver a las condiciones iniciales, puede ser el responsable de más del 50% de la duración general del método. Por ello se evalúa la variabilidad en los tiempos de retención y áreas al utilizar como tiempo de equilibrado menos de 5 minutos, que fue el tiempo utilizado durante la optimización. Utilizando tiempos de re-equilibrado de 3 min se obtienen variabilidades en tiempo de retención y área menores del 2%, por lo que se utiliza como tiempo de re-equilibrado 3 min, siendo el tiempo total de análisis para el método optimizado de 10 min.

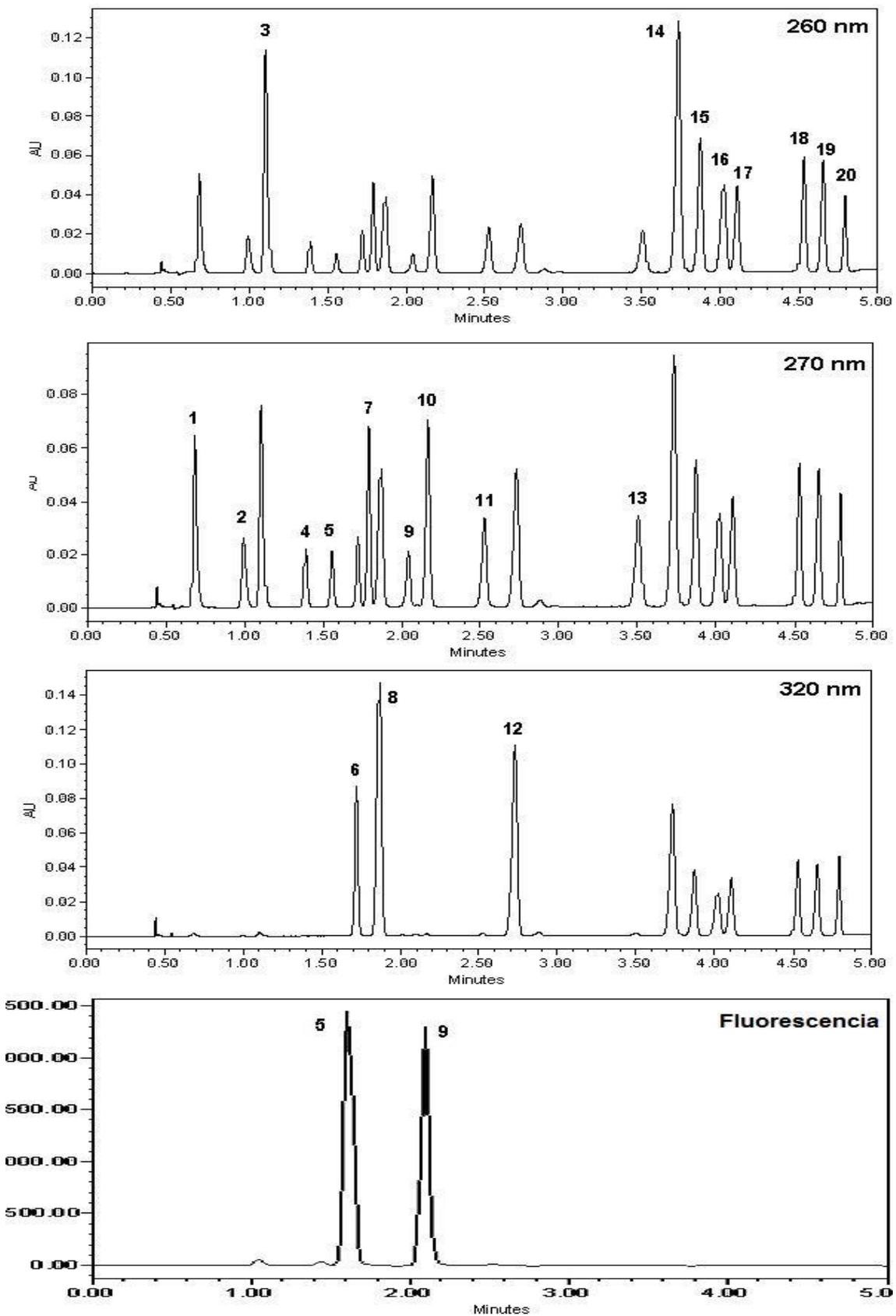


Figura 118. Cromatogramas de la mezcla de patrones obtenidos con el método optimizado a las distintas longitudes de onda de detección. La identificación de picos se muestra en las tablas 86 y 89.

4.4.2 Características del método

La identificación de los compuestos se realiza por comparación de los tiempos de retención y los espectros UV obtenidos con los de los patrones correspondientes. Para todos los compuestos la respuesta fue lineal entre 0,1 y 100 mg/L con coeficientes de regresión (R^2) mayores de 0,9986 (tabla 88). La cuantificación se realiza para una longitud de onda determinada que se muestra en la tabla 89.

Tabla 88. Curvas de calibración para cada uno de los 20 compuestos de estudio obtenida con el método cromatográfico optimizado para una columna de partículas recubiertas, fused-core, usando detección UV y fluorescencia.

Compuesto	Abrev.	Ordenada	Pendiente	R^2
Ácido gálico	GalAc	-9194	12300	0,9993
(-)-galocatequina	GC	1,23	3782	0,9991
Ácido protocatequico	PrtAc	10,7	17438	1,0000
(-)-epigalocatequina	EGC	-935	1844	0,9994
(-)-catequina	CAT	-964	3786	0,9996
Ácido clorogénico	ChlAc	-2201	13406	0,9999
Cafeína	Caf	-6586	11711	0,9995
Ácido cafeico	CafAc	83,4	25476	0,9999
(-)-epicatequina	EC	-291	3065	0,9999
(-)-epigalocatequina galato	EGCG	-942	14389	1,0000
(-)-galocatequina galato	GCG	-2209	8025	0,9999
Ácido p-cumárico	CouAc	-6607	26678	0,9996
(-)-epicatequina galato	ECG	-3991	7230	0,9974
Miricetina-3-O-ramnósido	MyrR	-1095	10520	0,9998
Quercetina-3-O-rutinósido	QueR	1959	6892	0,9991
Quercetina-3-O-glucopiranosido	QueG	3223	10650	0,9995
Luteolina-7-O-glucósido	LutG	1210	9421	0,9992
Kaempferol-3-O-rutinósido	KpfR	-335	10844	0,9998
Kaempferol-3-O-glucósido	KpfG	-6921	8322	0,9994
Apigenina-7-O-glucósido	ApiG	-5040	10260	0,9995
(-)-catequina	CAT (fluor)	53801	9000000	1,0000
(-)-epicatequina	EC (fluor)	2000000	6000000	0,9989

En general, las propiedades del método optimizado respecto al tiempo de retención, la anchura de pico, el factor de capacidad (k'), el factor de separación (α), la resolución (R_s) y la simetría de pico (A) son excelentes (tabla 88). Se consigue una buena separación de todos los compuestos con picos muy estrechos y simétricos.

El tiempo de retención para todos los compuestos se encuentra entre 0,68 min (GalAc) y 4,80 min (ApiG) y la simetría de picos entre 0,84 (QueG) y 1,53 (GalAc). Una baja variabilidad en los tiempos de retención, menor de 0.26%, se observa para todos los compuestos analizados. Algo a tener en cuenta es que la variabilidad en los tiempos de retención para los compuestos detectados mediante fluorescencia, CAT y EC, es mayor que la variabilidad de sus tiempos detectados por UV. Esto puede ser causado por la difusión que se produce entre la celda del detector de fila de diodos y la conexión en línea existente entre los dos detectores (DAD y fluorescencia).

Tabla 89. Parámetros cromatográficos para el método optimizado de análisis de 20 compuestos usando una columna de partículas recubiertas, fused-core. Núm. Pico: número del pico cromatográfico; RSD: desviación estándar relativa en porcentaje; tr: tiempo de retención.

Núm, pico	Compuesto	Abrev,	Detección nm	tr minutos	RSD tr	RSD Área	K'	A	Rs	α	LOD ($\mu\text{g/L}$)	LOQ ($\mu\text{g/L}$)
1	Ácido Gálico	GalAc	270	0,68	0,11	0,50	0,55	1,53	-	-	102	339
2	(-) Galocatequina	GC	270	0,99	0,08	0,43	1,32	1,24	6,69	0,17	211	704
3	Ácido protocatequico	PrtAc	260	1,11	0,07	0,24	1,56	1,12	2,07	1,18	7,67	25,6
4	(-) Epigallocatequina	EGC	270	1,39	0,12	0,58	2,24	1,00	7,32	1,44	109	364,5
5	(-) Catequina	CAT	270	1,56	0,13	0,33	2,75	1,01	3,24	1,23	11,5	38,3
6	Ácido clorogénico	ChIac	320	1,72	0,14	0,27	2,98	0,94	1,38	1,08	13,3	44,4
7	Cafeína	CAF	270	1,79	0,12	0,13	3,15	0,95	1,78	1,05	4,22	14,1
8	Ácido cafeico	CafAc	320	1,86	0,09	0,16	3,33	0,91	1,81	1,06	5,29	17,6
9	(-) Epicatequina	EC	270	2,04	0,11	0,25	3,91	1,01	3,31	1,18	49,7	166
10	(-) Epigallocatequina galato	EGCG	270	2,16	0,10	0,11	4,03	0,93	0,68	1,03	22,9	76,2
11	(-) Galocatequina galato	GCG	270	2,52	0,12	0,60	4,91	0,90	7,33	1,22	8,69	29,0
12	Ácido p-cumárico	CouAc	320	2,73	0,08	0,22	5,36	0,85	3,36	1,09	1,90	6,32
13	(-) Epicatequina galato	ECG	270	3,51	0,06	0,57	7,23	0,86	13,1	1,35	13,6	45,3
14	Miricetina-3-O-ramnósido	MYR	260	3,74	0,06	0,18	7,65	0,89	2,91	1,06	6,09	20,3
15	Quercetina-3-O-rutinosido	Quer	260	3,87	0,07	0,34	7,98	0,86	2,32	1,04	12,2	40,7
16	Quercetina-3-O-glucopiranosido	QueG	260	4,02	0,07	0,47	8,41	0,84	3,27	1,05	14,2	47,4
17	Luteolina-7-O-glucósido	LutG	260	4,11	0,08	0,55	8,60	0,89	1,50	1,02	23,7	78,9
18	Kaempferol-3-O-rutinosido	Kpfr	260	4,53	0,07	0,37	9,56	0,91	8,49	1,11	27,5	91,5
19	Kaempferol-3-O-glucósido	Kpfg	260	4,66	0,06	0,48	9,86	0,87	2,82	1,03	174	579
20	Apigenina-7-O-glucósido	ApiG	260	4,80	0,07	0,42	10,2	0,90	3,23	1,03	50,4	168
5	(-) Catequina	CAT	Fluorescencia	1,62	0,26	0,39	2,76	1,05	-	-	0,50	1,66
9	(-) Epicatequina	EC	Fluorescencia	2,12	0,23	0,47	3,92	1,00	2,25	1,42	0,46	1,54

Independientemente de la forma de detección, la variabilidad en las áreas para todos los compuestos es menor del 0,60%. Los límites de detección están entre 0,46 y 211 µg/L para todos, mientras que los límites de cuantificación se encuentran entre 1,54 y 704 µg/L. Los menores límites de detección se obtienen para la CAT (0,50 y 1,66 µg/L) y para la EC (0,46 y 1,54 µg/L) que son los dos compuestos que se detectan mediante fluorescencia. Por otro lado, los mayores límites de detección y cuantificación observados son para otro flavanol, la GC (211 y 704 µg/L).

Una de las características más relevantes obtenidas en el desarrollo de este método es su corto tiempo de análisis, 10 min entre inyecciones, teniendo en cuenta que se ha utilizado un equipo de HPLC convencional. Cuando lo comparamos con métodos convencionales recientemente publicados para la determinación de diferentes tipos de compuestos, la reducción de tiempo es notable. En el método desarrollado por Sultana y col. 2008 [64], por ejemplo, se necesitaron unos 40 min para separar 8 flavanoles y 5 procianidinas oligoméricas en té usando HPLC-MS, el tiempo total incluyendo la limpieza de columna y la vuelta a las condiciones iniciales, sin tener en cuenta el tiempo de re-equilibrado, fue de 55 min. Cabrera y col 2003 [65] desarrollaron un método para el análisis de EGCG, EGC, ECG, EC, GalAc y CAF, que lograba su separación en 25 min. Yang y col 2007 [66] publicaron la separación simultánea de 3 alcaloides y 7 flavanoles en hojas de té en aproximadamente 20 min. Otro método propuesto fue el de He y col. 2010 [67] separan CAF y 5 flavanoles en aproximadamente 15 min, aunque la separación no fue completa (EGC y CAT no fueron resueltos).

Existen publicaciones de métodos más rápidos utilizando un sistema convencional de HPLC, como es el método desarrollado por Hu y col. 2009 [68] donde se consiguió la separación de 10 flavanoles, 3 alcaloides y GalAc en té en aproximadamente 11 minutos. Los autores afirman una reducción de 2,5 a 7 veces en el tiempo de análisis, respecto al obtenido con los actuales métodos de análisis (40-105 minutos). Sin embargo, hay algunos compuestos que pueden ser analizados con el método que se presenta en este capítulo, consiguiendo menores tiempos de retención (3-4 veces menos) que con el de Hu y col. 2009. Por ejemplo, para ambos métodos el primer compuesto en eluir es el GalAc seguido por EGC y CAT. Los tiempos de retención para estos compuestos con el método propuesto por Hu y col. fueron 3,0; 3,3; 5,1 y 5,4 minutos, respectivamente, mientras que los tiempos de retención obtenidos con el método desarrollado en este capítulo son 0,68, 0,99, 1,39 y 1,56 minutos, respectivamente. Esto supone tiempos de retención entre 3,3 y 4,4 veces más cortos en el método propuesto.

Pero existen otras alternativas para obtener separaciones rápidas en sistemas de HPLC convencionales. Una de estas alternativas es el uso de columnas monolíticas, que ya han sido descritas a lo largo de este capítulo; se ha comentado que debido a su diseño estas columnas son capaces de reducir los tiempos de análisis

a través de bajas presiones de trabajo, permitiendo flujos altos y mayores transferencias de masa [32]. Existen publicaciones que utilizan estas columnas para el análisis de cafeína y otros alcaloides en alimentos, como es el trabajo de Tzanavaras y Themelis 2007 [37] donde se determinan CAF, teobromina y teofilina en té, café, cacao, chocolate, bebidas de cola y café soluble. Se consigue la separación de los tres compuestos en 3,20 minutos, siendo 3,20 min el tiempo de retención de la CAF. Si comparamos con el tiempo de retención obtenido para CAF con el método descrito en este capítulo, 1,80 min, vemos que con este método se consigue una reducción del tiempo de retención a casi la mitad. Además los picos obtenidos con la columna de partículas recubiertas son más simétricos y estrechos que los obtenidos con la columna monolítica (como se comprobó en el apartado 4.1 de este capítulo); estas diferencias también pueden ser debidas a que Tzanavaras y Themelis 2007 [37], aunque utilizaron una columna monolítica más corta, 50 mm, y como fase móvil acetonitrilo, la baja temperatura (25°C) y el bajo flujo (0,5 mL/min) pueden explicar esas diferencias con el método desarrollado con una columna de partículas recubiertas, *fused-core*.

Sin duda, la reducción del tiempo de análisis usando el método desarrollado en este capítulo es importante, lo que indica un gran potencial de estas columnas de partículas recubiertas, *fused-core*, para proporcionar separaciones rápidas en comparación con las columnas particuladas convencionales o las monolíticas. De hecho, este rendimiento sólo es alcanzable por la separaciones con UHPLC (ultra-high performance liquid chromatography), como el estudio de Nováková y col. 2010 [69] donde se desarrolla un método de determinación de 29 compuestos fenólicos y cafeína (12 de los cuales se detectan en el método desarrollado en este apartado) en té y extractos en menos de 19 min usando una columna de 100 mm, de tamaño de partícula de 1,7 µm, a 25°C y con un gradiente de agua y metanol acidificados (0,1% de ácido fórmico) con un flujo variable entre 0,42 a 0,45 mL/min. La diferencia más evidente entre éste y el método propuesto, además del número de compuestos analizados, es el flujo de trabajo. La columna de partículas recubiertas, debido a su tamaño de partícula, 2,7 µm, a la temperatura de trabajo, 55°C, y el uso de acetonitrilo como fase móvil en lugar de metanol, permite trabajar a 2,2 mL/min. La mayoría de los ácidos fenólicos y los flavanoles analizados en ambos estudios son similares, pero hay diferencias en los flavonoides analizados. En el método desarrollado en este capítulo se detectan más derivados glucósidos de los flavonoides que en el método desarrollado por Nováková y col. 2010 [69] donde se detectan solamente las agluconas de los flavonoides.

Se puede concluir que, en general, el método desarrollado con la columna de partículas recubiertas, *fused-core*, con un sistema convencional de HPLC posee un rendimiento cromatográfico similar, e incluso superior, al obtenido con los sistemas UHPLC. Sin embargo, es importante resaltar el potencial de los sistemas UHPLC para la obtención de método más rápidos si se utilizan las condiciones óptimas.

4.4.3 Aplicación del método optimizado a muestras reales

Utilizando el método cromatográfico optimizado se analizaron 8 muestras diferentes de té (negro, blanco y verde), café, mate, refresco y bebida energética.

El método de extracción utilizado se describe en el apartado 3.3.2 de este capítulo; se llevaron a cabo tres extracciones secuenciales utilizando ultrasonidos y diferentes disolventes de metanol acuoso, enrasando al final a un volumen conocido para determinar su concentración. Las muestras líquidas se desgasificaron y se analizaron directamente.

La concentración de los compuestos detectados en cada una de las muestras se recoge en la *tabla 90*. Todas las muestras se analizaron por duplicado y en todas, la variabilidad en su concentración fue menor del 5%.

Tabla 90. Concentración en mg/L y mg/g de los compuestos analizados en las muestras objeto de estudio con el método cromatográfico optimizado con una columna de partículas recubiertas, fused-core. Comp.: compuesto; Núm. Pico: número del pico cromatográfico; n.d.: compuesto no detectado, menor del límite de detección; <LOQ: compuesto detectado pero con una concentración menor del límite de cuantificación.

Comp.	Núm. Pico	Té Verde	Té Blanco	Té Negro	Mate	Bebida Refrescante	Bebida energética	Café soluble	Té verde + guaraná
		mg/g	mg/g	mg/g	mg/g	mg/L	mg/L	mg/g	mg/ L
GalAc	1	4,29	5,58	8,15	n.d.	n.d.	2,14	n.d.	3,14
GC	2	29,3	11,1	0,73	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,11
PrtAc	3	n.d.	n.d.	0,38	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<LOQ
EGC	4	66,4	44,6	1,60	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	14,8
CAT	5	31,4	28,3	1,26	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	14,4
ChlAc	6	6,95	2,43	1,21	134	n.d.	n.d.	60,5	n.d.
CAF	7	130	140	89,1	39,9	108,4	313,8	69,6	122
CafAc	8	n.d.	n.d.	n.d.	1,79	n.d.	n.d.	4,55	n.d.
EC	9	12,2	9,61	4,18	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	27,9
EGCG	10	30,6	29,1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	13,4
GCG	11	n.d.	n.d.	0,41	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,36
CouAc	12	n.d.	n.d.	<LOQ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
ECG	13	14,8	22,0	0,55	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	12,8
MyR	14	2,52	1,85	1,70	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,04
QueR	15	17,6	12,4	8,56	38,7	n.d.	n.d.	n.d.	4,74
QueG	16	5,50	2,42	1,92	3,18	n.d.	n.d.	n.d.	1,57
LutG	17	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
KpfR	18	4,44	1,52	1,66	4,19	n.d.	n.d.	n.d.	1,05
KpfG	19	3,78	2,15	1,88	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,39
ApiG	20	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

El uso de distintas longitudes de onda y de distintos detectores para la identificación y cuantificación de los compuestos fue necesario cuando se aplicó el método a las muestras reales. Uno de los mayores problemas encontrados fue la gran diferencia en la concentración de ciertos compuestos en función de la muestra. La elevada concentración de la cafeína requirió dilución de algunas de las muestras para disminuir la respuesta en el detector y evitar la saturación de la señal. Pero hay que tener en cuenta que los ácidos fenólicos, catequinas y flavonoides se encuentran en baja concentración, comparado con la cafeína, y la dilución dificultaba su detección. Por ello se utilizaron distintos detectores (DAD y fluorescencia) y distintas longitudes de onda (260, 270 y 320 nm) para poder detectar selectivamente y cuantificar los compuestos que se encontraban en concentraciones menores.

Por ejemplo, el compuesto cafeína (7) eluye junto al ChIAc (6) y CafAc (8) pero estos dos compuestos absorben en el espectro UV a 323-326 nm, mientras que la cafeína no absorbe a esas longitudes de onda, por lo tanto es posible la cuantificación de esos dos compuestos sin la interferencia de la cafeína. Por otro lado, se utilizó la fluorescencia que presentan los compuesto CAT y EC, lo que permite su detección y cuantificación selectiva frente a otros compuestos no fluorescentes. Además la gran sensibilidad de la detección por fluorescencia permite reducir los límites de detección y cuantificación de los compuestos detectados de este modo, en concreto CAT y EC presentan los menores límites de detección y cuantificación.

Entre los compuestos analizados, la cafeína (CAF) fue el compuesto que se encuentra en mayor concentración, mientras que la concentración del resto de compuestos no llega ni a la concentración más baja encontrada para la cafeína. Entre los ácidos fenólicos, el ChIAc fue el que se detectó en mayor concentración, siendo su valor máximo para el mate (134 mg/g); el compuesto encontrado en mayor concentración en el té blanco y el té negro fue el GalAc encontrado en concentraciones de 5,58 mg/g y 8,15 mg/g, respectivamente. La EGC fue el compuesto encontrado en mayor concentración entre el resto de flavanoles para el té verde (66,4 mg/g) y el té blanco (44,6 mg/g), mientras que para el té negro el compuesto que presentó mayor concentración fue la EC (4,18 mg/g). QueR fue el flavonoide encontrado en mayor concentración dentro de los de su familia en todas las muestras en las que se detectó, siendo su valor máximo de 38,7 mg/g para la muestra de mate.

El cromatograma del extracto de té verde se muestra en la *figura 119*, a excepción de la cafeína (CAF), los flavanoles fueron los compuestos encontrados en mayor concentración, seguido de los flavonoles y los ácidos fenólicos. Los compuestos PrtAc, CafAc, GCG, CouAc, LutG y ApiG fueron no detectados en esta muestra.

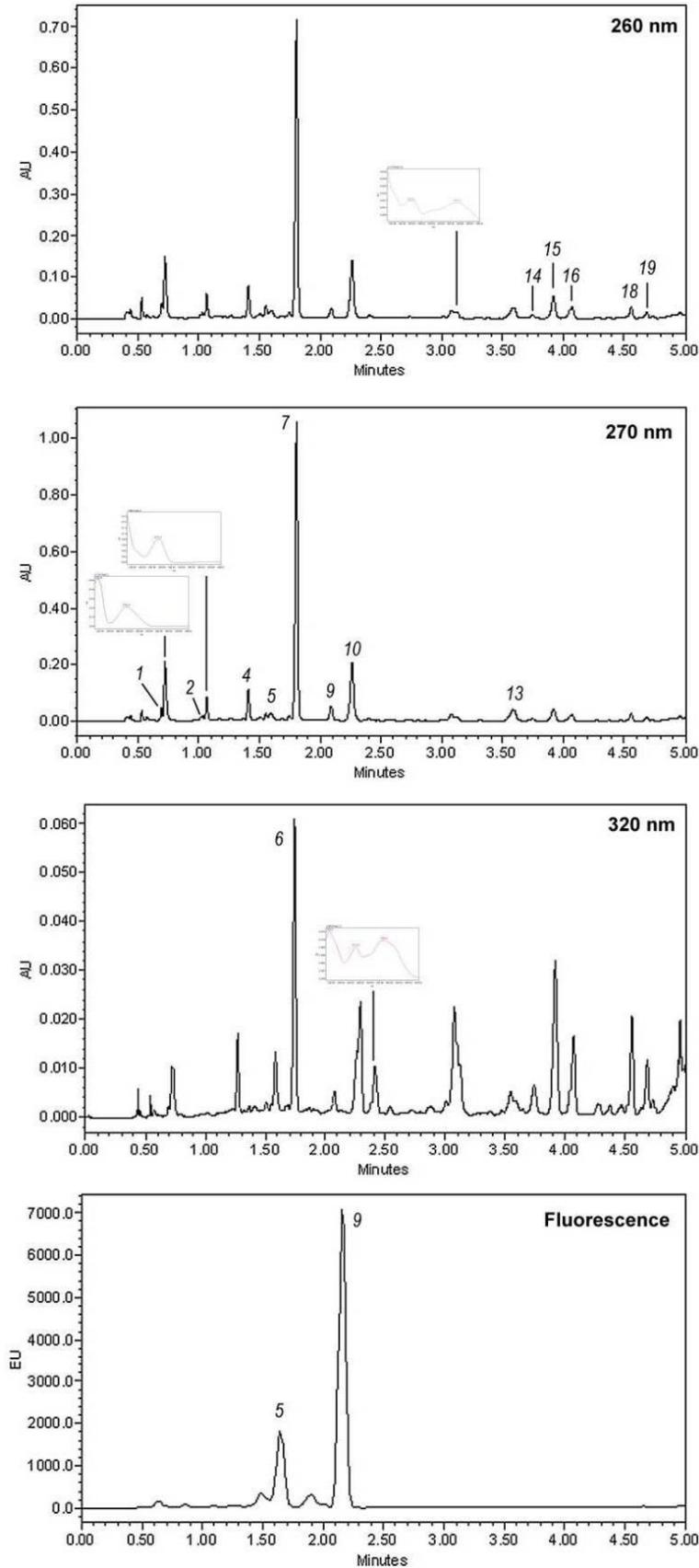


Figura 119. Cromatogramas de la muestra de té verde obtenido con el método optimizado para una columna de partículas recubiertas, fused-core. Para la identificación de picos ver tablas 86 y 89.

Sin embargo el análisis cromatográfico de la muestra de té verde también indicó la presencia de dos compuestos con área significativa no identificados (*figura 119*, 270 nm), que eluyen cerca del ácido gálico, la galocatequina galato y el ácido protocatéquico. Los espectros UV de estos dos compuestos, con tiempos de retención de 0,73 min y 1,06 min, son similares a los espectros del ácido cumárico y de la cafeína, respectivamente, por lo que podríamos decir que son derivados de un ácido fenólico y de un alcaloide. También se observan en la *figura 119* a 260 nm y 320 nm otros dos compuestos no identificados, con tiempos de retención de 2,41 min y 3,12 min. El espectro UV del compuesto que eluye a 3,12 min concuerda con el espectro de la quercetina y podría ser un derivado de este flavonoide. El otro compuesto no identificado (2,41 min) muestra en su espectro UV tres picos de absorción claros a 216, 271 y 329 nm, pero no concuerdan con ninguno de los compuestos analizados.

El análisis de la muestra del comprimido de té verde y guaraná (*figura 120*) mostró un perfil fitoquímico similar al encontrado en la muestra de té verde aunque en concentraciones más bajas. En el caso del flavanol galocatequina la disminución es notable, de los 29,3 mg/g encontrados en el té verde, pasamos a los 1,11 mg/g encontrados en esta muestra. Sin embargo, en el caso de la epicatequina ocurre lo contrario; en el comprimido su concentración es dos veces mayor que la encontrada en el té verde. Aunque la concentración de la epicatequina sea mayor en el comprimido la suma de las concentraciones de todos los flavanoles es inferior en el comprimido de té verde y guaraná que en el té verde. Por otra parte algunos compuestos como el ácido protocatéquico y la galocatequina galato, que en el té verde no se detectaban, sí que aparecen en la muestra de comprimido de té verde y guaraná, por lo que podrían ser compuestos que provienen del guaraná; además en la muestra de comprimido no se detectan esos compuestos no identificados que se observaban anteriormente.

La muestra de té blanco (*figura 121*) también muestra un perfil fitoquímico similar al de la muestra de té verde, aunque con una relativa disminución de la concentración de los compuestos estudiados. La cafeína, al igual que la epicatequina galato, se encuentra en mayor concentración que en el té verde. Se observan también los dos compuestos no identificados a 270 nm y a tiempos de retención de 0,73 min y 1,06 min que se observaban en el análisis del té verde, aunque las concentraciones son diferentes. Además en esta muestra de té blanco se detectan otros dos compuestos no identificados a 260 nm con tiempos de retención de 3,63 min y 4,28 min. Estos dos compuestos poseen un espectro UV similar a los encontrados para la quercetina y kaempferol, respectivamente, por lo que podrían ser derivados de estos flavonoles.

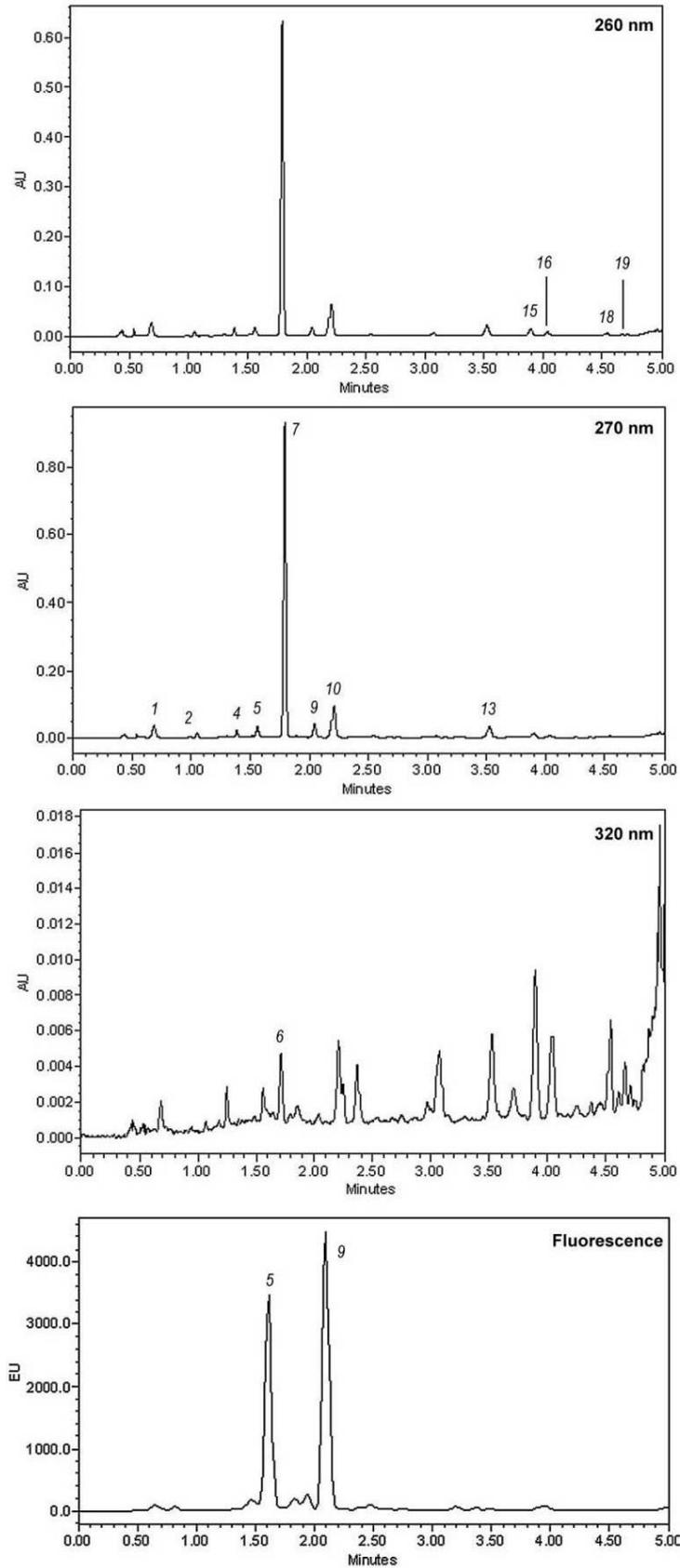


Figura 120. Cromatogramas de la muestra de comprimido de té verde y guaraná obtenido con el método optimizado para una columna de partículas recubiertas, fused-core. Para la identificación de picos ver tablas 86 y 89.

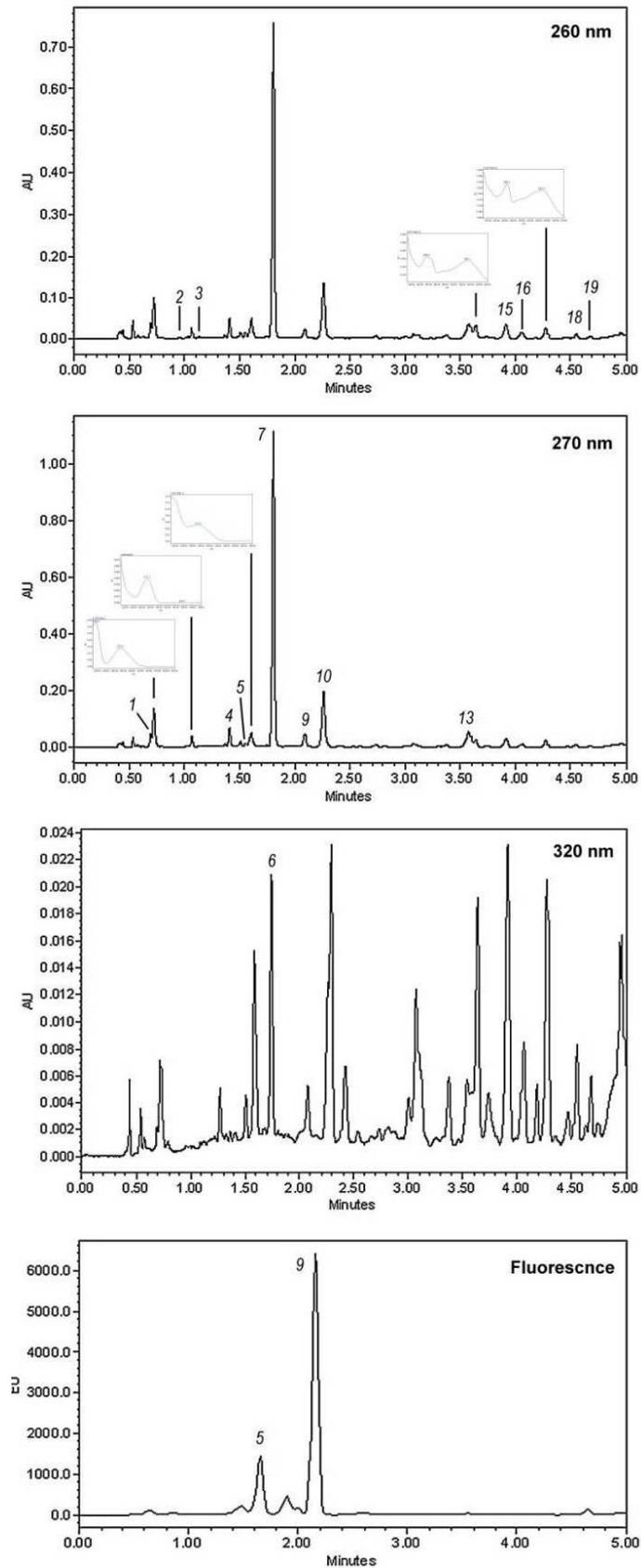


Figura 121. Cromatogramas de la muestra de té blanco obtenido con el método optimizado para una columna de partículas recubiertas, fused-core. Para la identificación de picos ver tablas 86 y 89.

Al contrario que en las muestras analizadas hasta este punto, la muestra de té negro (*figura 122*) no posee un perfil fitoquímico similar al del té verde. En el caso del té negro los flavonoides son los compuestos con la concentración más alta, seguido por los ácidos fenólicos y los flavanoles. En la muestra de té negro el ácido protocatéquico fue detectado. La concentración total de los compuestos detectados y cuantificados en la muestra de té negro es tres veces menor que la encontrada en el té verde. Como en las otras muestras, entre los flavonoides detectados, quercetina-3-O-glucósido es el de mayor concentración (8,56 mg/g). En cambio para los ácidos fenólicos el más abundante fue el ácido gálico en vez del ácido clorogénico que es el mayoritario en el té verde; y para los flavanoles el más abundante fue la epicatequina en vez de la epigalocatequina del té verde. En esta muestra de té negro también se detectan compuestos no identificados que se encontraban en el té verde, los de tiempos de retención de 0,73 min, 1,06 min, 2,41 min y 3,12 min.

La muestra de mate (*figura 123*) no posee un perfil cromatográfico similar a lo analizado hasta ahora. Se observa una concentración considerablemente menor de cafeína (39,9 mg/g) y una concentración mayor de ácido clorogénico (134 mg/g) y quercetina (38,7 mg/g) en comparación con las concentraciones observadas en las muestras de té. El ácido cafeico sólo fue detectado en la muestra de mate. Otra diferencia es que mientras que en las muestras de té los compuestos no identificados eran posibles derivados del ácido cumárico y de la quercetina, en el caso de la muestra de mate la mayoría de los compuestos no identificados son posibles derivados del ácido clorogénico. Como se puede observar en la *figura 123* a 320 nm alguno de estos compuestos no identificados se encuentran en concentraciones elevadas. A 270 nm se detecta el mismo compuesto no identificado a 1,06 min que se encontraba en las muestras de té y que podría ser derivado de un alcaloide por su espectro similar a la cafeína.

En la *figura 124* se muestra el cromatograma obtenido de la muestra de café soluble. Se detectan varios compuestos no identificables a 320 nm, pero en este caso todos ellos poseen un espectro similar al obtenido para el ácido clorogénico, por lo que se puede pensar que son derivados del mismo. La cafeína, el ácido clorogénico y el ácido cafeico fueron los únicos compuestos detectados en esta muestra, no detectándose ni flavanoles, ni flavonoles, ni flavonas en la misma. La concentración de cafeína fue mayor que la encontrada en la muestra de mate, pero inferior a la encontrada en las muestras de té. En cambio, la concentración de ácido clorogénico encontrada fue considerablemente mayor que en la muestra de té, pero menor que en la muestra de mate. En el caso del ácido cafeico la concentración encontrada en el café fue mayor que la encontrada en el mate. De los compuestos no identificados en la muestra de café soluble se puede pensar que los que eluyen a 1,25, 1,53, 4,40 y 4,59 min son los mismos presentes en la muestra de mate, ya que poseen tiempos de retención y espectros UV similares.

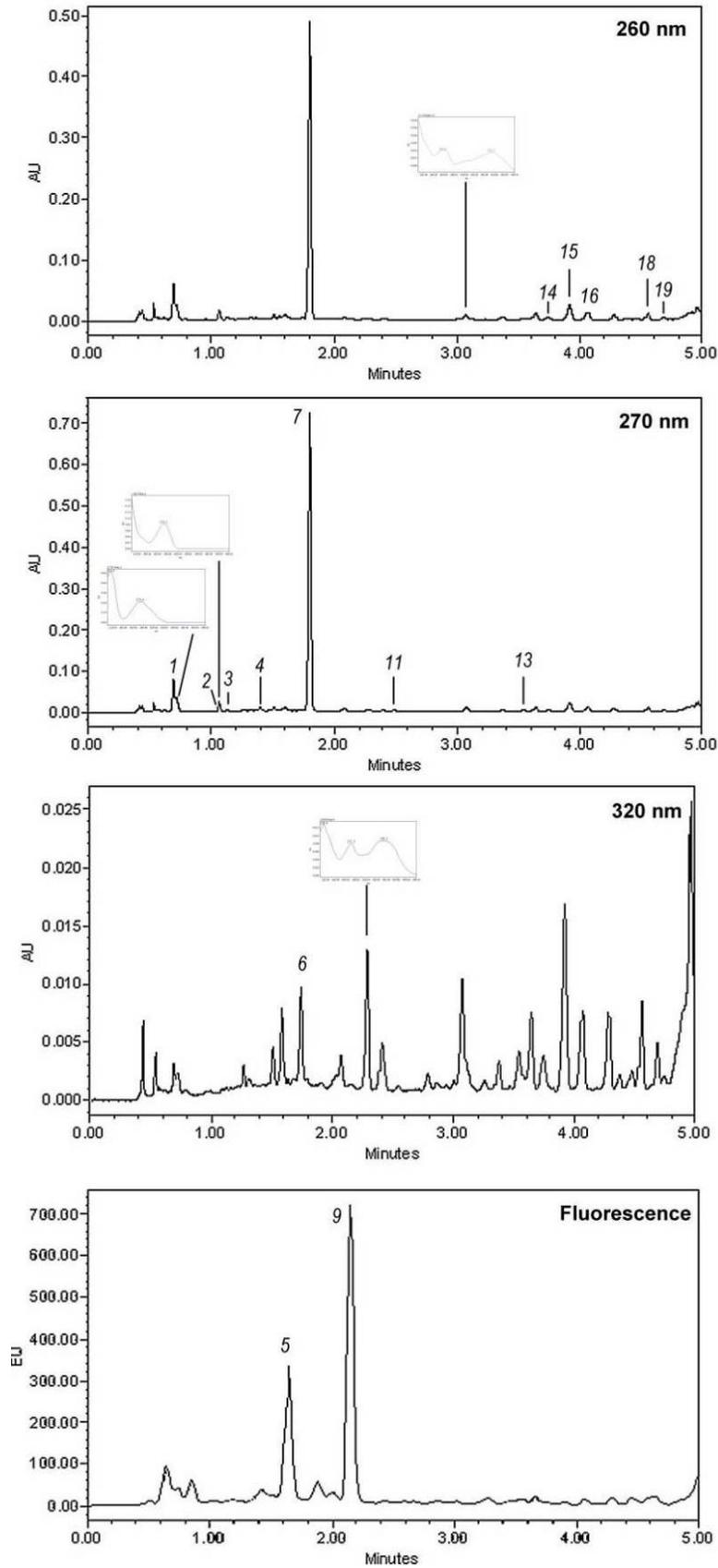


Figura 122. Cromatogramas de la muestra de té negro obtenido con el método optimizado para una columna de partículas recubiertas, fused-core. Para la identificación de picos ver tablas 86 y 89.

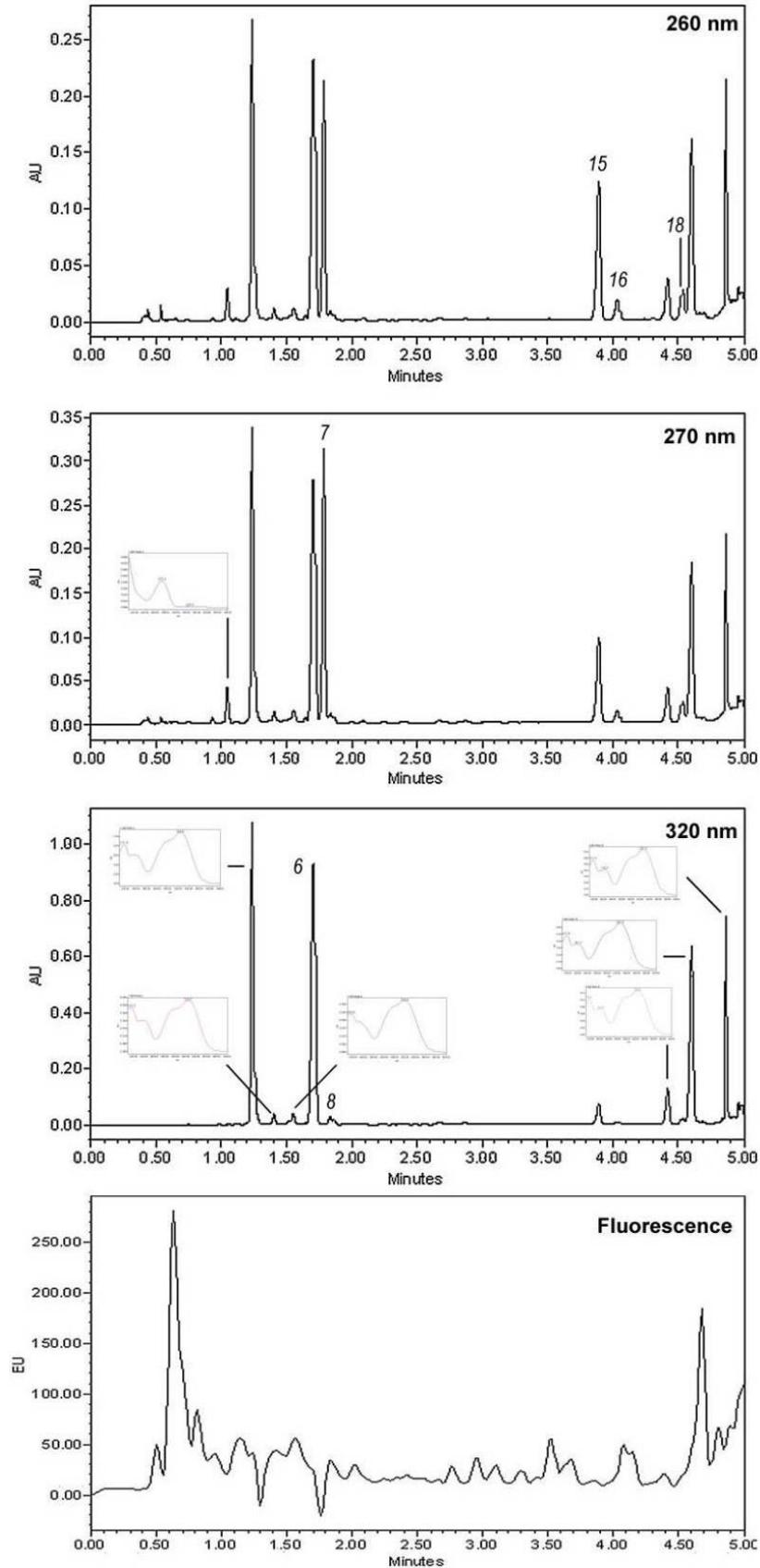


Figura 123. Cromatogramas de la muestra de mate obtenido con el método optimizado para una columna de partículas recubiertas, fused-core. Para la identificación de picos ver tablas 86 y 89.

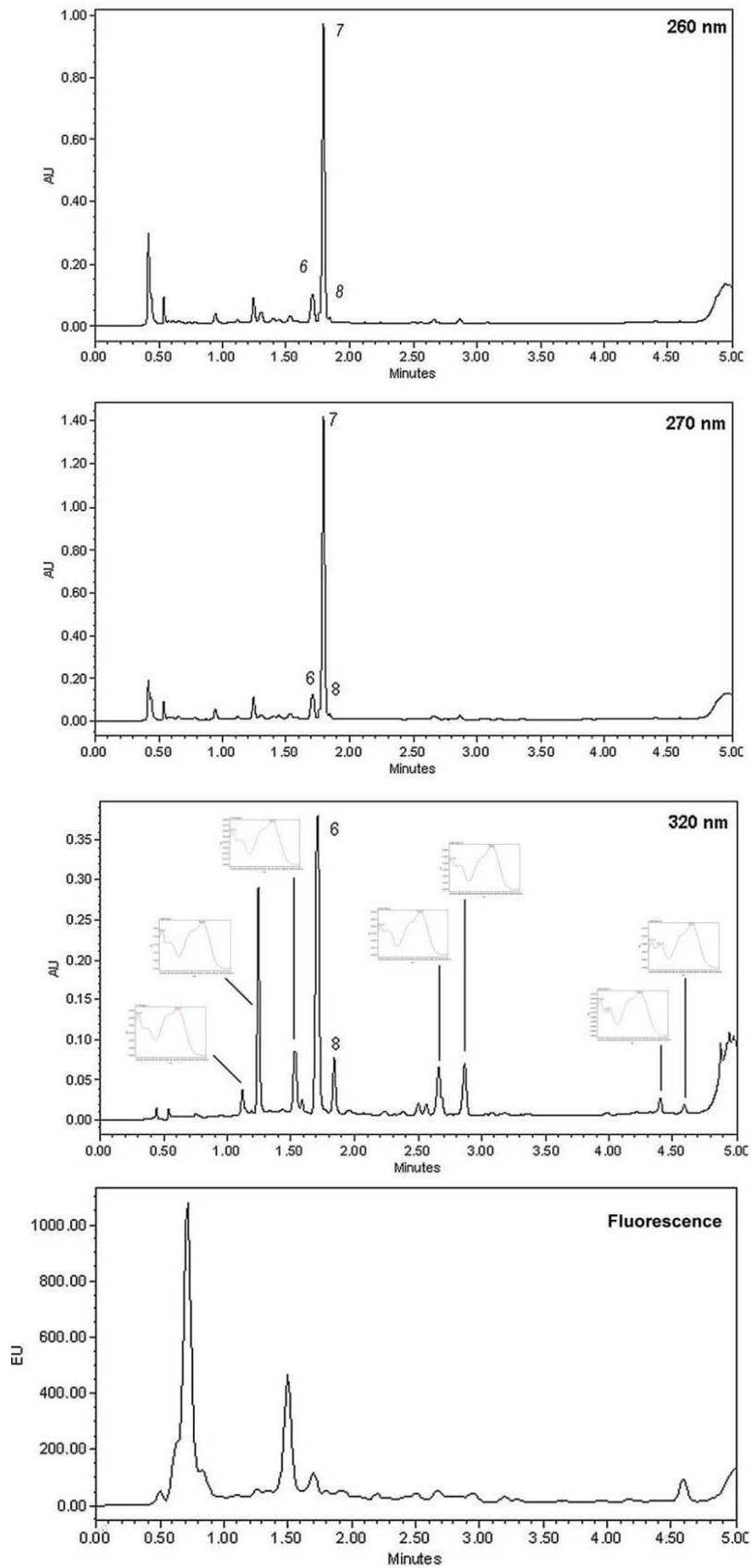


Figura 124. Cromatogramas de la muestra de café soluble obtenido con el método optimizado para una columna de partículas recubiertas, fused-core. Para la identificación de picos ver tablas 86 y 89.

De todas las muestras analizadas, la muestra de refresco (figura 125) es la única donde sólo se identifica un único compuesto, la cafeína con una concentración de 108 mg/L, mucho mayor que la detectada en la muestra de mate y de café soluble, pero menor que la encontrada en los tés. Los compuestos de mayor área son compuestos no identificados (270 nm y 320 nm), a tiempos de retención de 0,72, 0,94, 1,09 y 1,58 min; en este caso estos compuestos no presentan un espectro UV que coincida con alguno de los compuestos identificados en este método.

El más simple de todos los perfiles obtenidos en este estudio lo proporciona el análisis cromatográfico de la muestra de bebida energética (figura 126). Los únicos compuestos detectados por tiempo de retención y espectro son el ácido gálico y la cafeína (picos 1 y 7 respectivamente). La concentración de cafeína detectada en esta muestra era totalmente referible a la cantidad que marca la etiqueta del fabricante (0,03%). En cambio, la concentración de ácido gálico (2,14 mg/L) fue menor que la encontrada en el té verde y los comprimidos de té y guaraná.

En esta muestra también se detectan compuestos no identificables. Uno de estos compuestos, el que eluye a 1,25 minutos (270 nm), reveló un espectro UV muy similar al del ácido siríngico, y podría ser un derivado del mismo. También otros dos compuestos no identificados que eluyen a 2,56 minutos y 4,22 minutos a 320 nm poseen espectros UV similares al ácido *p*-cumárico indicando que pueden ser derivados del mismo. Otros compuestos no identificados no presentan espectros UV similares a los analizados.

Alguno de los compuestos no identificados como los que eluyen a 1,54 min y 2,56 min eluyen cerca de la catequina y la galocatequina galato. Sin embargo, aunque ninguno de estos dos compuestos se solapa con los compuestos analizados, se debe prestar especial atención cuando se analicen muestras donde aparezcan estos picos, a pesar de que utilizando la fluorescencia, la identificación y la cuantificación de la catequina es relativamente sencilla aun en presencia de estos compuestos no identificados que pueden interferir, puesto que dichos compuestos interferentes no presentan fluorescencia en las condiciones en las que se trabaja. Esto también puede ser válido para la galocatequina galato, ya que en otras condiciones del detector puede ser detectada [70]. Uno de estos compuestos no identificados, en concreto el que eluye a 0,95 min, coincide en tiempo de retención y espectro UV con el compuesto no identificado en la muestra de refresco.

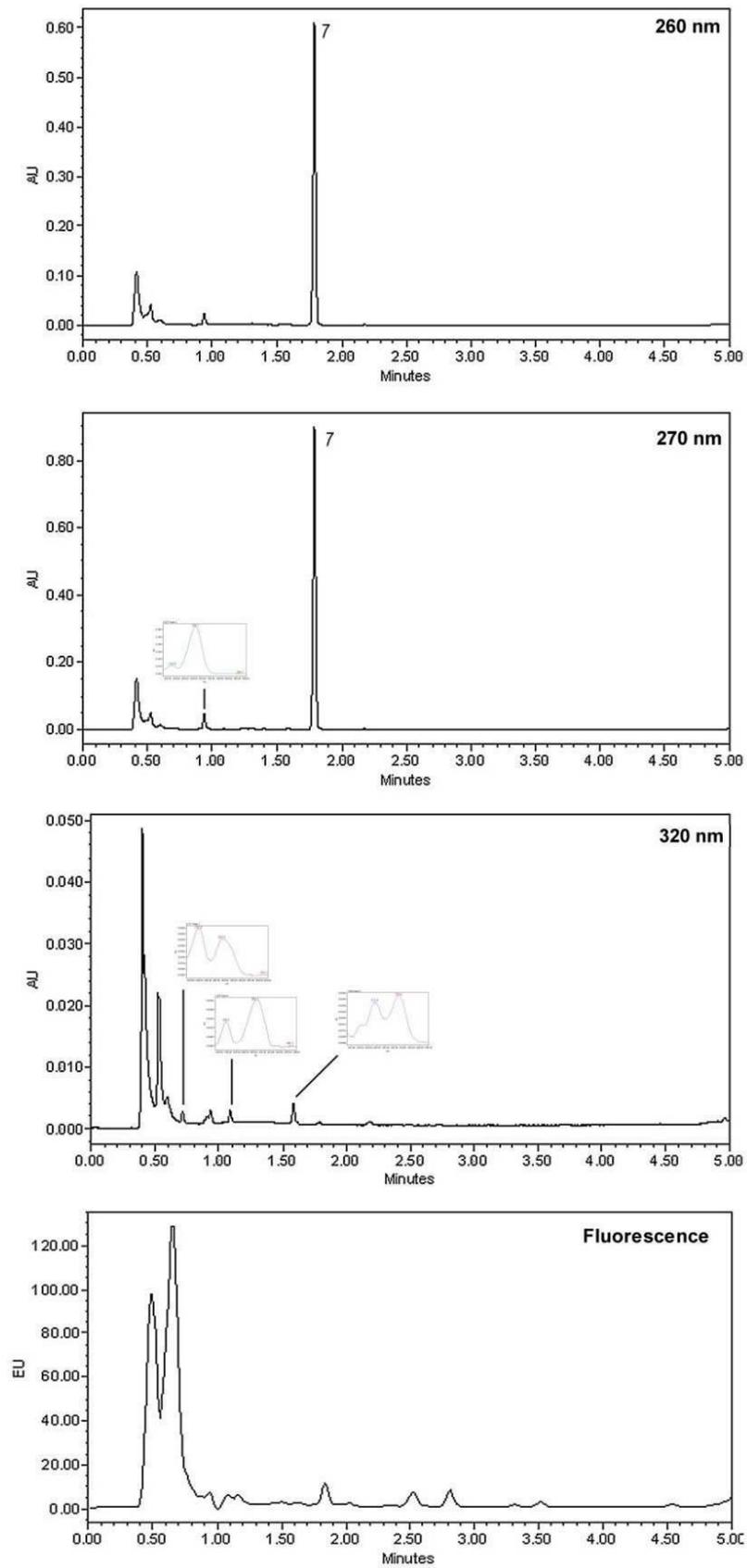


Figura 125. Cromatogramas de la muestra de refresco obtenido con el método optimizado para una columna de partículas recubiertas, fused-core. Para la identificación de picos ver tablas 86 y 89.

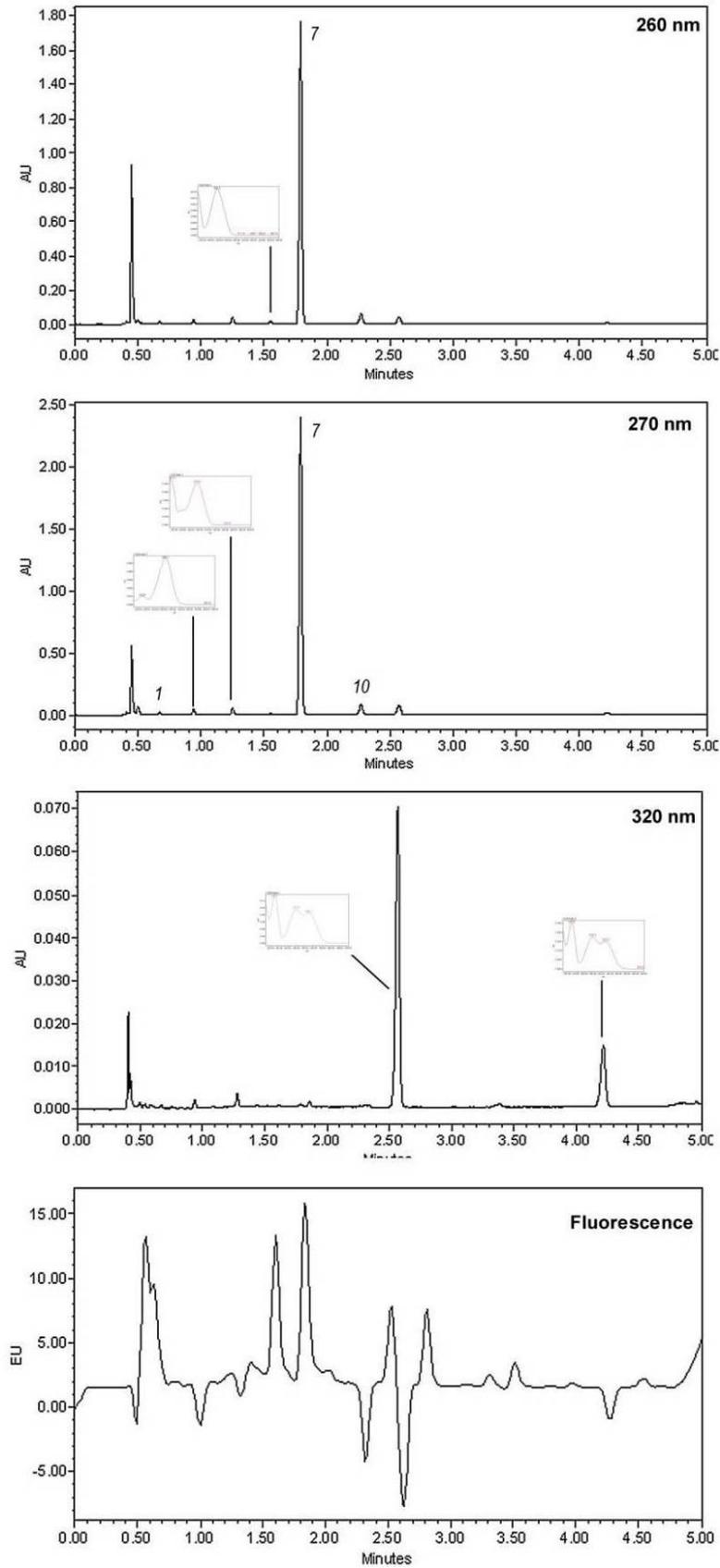


Figura 126. Cromatogramas de la muestra de bebida energética obtenido con el método optimizado para una columna de partículas recubiertas, fused-core. Para la identificación de picos ver tablas 86 y 89.

La visión general de la distribución de los compuestos analizados e incluso de los no identificados presentes en las muestras analizadas está de acuerdo con lo que se observa en la bibliografía para cada tipo de muestra.

Por ejemplo, el té negro es sometido a un proceso de fermentación durante su procesado que reduce los niveles de flavanoles, en comparación con los detectados en el té verde [26, 71]. Este aspecto queda reflejado en los resultados obtenidos en este estudio, siendo la concentración de los flavanoles en el té verde mayor que la encontrada en el té negro.

Otro dato contrastable son los compuestos mayoritarios no identificados encontrados en la muestra de café soluble, que mostraban espectros similares a los del ácido clorogénico, lo cual nos indicaba que podrían ser posibles derivados del ácido clorogénico, lo cual está documentado en diversos trabajos de investigación [10, 13].

4.4.4 Patrones de distribución de polifenoles y alcaloides en cafés solubles, refrescos, bebidas energéticas y tés.

El método cromatográfico optimizado en este apartado se ha utilizado para la determinación de diferentes perfiles de fitoquímicos en diversos tipos de bebidas: cafés solubles, refrescos, bebidas energéticas y diferentes tipos de tés que se comercializan en el mercado español (*tabla 91*). Los resultados obtenidos se han utilizado para realizar estudios de componentes principales para identificar patrones de distribución de los fitoquímicos que nos permitan diferenciar correctamente entre las muestras analizadas.

Entre las muestras seleccionadas para el análisis se han seleccionado diferentes muestras de café soluble (**C**) de diferentes procedencias, incluso muestras descafeinadas, refrescos (**SD**) y bebidas energéticas (**EN**), e incluso una gran variedad de tipos de té según su grado de fermentación.

El té se puede clasificar en función de su grado de fermentación durante su procesado. Las hojas de *Camellia sinensis* una vez recolectadas se secan con calor para evitar la fermentación producida por la actividad de las enzimas propias del té; este tipo de té se clasifica como té no fermentado que a su vez incluye el té verde (**GT**) y el té blanco (**WT**). La principal diferencia entre ambos es que en el caso del té blanco se recolectan brotes y hojas jóvenes de té poco antes de que los brotes se hayan desarrollado completamente, en cambio en el té verde la recolección se realiza más tarde.

Tabla 91. Muestras analizadas, códigos de identificación utilizados e información proporcionada por el fabricante.

Código	Muestra	Marca	Descripción del fabricante
GT1	Té verde	1	Té verde Java.
GT2	Té verde	2	-
GT3	Té verde y menta	3	70 % Té verde; 30 % menta.
GT4	Té verde	4	98,2 % Té verde; 1,1 % sabor natural; 0,4 % flor de naranjo.
GT5	Té verde y cáscara de limón	5	75 % Té verde; 11 % cáscara de limón; hierba de limón y aroma de limón.
GT6	Té verde	6	-
GT7	Té verde	7	-
GT8	Té verde y menta	8	Té verde y menta (% no especificado).
GT9	Té verde	3	-
GT10	Té verde	9	-
GT11	Té verde	10	Té Grüner.
GT12	Antioxidante belleza	5	61 % té; té verde y aroma de vainilla.
WT1	Té blanco	8	-
WT2	Mezcla de té (blanco)	6	35 % Té blanco; té verde; té rojo y aroma.
WT3	Té blanco antioxidante	5	93 % Té; 0,5 % flor de naranjo y aroma de jazmin.
WT4	Mezcla de té	2	35 % Té blanco; 30 % té verde; 30 % té rojo; 5 % aroma de ciruela.
BT1	Té negro	2	Mezcla de té negros (Ceylon y Assam).
BT2	Té negro	11	Mezcla de té negros (Assam, Africano y Ceylan).
BT3	Té negro	7	-
BT4	Té negro	4	-
BT5	Té negro	12	Mezcla de té negros.
BT6	Té Earl Grey	1	Té negro y aceite de bergamota.
BT7	Té Prince of Wales	1	Mezcla de té negros.
BT8	Té Darjeeling	1	Té Darjeeling.
BT9	Té English breakfast	1	Mezcla de té negros.
BT10	Té Lady grey	1	Té negro, aroma de aceite de bergamota y cascara de limón y naranja.
BT11	Té English afternoon	13	Mezcla de té negros.
BT12	Té negro breakfast	2	-
BT13	Té Earl grey	2	98 % Té negro; 2% bergamota y naranja.
BT14	Té al limón	2	-
BT15	Té negro y grosella negra	1	Tea; 4 % aroma de grosella negra; 1 % grosella negra.
BT16	Té negro y cereza	1	Tea; 6 % aroma de cereza; 1 % cereza..
BT17	Té negro y limón	1	Tea; 12,5 % aroma de limón; 1 % limón.
BT18	Té negro y frutos rojos	1	Tea; 8% aromas; 1 % cereza; 1 % grosella; 1 % frambuesa; 1 % fresa.
BT19	Té negro y mango, naranja y fruta de la pasión	1	Tea; 8 % aroma de naranja; 6 % aroma de mango; 3 % aroma de fruta de la pasión; 1 % mango; 1 % fruta de la pasión; 1 % naranja.
BT20	Té negro	3	Té Ceylan.
BT21	Té negro descafeinado	2	-

Tabla 91 (cont). Muestras analizadas, códigos de identificación utilizados e información proporcionada por el fabricante.

Código	Muestra	Marca	Descripción del fabricante
RT1	Tè rojo	8	-
RT2	Tè rojo	2	-
RT3	Tè rojo y limón	1	Pu-erh; Tè verde: 10 % aroma de limón.
RT4	Tè rojo	4	53.8 % Tè negro; 35.3 % rooibos; 6.4 % hibisco; 4.3 % aroma.
RT5	Tè rojo	7	-
RT6	Tè rojo antioxidante	5	84 % tè; 14 % anís; aroma de ciruela.
RT7	Tè rojo	6	Pu-erh
C1	Cafè	14	Cafè.
C2	Cafè	14	Cafè.
C3	Cafè	14	Cafè; mezcla verde.
C4	Cafè	14	Cafè; expreso; arábica.
C5	Cafè	14	Cafè; América latina.
C6	Cafè	14	Cafè; Colombia.
C7	Cafè	15	Cafè; Colombia.
C8	Cafè	15	Cafè; natural.
C9	Cafè	15	Cafè; expreso.
C10	Cafè	16	Cafè
C11	Cafè	17	Cafè
C12	Cafè	18	Cafè; crema.
C13	Cafè	14	Cafè descafeinado.
C14	Cafè	15	Cafè descafeinado.
C15	Cafè	19	Cafè descafeinado.
C16	Cafè	16	Cafè descafeinado.
C17	Cafè	17	Cafè descafeinado.
SD1	Refresco	20	Refresco; cola; descafeinado.
SD2	Refresco	20	Refresco; cola; light; descafeinado.
SD3	Refresco	20	Refresco; cola; sin azúcar.
SD4	Refresco	20	Refresco; cola.
SD5	Refresco	20	Refresco; cola; light.
SD6	Refresco	21	Refresco; cola; limón.
SD7	Refresco	21	Refresco; cola.
SD8	Refresco	21	Refresco; cola; light.
SD9	Refresco	21	Refresco; cola; limón; light.
SD10	Refresco	21	Refresco; cola; sin azúcar.
SD11	Refresco	22	Refresco; cola.
EN1	Bebida energética	20	Bebida energética; con fruta.
EN2	Bebida energética	20	Bebida energética.
EN3	Bebida energética	23	Bebida energética.
EN4	Bebida energética	24	Bebida energética.
EN5	Bebida energética	24	Bebida energética; sin azúcar.
EN6	Bebida energética	25	Bebida energética.
EN7	Bebida energética	26	Bebida energética.

Si se permite la fermentación de las hojas de té antes de su secado por tratamiento de calor se produce un té oscuro conocido como té negro (**BT**). Si el periodo de fermentación es más largo, como es el caso del té *pu-erh* y té rojo (**RT**), este proceso no sólo está llevado a cabo por la enzimas propias del té, sino que otros microorganismos actúan en el proceso. Cuando la fermentación se produce de manera parcial se habla de té *oolong*. El proceso de fermentación puede provocar cambios en la composición de los fitoquímicos del té. Se conoce que durante la fermentación los flavanoles se oxidan, disminuyendo su concentración en té fermentados en comparación con los té no fermentados [72, 73].

La extracción de las muestras analizadas se realiza con ultrasonidos como se describe en el apartado 3.3.2.

4.4.4.1 Patrones de distribución de compuestos fitoquímicos en bebidas

La concentración de los ácidos fenólicos, flavanoles, flavonoles, flavonas y alcaloides detectados en las muestras analizadas se muestran en las *tablas 92, 93 y 94*.

Los té presentan la mezcla de compuestos más compleja en términos de todas las familias detectadas, por ello su composición se discutirá en las próximas secciones.

El café contiene cafeína, ácido cafeico y ácido clorogénico. En la mayoría de las muestras de café analizadas la cafeína es el compuesto mayoritario, con concentraciones entre 23,9 mg/g (C12) y 56,3 mg/g (C1), correspondiéndose con lo encontrado en la bibliografía [74, 75]. En los cafés descafeinados la concentración de cafeína varía entre 0,90 mg/g (C17) y 2,26 mg/g (C13). Únicamente en un café soluble el ácido clorogénico es el compuesto mayoritario (42,7 mg/g, C9); en esta muestra la información que proporciona el fabricante es que se trata de un producto de café con mezcla de café tostado y café verde, lo cual concuerda con el perfil de ácidos orgánicos detectados. En general, el ácido clorogénico en los cafés presenta concentraciones entre 3,70 mg/g (C14) y 42,7 mg/g (C9). El ácido cafeico es el compuesto minoritario en todas las muestras de café analizadas (0,21 (C14)-2,42 (C3) mg/g).

La cafeína es el único compuesto detectado en las muestras de refrescos, con concentraciones que varían entre 30,7 mg/L (SD6) y 123 mg/L (SD1) para los refrescos no descafeinados, y entre 0,09 (SD11) y 0,18 (SD10) mg/L para los refrescos descafeinados. Las mayores concentraciones de cafeína se han encontrado en las muestras light de refrescos.

Las bebidas energéticas son, de las muestras analizadas en este estudio, las que mayores concentraciones de cafeína presentan (69,0-349 mg/L).

Tabla 92. Concentración de los compuestos analizados en café (C), refrescos (SD) y bebidas energéticas (EN).

Muestras	Compuesto (mg/g)			Muestras	Compuesto (mg/L)
	Caf	ChIAc	CafAc		Caf
C1	56,3	14,8	1,06	SD1	123
RSD (%)	0,59	0,16	0,07	RSD (%)	0,39
C2	50,9	16,9	1,30	SD2	92,3
RSD (%)	0,12	0,14	0,09	RSD (%)	0,60
C3	48,8	19,8	2,42	SD3	98,4
RSD (%)	0,43	0,01	0,21	RSD (%)	0,84
C4	47,5	20,9	1,08	SD4	30,8
RSD (%)	0,04	0,03	0,11	RSD (%)	0,91
C5	42,4	9,71	1,15	SD5	107
RSD (%)	0,18	0,07	0,16	RSD (%)	0,53
C6	40,9	13,6	1,29	SD6	30,7
RSD (%)	0,82	0,18	0,11	RSD (%)	0,35
C7	35,7	19,3	1,18	SD7	111
RSD (%)	0,76	0,22	0,05	RSD (%)	0,54
C8	35,4	12,1	0,91	SD8	122
RSD (%)	0,17	0,20	0,03	RSD (%)	0,97
C9	32,6	42,7	0,89	SD9	108
RSD (%)	0,12	0,39	0,01	RSD (%)	0,83
C10	28,4	16,2	0,57	SD10	0,18
RSD (%)	0,06	0,20	0,17	RSD (%)	1,32
C11	27,3	9,16	0,38	SD11	0,09
RSD (%)	0,07	0,20	0,22	RSD (%)	4,46
C12	23,9	28,0	0,67	EN1	313
RSD (%)	0,05	0,14	0,10	RSD (%)	2,36
C13	2,26	12,5	1,30	EN2	323
RSD (%)	0,15	0,10	0,06	RSD (%)	1,55
C14	1,74	3,70	0,21	EN3	339
RSD (%)	0,24	0,07	0,39	RSD (%)	1,24
C15	1,71	11,0	0,82	EN4	227
RSD (%)	0,07	0,23	0,19	RSD (%)	2,71
C16	1,75	18,21	1,46	EN5	69,0
RSD (%)	0,42	0,19	0,15	RSD (%)	0,36
C17	0,90	18,6	0,94	EN6	349
RSD (%)	0,07	0,11	0,06	RSD (%)	0,45
				EN7	330
				RSD (%)	1,18

Tabla 93. Concentración de los compuestos analizados en téis no fermentados

Muestras	Compuesto (mg/g)																			
	CaF	TheB	GC	EGC	CAT	EC	EGCG	GCG	EGC	MyrR	QueR	QueG	Luts	KpFR	KpFG	GalAc	PrAc	ChIAc	CafAc	CouAc
GT1	25,9	1,27	5,86	13,1	6,28	2,50	6,11	n.d.	2,85	0,30	3,58	1,16	n.d.	0,88	0,59	0,82	n.d.	1,36	n.d.	n.d.
RSD (%)	1,23	1,17	1,14	1,43	1,28	1,06	2,05	n.d.	2,23	3,57	1,09	2,09	n.d.	3,10	2,44	1,05	n.d.	1,02	n.d.	n.d.
GT2	18,4	1,58	2,16	7,92	0,54	4,62	3,77	n.d.	2,63	0,11	1,92	0,62	0,02	0,56	0,29	0,62	n.d.	0,51	n.d.	n.d.
RSD (%)	2,11	1,33	2,40	2,36	1,04	1,22	2,41	n.d.	2,24	3,30	1,13	3,61	3,08	3,53	2,48	1,20	n.d.	1,54	n.d.	n.d.
GT3	14,3	1,61	1,89	5,43	0,40	2,82	0,13	0,02	n.d.	0,10	1,15	0,77	0,59	0,36	0,13	0,49	0,04	0,30	0,02	n.d.
RSD (%)	2,09	2,22	1,17	1,37	2,05	2,02	3,18	3,73	n.d.	3,14	1,90	3,46	3,35	3,47	3,41	2,92	2,67	2,96	3,15	n.d.
GT4	26,8	2,37	5,71	15,70	1,78	7,04	11,16	n.d.	5,53	0,27	3,20	1,09	n.d.	0,76	0,76	5,65	n.d.	2,54	n.d.	n.d.
RSD (%)	1,06	1,08	1,14	1,12	2,03	1,06	2,14	n.d.	1,12	3,87	1,61	2,16	n.d.	3,50	3,51	1,15	n.d.	2,08	n.d.	n.d.
GT5	11,6	0,16	1,98	10,08	0,36	4,49	1,13	n.d.	0,71	0,13	2,00	0,24	0,05	0,13	0,08	0,14	n.d.	0,14	n.d.	n.d.
RSD (%)	2,04	1,35	2,37	1,22	2,18	1,23	1,17	n.d.	3,55	3,29	1,22	2,57	3,93	3,21	3,09	1,17	n.d.	2,14	n.d.	n.d.
GT6	19,8	0,57	0,25	6,91	n.d.	n.d.	4,40	n.d.	19,6	0,11	2,07	0,75	n.d.	0,52	0,26	1,00	n.d.	0,32	n.d.	n.d.
RSD (%)	2,05	2,40	2,27	2,16	n.d.	n.d.	2,37	n.d.	2,38	3,13	1,25	2,18	n.d.	3,26	3,27	2,20	n.d.	1,44	n.d.	n.d.
GT7	15,4	0,40	1,25	5,42	0,29	2,98	3,58	0,07	3,12	n.d.	2,03	0,75	n.d.	0,51	0,36	0,97	0,02	0,18	n.d.	n.d.
RSD (%)	2,14	1,48	2,41	2,05	1,10	1,08	1,11	3,63	1,41	n.d.	1,14	3,41	n.d.	3,53	3,80	2,16	2,68	2,57	n.d.	n.d.
GT8	15,8	0,36	1,38	8,11	0,29	3,16	n.d.	n.d.	2,10	n.d.	2,03	1,24	0,47	0,14	0,05	0,50	0,18	0,15	0,05	0,21
RSD (%)	1,21	2,76	2,33	1,18	1,12	1,02	n.d.	n.d.	1,09	n.d.	1,08	2,28	3,55	3,16	3,25	2,08	2,28	1,33	3,21	0,04
GT9	25,6	1,12	3,70	10,4	0,77	5,27	8,69	0,49	6,33	n.d.	2,14	0,75	n.d.	0,60	0,32	1,21	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
RSD (%)	2,10	1,07	1,11	2,08	1,14	1,21	1,16	3,74	1,48	n.d.	1,22	2,68	n.d.	3,58	3,52	1,14	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
GT10	18,4	0,47	2,21	7,67	0,44	4,50	7,32	0,34	5,74	n.d.	2,09	0,76	n.d.	0,51	0,28	1,08	n.d.	0,29	n.d.	n.d.
RSD (%)	1,19	1,41	1,14	1,28	1,13	1,69	1,09	3,85	1,11	n.d.	1,32	3,32	n.d.	3,61	3,85	2,25	n.d.	1,36	n.d.	n.d.
GT11	22,7	1,16	5,06	12,6	1,59	6,80	14,8	0,34	12,2	0,28	3,28	1,20	n.d.	0,65	0,58	0,67	0,09	1,23	n.d.	n.d.
RSD (%)	1,13	2,20	1,21	1,12	2,86	1,11	0,18	0,54	1,52	0,83	1,88	2,24	n.d.	3,54	3,14	3,45	4,17	2,11	n.d.	n.d.
GT12	28,4	1,18	1,22	4,80	0,38	2,36	6,48	n.d.	4,94	0,19	1,86	0,45	n.d.	0,22	0,24	1,78	0,04	0,30	n.d.	Tr
RSD (%)	1,09	2,17	2,66	1,30	3,04	2,03	0,36	n.d.	1,08	0,05	2,38	3,77	n.d.	3,66	3,09	2,14	4,64	3,77	n.d.	n.d.
WT1	27,9	0,70	2,22	8,81	5,67	1,99	5,81	n.d.	4,28	0,16	2,54	0,54	n.d.	0,30	0,26	1,08	n.d.	0,45	n.d.	n.d.
RSD (%)	1,46	3,05	1,47	1,10	1,06	2,07	1,04	n.d.	1,09	4,24	2,21	3,52	n.d.	4,04	4,46	2,29	n.d.	3,49	n.d.	n.d.
WT2	16,9	0,61	2,12	24,9	0,59	3,30	0,20	0,02	n.d.	0,14	1,24	0,44	0,01	0,29	0,16	0,92	n.d.	0,52	n.d.	n.d.
RSD (%)	1,09	3,34	1,27	1,76	2,30	2,15	3,13	4,18	n.d.	3,95	2,22	3,54	4,27	4,11	4,11	2,30	n.d.	3,38	n.d.	n.d.
WT3	22,7	0,30	0,76	5,78	0,15	2,36	1,33	n.d.	1,27	0,14	1,61	0,43	n.d.	0,09	0,08	0,99	0,02	0,04	n.d.	n.d.
RSD (%)	1,08	3,36	3,09	1,26	3,09	1,02	2,18	n.d.	2,35	3,19	2,25	3,10	n.d.	4,50	4,30	0,39	4,91	3,28	n.d.	n.d.
WT4	20,4	0,76	2,33	6,75	2,59	0,89	2,09	n.d.	1,70	0,15	1,44	0,51	n.d.	0,31	0,19	1,11	0,02	0,45	Tr	n.d.
RSD (%)	1,10	3,18	1,41	1,29	1,91	3,03	0,13	n.d.	2,23	0,19	2,35	3,25	n.d.	3,17	4,25	2,23	4,76	3,72	n.d.	n.d.

LOD: límite de detección; LOQ: límite de cuantificación; RSD (%): % desviación estándar relativa; n.d.: no detectado (< límite de detección); Tr: trazas (< límite de cuantificación).

Tabla 94. Concentración de los compuestos analizados en téis fermentados

Muestras	Compuesto (mg/g)																			
	Caf	Theb	GC	EGC	CAT	EC	EGCG	GCG	ECG	Mvnr	Quer	Queg	LutC	KpIR	KpIG	GalC	PrfAc	ChfAc	CaFAc	CouAc
BT1	23.1	0.82	0.29	0.59	0.50	0.39	0.45	n.d.	0.89	0.95	1.77	0.68	n.d.	0.50	0.32	1.42	0.06	0.31	n.d.	Tr
RSD (%)	1.12	2.22	3.04	3.34	3.58	2.12	3.14	n.d.	3.33	3.21	1.27	3.21	n.d.	3.23	3.16	1.17	3.20	3.47	n.d.	n.d.
BT2	25.7	1.38	0.34	0.60	0.37	1.02	0.47	n.d.	1.28	0.18	2.55	1.43	n.d.	0.75	0.87	1.34	n.d.	0.80	n.d.	n.d.
RSD (%)	1.11	1.07	3.35	3.32	3.05	2.05	3.61	n.d.	2.29	3.20	1.15	2.28	n.d.	3.02	3.64	1.23	n.d.	3.21	n.d.	n.d.
BT3	24.4	0.91	0.42	0.84	0.35	1.20	1.48	n.d.	2.00	0.23	3.13	0.56	n.d.	0.63	0.48	1.82	0.04	0.52	n.d.	Tr
RSD (%)	1.25	2.13	3.07	3.22	3.12	1.25	1.86	n.d.	1.23	3.14	1.64	3.05	n.d.	2.36	3.21	1.26	3.18	3.07	n.d.	n.d.
BT4	23.7	0.35	0.04	0.16	0.04	0.15	0.04	n.d.	n.d.	0.03	1.04	0.08	0.08	0.28	0.14	1.90	0.07	0.05	n.d.	Tr
RSD (%)	1.12	3.60	3.02	3.72	3.12	3.03	2.81	n.d.	n.d.	3.54	1.07	3.45	3.19	3.78	4.25	1.07	3.17	3.25	n.d.	n.d.
BT5	24.8	1.24	0.46	1.50	0.65	1.63	0.58	n.d.	1.05	0.26	3.18	1.21	n.d.	0.72	0.65	2.12	n.d.	0.81	n.d.	n.d.
RSD (%)	1.09	2.09	3.13	1.97	2.06	2.03	2.46	n.d.	2.38	3.75	1.36	2.25	n.d.	4.30	4.56	1.15	n.d.	2.42	n.d.	n.d.
BT6	17.7	0.43	0.13	0.22	0.25	0.90	n.d.	0.03	n.d.	0.13	1.77	0.44	n.d.	0.33	0.21	1.60	0.08	0.21	n.d.	Tr
RSD (%)	1.04	3.19	3.17	3.13	3.14	2.08	n.d.	4.34	n.d.	3.09	1.32	3.57	n.d.	3.59	3.13	1.16	4.13	3.12	n.d.	n.d.
BT7	18.3	0.37	0.13	0.53	0.76	0.39	n.d.	n.d.	n.d.	0.11	1.39	0.20	n.d.	0.22	0.54	1.81	0.10	0.16	n.d.	Tr
RSD (%)	1.53	3.54	3.52	3.78	3.84	2.31	n.d.	n.d.	n.d.	3.18	1.14	3.40	n.d.	3.43	3.25	1.10	4.80	3.60	n.d.	n.d.
BT8	32.3	1.45	1.33	2.05	0.71	2.68	3.74	n.d.	2.98	0.12	2.12	0.54	n.d.	0.52	0.43	2.74	n.d.	0.69	n.d.	n.d.
RSD (%)	1.21	2.05	2.40	2.86	3.32	3.19	1.11	n.d.	1.17	3.14	1.21	2.40	n.d.	3.28	3.76	1.15	n.d.	2.13	n.d.	n.d.
BT9	27.7	1.28	0.28	n.d.	0.85	1.37	0.58	n.d.	1.96	0.25	2.61	6.31	n.d.	0.65	0.64	1.87	n.d.	0.74	n.d.	Tr
RSD (%)	1.25	2.09	3.31	n.d.	2.19	2.08	3.22	n.d.	1.19	3.46	1.17	1.16	n.d.	3.66	4.78	2.13	n.d.	2.29	n.d.	n.d.
BT10	32.2	0.86	0.15	0.63	0.46	1.40	0.15	n.d.	n.d.	0.32	1.70	0.75	n.d.	0.66	0.39	2.98	0.17	0.43	n.d.	Tr
RSD (%)	1.37	3.22	3.31	3.19	3.32	3.56	3.54	n.d.	2.95	2.83	3.11	1.06	4.68	3.66	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
BT11	27.4	1.80	0.85	1.22	0.97	2.79	2.91	n.d.	2.88	0.16	1.92	0.52	n.d.	0.43	0.25	3.01	n.d.	0.95	n.d.	Tr
RSD (%)	1.05	2.35	3.11	2.56	2.03	2.23	2.95	n.d.	1.22	2.21	2.09	3.59	n.d.	3.02	4.22	1.10	n.d.	2.18	n.d.	n.d.
BT12	27.0	1.15	0.36	0.43	0.46	0.69	0.70	n.d.	1.87	0.23	2.68	1.22	n.d.	0.70	0.62	1.88	0.02	0.49	n.d.	n.d.
RSD (%)	1.49	3.16	3.22	3.47	3.54	3.08	3.04	n.d.	2.12	3.82	1.13	2.17	n.d.	3.14	4.38	2.15	4.72	3.14	n.d.	n.d.
BT13	22.1	0.68	0.19	0.71	0.19	0.58	0.70	n.d.	1.39	0.21	2.10	0.68	n.d.	0.48	0.32	1.59	0.05	0.20	n.d.	n.d.
RSD (%)	1.10	3.28	3.24	3.19	3.13	4.04	3.36	n.d.	2.11	3.70	1.19	3.15	n.d.	3.54	3.98	2.19	4.57	4.20	n.d.	n.d.
BT14	15.7	0.61	0.04	0.20	0.23	0.41	n.d.	n.d.	n.d.	0.16	1.26	0.30	0.02	0.34	0.13	1.15	0.06	0.70	n.d.	Tr
RSD (%)	1.02	3.08	3.17	4.12	3.18	3.09	n.d.	n.d.	n.d.	0.24	2.35	3.03	0.31	3.53	4.36	2.28	4.17	3.08	n.d.	n.d.
BT15	20.3	0.34	0.10	n.d.	0.33	2.05	0.60	n.d.	3.71	0.22	2.28	3.13	n.d.	3.61	3.29	2.18	0.08	0.18	n.d.	Tr
RSD (%)	1.44	3.38	3.58	n.d.	3.13	2.05	0.60	n.d.	3.71	0.22	2.28	3.13	n.d.	3.61	3.29	2.18	0.08	0.18	n.d.	n.d.
BT16	17.9	0.42	0.15	1.69	0.32	1.06	0.26	n.d.	0.70	0.16	1.94	1.02	n.d.	0.32	0.28	1.70	0.08	0.18	n.d.	Tr
RSD (%)	1.11	3.28	3.03	2.32	3.44	2.13	0.45	n.d.	3.62	0.20	2.20	2.41	n.d.	3.11	3.90	2.16	4.10	4.61	n.d.	n.d.
BT17	21.0	0.46	0.14	0.53	0.27	1.06	0.13	n.d.	0.35	0.18	1.80	0.44	n.d.	0.27	0.18	1.92	0.09	0.14	n.d.	Tr
RSD (%)	1.06	3.37	3.45	3.19	3.06	2.16	0.40	n.d.	3.51	0.14	2.44	3.54	n.d.	3.94	3.07	2.15	4.22	4.15	n.d.	n.d.
BT18	19.4	0.44	0.14	0.95	0.27	0.91	0.26	n.d.	0.69	0.15	1.72	0.54	n.d.	0.28	0.20	1.36	0.07	n.d.	n.d.	Tr
RSD (%)	1.24	3.30	3.09	2.21	3.07	3.43	0.49	n.d.	3.79	0.18	3.11	3.60	n.d.	3.17	3.20	2.19	4.32	n.d.	n.d.	n.d.
BT19	16.5	0.36	0.12	0.28	0.31	1.09	0.20	n.d.	0.53	0.16	1.73	0.48	n.d.	0.26	0.20	1.52	0.07	0.17	n.d.	Tr
RSD (%)	1.13	3.35	3.26	3.48	3.16	2.25	0.35	n.d.	3.42	0.06	2.17	2.54	n.d.	3.12	3.15	2.07	4.29	4.35	n.d.	n.d.
BT20	20.8	0.98	0.20	0.53	0.37	0.55	0.27	n.d.	n.d.	0.21	2.09	0.85	n.d.	0.56	0.48	1.51	0.04	0.51	n.d.	Tr
RSD (%)	1.20	2.26	3.14	3.21	3.14	3.11	0.52	n.d.	n.d.	1.69	1.34	2.29	n.d.	3.59	3.51	2.20	4.52	3.31	n.d.	n.d.
BT21	0.50	0.21	n.d.	n.d.	0.07	0.11	n.d.	n.d.	n.d.	0.16	1.73	0.35	n.d.	0.25	0.03	1.55	0.03	0.69	Tr	n.d.
RSD (%)	3.52	3.11	n.d.	n.d.	4.17	4.02	n.d.	n.d.	n.d.	4.20	2.32	3.07	n.d.	3.11	4.26	2.24	3.77	3.26	n.d.	n.d.

LOD: límite de detección; LOQ: límite de cuantificación; RSD (%): % desviación estándar relativa; n.d.: no detectado (< límite de detección); Tr: trazas (< límite de cuantificación).

Tabla 94 (cont.). Concentración de los compuestos analizados en téis fermentados

Muestras	Compuestos (mg/g)																			
	Caf	TheB	GC	EGC	CAT	EC	EGCG	GCG	ECG	MyrR	Quer	QueG	LutG	KpFR	KpFG	GaiAc	PrtAc	ChiAc	CafAc	CouAc
RT1	25,0	1,25	0,17	0,16	0,20	0,61	n.d.	n.d.	n.d.	0,08	0,27	0,08	n.d.	0,04	0,03	3,59	0,11	0,16	n.d.	Tr
RSD (%)	1,09	2,08	2,23	3,12	3,21	3,18	n.d.	n.d.	n.d.	3,37	3,24	3,42	n.d.	2,88	3,79	1,49	3,24	3,15	n.d.	n.d.
RT2	20,3	0,92	n.d.	n.d.	0,17	0,11	n.d.	n.d.	n.d.	0,11	0,34	0,12	n.d.	0,10	0,05	2,62	0,11	0,10	n.d.	Tr
RSD (%)	1,06	3,16	n.d.	n.d.	3,01	3,04	n.d.	n.d.	n.d.	3,18	2,79	4,39	n.d.	2,26	3,28	1,13	3,19	3,26	n.d.	n.d.
RT3	25,1	1,13	0,12	0,13	0,12	0,48	n.d.	n.d.	n.d.	0,08	0,32	0,09	n.d.	0,05	n.d.	2,87	0,10	0,04	n.d.	Tr
RSD (%)	1,10	2,22	3,00	3,32	3,23	3,17	n.d.	n.d.	n.d.	4,42	2,38	4,48	n.d.	3,21	n.d.	1,12	3,14	3,21	n.d.	n.d.
RT4	13,4	0,59	0,20	n.d.	0,36	0,80	n.d.	n.d.	n.d.	0,38	1,88	0,73	0,08	0,47	0,41	1,01	0,02	0,55	n.d.	Tr
RSD (%)	1,15	3,27	3,33	n.d.	3,03	3,12	n.d.	n.d.	n.d.	3,15	2,04	3,18	3,30	2,72	2,55	2,27	3,72	3,15	n.d.	n.d.
RT5	21,9	0,72	0,07	n.d.	0,05	0,20	n.d.	n.d.	n.d.	0,13	0,68	0,07	n.d.	0,08	0,05	2,85	0,11	0,02	n.d.	Tr
RSD (%)	1,01	3,16	3,98	n.d.	3,04	3,02	n.d.	n.d.	n.d.	3,20	2,66	3,41	n.d.	3,39	2,88	1,10	3,19	3,55	n.d.	n.d.
RT6	24,0	1,13	n.d.	n.d.	0,09	0,27	n.d.	n.d.	n.d.	0,27	0,98	0,11	n.d.	0,09	0,04	3,41	0,09	0,63	n.d.	Tr
RSD (%)	1,09	2,21	n.d.	n.d.	3,60	3,14	n.d.	n.d.	n.d.	3,14	2,17	3,05	n.d.	2,36	2,90	1,99	3,11	3,45	n.d.	n.d.
RT7	28,8	1,22	0,10	n.d.	0,10	0,26	0,01	n.d.	0,69	n.d.	0,70	0,14	n.d.	0,08	0,07	3,02	0,11	0,02	n.d.	Tr
RSD (%)	1,07	2,17	3,57	n.d.	3,10	3,13	3,99	n.d.	3,65	n.d.	3,82	3,16	n.d.	3,30	3,52	1,93	3,12	3,93	n.d.	n.d.

LOD: límite de detección; LOQ: límite de cuantificación; RSD (%): % desviación estándar relativa; n.d.: no detectado (< límite de detección);
Tr: trazas (< límite de cuantificación).

Para detectar un patrón general de distribución de todas las bebidas se realizó un análisis de componentes principales (PCA) con las concentraciones obtenidas de cafeína, ácido cafeico y ácido clorogénico (*figura 127*). Los datos presentados en este primer gráfico de PCA se han transformado para mostrar el contenido de estos compuestos en mg/L presentes en las latas de refrescos y bebidas energéticas y en una taza de café o té. En el caso de café soluble y té se ha considerado que 2,5 g de producto se ha disuelto o extraído, respectivamente, en 200 mL de agua (con una recuperación del 75 % para cada extracción).

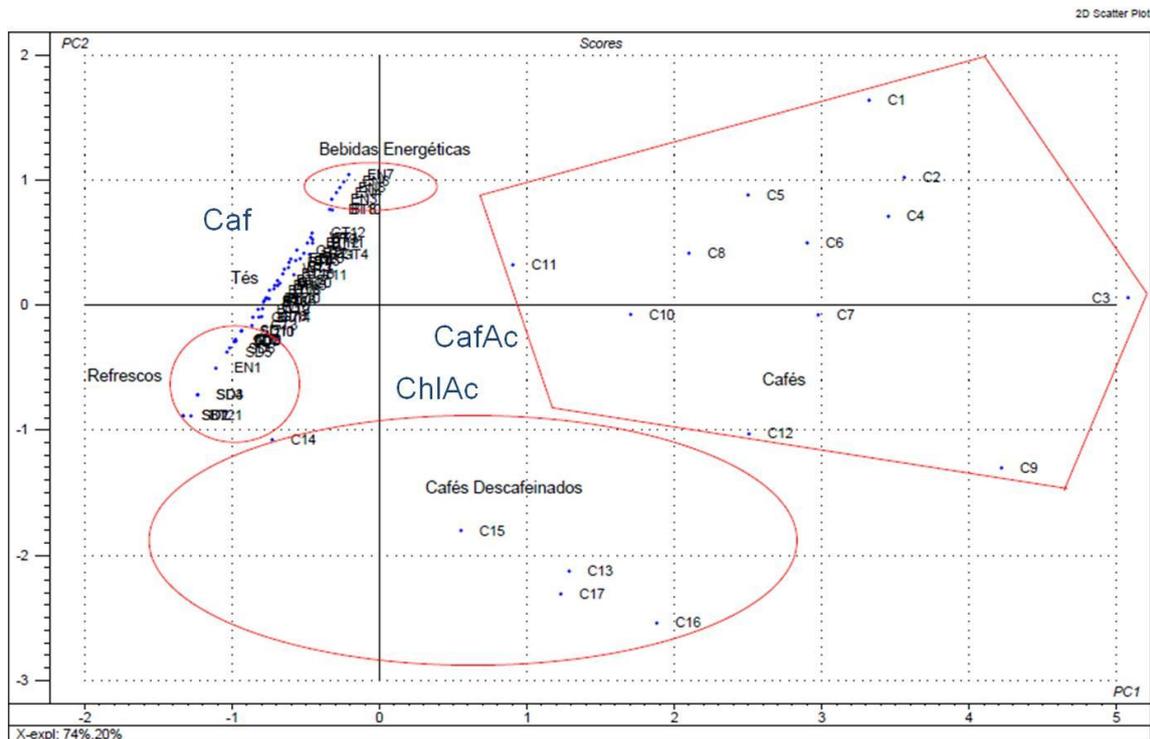


Figura 127. Resultados del análisis de componentes principales de ChIAc, CafAc y Caf frente a las muestras analizadas.

Se observa una clara separación entre los cafés descafeinados -5 muestras- y los cafés no descafeinados -12 muestras-. El resto de muestras (refrescos, bebidas energéticas y tés) están juntas en un gran grupo caracterizado por la ausencia de ácido clorogénico y ácido cafeico; dentro de este grupo hay otro menor que incluye todas las bebidas energéticas (excepto EN1), caracterizadas por tener mayores concentraciones de cafeína que los refrescos y los tés, pero no tan grandes como las que presentan los cafés no descafeinados. Todos los refrescos y la bebida energética EN1 aparecen juntas entre los valores de PC2 -1 y 0. En la figura se han localizado las cargas para cada variable estudiada (Caf, ChIAc y CafAc).

Como hemos comentado al principio de este apartado, debido a la complejidad de la composición de los tés se ha realizado un análisis estadístico por separado con estas muestras.

4.4.4.2 Patrones de distribución en té no fermentados

En la *figura 128* se muestran la concentración total de cada familia de compuestos determinados en las muestras de té, tanto fermentados como no fermentados.

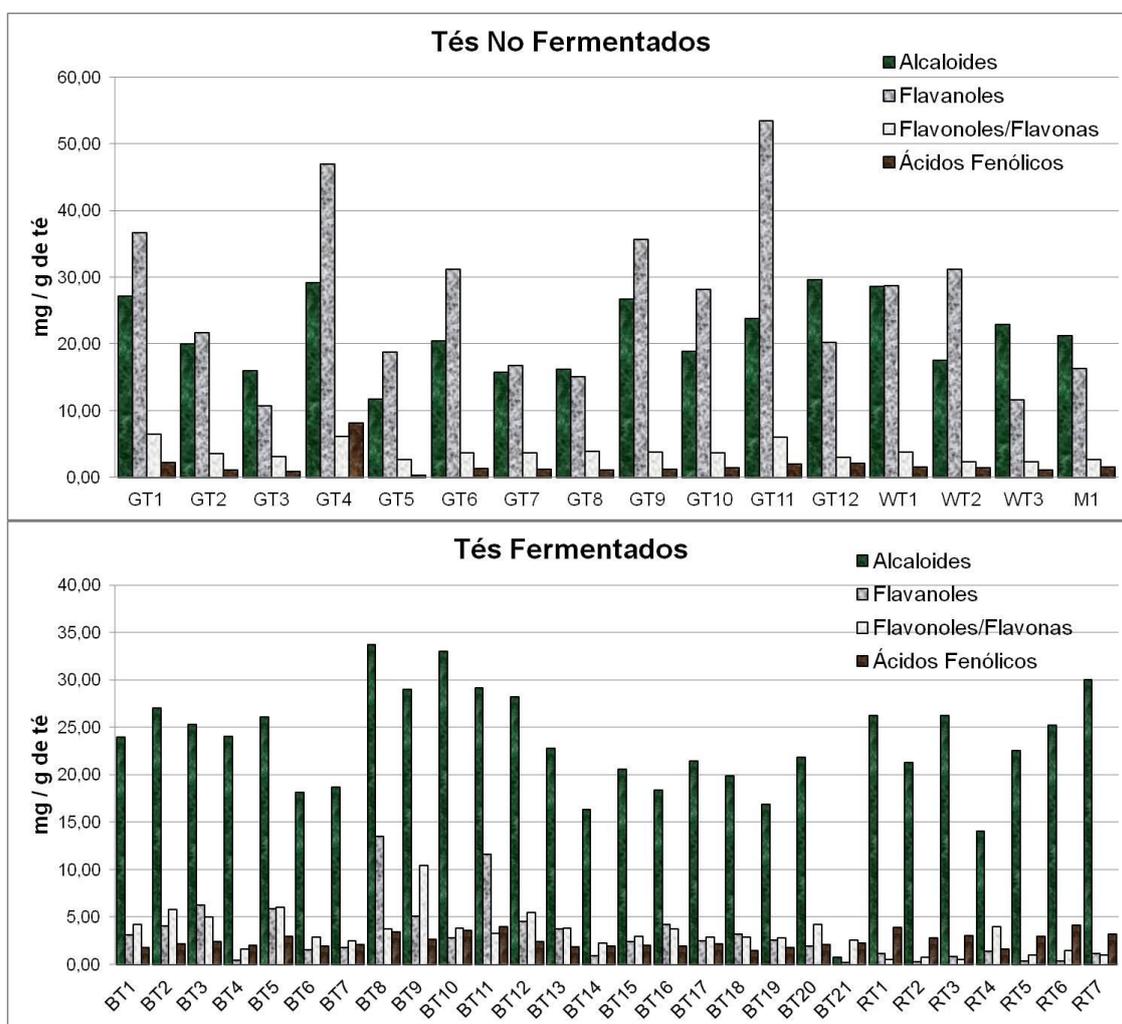


Figura 128. Distribución de las familias de compuestos en muestras de té fermentado y no fermentado.

La clasificación de té fermentados incluyen los té verdes (GT) y té blancos (WT) analizados. El código de identificación de cada muestra y su información proporcionada por el fabricante se encuentran en la *tabla 91* y la concentración de cada una de los compuestos determinados en este estudio en la *tabla 93*.

Como se puede observar en la *figura 128*, para la mayoría de los té no fermentados los *flavanoles* son los compuestos mayoritarios, seguidos de los *alcaloides*. Los *ácidos fenólicos* son la familia de compuestos presentes en menor concentración para todas las muestras analizadas. Los *flavanoles* están en mayor concentración en el té verde, con una gran variabilidad en las concentraciones que se encuentran entre 10,7 mg/g (GT3) y 53,4 mg/g (GT11).

En los tés blancos se aprecia un perfil similar, siendo los flavanoles los compuestos mayoritarios (entre 11,7 mg/g (WT3) y 31,2 mg/g (WT2)). Sin embargo se observan diferentes concentraciones de fitoquímicos en las muestras WT3 y WT4, donde los flavanoles están en menor concentración que los alcaloides. En general, se observan menores concentraciones de flavanoles en los tés blancos que en los verdes, pero debido a la gran variabilidad observada en el grupo de los tés verdes, la concentración de estos compuestos en los tés blancos están dentro del amplio rango encontrado en este tipo de tés no fermentados. Hay que tener en cuenta el reducido número de muestra de té blanco utilizadas en el estudio, por lo que la información obtenida del análisis de las muestras sólo se puede usar para la comparación entre tés fermentados y no fermentados. La única muestra de las analizadas hecha exclusivamente de té blanco (según la información proporcionada por el fabricante) es la WT1, mientras que otras son mezclas de tés blancos, verdes y rojos (WT2 y WT4), o té blanco con for de naranjo (WT3). Un muestreo mayor podría proporcionarnos datos para diferenciar entre los diferentes tipos de tés no fermentados.

Se observan mayores concentraciones para flavanoles en las muestras de té verde sin aditivos o mezclas. Una posible explicación de estas mayores cantidades observadas frente al resto de tés verdes es que este tipo de compuestos se encuentran en menores concentraciones en los aditivos utilizados y por lo tanto en los tés verdes que no son “puros” disminuye su concentración.

Desde otro punto de vista, se puede obtener más información a partir de la concentración individual de cada compuesto concreto en las muestras (*tabla 93*). El principal flavanol en la mayoría de las muestras es el EGC con valores que varían entre 5,42 mg/g (GT7) y 15,70 mg/g (GT4) para los tés verdes y entre 5,78 mg/g (WT1) y 24,9 mg/g (WT2) en los tés blancos. La mayor concentración para los flavanoles individualizados se detecta en la muestra WT2, que se trata de una mezcla de tés (blanco, verde y rojo). EGCG es el segundo flavanol en concentración detectado en estas muestras, aunque en algunas muestras (GT11 y GT12) es el principal flavanol detectado, presentando mayores concentraciones que para EGC. Con respecto al resto de flavanoles no es posible establecer una tendencia clara en sus concentraciones debido a la gran variabilidad presente en las muestras analizadas.

Las concentraciones de *flavanoles* encontradas en las muestras analizadas concuerdan con los valores bibliográficos de otros estudios. En un estudio donde se analizaron los flavanoles de 7 tés no fermentados consumidos en Reino Unido usando agua como disolvente de extracción [76] el flavanol encontrado en mayor concentración fue EGC con concentraciones entre 16,2 y 32,0 mg/g. Concentraciones similares fueron encontradas en estudios realizados por otros investigadores; el análisis de flavanoles en 7 tés verdes [64] muestran grandes concentraciones de EGCG (20,3-40,6 mg/g) y EGC (19,0-34,6 mg/g). Usando como disolvente de

extracción acetonitrilo acuoso (60%) [77] en 13 téis no fermentados comerciales se detectaron menores concentraciones de flavanoles; en todos los téis analizados la EGCG fue el principal compuesto encontrado presentando concentraciones entre 4,9 y 10,2 mg/g. En el estudio de 14 diferentes muestras de té [78] el principal flavanol detectado fue también EGC con concentraciones variables entre 8,0 y 83,3 mg/g dependiendo del tipo de té y su zona de cultivo. Aunque en este estudio se detectan mayores concentraciones de EGC en algunas muestras, el límite inferior es aproximadamente igual y apoya las observaciones realizadas en este estudio.

En conjunto las diferencias observadas entre los niveles encontrados en la bibliografía y los obtenidos en este estudio pueden ser atribuidas a la variedad del té, la zona de cultivo, las condiciones del procesado y la metodología analítica utilizada para la determinación de los fitoquímicos presentes. Un ejemplo de esto último es el encontrado en el trabajo de Sultana et al. (2008) [64], donde se observan diferencias en la concentración en el extracto final dependiendo de las condiciones de extracción. Los compuestos poseen diferentes polaridades y están sujetos a diferentes interacciones con la matriz de la muestra, un disolvente puede ser efectivo para la extracción de una clase de compuestos y no efectivo para el resto. Esto se puede observar para el caso de los ácidos fenólicos con una alta polaridad frente a los flavonoides relativamente apolares. En todas las referencias bibliográficas mencionadas en los párrafos anteriores se utilizaron diferentes disolventes para la extracción de los analitos de interés, dando lugar a un amplio rango de valores de concentración. En concreto, en este estudio se utilizaron 3 extracciones secuenciales disminuyendo en cada una la polaridad del disolvente utilizado para asegurar la recuperación cuantitativa de los compuestos de interés.

Los *alcaloides* son los segundos compuestos en concentración presentes en los téis no fermentados. Su concentración total varía entre 11,8 mg/g (GT5) y 29,6 mg/g (GT12). El valor tan bajo de concentración encontrada en alcaloides de la muestra GT5 fue algo esperado debido a su baja cantidad de té verde (<61%) en su composición, según la información del fabricante. En este caso los téis blancos presentan valores de alcaloides similares a los observados para los téis verdes.

La cafeína ha sido el alcaloide principal en todas las muestras, variando entre 11,6 mg/g (GT5) y 28,4 mg/g (GT12). Estos niveles concuerdan con los observados en bibliografía [76-78].

Otros alcaloide que se ha detectado en las muestras analizada es la teobromina, que se ha encontrado en menores concentraciones que la cafeína. En el té verde su rango de concentración se encuentra entre 0,16 (GT5) y 2,37 mg/g (GT4); en los téis blancos es menor su concentración (0,30 (WT3) – 0,76 mg/g (WT4)). En la bibliografía hay pocos trabajos donde se analizara la teobromina [68, 77, 79]; las concentraciones encontradas en ellos varían entre 0,002 y 0,84 mg/g. En general, en este estudio se detectaron mayores concentraciones de teobromina que los

encontrados en la bibliografía. Una posible explicación de esto son los diferentes métodos de preparación de las muestras como se ha comentado anteriormente; la utilización de las tres extracciones secuenciales permite obtener mayor eficacia en la extracción y mejorar las recuperaciones si se compara con una única extracción [80].

Flavonoles y flavonas también se han detectado en concentraciones relativamente altas en tés no fermentados, entre 2,28 mg/g (WT1) y 6,51 mg/g (GT1), y en general son mayores en los tés verdes “puros” que en las mezclas de tés. El principal flavonol presente en las muestras es QueR (1,15 (GT3) – 3,58 mg/g (GT1)). Además los derivados de quercetina se encuentran en mayores concentraciones que los derivados de kaempferol y miricetina. En la bibliografía se encuentran pocas referencias de flavonoles en té [81, 82], donde los derivados de quercetina presentan concentraciones entre 1,40 y 2,30 mg/g, los de kaempferol entre 0,91 y 1,50 mg/g, y los de miricetina entre 0,52 y 1,20 mg/g; lo cual respalda los resultados obtenidos en este estudio.

Entre todos los compuestos analizados los *ácidos fenólicos* son los que presentan menores concentraciones en todas las muestras de té verde analizadas. Su concentración varía entre 0,25 mg/g (GT5) y 8,19 mg/g (GT4). Coincide que la muestra con menor concentración de ácidos fenólicos es también la muestra con menor proporción de té verde (75%), y que la mayor concentración de estos compuestos aparece en la muestra con mayor proporción de té verde (98,2% té verde y 0,4% flor de naranjo). Además de la mayor proporción de té verde es posible asumir que el aditivo utilizado aumenta la concentración de ácidos fenólicos ya que está demostrado que estos compuestos están presentes en varias especies cítricas. Comparando esta muestra con el resto de muestras su concentración en ácidos fenólicos es mucho mayor que en otras. En los tés blancos se observan niveles similares de ácidos fenólicos que los encontrados en los tés verdes, siendo menores en las mezclas de tés.

Entre los ácidos fenólicos analizados, el GalAc es el principal ácido detectado en las muestras analizadas (0,14 (GT5) – 5,65 mg/g (GT4)), seguido por ChIAc (0,00 (GT9) – 2,54 mg/g (GT4)), mientras que el resto de ácidos analizados se encuentran en concentraciones menores de 0,3 mg/g. En la bibliografía sólo se han determinado GalAc y ChIAc [26, 77, 83]. Las concentraciones observadas de GalAc varían entre 0,02 mg/g y 3,62 mg/g mientras que para el ChIAc se observan valores entre 0,01 mg/g y 0,03 mg/g. Estas concentraciones comparadas con las observadas en este estudio son menores; como se ha comentado a lo largo de este apartado, esta diferencia está asociada no sólo a las características de las muestras, sino también a la preparación de las muestras.

4.4.4.3 Patrones de distribución en té fermentados

Como se ha comentado al principio de este apartado, el té puede someterse a un proceso de fermentación que da lugar a los diferentes tipos de té. En este estudio se han determinado los patrones de distribución de los fitoquímicos en dos tipos de té fermentados, té negro (BT) y té rojo (RT). La identificación de las muestras y sus características según el fabricante se muestran en la *tabla 91*. La concentración total de las diferentes familias de compuestos determinadas en este estudio se muestran en la *figura 128* y la concentración de cada uno de los compuestos en la *tabla 93*.

El análisis de estos datos revela que los alcaloides son los compuestos en mayor concentración para todas las muestras de té fermentadas analizadas. El resto de familias de compuestos se presentan en menores concentraciones que los alcaloides. No es posible establecer un patrón de distribución preciso de flavonoles/flavonas y flavanoles debido a la gran variabilidad observada en las muestras analizadas. En ciertas muestras la concentración de flavonoles/flavonas es mayor que la encontrada para flavanoles, mientras que para otras muestras se observa el comportamiento inverso.

La menor concentración de *alcaloides* determinados en estas muestras es para la muestra de té negro BT14 (16,3 mg/g), dos veces menor que la mayor concentración encontrada para esta familia de compuestos (33,7 mg/g BT8). Esta baja concentración puede ser debida a los aditivos que presenta esta muestra de té concreta (BT14), ya que la presencia de aditivos reduce la cantidad de té en el producto, y por lo tanto reduce la concentración de los compuestos principales del té. Esto también se observa en la *figura 128*, donde los té que son mezclas o aromatizados presentan la mayor concentración de alcaloides, mientras que la introducción de frutas da lugar a té con menores concentraciones de esta familia de compuestos. Como se ha mencionado anteriormente, es posible que la adición de otros compuestos diferentes del té pueda reducir la concentración de los fitoquímicos presentes debido a la menor cantidad de té en el producto. En el contexto de este trabajo ha sido interesante el análisis de muestras descafeinadas de té para poder comparar los resultados. La muestra de té descafeinado (BT21) posee concentraciones muy bajas de alcaloides (0,71 mg/g) que concuerda con la información proporcionada por el fabricante. Por otro lado, la concentración total de alcaloides en los té rojo es similar al observado para los té negro, variando entre 14,0 mg/g (RT4) y 30,0 mg/g (RT7).

La cafeína es el alcaloide presente en mayor concentración para todos los té fermentados analizados. En el té negro varía entre 15,7 mg/g (BT14) y 32,3 mg/g (BT8). Menores concentraciones se han observado en las muestras de té con frutas y aromas añadidos frente a las muestras de té "puras". Resultados similares se recogen en el estudio de Khokhar and Magnúsdóttir, 2002 [76], donde la concentración de cafeína de 19 muestras de té negro varía entre 22,1 y 28,0 mg/g. Además de las

diferencias causadas por la preparación de las muestras, existen otros factores que afectan a los niveles de cafeína en el té, como es la variedad de té, el ambiente de cultivo y las condiciones de procesado [84]. La concentración de cafeína en las muestras de té rojo es similar al observado en las de té negro, lo cual concuerda con lo observado en la bibliografía [78]. Las concentraciones de teobromina detectadas son mucho menores que las de cafeína en todas las muestras de té fermentado analizadas. Su concentración varía entre 0,21 mg/g (BT21) y 1,45 mg/g (BT8). Para el caso específico de la muestra de té descafeinado (BT21) se observan valores similares de teobromina que en los tés no descafeinados, lo cual indica que o el té utilizado tiene una concentración mayor de teobromina, lo cual compensa las pérdidas producidas por el proceso de descafeinado, o que el proceso de descafeinado no afecta significativamente a la concentración de este alcaloide.

En los tés negros se han encontrado concentraciones de *flavanoles* entre 0,43 mg/g (BT4) y 13,5 mg/g (BT8). En el caso del té descafeinado (BT21) la concentración total de flavanoles (0,18 mg/g) es mucho menor que para el resto de tés. Una posible explicación es que durante el proceso de descafeinado, se produzcan pérdidas y/o la degradación de los flavanoles. También se observan menores concentraciones de flavanoles en las muestras de té rojo que varían entre 0,28 mg/g (RT2) y 1,36 mg/g (RT4). En este caso, no sólo las condiciones de procesado afectan a la menor concentración encontrada para esta familia de compuestos, sino que puede ser debido en gran medida por el té utilizado. Sin embargo, hay que tener en cuenta que los flavanoles son muy lábiles a la degradación provocada por la oxidación. Además, la gran variabilidad en las concentraciones de flavanoles está probablemente relacionada con la introducción de mezclas de tés en la categoría de tés rojos.

Entre los flavanoles determinados, EC fue el compuesto mayoritario de esta familia en la mayoría de los tés fermentados. En los tés negros su concentración varía entre 0,11 mg/g (BT21) y 2,79 mg/g (BT11), mientras que en los tés rojos está entre 0,11 mg/g (RT2) y 0,80 mg/g (RT4). Otros flavanoles mayoritarios en algunos tés negros fueron EGC (<1,69 mg/g) y EGCG (<3,74 mg/g). El flavanol encontrado en menor concentración fue GCG, el cual no fue detectado en varias muestras. Sin embargo hay una gran variabilidad en los niveles de flavanoles encontrados en los tés fermentados, algo que ya se reflejó en estudios previos [77, 85]. Otra evidencia que está respaldada por la bibliografía [76] es la menor concentración de estos compuestos en muestras con frutas añadidas comparadas con las muestras “puras” de té.

Las concentraciones de los *flavonoles* y *flavonas* encontradas en las muestras de té fermentado varían entre 1,64 mg/g (BT4) y 10,5 mg/g (BT9). En los tés rojos las concentraciones son menores que en los tés negros (0,50 mg/g (RT1) – 1,49 mg/g (RT6)). Varios factores influyen en la concentración de estas familias de compuestos, aunque el principal es el té utilizado. QueR es el compuesto de estas

familias que en mayor concentración se encuentra en las muestras de té negro analizadas (1,04 – 3,18 mg/g). Los derivados de quercetina se encuentran en mayores niveles que los derivados de kaempferol y miricitina. La flavona LutG se encontró en bajas concentraciones en la mayoría de las muestras y no se detectó en algunos té. A pesar de que hay pocos estudios del análisis de flavonoles en té, sus resultados concuerdan con los encontrados en este estudio [81].

La concentración total de *ácidos fenólicos* en té negros no son significativamente diferentes a los encontrados en los té rojos. En los té negros la concentración varía entre 1,43 mg/g (BT18) y 3,96 mg/g (BT11), mientras que para los té rojos la concentración está entre 1,58 mg/g (RT4) y 4,13 mg/g (RT6). El ácido fenólico mayoritario en los té fermentados es el GalAc, con concentraciones en té negros entre 1,14 mg/g (BT14) y 3,01 mg/g (BT11) y en té rojos entre 1,01 (RT4) y 3,59 mg/g (RT1). ChlAc también se encontró en concentración relativamente alta. La menor concentración fue detectada para el PrtAc en la mayoría de las muestras. CafAc no se detectó en las muestras y CouAc tampoco se detectó o estaba en concentraciones menores al límite de cuantificación. De los pocos estudios que hay sobre el análisis de ácidos fenólicos en té negros [77, 86], sus resultados concuerdan con los obtenidos en este estudio, en lo que a los niveles de ácidos gálico y clorogénico se refiere.

4.4.4.4 Diferenciación entre té fermentados y no fermentados

Los patrones de distribución son una gran herramienta para diferenciar los té, no sólo en términos de su composición de té, sino por su perfil fitoquímico. Además pueden apoyar estudios epidemiológicos y de intervención proporcionando la información necesaria sobre el perfil fitoquímico, para utilizarlo correctamente en la estimación de su ingesta por individuos y sujetos a prueba.

Por lo tanto, procedimientos de reconocimiento de patrones se aplicaron a los diferentes grupos de conjuntos de datos con el objetivo de clasificar las muestras con respecto al tipo de té. El análisis de componentes principales (PCA) ha sido utilizado para representar la distribución de los datos fitoquímicos de todos los tipos de té. El primer PCA fue el formado por la matriz de todas las muestras de té analizadas (excepto la muestra de té descafeinado) y todos los compuestos analizados: 43 muestras y 20 variables. La gráfica del primer componente principal frente al segundo (PC1 vs. PC2) se muestra en la *figura 129*.

Como se puede observar es posible identificar tres grupos diferentes de muestras: un grupo con los valores de PC1 menores de -2 y valores de PC2 positivos (té rojos); un grupo de muestras con valores de PC1 entre -2 y 3 y valores positivos de PC2 (té negros) y otro grupo con valores negativos de PC2 (té no fermentados). El PCA usando todas las muestras y factores es capaz de explicar el 50% de la varianza observada. Teniendo en cuenta las enormes diferencias entre los tipos de

muestras (tés verdes, blancos, negros y rojos y el uso de una amplia variedad de aditivos) y el contenido en té, estos resultados son excepcionalmente buenos.

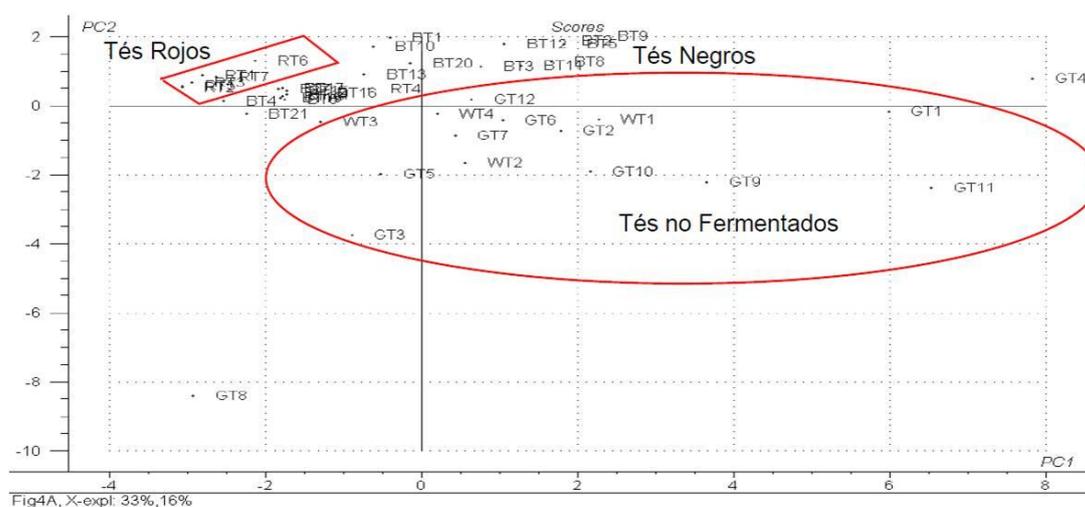


Figura 129. Resultado del análisis de componentes principales de la concentración de los 20 compuestos analizados frente todas las muestras (excepto BT21).

Además, estos resultados muestran que es posible diferenciar la mayoría de los tés no fermentados (valores de PC2 negativos) de los tés fermentados (valores de PC2 positivos). Como se puede observar, las muestras de tés no fermentados GT4 y GT12 han sido erróneamente clasificadas como fermentados, representan menos de 5% del total de muestras analizadas. En este aspecto, las muestras de tés no fermentados son más probables de ser incorrectamente clasificadas que los tés fermentados, ya que los no fermentados poseen valores de PC2 negativos.

Estos patrones de reconocimiento reflejan la diferente composición fitoquímica que existe entre estos dos tipos de té. Ambos, fermentados y no fermentados, poseen concentraciones similares de alcaloides, sin embargo algunos tés no fermentados muestran concentraciones de cafeína ligeramente menores que los tés fermentados. No existen diferencias significativas en el contenido de flavonoles y flavonas entre fermentados y no fermentados, su contenido en ambos es similar. QueR es el compuesto mayoritario de este grupo, y los derivados de quercetina poseen una concentración mayor que los derivados de kaempferol y miricitina.

La comparación de los patrones de distribución de los tés fermentados y no fermentados indica que la principal diferencia entre ambos es la composición de flavanoles y ácidos fenólicos. Tés no fermentados poseen mayor concentración de flavanoles, mientras que estos están presentes en concentraciones bajas en los tés fermentados. De manera ilustrativa, en tés no fermentados, el contenido total de flavanoles varía desde 10,7 mg/g a 53,4 mg/g, mientras que en los tés fermentados su contenido está entre 0,28 mg/g y 13,5 mg/g. A parte de estas diferencias en las concentraciones, el perfil de los flavanoles en ambos tipos es algo diferente. Mientras que en los tés no fermentados el principal flavanol fue EGC (5,42 – 13,1 mg/g), en los

tés fermentados el principal fue EC (0,11 – 1,63 mg/g) y el flavanol EGC se encontró en concentraciones menores de 1,69 mg/g. Otro flavanol importante presente en ambos tipos de té fue EGCG, el cual presenta menores concentraciones en tés fermentados que en tés no fermentados. Estas diferencias encontradas fueron esperadas ya que los flavanoles se oxidan o condensan en otras moléculas polifenólicas mayores como son las teaflavinas y tearubiginas durante el proceso de fermentación [87].

A diferencia de la tendencia de los flavanoles, los ácidos fenólicos presentan una tendencia inversa en su patrón de distribución al comparar los dos tipos de tés. Estos compuestos se encuentran en mayor concentración en tés no fermentados (0,25 - 8,19 mg/g) que en los tés fermentados (1,43 – 3,96 mg/g), aunque existen algunas excepciones. La principal diferencia observada entre los dos tipos de tés fue en la concentración del GalAc (no fermentados: 0,14 – 1,78 mg/g; fermentados: 1,15 – 3,01 mg/g). Los valores mayores presentes en los tés fermentados puede estar relacionado con la ruptura de los galatos de los flavanoles durante el proceso de fermentación, incrementando la concentración de este compuesto en el producto final. El análisis de los patrones de distribución de los fitoquímicos que hemos realizado indica que los flavanoles y el GalAc son marcadores potenciales para la diferenciación entre tés fermentados y no fermentados. De hecho, estos patrones son la clave para identificar la huella fitoquímica de las muestras que nos permita una diferenciación más precisa entre los tipos de té estudiados.

Sin embargo, es importante considerar que algunas de las muestras analizadas son mezclas de tés fermentados y no fermentados. Como el total de las muestras de tés no fermentados que son mezclas es mayor que las que se encuentran entre los tés fermentados, éstas se identificaron correctamente como no fermentadas (valores de PC2 negativos). Con cantidades relativamente altas de té no fermentado, estas muestras poseían concentraciones suficientes de los componentes claves para proporcionar una huella fitoquímica característica de tés no fermentados, y por lo tanto se reconocieron como tal.

También hay una gran variabilidad en los valores del PCA que puede ser parcialmente atribuible a los diferentes tipos de muestras y aditivos utilizados. Algunas muestras, por ejemplo, están también compuestas por frutas ricas en polifenoles, y dependiendo de la cantidad añadida, pueden influenciar en la huella fitoquímica, y por lo tanto, dificulta su correcta clasificación. Con el fin de proporcionar una mejor visión de los patrones de distribución de los tés verdes, blancos, negros y rojos, se debe eliminar la variabilidad causada por tales muestras, que deben ser eliminadas. Por lo tanto se ha diseñado un segundo PCA (*figura 130*) donde se incluyeron sólo las muestras “puras” (según la información proporcionada por el fabricante) y los 20 compuestos analizados. Ese segundo PCA fue capaz de explicar el 57% de la varianza observada.

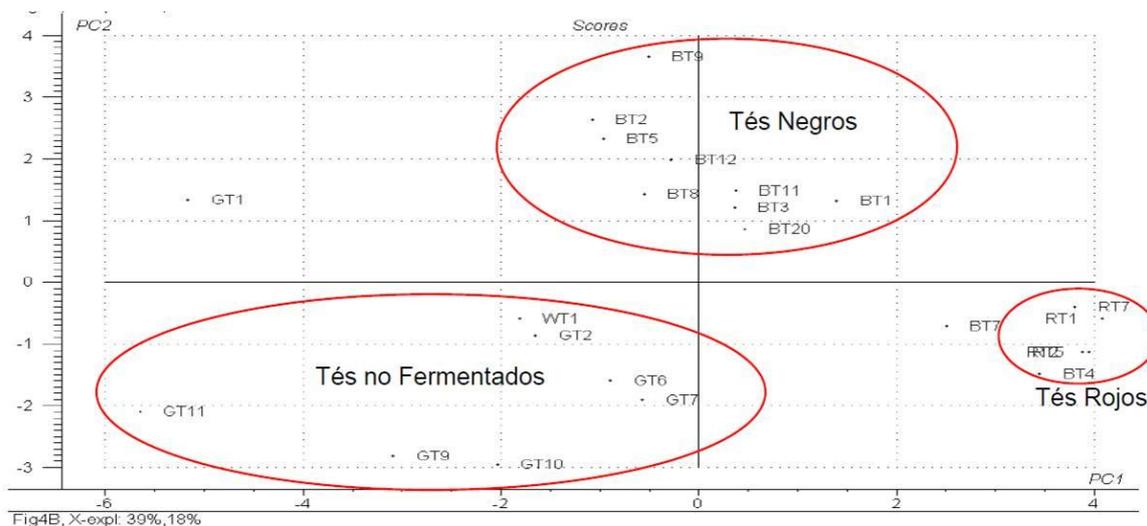


Figura 130. Resultado del análisis de componentes principales de la concentración de los 20 compuestos analizados frente a las muestras "puras".

Como se puede comprobar, los tés no fermentados (verdes y blancos) forman un grupo de muestras con valores negativos de PC1 y PC2, mientras que los tés negros forman otro grupo. Además, fue posible formar un grupo de tés rojos, los cuales poseen valores positivos de PC1 y negativos de PC2. Sin embargo la diferenciación entre los distintos tipos de tés no fermentados (verdes y blancos) no es posible.

Utilizando este PCA muchas de las muestras se han podido clasificar correctamente, con la excepción de las muestras GT1, BT4 y BT7. La única muestra de tés no fermentados clasificada incorrectamente fue la GT1. Por lo tanto se confirma que la diferenciación entre los diferentes tipos de tés se mejora usando grupos de muestras más homogéneos.

Como se ha mencionado anteriormente, existe una gran variabilidad en la concentración de varios compuestos minoritarios que puede afectar a la diferenciación entre los tipos de tés. Buscando mejorar la separación entre muestras eliminando esta variabilidad se realiza un tercer PCA que incluye sólo los compuestos principales de cada clase (Caf, EC, EGC, EGCG, QueR y GalAc) con las muestras "puras" (figura 131). En este caso la explicación de varianza aumenta hasta un 80%, lo cual indica que es posible usar un patrón de distribución de fitoquímicos para identificar tipos de tés.

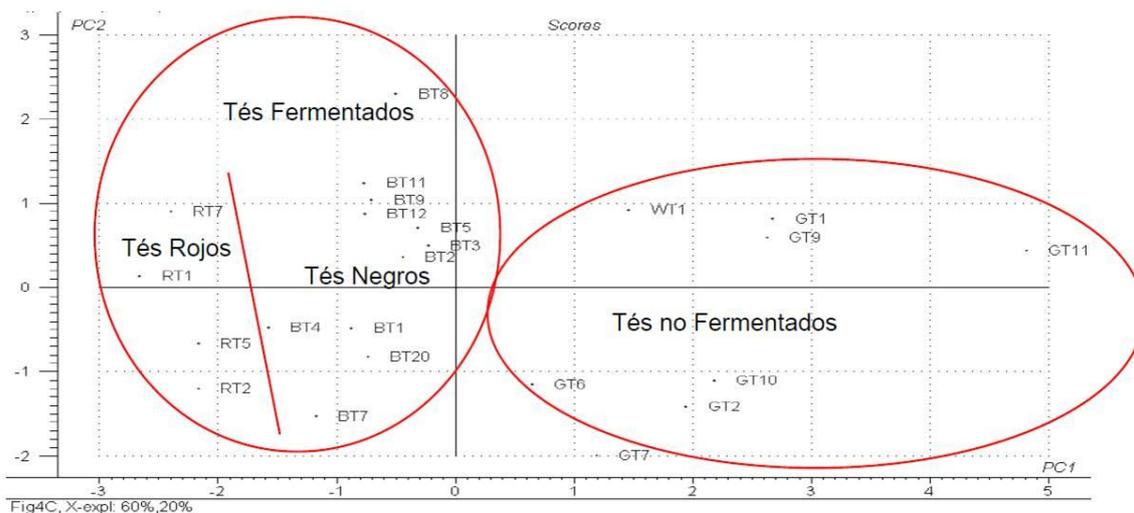


Figura 131. Resultado del análisis de componentes principales de la concentración de los principales compuestos (Caf, EC, EGC, EGCG, QueR y GalAc) frente a las muestras "puras".

Todos los té no fermentados poseen valores de PC1 positivos, mientras que los té fermentados tienen valores negativos. Además es posible diferenciar entre té rojos y negros; sin embargo ambos tipos de té tienen valores de PC1 negativos, siendo los de los té rojos menores (<-2) que los de los té negros.

4.4.5 Conclusiones

Un método cromatográfico rápido para la determinación simultánea de varias clases de compuestos fenólicos, entre ellos ácidos fenólicos, flavanoles, flavonas y flavonoles, así como cafeína en diferentes muestras se ha optimizado y evaluado. Usando una columna de partículas recubiertas, *fused-core*, la separación de todos los compuestos se consigue en 10 minutos, incluyendo en ese tiempo la limpieza de la columna, la vuelta a las condiciones iniciales y el tiempo de re-equilibrado. Comparando este método con otros métodos documentados en la bibliografía, incluidos los métodos de UHPLC, se consigue una mejora en el desarrollo del método cromatográfico.

El método se aplicó a muestras con distintos perfiles fitoquímicos y se comprobó que las clases predominantes de compuestos dependen de la muestra. Se comprobó que los perfiles obtenidos aplicando el método optimizado concuerdan con lo consultado en la bibliografía.

Aplicando el método a diferentes muestras de té es posible, con los datos de concentraciones de los compuestos analizados, conseguir patrones de distribución de los presente fitoquímicos que permitieron realizar una clasificación de la mayoría de los tipos de té analizados.

Considerando las buenas características cromatográficas obtenidas con este método optimizado, cabe esperar que el número de analitos que puedan ser analizados con este método aumente y se puede ampliar su uso a otras muestras.

5 CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el estudio de diferentes fases estacionarias para la obtención de métodos cromatográficos rápidos nos indican que la utilización de acetonitrilo como fase móvil proporciona mejores resultados con todas las columnas que el uso de metanol como fase móvil.

Entre las columnas testadas, la columna con mejor comportamiento fue la columna de partículas recubiertas, ya que además de proporcionar buenos resultados en los parámetros estudiados, nos permite, por sus características técnicas, optimizar el método para obtener análisis más rápidos sin perder reproducibilidad y eficacia en la separación.

La columna monolítica presenta un gran potencial pero el traspaso directo de métodos cromatográficos desarrollados para columnas particuladas no es posible y es necesaria una optimización más exhaustiva del método.

Optimizando las condiciones de análisis cromatográfico se consiguió optimizar dos métodos de análisis de las 12 principales isoflavonas de soja usando una columna monolítica. Usando acetonitrilo como fase móvil y trabajando a temperatura ambiente se consigue la separación de todos los compuestos en 5 minutos con un tiempo total de análisis entre inyecciones de 15,01 minutos. Utilizando metanol como fase móvil la separación se consigue en menos de 10 minutos y con un tiempo total de análisis de 16,01 minutos. Ambos métodos presentan buenas características cromatográficas.

Con la columna de partículas recubiertas y utilizando como fase móvil acetonitrilo también se realiza la optimización de las condiciones cromatográficas (temperatura, flujo, tiempo de re-equilibrado) para desarrollar un método rápido y reproducible para la determinación de las 12 isoflavonas. La separación de todos los compuestos se consigue en 5,8 min y el tiempo total de análisis, incluyendo limpieza de columna y tiempo de re-equilibrado, es de menos de 12 min. El método optimizado muestra unos excelentes parámetros cromatográficos en términos de resolución, simetría de pico, reproducibilidad, límites de detección y cuantificación. El método optimizado se utilizó con éxito para el análisis de isoflavonas en muestras con similares características.

Debido a los resultados obtenidos se decide utilizar la columna de partículas recubiertas, *fused-core*, para otro tipo de compuestos diferentes de las isoflavonas, en concreto para un análisis simultáneo de diferentes clases de compuestos fenólicos y cafeína. Se desarrolló un método que consigue la separación de 20 compuestos diferentes en menos de 5 minutos y con un tiempo total de análisis de 10 minutos. El método desarrollado presenta excelentes parámetros cromatográficos y se aplicó a diferentes tipos de muestras comprobando su versatilidad ante distintos perfiles de compuestos.

La combinación entre la tecnología de la columna y la optimización de los parámetros cromatográficos posibilita incrementar el número de muestras que se

pueden analizar por día si lo comparamos con los métodos convencionales. En base a los resultados obtenidos con la columna de partículas recubiertas se puede concluir que esta tecnología posee un gran potencial para proporcionar métodos rápidos y más sensibles para el análisis de isoflavonas y otros compuestos naturales.

6 BIBLIOGRAFÍA

1. Naczki, M. and F. Shahidi, *Extraction and analysis of phenolics in food*. Journal of Chromatography A, 2004. **1054**(1-2): p. 95-111.
2. Bernal, J., et al., *Advanced analysis of nutraceuticals*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2011. **55**(4): p. 758-774.
3. Cheynier, V., *Polyphenols in foods are more complex than often thought*. The American Journal of Clinical Nutrition, 2005. **81**(Suppl): p. 223S-229S.
4. Huang, M.-T., C.-T. Ho, and C.Y. Lee, *Phenolic compounds in food and their effects on health II. Antioxidants & cancer prevention*. ACS Symposium Series 507. 1992, Washington D.C., EEUU: American Chemical Society.
5. Naczki, M. and F. Shahidi, *Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2006. **41**: p. 1523-1542.
6. Saikat, S. and C. Raja, *The Role of Antioxidants in Human Health*, in *Oxidative Stress: Diagnostics, Prevention, and Therapy*, S. Andreescu and M. Hepel, Editors. 2011, American Chemical Society. p. 1-37.
7. Santangelo, C., et al., *Polyphenols, intracellular signalling and inflammation*. Ann Ist Super Sanita, 2007. **43**(4): p. 394-405.
8. Sies, H., *Polyphenols and health: Update and perspectives*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2010. **501**(1): p. 2-5.
9. Ignat, I., I. Volf, and V.I. Popa, *A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables*. Food Chemistry, 2011. **126**(4): p. 1821-1835.
10. Clifford, M.N., *Chlorogenic acids and other cinnamates – nature, occurrence and dietary burden*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 1999. **79**(3): p. 362-372.
11. Moon, J.-K., H.S. Yoo, and T. Shibamoto, *Role of Roasting Conditions in the Level of Chlorogenic Acid Content in Coffee Beans: Correlation with Coffee Acidity*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009. **57**(12): p. 5365-5369.
12. Song, W.O. and O.K. Chun, *Tea Is the Major Source of Flavan-3-ol and Flavonol in the U.S. Diet*. The Journal of Nutrition, 2008. **138**(8): p. 1543S-1547S.
13. Wang, Y. and C.-T. Ho, *Polyphenolic Chemistry of Tea and Coffee: A Century of Progress*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009. **57**(18): p. 8109-8114.
14. García-Lafuente, A., et al., *Flavonoids as anti-inflammatory agents: implications in cancer and cardiovascular disease*. Inflammation Research, 2009. **58**(9): p. 537-552.
15. Rimbach, G., et al., *Dietary isoflavones in the prevention of cardiovascular disease - A molecular perspective*. Food and Chemical Toxicology, 2008. **46**(4): p. 1308-1319.
16. Rostagno, M.A., et al., *Sample preparation for the analysis of isoflavones from soybeans and soy foods*. Journal of Chromatography A, 2009. **1216**(1): p. 2-29.
17. Hurst, W.J., *Methods of Analysis for Functional Foods and Nutraceuticals*, ed. W.J. Hurst. 2002: CRC Press.

18. Gryniewicz, G., et al., *Chromatographic quantification of isoflavones (why and how)*. Acta Chromatographica, 2005. **15**: p. 31-65.
19. Careri, M., F. Bianchi, and C. Corradini, *Recent advances in the application of mass spectrometry in food-related analysis*. Journal of Chromatography A, 2002. **970**(1-2): p. 3-64.
20. Robbins, R.J., *Phenolic Acids in Foods: An Overview of Analytical Methodology*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003. **51**(10): p. 2866-2887.
21. Kalili, K.M. and A. de Villiers, *Recent developments in the HPLC separation of phenolic compounds*. Journal of Separation Science, 2011. **34**(8): p. 854-876.
22. Skoog, D.A., F.J. Holler, and T.A. Nieman, *Introducción a las separaciones cromatográficas.*, in *Principios de Análisis Instrumental*, H.B. Company, Editor. 2001, Saunders College Publishing. p. 730-830.
23. Klejdus, B., et al., *Liquid chromatographic-mass spectrometric determination of genistin and daidzin in soybean food samples after accelerated solvent extraction with modified content of extraction cell*. Analytica Chimica Acta, 2004. **517**(1-2): p. 1-11.
24. Neue, U.D., et al., *3 HPLC columns and packings*, in *Separation Science and Technology*. 2007, Academic Press. p. 45-83.
25. Rostagno, M.A., et al., *Methods and techniques for the analysis of isoflavones in foods*, in *Chromatography types, techniques and methods.*, T.J. Quintin, Editor. 2010, Nova Science: New York. p. 551.
26. Zuo, Y., H. Chen, and Y. Deng, *Simultaneous determination of catechins, caffeine and gallic acids in green, Oolong, black and pu-erh teas using HPLC with a photodiode array detector*. Talanta, 2002. **57**(2): p. 307-316.
27. Klejdus, B., et al., *Ultrahigh-pressure liquid chromatography of isoflavones and phenolic acids on different stationary phases*. Journal of Chromatography A, 2008. **1195**(1-2): p. 52-59.
28. Eeltink, S., et al., *Comparison of the efficiency of microparticulate and monolithic capillary columns*. Journal of Separation Science, 2004. **27**(17-18): p. 1431-1440.
29. Nováková, L. and H. Vlčková, *A review of current trends and advances in modern bio-analytical methods: Chromatography and sample preparation*. Analytica Chimica Acta, 2009. **656**(1-2): p. 8-35.
30. Svec, F., *Porous monoliths: The newest generation of stationary phases for HPLC and related methods*. LC-GC Europe, 2003. **16**: p. 24-28.
31. Tanaka, N. and H. Kobayashi, *Monolithic columns for liquid chromatography*. Analytical Bioanalytical Chemistry, 2003. **376**: p. 298-301.
32. Rostagno, M.A. and A. Villares, *Fast separation of phytochemicals by High Performance Liquid Chromatography using monolithic columns*, in *Monolithic chromatography and its modern applications*, P.G. Wang, Editor. 2010, ILM publications. p. 339-380.
33. Brenier-Maurel, C., et al., *Optimization of St John's Wort flavonoid separation by reversed phase liquid chromatography on a silica-based monolithic column*. Chromatographia, 2002. **56**(5-6): p. 277-282.

34. Chinnici, F., et al., *Improved HPLC Determination of Phenolic Compounds in Cv. Golden Delicious Apples Using a Monolithic Column*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003. **52**(1): p. 3-7.
35. Apers, S., et al., *Fast high-performance liquid chromatography method for quality control of soy extracts*. Journal of Chromatography A, 2004. **1038**(1&2): p. 107-112.
36. Troncoso, N., et al., *Fast high performance liquid chromatography and ultraviolet-visible quantification of principal phenolic antioxidants in fresh rosemary*. Journal of Chromatography A, 2005. **1100**(1): p. 20-25.
37. Tzanavaras, P.D. and D.G. Themelis, *Development and validation of a high-throughput high-performance liquid chromatographic assay for the determination of caffeine in food samples using a monolithic column*. Analytica Chimica Acta, 2007. **581**(1): p. 89-94.
38. Repollés, C., J.M. Herrero-Martínez, and C. Ràfols, *Analysis of prominent flavonoid aglycones by high-performance liquid chromatography using a monolithic type column*. Journal of Chromatography A, 2006. **1131**(1&2): p. 51-57.
39. Rostagno, M.A., M. Palma, and C.G. Barroso, *Fast analysis of soy isoflavones by high-performance liquid chromatography with monolithic columns*. Analytica Chimica Acta, 2007. **582**(2): p. 243-249.
40. Castellari, M., et al., *Analysis of wine phenolics by high-performance liquid chromatography using a monolithic type column*. Journal of Chromatography A, 2002. **973**(1-2): p. 221-227.
41. van Nederkassel, A.M., et al., *Fast separations on monolithic silica columns: method transfer, robustness and column ageing for some case studies*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2003. **32**(2): p. 233-249.
42. DeStefano, J.J., T.J. Langlois, and J.J. Kirkland, *Characteristics of Superficially-Porous Silica Particles for Fast HPLC: Some Performance Comparisons with Sub-2-µm Particles*. Journal of Chromatographic Science, 2008. **46**(3): p. 254-260.
43. Gritti, F., et al., *Performance of columns packed with the new shell particles, Kinetex-C18*. Journal of Chromatography A, 2010. **1217**(10): p. 1589-1603.
44. Guillarme, D., et al., *New trends in fast and high-resolution liquid chromatography: a critical comparison of existing approaches*. Anal Bioanal Chem, 2010. **397**(3): p. 1069-82.
45. Nováková, L., L. Matysova, and P. Solich, *Advantages of application of UPLC in pharmaceutical analysis*. Talanta, 2006. **68**(3): p. 908-18.
46. Kirkland, J.J., et al., *Fused-core particle technology in high-performance liquid chromatography: An overview*. Journal of Pharmaceutical Analysis, 2007. **3**(5): p. 303-312.
47. Gritti, F., et al., *Comparison between the efficiencies of columns packed with fully and partially porous C18-bonded silica materials*. Journal of Chromatography A, 2007. **1157**(1-2): p. 289-303.
48. Bayram, B., et al., *A validated method for the determination of selected phenolics in olive oil using high-performance liquid chromatography with coulometric electrochemical detection and a fused-core column*. Food Chemistry, 2013. **138**(2-3): p. 1663-1669.

49. Martí, R., et al., *Fast simultaneous determination of prominent polyphenols in vegetables and fruits by reversed phase liquid chromatography using a fused-core column*. Food Chemistry, 2015. **169**: p. 169-179.
50. Rostagno, M.A., M. Palma, and C.G. Barroso, *Ultrasound-assisted extraction of soy isoflavones*. Journal of Chromatography A, 2003. **1012**(2): p. 119-128.
51. Rostagno, M.A., M. Palma, and C.G. Barroso, *Ultrasound-assisted extraction of isoflavones from soy beverages blended with fruit juices*. Analytica Chimica Acta, 2007. **597**(2): p. 265-272.
52. Rostagno, M.A., M. Palma, and C.G. Barroso, *Solid-phase extraction of soy isoflavones*. Journal of Chromatography A, 2005. **1076**(1&2): p. 110-117.
53. Long, G.L. and J.D. Winefordner, *Limit of Detection A Closer Look at the IUPAC Definition*. Analytical Chemistry, 1983. **55**(7): p. 712A-724A.
54. Gritti, F., et al., *Comparison between the efficiencies of columns packed with fully and partially porous C18-bonded silica materials*. Journal of Chromatography A, 2007. **1157**(1&2): p. 289-303.
55. Rostagno, M.A., M. Palma, and C.G. Barroso, *Pressurized liquid extraction of isoflavones from soybeans*. Analytica Chimica Acta, 2004. **522**(2): p. 169-177.
56. Zhang, Y.C. and S.J. Schwartz, *Analysis of Isoflavones in Soy Foods*, in *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, I. John Wiley & Sons, Editor. 2004. p. 11.6.1-11.6.17.
57. Griffith, A.P. and M.W. Collison, *Improved methods for the extraction and analysis of isoflavones from soy-containing foods and nutritional supplements by reversed-phase high-performance liquid chromatography and liquid chromatography-mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 2001. **913**(1&2): p. 397-413.
58. Kromidas, S., et al., *Fundamentals of Optimization: Sections 1.1 and 1.2, in HPLC Made to Measure*. 2008, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. p. 1-70.
59. Murphy, P.A., K. Barua, and C.C. Hauck, *Solvent extraction selection in the determination of isoflavones in soy foods*. Journal of Chromatography B, 2002. **777**(1&2): p. 129-138.
60. Greibrokk, T. and T. Andersen, *High-temperature liquid chromatography*. Journal of Chromatography A, 2003. **1000**(1-2): p. 743-755.
61. Wang, H. and P.A. Murphy, *Isoflavone Composition of American and Japanese Soybeans in Iowa: Effects of Variety, Crop Year, and Location*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1994. **42**(8): p. 1674-1677.
62. Berk, Z., *Technology of production of edible flours and protein products from soybeans*. FAO AGRICULTURAL SERVICES BULLETIN No. 97, ed. F.a.A.O.o.t.U. Nations. 1992, Roma.
63. Villares, A., et al., *Content and Profile of Isoflavones in Soy-Based Foods as a Function of the Production Process*. Food and Bioprocess Technology, 2011. **4**(1): p. 27-38.
64. Sultana, T., et al., *Quality Assessment and Quantitative Analysis of Flavonoids from Tea Samples of Different Origins by HPLC-DAD-ESI-MS*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008. **56**(10): p. 3444-3453.
65. Cabrera, C., R. Giménez, and M.C. López, *Determination of Tea Components with Antioxidant Activity*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003. **51**(15): p. 4427-4435.

66. Yang, X.R., et al., *Simultaneous analysis of purine alkaloids and catechins in Camellia sinensis, Camellia ptilophylla and Camellia assamica var. kucha by HPLC*. Food Chemistry, 2007. **100**(3): p. 1132-1136.
67. He, Q., et al., *SIMULTANEOUS DETERMINATION OF CAFFEINE AND CATECHINS IN TEA EXTRACTS BY HPLC*. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 2010. **33**(4): p. 491-498.
68. Hu, B., et al., *Efficient procedure for isolating methylated catechins from green tea and effective simultaneous analysis of ten catechins, three purine alkaloids, and gallic acid in tea by high-performance liquid chromatography with diode array detection*. Journal of Chromatography A, 2009. **1216**(15): p. 3223-3231.
69. Nováková, L., et al., *Rapid qualitative and quantitative ultra high performance liquid chromatography method for simultaneous analysis of twenty nine common phenolic compounds of various structures*. Talanta, 2010. **80**(5): p. 1970-1979.
70. Dalluge, J.J. and B.C. Nelson, *Determination of tea catechins*. Journal of Chromatography A, 2000. **881**(1-2): p. 411-424.
71. Muthumani, T. and R.S.S. Kumar, *Influence of fermentation time on the development of compounds responsible for quality in black tea*. Food Chemistry, 2007. **101**(1): p. 98-102.
72. Cabrera, C., R. Artacho, and R. Gimenez, *Beneficial effects of green tea--a review*. J Am Coll Nutr, 2006. **25**(2): p. 79-99.
73. Mattila, P. and J. Kumpulainen, *Determination of Free and Total Phenolic Acids in Plant-Derived Foods by HPLC with Diode-Array Detection*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002. **50**(13): p. 3660-3667.
74. Perrone, D., C.M. Donangelo, and A. Farah, *Fast simultaneous analysis of caffeine, trigonelline, nicotinic acid and sucrose in coffee by liquid chromatography-mass spectrometry*. Food Chem, 2008. **110**(4): p. 1030-5.
75. Svorc, L., et al., *Voltammetric determination of caffeine in beverage samples on bare boron-doped diamond electrode*. Food Chem, 2012. **135**(3): p. 1198-204.
76. Khokhar, S. and S.G.M. Magnusdottir, *Total Phenol, Catechin, and Caffeine Contents of Teas Commonly Consumed in the United Kingdom*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002. **50**(3): p. 565-570.
77. Fernández, P.L., et al., *Study of Catechin and Xanthine Tea Profiles as Geographical Tracers*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002. **50**(7): p. 1833-1839.
78. Lin, Y.-S., et al., *Factors Affecting the Levels of Tea Polyphenols and Caffeine in Tea Leaves*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003. **51**(7): p. 1864-1873.
79. Mizukami, Y., Y. Sawai, and Y. Yamaguchi, *Simultaneous Analysis of Catechins, Gallic Acid, Strictinin, and Purine Alkaloids in Green Tea by Using Catechol as an Internal Standard*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007. **55**(13): p. 4957-4964.
80. Rostagno, M.A., et al., *Sample preparation for the analysis of isoflavones from soybeans and soy foods*. Journal of Chromatography A, 2009. **1216**(1): p. 2-29.
81. Hertog, M.G.L., P.C.H. Hollman, and B. van de Putte, *Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of tea infusions, wines, and fruit juices*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1993. **41**(8): p. 1242-1246.

82. Perva-UzunaliÄ±, A., et al., *Extraction of active ingredients from green tea (Camellia sinensis): Extraction efficiency of major catechins and caffeine*. Food Chemistry, 2006. **96**(4): p. 597-605.
83. Nishitani, E. and Y.M. Sagesaka, *Simultaneous determination of catechins, caffeine and other phenolic compounds in tea using new HPLC method*. Journal of Food Composition and Analysis, 2004. **17**(5): p. 675-685.
84. Astill, C., et al., *Factors affecting the caffeine and polyphenol contents of black and green tea infusions*. J Agric Food Chem, 2001. **49**(11): p. 5340-7.
85. Wang, Y., et al., *Simultaneous determination of theanine, gallic acid, purine alkaloids, catechins, and theaflavins in black tea using HPLC*. International Journal of Food Science & Technology, 2010. **45**(6): p. 1263-1269.
86. Cabrera, C., R. Giménez, and M.C. López, *Determination of Tea Components with Antioxidant Activity*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003. **51**(15): p. 4427-4435.
87. Gardner, E.J., C.H. Ruxton, and A.R. Leeds, *Black tea--helpful or harmful? A review of the evidence*. Eur J Clin Nutr, 2007. **61**(1): p. 3-18.

Capítulo 3: Extracción de isoflavonas por dispersión de matriz en fase sólida (MSPD)

1 INTRODUCCIÓN

1.1 FUNDAMENTOS DE LA TÉCNICA DE EXTRACCIÓN

La extracción por dispersión de matriz en fase sólida (*Matrix Solid Phase Dispersion*, MSPD) es una técnica comúnmente utilizada en la extracción de contaminantes orgánicos y de medicamentos en una gran variedad de matrices medioambientales y biológicas sólidas, semisólidas y viscosas. [1-6]

La MSPD es un proceso patentado para la ruptura y extracción de compuestos en muestras sólidas, presentado por primera vez en 1989 por Baker y col. [7] en la determinación de residuos de medicamentos en tejidos. Esta técnica combina varios aspectos de distintas técnicas con el fin de generar un material que posee un carácter cromatográfico particular para la extracción de los compuestos de interés de la muestra.

En la técnica de MSPD se mezcla la muestra (viscosa, sólida o semisólida) con un soporte sólido (agente/sólido dispersante) como puede ser la sílica (SiO_3), que previamente se ha derivatizado para producir en su superficie una fase orgánica enlazada, como la octadecilsililo (C_{18}) [1, 3, 6]. El sorbente utilizado es el mismo que el utilizado en la extracción en fase sólida (SPE) que ha sido comentado como método de limpieza de los extractos en la introducción de esta tesis. La principal diferencia entre ambos métodos, SPE y MSPD, es que la muestra en la extracción mediante MSPD está dispersa en todo el sorbente, mientras que en SPE se encuentra retenida en los primeros milímetros del mismo.

Al mezclar la muestra con el soporte sólido por medio de un mortero y la mano del mismo (majadero) se produce la ruptura de las células de la matriz de la muestra por fricción con el sólido, moliendo la muestra en pequeñas porciones y aumentando la superficie de contacto en la que se produce la extracción. Además al poseer el soporte la fase orgánica enlazada C_{18} tiene lugar al mismo tiempo tanto la disolución como la dispersión de los compuestos presentes en la muestra en el soporte. Por lo tanto, por medio del proceso de MSPD se consigue la ruptura de la muestra y la dispersión de los compuestos de interés [1, 3, 6].

La distribución de los analitos en la superficie del soporte es en función de su relativa polaridad [1]. Por medio de las interacciones hidrófobas e hidrófilas de los diferentes compuestos de la muestra sobre la superficie de la fase enlazada se produce una fase con características excepcionales para llevar a cabo el aislamiento del analito de interés.

En el caso de tener como soporte sólido sílica con una fase orgánica enlazada de C_{18} la distribución de los componentes de la muestra puede darse por varios mecanismos según su polaridad. Los compuestos no polares se dispersan en la fase orgánica no polar en base a sus coeficientes de distribución con la fase y los cambios dinámicos que ocurren durante el proceso. Los compuestos pequeños y con

alta polaridad, como es el caso de la molécula de agua, se prevé que se asocien a los silanoles de la superficie de la partícula de sílica, así como las moléculas de la matriz que puedan formar enlaces de hidrógeno con las mismas. En cambio los compuestos grandes y/o con menor polaridad se distribuyen a través de la superficie de la bifase no polar, fase enlazada/muestra dispersada con estructura lipofílica [1].

Una vez mezclado sólido y muestra se introducen en una jeringa vacía donde se coloca una frita de polipropileno en la base y otra en la parte superior, se compacta y se procede a la elución de los analitos de interés con el disolvente adecuado.

Por lo tanto la extracción por medio de MSPD es un proceso analítico inequívoco de ruptura y dispersión, el cual posee características cromatográficas que permiten la elución selectiva de un único compuesto o familias de compuestos o también el fraccionamiento de la matriz de la muestra [8].

Las principales ventajas que presenta la extracción con MSPD con respecto a las técnicas convencionales de extracción son:

- Procedimiento simple y rápido.
- Bajo consumo de muestra y disolvente.
- Coste reducido por extracción.
- No es necesaria una instrumentación cara.
- Su aplicación es sencilla.
- Posibilidad de realizar la extracción y la limpieza en un único paso.

El uso de condiciones suaves de extracción, temperatura ambiente y presión atmosférica, junto con la combinación de un sorbente dispersante en contacto con toda la muestra y el disolvente de elución apropiado permite a esta técnica proporcionar recuperaciones aceptables y selectividades medias [5].

1.2 ETAPAS DE LA EXTRACCIÓN POR DISPERSIÓN DE MATRIZ EN FASE SÓLIDA

En la *figura 132* se muestra el esquema del proceso de extracción por MSPD [1-4, 6, 8].

1.2.1 Paso 1: etapa de disrupción y dispersión.

La muestra sólida o semisólida se mezcla con el agente dispersante (sorbente) en un mortero de vidrio. Se mezclan con la ayuda de una mano de mortero de vidrio, con el que se rompe la estructura original de la muestra y se consigue una distribución homogénea de todas las partículas del sorbente. Se suele trabajar con

pequeñas cantidades de muestra, en torno a 0,5 g. La relación entre sorbente y muestra que se utiliza normalmente es entre 1:1 y 1:4.

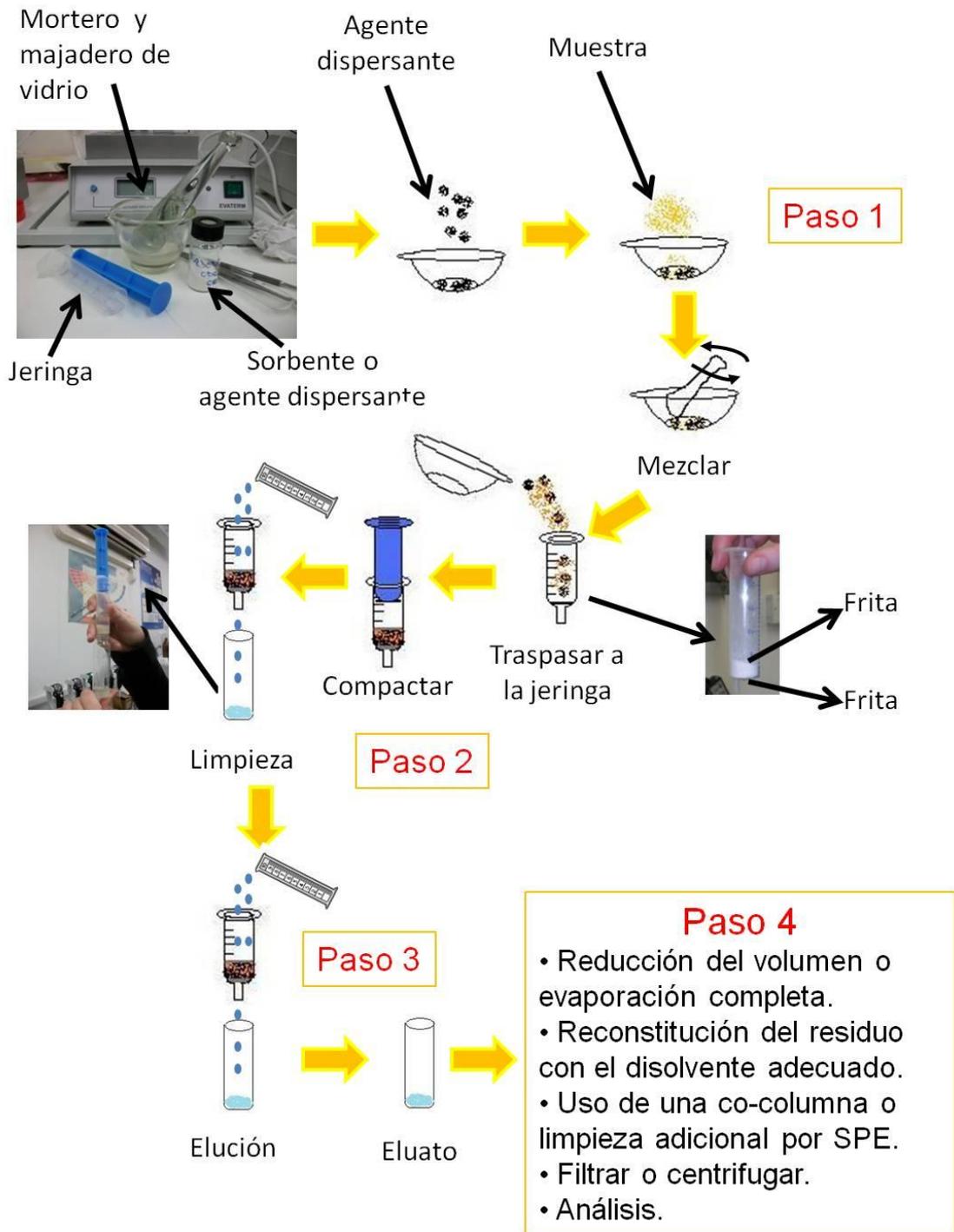


Figura 132 Representación esquemática del proceso de MSPD.

El conseguir una mezcla homogénea entre muestra y sorbente depende del estado físico de la muestra. Si la muestra es líquida sólo con agitar se puede conseguir la mezcla aunque el proceso es más similar a la extracción en fase sólida (SPE) que a la extracción por MSPD [5]. En el caso de las muestras sólidas se deben

tener en cuenta dos aspectos diferentes a las líquidas, el mayor número de interferentes y la gran interacción que se presenta entre el analito y la matriz; por ello el proceso de mezcla es un punto clave y es recomendable el uso de la fricción generada por el mortero [3-6].

En algunos procedimientos se añade agua a la muestra y luego se procede a la mezcla con el sólido dispersante [9], en estos casos se ha comprobado que mejora la reproducibilidad. En cambio, en otros se añade un sólido dispersante con propiedades de agente de secado como la sílica o el sulfato de sodio anhidro, proporcionando la formación de un material finamente dividido y a la vez suficientemente seco para la posterior extracción [4].

1.2.2 Paso 2: etapa de empaquetado.

Una vez completada la etapa de disrupción y dispersión de la muestra en el material dispersante se procede a empaquetar la mezcla en una columna que puede ser una jeringa vacía o un reservorio de los utilizados en SPE con una frita de polipropileno o acero inoxidable, papel de filtro de celulosa o lana de vidrio al fondo para evitar la pérdida de sólido. En ciertas ocasiones se coloca otra frita encima de la mezcla para facilitar la comprensión de la mezcla con el émbolo de la jeringa. [1, 4, 6]

Lo importante en este paso es tener en cuenta los principios de una buena cromatografía: evitar la formación de canales en la columna y no compactar demasiado el material [1].

En ciertas ocasiones también se puede empaquetar la mezcla en un cartucho de SPE con relleno de SPE sin tratar, de modo que se realiza la extracción por medio de MSPD seguida de una etapa de limpieza por SPE.

1.2.3 Paso 3: etapa de elución.

En este paso de elución existen dos posibilidades a la hora de elegir el disolvente adecuado [1, 2, 5].

- Los compuestos de interés se quedan retenidos en la columna y los interferentes se eluyen con un disolvente adecuado en una etapa de lavado. Seguidamente los analitos son eluidos con un disolvente diferente al utilizado en la etapa anterior.
- Los interferentes son retenidos en la columna y los compuestos de interés se eluyen con el disolvente adecuado.

Muchas aplicaciones utilizan volúmenes superiores a 8 mL para la elución, aunque en la mayoría de ellas se comprueba que la mayoría de los compuestos de interés se eluyen en los primeros 4 mL [1]; no obstante, todo depende de la cantidad de sorbente utilizado durante la preparación de la muestra.

Debido a que la muestra se eluye totalmente en la columna es posible realizar eluciones múltiples o secuenciales de la misma. Esto permite el aislamiento de un único compuesto o de una familia de compuestos o en ciertas ocasiones de varias familias de compuestos en un único proceso de MSPD. Por ejemplo en un proceso de MSPD utilizando como sólido dispersante C_{18} es muy frecuente eluir con una secuencia de disolventes comenzando con el menos polar (hexano, por ejemplo) e incrementando la polaridad gradualmente (acetato de etilo, acetonitrilo, metanol...) hasta llegar a la polaridad del agua [1, 3, 6]. Para el mismo fin también es posible el uso de ácido, base o una sal para alterar el estado iónico de los componentes retenidos en la columna.

La mayoría de las eluciones se producen por gravedad. En ciertos casos el flujo se inicia aplicando presión en la cabeza de columna o colocando la columna en un sistema de vacío y aplicando succión. Incluso en otros estudios se emplea el sistema de vacío para controlar el flujo de elución de varios disolventes [1].

1.2.4 Paso 4: etapa de tratamiento y análisis del eluato.

Una vez obtenido el eluato, donde se encuentran aislados los compuestos de interés, el último paso es el tratamiento del mismo para su posterior análisis.

En ciertos estudios se procede a una etapa de limpieza adicional tratando el extracto por medio de SPE. Esta etapa puede ser a continuación con una columna diferente o se puede incluir en la propia columna de MSPD incorporando una capa de otro material adsorbente distinto o igual al utilizado anteriormente y realizar la limpieza a la vez que la extracción [1, 5, 9].

En la mayoría de los casos el eluato se concentra por medio de sistemas al vacío o por corriente de nitrógeno y posteriormente se reconstituye el residuo seco con un disolvente adecuado para su posterior análisis, por ejemplo, por cromatografía. También se puede analizar directamente el eluato previamente filtrado o centrifugado [1].

1.3 FACTORES QUE AFECTAN A LA EXTRACCIÓN

La MSPD, al igual que la SPE, es una forma de cromatografía en la que se aplican los mismos principios que a la cromatografía convencional, aunque posee características que la hacen más compleja.

La extracción por MSPD se basa en la ruptura y dispersión de la muestra sólida en una fase orgánica unida a un soporte sólido, esta mezcla es empaquetada en una columna donde posteriormente se pueden eluir los compuestos de interés.

Las interacciones que se producen en la extracción por MSPD son las que se producen entre la fase estacionaria (el sólido dispersante), la fase móvil (el disolvente

de elución) y todos los componentes de la matriz de la muestra. Esta interacción también se observa en la SPE cuando se acumulan los compuestos de la muestra en la parte superior de la columna, o en la cromatografía líquida o gaseosa cuando se realizan repetidas inyecciones y se obtiene una acumulación de compuestos en la parte superior de la columna. Sin embargo en estas técnicas la acumulación de los compuestos en la cabeza de la columna afecta a la recuperación y los resultados ya que da lugar a lo que se conoce como cola (o pérdida de simetría por la derecha) de los picos cromatográficos, división de los mismos o aparición de hombros; incluso en algunos casos, se llega a producir la pérdida de los compuestos de interés. En cambio en la extracción mediante MSPD, el hecho de que la muestra se disperse por toda la columna no es un inconveniente, sino que es una ventaja que da lugar a una fase cromatográfica única [1].

Puesto que estas interacciones todavía no se encuentran del todo explicadas, los factores a tener en cuenta a la hora de optimizar la extracción mediante MSPD son los mismos que se tienen en cuenta en la SPE.

1.3.1 La naturaleza del agente dispersante (sólido+fase orgánica unida)

Este método de extracción tal y como lo definió Baker y col. en 1989 [7] utiliza como agente dispersante un sólido a base de **sílica**. Este material posee grupos silanoles (SiOH) en su superficie y en los poros del material (*figura 133*). Estos silanoles juegan un papel importante a la hora de obtener una muestra seca, algo que otros materiales sin grupos funcionales susceptibles de formar enlaces de hidrógeno no son capaces de proporcionar, lo que puede provocar problemas a la hora de empaquetar la mezcla [1].

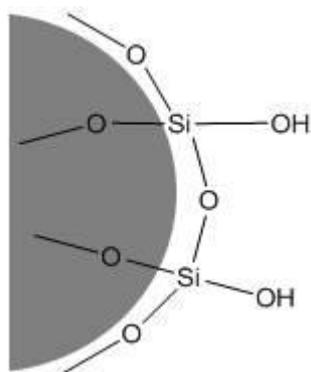


Figura 133. Estructura esquematizada de la superficie de un sólido a base de sílica donde se observan los grupos silanoles libres (SiOH).

En la mayoría de las aplicaciones de MSPD la fase orgánica más común utilizada es la **fase reversa**, en concreto C₁₈ [1-6, 8, 10]. En este material dispersante sólido formado a base de sílica, los silanoles se encuentran unidos a una cadena alquílica de 18 carbonos (*figura 134*). Esta fase reversa se utiliza para compuestos

poco polares que pueden ser retenidos por la fase orgánica enlazada por medio de las interacciones no polar-no polar o también llamadas de Van der Waals. En este caso las partículas de sílica teóricamente rompen la arquitectura biológica de las muestras debido a las cadenas alquílicas unidas a los silanoles que contribuyen a disolver los compuestos presentes en la matriz por medio de dichas interacciones. Un disolvente relativamente polar permite romper el enlace entre el material sorbente y el compuesto y eluir así los compuestos de interés [5, 11].

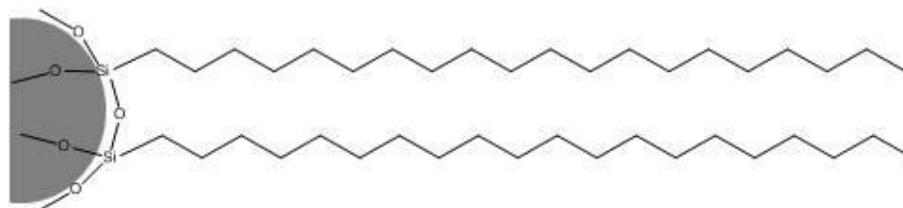


Figura 134. Estructura esquematizada de la superficie de un sólido a base de sílica C_{18} donde se observan los grupos silanoles unidos a las cadenas alquílicas de 18 carbonos.

Dentro de los materiales que trabajan en fase reversa se encuentran los materiales poliméricos como los derivados del polímero mixto de poliestireno-divinilbenceno (PS-DVB) [10]. Este tipo de material se compone de partículas de sílica unidas hidrofóbicamente, que se han recubierto con un polímero hidrofílico (figura 135). En este caso se dan las mismas interacciones características de la fase reversa (materiales conocidos como C_{18}) y además se dan interacciones entre los electrones de los sustituyentes hidrofílicos del sólido y de los compuestos de interés. Estos materiales poliméricos presentan mayor estabilidad a pHs ácidos y mayor capacidad para retener analitos más polares que los materiales convencionales elaborados a base de sílica [11].

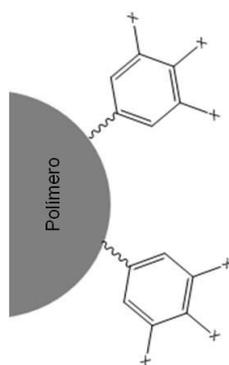


Figura 135. Estructura esquematizada de la superficie de un sólido polimérico.

Se ha documentado también el uso de la **fase normal** en el caso de la extracción de compuestos más polares, utilizando como sólido dispersante sílica gel, alúmina, florisil o sílice con una fase polar unida [10]. En este caso la interacción con los componentes de la muestra se basa en fenómenos de adsorción y no disuelven la muestra como los materiales dispersantes enlazados con fases orgánicas. Pero las

propiedades de adsorción se pueden modular por medio del contenido de agua o el pH [5]. Por ejemplo la superficie de la sílica es modificable añadiendo un ácido ya que se forman enlaces de hidrógeno entre los grupos silanoles y los compuestos básicos de la muestra a través del ácido añadido. De esta forma los compuestos ácidos o neutros de la muestra se pueden eluir antes que los básicos utilizando un disolvente de elución apolar, y posteriormente eluir los ácidos con un disolvente relativamente polar que rompa los enlaces de hidrógeno previamente formados [2].

También hay estudios donde se utilizan **sólidos inertes** como tierra de diatomeas o arena [2, 10]. En este caso el coste del análisis es menor pero a expensas de la selectividad, ya que ésta sólo se regula por la solubilidad del analito en el los posibles disolventes de elución. Aunque puede considerarse un procedimiento de trabajo cuya efectividad es bastante limitada, se han presentado trabajos donde los resultados obtenidos son comparables con los obtenidos utilizando un sólido dispersante C₁₈ [5].

La tendencia en la actualidad es el uso de nuevos materiales con alta selectividad o con alto poder de adsorción. Dentro de este nuevo grupo de materiales se encuentran los **polímeros de impresión molecular** (*molecular imprinted polymers*, MIPs), que son materiales que presentan una alta selectividad. Se trata de materiales poliméricos programados para reconocer ciertos compuestos o clases de compuestos con alta afinidad y selectividad; de hecho estos materiales sintéticos imitan la acción de anticuerpos y enzimas [6, 10].

Materiales como los **nanotubos de carbono multicapa** (*multiwalled carbon nanotubes*, MWCNTs) poseen una excelente habilidad adsorptiva debido a su gran área de superficie y su estructura única, lo cual proporciona una gran área hidrofóbica y una estructura de tubos con cavidades que aumentan su poder de adsorción [10].

En el caso de la extracción mediante MSPD el tamaño de poro no es un factor tan importante como puede serlo en el caso de la SPE. No obstante sí que hay que tener en cuenta el **tamaño de partícula**. Tamaños de partículas entre 3 y 20 µm dan lugar a flujos bajos o inexistentes, por lo que en la mayoría de las aplicaciones de MSPD se utilizan partículas de diámetro entre 40-100 µm [1].

Otro factor a tener en cuenta es la cantidad de sólido dispersante utilizado con respecto a la muestra, la llamada **relación muestra:sólido**. En la mayoría de las extracciones realizadas mediante MSPD se trabaja con relaciones entre muestra y material dispersante entre 1:1 y 1:4 [2]. Esta variable debe ser estudiada para cada caso en particular.

1.3.2 La naturaleza de la muestra

Debido a que en la MSPD la muestra forma parte de la fase cromatográfica, cabe esperar que las tanto las recuperaciones como los resultados obtenidos en la

extracción de un determinado compuesto, dependan del tipo de muestra en el que se encuentra dicho compuesto, ya que el analito en cuestión puede coeluir con ciertos componentes que serán diferentes en función de la matriz [1].

Un trabajo en el que queda de manifiesto que los componentes de la matriz ejercen una gran influencia en la optimización del método de MSPD es el de Kristenson y col. 2001 [12] en el que se optimizó un método de extracción mediante MSPD de ciertos pesticidas en naranjas. Este procedimiento se aplicó a otras muestras como fueron manzanas, peras y uvas; se observó que en el caso de la determinación de pesticidas en manzanas, fue necesario omitir la etapa de lavado para poder obtener resultados comparables a los obtenidos en las otras matrices.

En ciertas ocasiones es necesario alterar el estado de ionización de los componentes de la muestra para asegurar que tienen lugar ciertas interacciones con la fase enlazada del sólido dispersante y/o con el disolvente de elución. Por ello se pueden adicionar ácidos, bases, sales, agentes quelantes o desquelantes, antioxidantes, etc. a la mezcla entre sólido y muestra y/o como aditivo al disolvente de elución [1].

1.3.3 La naturaleza del disolvente de elución

La elección del disolvente de elución depende de la polaridad de los compuestos de interés, aunque al igual que en la SPE la polaridad relativa del disolvente de elución, así como la de la fase unida al sólido dispersante, juegan un papel significativo en los compuestos que se eluyen o los que se retienen en la columna.

Por ello para eluir sustancias no polares se utilizan disolventes apolares [13-15]. En el caso de sustancias con una polaridad media o alta se utilizan disolventes más polares [9, 11, 16-23]. También se ha estudiado el uso de agua caliente como disolvente de elución aportando otras ventajas al método como son el bajo coste y el tratarse de un disolvente respetuoso con el medio ambiente [5, 24].

Pero en el caso concreto de la MSPD, al contrario que ocurre en la SPE, también hay que considerar la retención y elución de los componentes de la matriz de la muestra que no son de nuestro interés y que pueden coeluir e incluso modificar la polaridad de los compuestos buscados, es decir, hay que tener muy en cuenta los posibles compuestos interferentes presentes en la matriz. Es necesario que durante el proceso de elución del compuesto de interés se queden retenidos en la columna la mayor cantidad posible de compuestos distintos del analito presentes en la muestra, es decir, hay que conseguir un alto grado de especificidad en la elución del compuesto o compuestos de interés [1]. Esto no siempre se puede llevar a cabo con la elección del disolvente de elución y se deben utilizar co-columnas, es decir, incluir otra fase empaquetada por debajo de la de la mezcla u otras técnicas de limpieza que eliminen

los compuestos interferentes, de modo que el análisis de los analitos de interés sea posible [2-6, 8-10].

1.4 APLICACIÓN DE LA MSPD A LA EXTRACCIÓN DE ISOFLAVONAS Y COMPUESTOS FENÓLICOS

La extracción mediante MSPD, desde que comenzó a utilizarse en 1989, ha despertado el interés en la comunidad científica, algo que se corrobora atendiendo a las revisiones que se han publicado en los últimos años [1-6, 8, 10].

Este tipo de tratamiento de muestra se ha aplicado a la extracción de una amplia variedad de compuestos tales como pesticidas, vitaminas, tranquilizantes, micotoxinas... y en un amplio número de muestras de distinta naturaleza, tales como frutas, tejidos animales, leche, huevos, suelos....

En la *tabla 95* se muestran algunos ejemplos de las aplicaciones de la MSPD en alimentos para la determinación de compuestos fenólicos y alcaloides.

Como se puede observar casi todos los métodos utilizan sólidos dispersantes de sílica con fase orgánica de C₁₈. Algunos utilizan sólidos inertes como la arena de mar o la sílica. El tiempo de mezclado en el mortero varía de 2 a 10 min, consiguiendo mejor mezcla cuanto mayor es el tiempo. En todas las aplicaciones encontradas se utiliza el mortero y la mano del mismo de vidrio como vía de mezclado.

En algunos trabajos se comparan los resultados de varias técnicas de extracción. En las extracciones realizadas utilizando MSPD la reducción del volumen de disolvente está en torno al 98 % comparando con los métodos convencionales de extracción. La reducción del tiempo de extracción se reduce también en un 90%. En cambio los valores de reproducibilidad varían en torno al 12 y el 78 % [2].

Al comparar la extracción de cafeína por diferentes métodos Dawidowicz y col. 2005 [25] obtienen las mayores recuperaciones con la extracción mediante MSPD, frente a las obtenidas con extracciones mediante ultrasonidos o líquidos presurizados...

La técnica de MSPD en el estudio realizado por Teixeira y col. 2006 [15], usando como sólido la arena de mar, proporciona mejores resultados que la extracción sólido-líquido convencional con metanol acuoso y durante 24 horas, y que la MSPD utilizando como sólido dispersante C₁₈.

En el caso de la extracción de derivados de ácido benzoico, Karasová y col. 2006 [16] obtienen los mejores resultados utilizando la extracción mediante MSPD y los menos satisfactorios cuando la extracción se realiza con fluidos supercríticos.

Tabla 95. Ejemplos de aplicaciones de la MSPD para la determinación de compuestos fenólicos y alcaloides.

Compuesto Fenólico	Muestra	En el mortero	Paso de elución	Ref.
Ácidos rosmarínico, cafeico y protocatéquico	<i>Melissa Officialis</i>	Se han estudiado 6 sólidos dispersantes diferentes, 5 tipo C ₁₈ y un florisil. Cada uno de ellos con diferentes tamaños de partícula. Las condiciones óptimas fueron: <ul style="list-style-type: none"> • 0,5 g de muestra. • 2 g de sólido Alltech C₁₈ 50 µm. • 1 mL de hexano. 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Lavado</i>: 10 mL de n-hexano y 10 mL de diclorometano. • <i>Secado</i> • <i>Elución</i>: 25 mL de una mezcla metanol:agua a pH 2,5 (80:20). 	[13]
Derivados del ácido benzoico	<i>Melissa Officialis</i>	<ul style="list-style-type: none"> • 0,5 g de muestra. • 2 g de sólido C₁₈. • 1 mL de n-hexano. 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Limpieza</i>: 10 mL de n-hexano y 10 mL de diclorometano. • <i>Elución</i>: 10 mL de una mezcla metanol:agua a pH 2,5 con ácido fórmico (80:20). 	[16]
Ácido clorogénico y rutina	Hojas de <i>Ficus Carica</i>	Se ha realizado la MSPD de dos agentes dispersantes diferentes: C18 y arena de mar. <ul style="list-style-type: none"> • El sólido C₁₈ se lava 3 veces con metanol y se seca con aire antes de mezclarlo con la muestra. • 0,5 g de muestra. • 2 g de sólido C₁₈. • 2 mL de n-hexano. • La arena de mar se lava 3 veces con agua y 3 veces con metanol y se seca con aire antes de mezclarlo con la muestra. • 0,5 g de muestra. • 2 g de arena de mar. • 2 mL de n-hexano. 	El procedimiento es igual para ambos sólidos utilizados. <ul style="list-style-type: none"> • <i>Secado</i> al vacío. • <i>Elución</i>: 10 mL de una mezcla metanol:agua (70:30). 	[15]
Ácidos fenólicos	Uvas blancas	<ul style="list-style-type: none"> • 1 g de muestra. • 2 g de sólido C₁₈. 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Limpieza</i>: mezcla de ácido clorhídrico acuoso (pH=2) y metanol (98:2). • <i>Elución</i>: etanol. 	[20]
Ácidos fenólicos	Vinos	<ul style="list-style-type: none"> • 1 mL de muestra. • 1,5 g de sólido sílica. 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Elución</i>: 5 mL de acetato de etilo a pH=1 y 20% de cloruro sódico. 	[21]
Ácidos fenólicos	Uvas blancas	<ul style="list-style-type: none"> • 1 g de muestra. • 2 g de sólido C₁₈. 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Limpieza</i>: mezcla de ácido clorhídrico acuoso (pH=2) y metanol (98:2). • <i>Elución</i>: etanol. 	[20]

Tabla 95 (cont.). Ejemplos de aplicaciones de la MSPD para la determinación de compuestos fenólicos y alcaloides.

Compuesto Fenólico	Muestra	En el mortero	Paso de elución	Ref.
Ácidos fenólicos	Vinos	<ul style="list-style-type: none"> • 1 mL de muestra. • 1,5 g de sólido sílica. 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Elución</i>: 5 mL de acetato de etilo a pH=1 y 20% de cloruro sódico. 	[21]
Cafeína	Hojas de té y granos de café	<ul style="list-style-type: none"> • 0,2 g de muestra. • 0,8 g de sólido C₁₈. • 1,5 mL de agua. 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Elución</i>: 10 mL de una mezcla metanol:agua (80:10). 	[25]
Flavanonas y xantonas	Corteza de la raíz de <i>Madura Pomifera</i>	<p>Se ha realizado la MSPD de dos agentes dispersantes diferentes: C₁₈ y arena de mar.</p> <ul style="list-style-type: none"> • El sólido C₁₈ se lava 3 veces con metanol y se seca con aire antes de mezclarlo con la muestra. • 0,05 g de muestra. • 0,6 g de sólido C₁₈. • 2 mL de n-hexano. <p>La arena de mar se lava 3 veces con agua y 3 veces con metanol y se seca con aire antes de mezclarlo con la muestra.</p> <ul style="list-style-type: none"> • 0,05 g de muestra. • 0,6 g de arena de mar. • 2 mL de n-hexano. 	<p>El procedimiento es igual para ambos sólidos utilizados.</p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Secado</i> al vacío. • <i>Elución</i>: 25 mL de una mezcla metanol:agua (90:10). 	[14]
Antocianinas	Zumo de grosella negra deshidratado, uvas y fresas	<p>Se ha realizado la MSPD de dos agentes dispersantes diferentes: C₁₈ y arena de mar en la muestra de zumo de grosella.</p> <ul style="list-style-type: none"> • El sólido C₁₈ se lava primero con n-hexano y luego con metanol y se seca con aire antes de mezclarlo con la muestra. • 0,1 g de muestra. • 0,4 g de sólido C₁₈. <p>La arena de mar se lava primero con agua y luego con metanol y se seca con aire antes de mezclarlo con la muestra.</p> <ul style="list-style-type: none"> • 0,1 g de muestra. • 0,4 g de arena de mar. <p>Para las muestras de uva y fresa el procedimiento es con arena de mar y son 4 y 16 g de arena respectivamente.</p>	<p>El procedimiento es igual para todos los sólidos y todas las muestras.</p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Elución</i>: 5 mL de una mezcla metanol:agua (50:50). 	[17]

Las aplicaciones encontradas en las que se utiliza la MSPD para la extracción de isoflavonas en alimentos se muestran en la *tabla 96*.

Tabla 96. Ejemplos de aplicaciones de la MSPD para la determinación de isoflavonas.

Compuesto Fenólico	Muestra	En el mortero	Paso de elución	Ref.
Isoflavonas	<i>Radix Astragali</i>	<ul style="list-style-type: none"> • 0,5 g de muestra. • 0,5 mL de agua. • 1 g de sólido C₁₈. <p>En la jeringa se introduce 1 g de sólido C₁₈ antes de introducir la mezcla. Es una capa de limpieza adicional.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Lavado</i>: 10 mL de agua. • <i>1ª Elución</i>: 10 mL de una mezcla metanol:agua (90:10). • <i>2ª Elución</i>: para asegurar que se extraen todos compuestos de interés: 10 mL de tetrahidrofurano. 	[9]
Isoflavonas	Harina de soja	<ul style="list-style-type: none"> • 0,25 g de muestra. • 0,5 g de sólido OASIS HLB. 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Limpieza</i>: 1 mL de una mezcla de 5% metanol acuoso acidificado (0,02 mL de ácido acético). • <i>1ª Elución</i>: 1 mL de una mezcla de 20% metanol acuoso acidificado (0,02 mL de amoníaco al 25%). • <i>2ª Elución</i>: 1 mL de una mezcla de 60% metanol acuoso acidificado (0,02 mL de amoníaco al 25%). • <i>3ª Elución</i>: 1 mL de una mezcla de 80% metanol acuoso acidificado (0,02 mL de amoníaco al 25%). • <i>4ª Elución</i>: 1 mL de metanol acidificado (0,02 mL de amoníaco al 25%). 	[18]
Isoflavonas	<i>Trifolium Pratense</i>	<ul style="list-style-type: none"> • 0,5 g de muestra. • 2 g de sólido C₁₈. 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>1ª Elución</i>: 5 mL de una mezcla diclorometano:metanol (25:75). • <i>2ª Elución</i>: 5 mL de una mezcla diclorometano:metanol (25:75). 	[23]
Isoflavonas	Soja	<ul style="list-style-type: none"> • 0,5 g de muestra. • 1 g de sólido sílica. 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Elución</i>: 12 mL metanol a pH=3 con ácido acético. 	[22]

La sílica con fase orgánica C₁₈ unida es el sólido de dispersión más utilizado en la extracción de isoflavonas mediante MSPD. Esto es esperable teniendo en cuenta los estudios de extracción en fase sólida (SPE) de isoflavonas realizados por Rostagno y col. 2005 [26] donde se comprobó que los mejores resultados para la extracción de isoflavonas mediante SPE se obtienen utilizando los sorbentes C₁₈ y en concreto, los sorbentes poliméricos OASIS HLB de la compañía Waters y Strata X de la compañía Phenomenex. También se comprobó que el aumento del pH en el disolvente de elución no afectaba, por lo que se utilizó metanol como eluyente, al igual que en la mayoría de los casos presentados en la *tabla 96*. La relación entre muestra y sólido dispersante varía entre 1:2 y 1:4. Los valores de variabilidad en porcentaje están en torno al 4% y el 25%.

En el trabajo realizado por Bajer y col. en 2007 [18] la extracción mediante MSPD es una de las técnicas estudiadas que mejores resultados aporta para determinar la concentración de daidzeína y genisteína en soja, ya que se obtiene una variabilidad menor del 7%, comparable a la obtenida al hacer la extracción asistida por ultrasonidos, que es la técnica que mejores resultados, tanto de recuperación como de reproducibilidad, muestra.

Con todo lo anterior podemos concluir que para la extracción mediante MSPD de las isoflavonas presentes en alimentos se utiliza un sólido dispersante tipo C₁₈ y como disolvente de elución metanol. A continuación, se va a describir el trabajo de extracción con esta técnica que se ha llevado a cabo.

2 OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo es desarrollar un método de extracción de las doce isoflavonas presentes en las muestras de soja mediante la extracción por dispersión de matriz en fase sólida (MSPD).

Para ello se utiliza como método inicial una modificación del presentado por Xiao y col. 2004 [9]; los parámetros a optimizar en este estudio son:

1) Tipo de sólido dispersante

Se estudian 3 tipos de sólidos dispersantes C₁₈, todos ellos procedentes de cartuchos de extracción en fase sólida:

- Sep-Pak® Vac C18 (Waters): sólido de sílica C₁₈.
- Oasis® HLB (Waters): sólido de polímero divinil-benceno-co-N-vinilpirrolidona.
- Stratra™ X (Phenomenex): sólido de polímero de divinilbenceno modificado.

2) Relación muestra:sólido dispersante

Una vez optimizado el tipo de sólido dispersante se estudia la cantidad utilizada con relación a la cantidad de muestra. Para ello se evalúan relaciones muestra:sólido de 1:4, 1:8 y 1:20.

Una vez optimizados estos dos parámetros se procede a estudiar la reproducibilidad realizando la extracción repetidamente con diferentes muestras de soja. Además se va a estudiar la repetibilidad intra- e inter-día.

3 EXPERIMENTAL

3.1 MATERIALES Y REACTIVOS

3.1.1 Reactivos y disolventes

Tanto el metanol como el acetonitrilo de grado HPLC se adquirieron en VWR (West Chester, PA, USA). El ácido acético del 96% utilizado fue de Merck (Darmstadt, Germany) y el agua ultrapura empleada durante las extracciones y el análisis ha sido obtenida por un sistema de purificación Mili-Q water Advantage A10 de Millipore (Bedford, MA, USA). En este sistema el agua se somete a una desionización en dos etapas a través de resinas de intercambio iónico. Todos los disolventes fueron sometidos a una desgasificación previa a su utilización en un baño de ultrasonidos.

Los sólidos dispersantes utilizados en la optimización son los presentados en la *tabla 97*. Su estructura química se muestra en la *figura 136*.

Tabla 97. Características de los sólidos dispersantes utilizados en la optimización de la extracción de isoflavonas por MSPD.

Nombre comercial	Nombre en el estudio	Fase sólida	Distribuidor
Sep-Pak® Vac	C18	Sílica octadecilo	Waters Corporation, Milford, MA, USA
Oasis® HLB	OASIS	Polímero de divinil-benceno-co-N-vinilpirrolidona	Waters Corporation, Milford, MA, USA
Strata™ X	StrataX	Polímero de divinilbenceno modificado	Phenomenex, Torrance, California, USA

3.1.2 Sustancias patrón

Los patrones de isoflavonas utilizados en la optimización del método de extracción se muestran en la *tabla 98* junto con su proveedor. Han sido almacenados antes de su uso a -20 °C. Sus estructuras químicas se muestran en la *figura 137*.

La pureza de los patrones de los derivados glucósidos y de las agluconas de las isoflavonas es superior al 99%, mientras que la pureza de los derivados acetiles y maloniles es mayor del 90%. Las disoluciones madre de cada una de las isoflavonas se prepararon en metanol y se almacenaron a -80 °C.

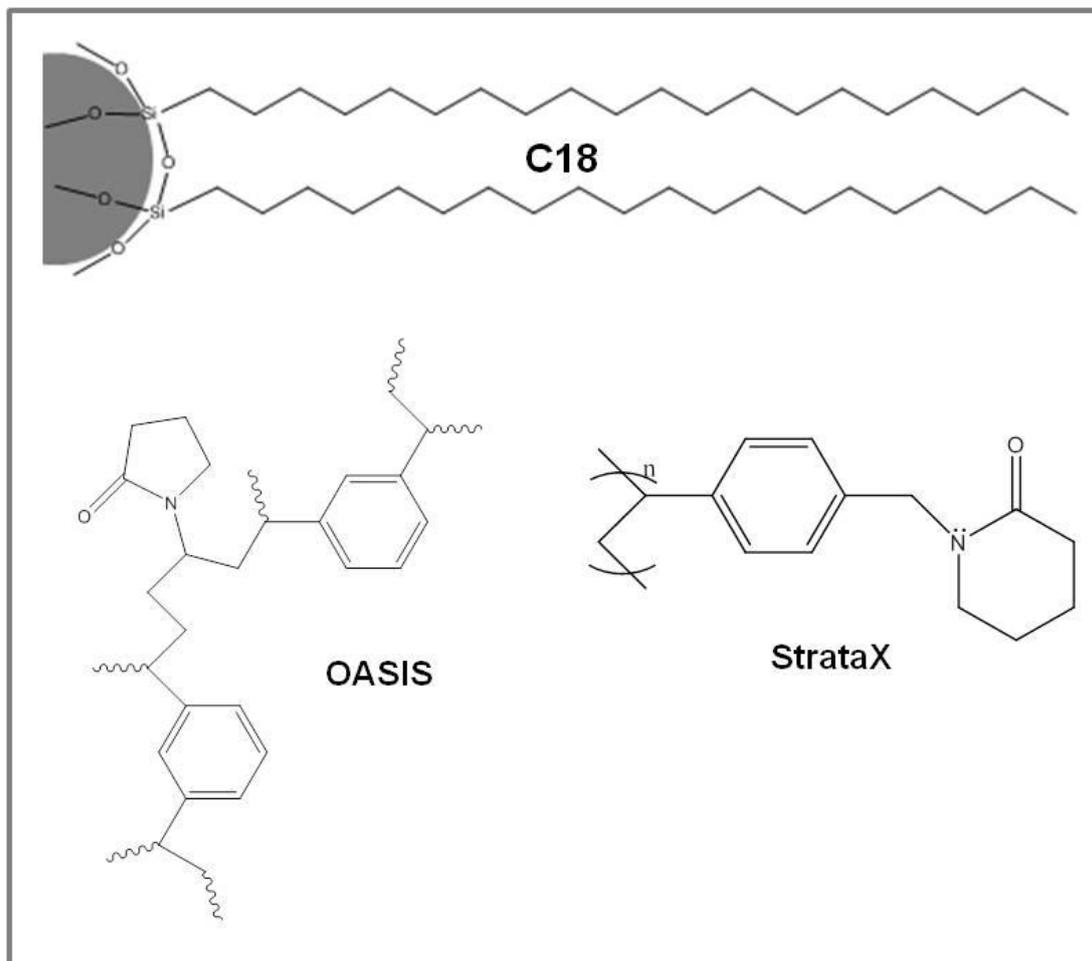


Figura 136. Estructuras químicas de los sólidos dispersantes a utilizar en la optimización del método de extracción de isoflavonas por MSPD.

Tabla 98. Patrones de las isoflavonas utilizadas en este estudio y su proveedor.

Compuesto	Proveedor
Daidzina	LC Labs (Woburn, MA, USA)
Glicitina	
Genistina	
Daidzeína	
Gliciteína	
Genisteína	Wako Chemicals (Neuss, Alemania)
Malonil daidzina	
Malonil glicitina	
Malonil genistina	
Acetil daidzina	
Acetil glicitina	
Acetil genistina	

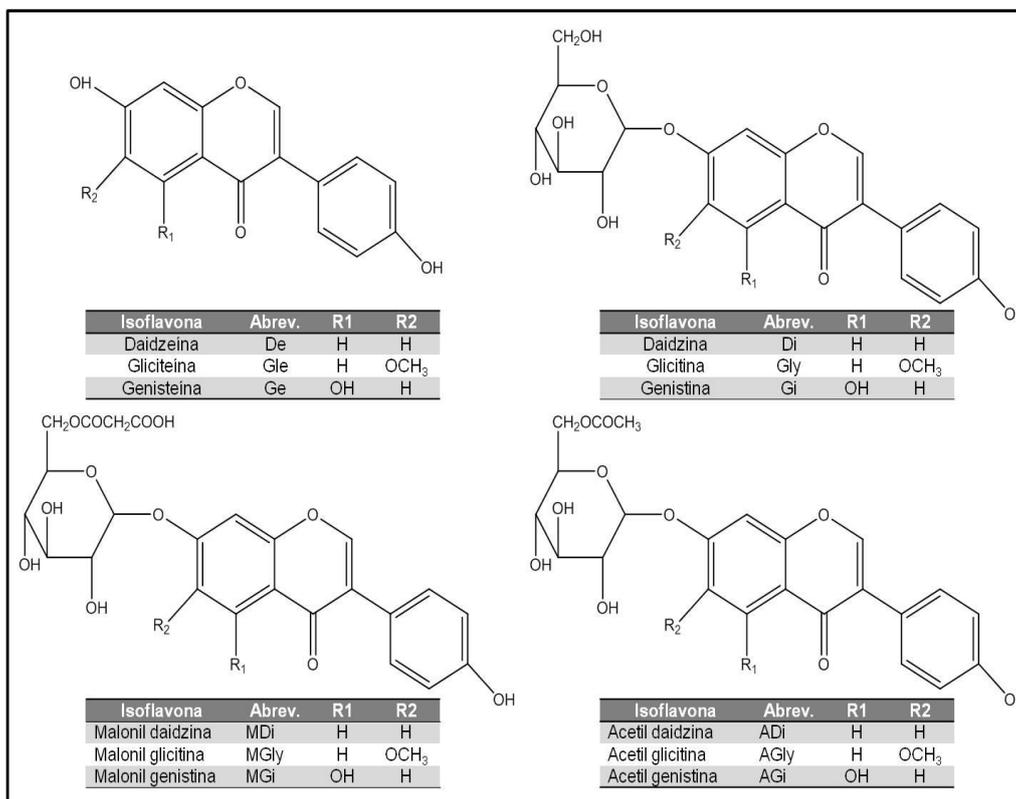


Figura 137. Estructura química y abreviaturas de las isoflavonas utilizadas en este estudio.

3.1.3 Muestras

Para la optimización del método de extracción de las isoflavonas mediante MSPD se han utilizado dos muestras de soja amarilla como materia prima (Soja1 y Soja2). Ambas muestras fueron adquiridas en un supermercado en la localidad de Soria y almacenadas antes de su uso a -20°C .

Antes de su utilización para la extracción fueron molidas en un molinillo de café de acero inoxidable hasta que se transforman en un polvo fino y homogéneo. Las muestras molidas son almacenadas a -20°C hasta su uso.

3.2 INSTRUMENTACIÓN

3.2.1 Sistema de mezclado

Para la mezcla de la muestra y el sólido dispersante se utiliza un mortero de vidrio con su correspondiente mano (figura 138) de 10 cm de diámetro. Entre muestras siempre es lavado y secado para su posterior utilización.



Figura 138. Mortero y mano del mismo de vidrio utilizado para la extracción de isoflavonas mediante MSPD. A su izquierda se muestra la jeringa de plástico y su émbolo utilizadas para la extracción.

3.2.2 Columnas de MSPD y fritas

Como columnas se utilizan jeringas desechables de plástico comunes de 25 mL (figura 138) y fritas de polipropileno de 2,5 cm de diámetro.

3.2.3 Sistema de evaporación de muestras por corriente de nitrógeno

Los eluatos, obtenidos al eluir con metanol, se evaporan a sequedad mediante un sistema de evaporación por corriente de nitrógeno. Está compuesto por un termobloque Evaterm (Labicom, República Checa) que permite calentar los extractos obtenidos a una temperatura constante y un sistema de corriente de nitrógeno por medio de tubos y puntas de jeringa (figura 139) que permiten la evaporación por desplazamiento de gas.



Figura 139. Sistema de evaporación de muestras.

3.2.4 Liofilizador

Durante la optimización del método de extracción de isoflavonas por MSPD se analiza el extracto acuoso obtenido en la etapa de lavado para comprobar si hay o no pérdidas; este extracto se liofiliza en un liofilizador Cryodos -80 (IMA-Telstar S.L., Terrassa, Barcelona, España). Ver *figura 23* del capítulo 1 de esta tesis.

3.2.5 Cromatógrafo líquido de alta resolución

El análisis mediante cromatografía líquida de alta resolución con detección ultravioleta (HPLC-UV) de las isoflavonas se realizó en un sistema Waters (Waters Corp., Milford, Massachusetts, USA) formado por un módulo de separación (2695), con un horno de columna integrado, un inyector de muestra automático y un detector de fila de fotodiodos (2998) conectado en línea a un detector de fluorescencia multifrecuencia (2475). Ver *figura 24* del capítulo 1 de esta tesis.

3.3 EXTRACCIÓN DE ISOFLAVONAS MEDIANTE MSPD

El método de extracción de isoflavonas mediante MSPD está basado en el método desarrollado por Xiao y col. 2004 [9] con ligeras modificaciones. El procedimiento inicial ha sido el que se describe a continuación.

Una muestra de soja molida de 0,125 g se introduce en el mortero al que se añaden 0,5 g de sorbente. Se mezclan con ayuda de la mano del mortero de vidrio durante 10 minutos hasta obtener una mezcla homogénea.

La mezcla se transfiere a la jeringa de 25 mL en la que se ha colocado una frita de polipropileno en su base para evitar que se pierda muestra. Una vez introducida la totalidad de la mezcla se coloca encima otra frita de polipropileno y se realiza una suave compresión con ayuda del émbolo de la jeringa utilizada para el compactamiento del material.

La mezcla se lava, para eliminar compuestos interferentes, con 10 mL de agua que se recogen y se liofilizan para su posterior redisolución en 1 mL de metanol que será analizado por HPLC-DAD, para comprobar si hay o no pérdidas de isoflavonas en el lavado. La muestra a inyectar se filtra a través de filtros de jeringa de nylon de 0,2 µm de tamaño de poro (VWR, West Chester, PA, USA).

Tras el lavado, la elución se realiza con 10 mL de metanol que se recogen y se evaporan a 50°C y bajo corriente de nitrógeno. En el momento del análisis lo obtenido del eluato se redissuelve en 1 mL de metanol que es analizado mediante HPLC-DAD.

Todas las extracciones se realizan por triplicado, menos las del método optimizado que se realizan 6 veces para calcular su reproducibilidad y repetibilidad intra- e inter-día.

3.4 ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO DE ISOFLAVONAS

El método utilizado para el análisis cromatográfico de las isoflavonas es una adaptación del método optimizado con una columna *fused-core* desarrollado en esta tesis (ver apartado 4.3 del capítulo 2).

Se trata de un método adaptado porque en esta ocasión en vez de utilizar una columna de partículas recubiertas, *fused-core*, de 100 mm de longitud, se trata de una columna con las mismas especificaciones pero con dimensiones de 150 mm - Kinetex™ C18, 2,6µm de tamaño de poro, 100 Å, dimensiones de 150x4,6 mm (Phenomenex, Torrance, California, USA).

El gradiente utilizado, incluido el tiempo de lavado y equilibrado, se muestra en la *tabla 99*.

Tabla 99. Método cromatográfico para el análisis de las isoflavonas obtenidas por extracción de las mismas mediante MSPD.

Flujo	1,6 mL/min	
Temperatura	50°C	
Fases móviles	Fase A	Agua 1% ácido acético
	Fase B	Acetonitrilo
Gradiente	Tiempo (min)	% B
	0,00	8
	2,63	15
	9,01	17
	11,54	19,2
	13,92	50
	16,45	100
	19,00	100
	25,00	8
	35,00	8

La absorbancia para la detección fue monitorizada entre 210 y 400 nm, cuantificando a 254 nm. El volumen de inyección se fijó en 10 µL. El software utilizado para el control del equipo y la recogida de datos fue Empower 2 versión 6.10.01.00.

La separación obtenida para las doce isoflavonas objeto de estudio se muestra en la *figura 140*, en la que se muestra el cromatograma obtenido a la longitud de onda de 254 nm.

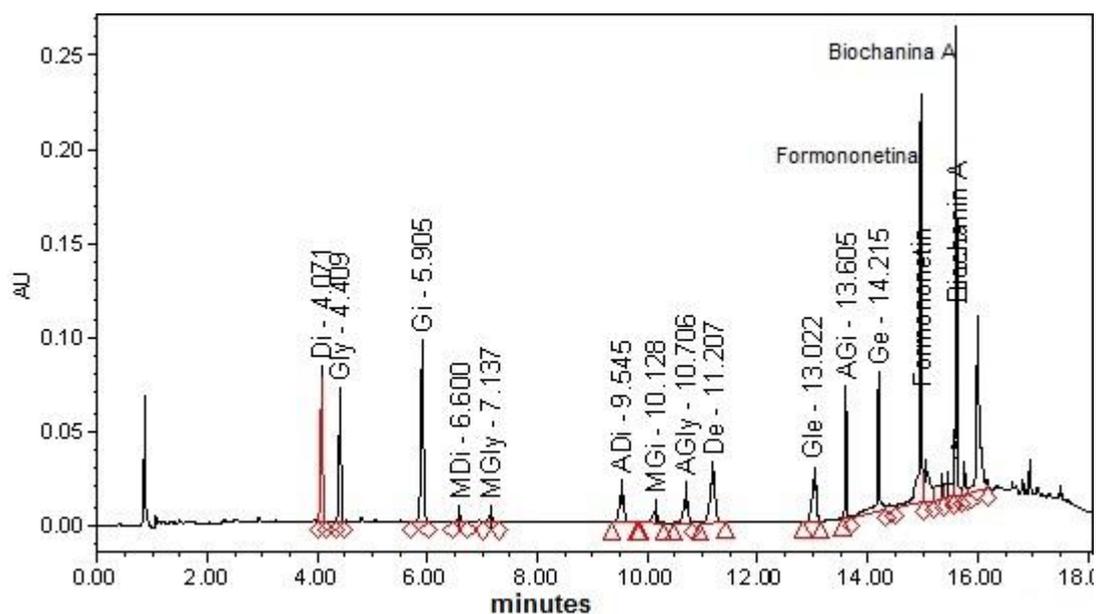


Figura 140. Cromatograma de los patrones de las doce isoflavonas utilizadas para el estudio de la extracción mediante MSPD. La concentración de las agluconas y los derivados glucósidos es de 10 ppm y para los derivados malonil y acetil es de 5 ppm.

En este cromatograma se muestran otras dos isoflavonas más al final, formononetina y biochanina A; esto es debido a que el método se desarrolló para la cuantificación de 14 isoflavonas sin embargo, en el estudio de optimización del método de extracción de isoflavonas en soja mediante MSPD ninguna de estas dos isoflavonas adicionales fueron detectadas, por lo que no se van a tener en cuenta.

La identificación de las isoflavonas fue llevada a cabo comparando los tiempos de retención y los espectros ultravioleta de cada uno de los compuestos con los correspondientes a los patrones individuales de cada una de las isoflavonas inyectadas con el mismo método y en las mismas condiciones.

La cuantificación se realizó por medio de la medida de las áreas obtenidas para cada pico cromatográfico a 254 nm, utilizando el método del patrón externo. La curva de calibrado para cada isoflavona se realizó con 7 puntos representando el área frente a la concentración. Las ecuaciones de regresión y coeficientes de correlación (R^2) se calcularon usando el software Microsoft Excel 2007, y se muestran en la *tabla 100*.

Tabla 100. Curvas de calibrado para cada isoflavona.

Isoflavona	Ordenada	Pendiente	R²
Di	-2354	25371	0,9999
Gly	-5141	26454	0,9938
Gi	-12453	38026	0,9998
MDi	-2842	30622	0,9999
MGly	-6133	31559	0,9938
ADi	-2592	27933	0,9999
MGi	-5624	28941	0,9938
AGly	-14931	45593	0,9998
De	-35579	33201	0,9848
Gle	7553	22670	0,9622
AGi	-13661	41715	0,9998
Ge	10211	46599	0,9994

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 EXPERIMENTOS INICIALES

Como se ha comentado anteriormente en este capítulo el método de extracción de isoflavonas por dispersión de matriz en fase sólida (MSPD) que se va a optimizar se basa en el desarrollado por Xiao y col. 2004 [9] para la extracción de isoflavonas en *Radix Astragali*. En nuestro caso queremos aplicar el método a muestras de soja, en las que las isoflavonas detectadas son diferentes y se encuentran en mayor concentración que las detectadas en la muestra de *Radix Astragali*.

En su método de extracción mediante MSPD utilizaban como sólido dispersante sílica C₁₈ en una relación muestra:sólido de 1:2. A la muestra pesada se le adicionan 0,5 mL de agua y se deja macerar antes de incorporar el sólido dispersante. Además se incorpora en la columna una primera capa de sólido dispersante sin mezclar para incluir una etapa adicional *on-line* de limpieza. Se realiza una etapa de lavado con 10 mL de agua seguida de una etapa de elución con 10 mL de metanol acuoso al 90% y para comprobar que la elución de las isoflavonas de interés se realizada al completo se realizó una segunda elución con 10 mL de un disolvente más polar como es el tetrahidrofurano.

En nuestro caso se realizaron varias pruebas con las condiciones descritas por Xiao y col. aplicándolas a nuestras muestras de soja. De los resultados obtenidos se decidió eliminar la adición de agua a la muestra ya que no aportaba mejora en los mismos. Además se aumentó la relación muestra:sólido a 1:4 ya que con mayor cantidad de muestra se daban elevadas pérdidas de las isoflavonas de interés en la etapa de lavado. La elución con tetrahidrofurano también se ha descartado ya que no mejoraba los resultados puesto que con los 10 mL de metanol utilizados en la elución se consigue una recuperación cuantitativa de las isoflavonas presentes en la soja.

Por lo tanto el método inicial aplicado a nuestras muestras (soja) y usando como sólido dispersante sílica C₁₈ es el que se muestra en la *tabla 101*.

Tabla 101. Condiciones iniciales de extracción de isoflavonas por MSPD.

Peso muestra	0,125 g
Peso sólido (C₁₈)	0,500 g
Tiempo mezcla	10 minutos
Lavado	10 mL de agua
	Recoger, congelar a -20°C y liofilizar
	Redisolver en 1 mL de metanol para análisis
Elución	10 mL de metanol acuoso al 90%
	Recoger y evaporar a 50°C bajo corriente de nitrógeno
	Redisolver en 1 mL de metanol para análisis

Los extractos redisueltos que proceden tanto de la etapa de lavado como de la elución se analizan por HPLC-DAD utilizando el método descrito en el apartado 3.4

de este capítulo. Los cromatogramas obtenidos al analizar estos extractos se muestran en las *figuras 141 y 142*, respectivamente.

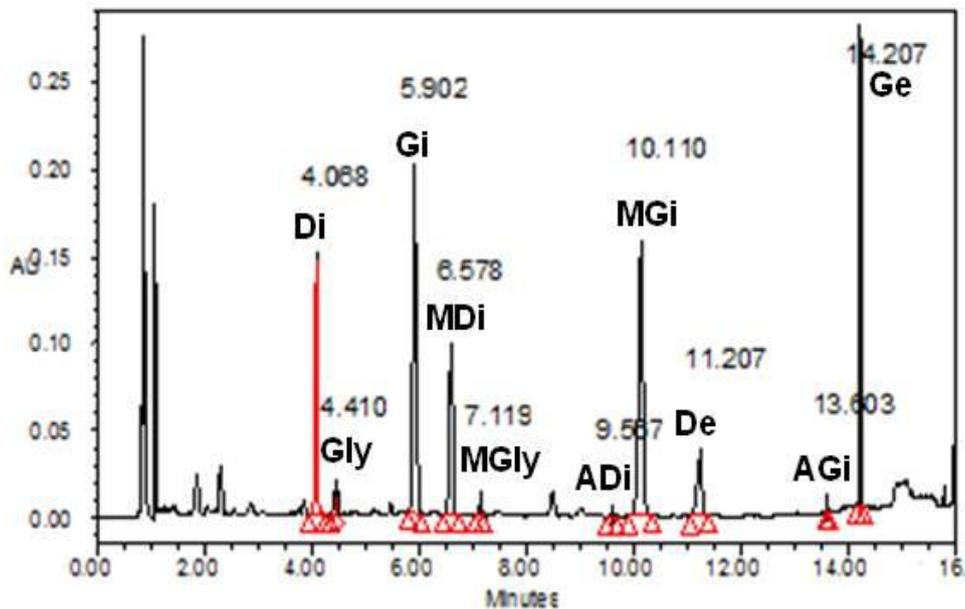


Figura 141. Cromatograma de las doce isoflavonas de soja presentes en el extracto obtenido al eluir con 90% de metanol. Condiciones: sorbente C_{18} en relación 1:4.

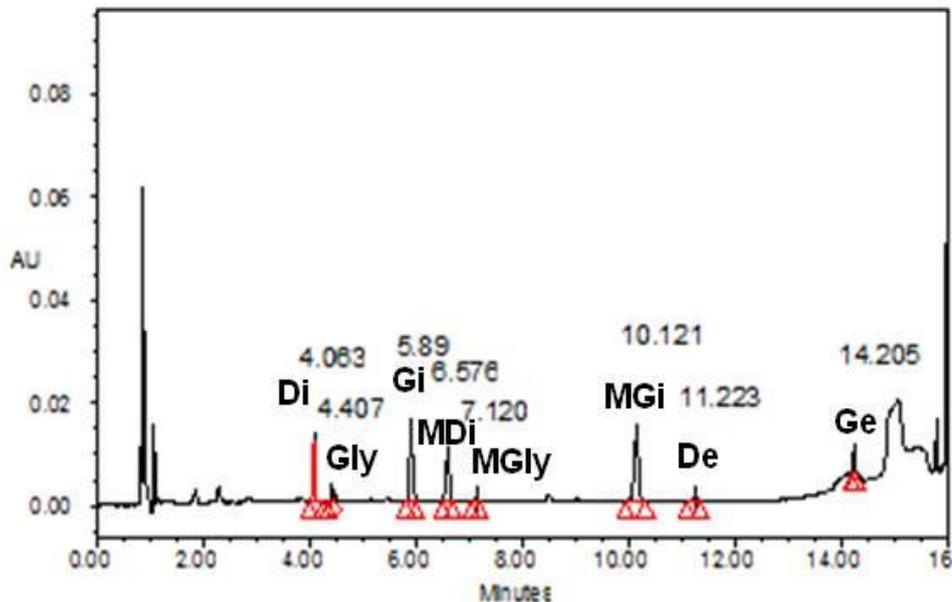


Figura 142. Cromatograma de las doce isoflavonas de soja presentes en el agua de lavado. Condiciones: sorbente C_{18} en relación 1:4.

Como se puede observar, al lavar con agua se producen pérdidas de isoflavonas al igual que ocurría con el método de Xiao y col. 2004 [9] sin embargo, en nuestro caso, son pérdidas considerables. Estas diferencias, al igual que las que se producen a la hora de aplicar el método rigurosamente, son debidas a que son

diferentes matrices, diferentes compuestos y diferentes concentraciones de los mismos.

La concentración de las isoflavonas detectadas en el extracto de elución se presentan en la *tabla 102*, valores realizados por triplicado (n=3). La variabilidad es menor del 37%.

Tabla 102. Concentración de las isoflavonas detectadas en el extracto obtenido tras la elución con 90% de metanol y C₁₈ como sólido en una relación 1:4 por MSPD. Concentración en µg/g y RSD en porcentaje n=3.

Isoflavona	Concentración	RSD
Di	125	15,1
Gly	16,1	16,2
Gi	158	14,6
MDi	61,6	32,4
MGly	13,8	37,5
ADi	1,99	27,3
MGi	120	13,3
AGly	0,00	
De	19,6	18,3
Gle	0,00	
AGi	4,08	27,1
Ge	10,7	27,8

Como se puede observar en la soja estudiada no se detectan las isoflavonas acetil glicitina y gliciteína. Esto se comprueba también en la segunda muestra de soja estudiada, por lo que estas dos isoflavonas no se incluyen en las tablas y valores que se presentan en este capítulo.

4.2 ELECCIÓN DEL SÓLIDO DISPERSANTE

Una vez fijadas las condiciones iniciales de extracción se procede a la elección del sólido dispersante estudiando tres tipos diferentes: uno convencional (C18) y dos poliméricos (OASIS y StrataX).

Los resultados de concentración obtenidos para los tres tipos de sólidos dispersantes estudiados se muestran en la *tabla 103*. Como se puede observar las mayores variabilidades se encuentran para las isoflavonas de menor concentración y las menos polares que eluyen al final del método cromatográfico, independientemente del sólido dispersante usado. Algo esperable ya que puede deberse a menor precisión en su detección por su baja concentración o por un aumento de la línea de base.

Los mayores valores de isoflavonas en el extracto de elución (90% metanol), es decir, la mejor recuperación, se obtienen cuando se utiliza como sólido dispersante el polímero StrataX. Las menores variabilidades se encuentran cuando se usan las resinas OASIS como sorbente, aunque éstas son comparables a las obtenidas con StrataX.

Con respecto a la pérdida de isoflavonas en el lavado se observan las mayores al usar C18 como sólido dispersante, siendo de media mayor al 50%. Esto se observaba en los cromatogramas anteriormente expuestos (*figuras 141 y 142*).

Tabla 103. Concentraciones ($\mu\text{g/g}$) y desviaciones estándar relativas en porcentaje (RSD) de las isoflavonas extraídas por MSPD con cada uno de los sólidos dispersantes estudiados. Cada experimento está realizado por triplicado ($n=3$).

90% Metanol						
C18			OASIS		StrataX	
Isoflavona	$\mu\text{g/g}$	RSD	$\mu\text{g/g}$	RSD	$\mu\text{g/g}$	RSD
Di	125	15,1	251	7,49	272	1,81
Gly	16,1	16,2	24,7	14,9	23,2	16,4
Gi	151	14,6	347	3,28	386	1,04
MDi	58,3	32,4	87,3	1,95	80,6	5,87
MGly	13,1	37,5	11,0	2,83	11,3	1,83
ADi	1,66	27,3	3,14	8,42	3,66	8,53
MGi	120	13,3	191	10,1	226	6,66
De	18,0	18,3	27,3	9,68	33,8	14,5
AGi	3,75	27,1	6,70	9,79	7,50	5,68
Ge	10,7	27,8	10,2	11,0	18,2	12,9
Agua						
C18			OASIS		StrataX	
Isoflavona	$\mu\text{g/g}$	RSD	$\mu\text{g/g}$	RSD	$\mu\text{g/g}$	RSD
Di	67,8	7,57	19,9	1,88	18,6	6,46
Gly	6,51	4,44	5,76	4,81	6,01	0,06
Gi	79,6	7,70	13,4	2,11	16,9	0,45
MDi	45,6	13,0	26,0	4,36	16,6	17,8
MGly	4,75	1,68	1,46	2,57	1,83	19,4
ADi	0,00		0,00		0,00	
MGi	75,4	13,6	37,7	3,19	11,7	17,1
De	25,4	27,0	9,27	1,16	8,03	8,03
AGi	2,41	31,7	0,00		0,00	
Ge	4,02	20,7	5,33	5,42	0,00	

Por lo tanto teniendo en cuenta estos resultados derivados de muestras triplicadas podemos concluir que los sólidos que mejor actúan como dispersantes en la extracción de isoflavonas en soja son los poliméricos, lo que concuerda con los estudios realizados con SPE [26]. Aunque los resultados obtenidos al utilizar resinas OASIS como sólido dispersante son los que presentan menor variabilidad, ésta es comparable a la obtenida usando StrataX, y en concreto en este último se obtienen mayores valores de recuperación para las isoflavonas estudiadas. Por lo que se concluye que el sólido dispersante idóneo para la extracción de isoflavonas de soja es el polimérico StrataX.

Los cromatogramas de los extractos, tanto el de elución como el de lavado, de las isoflavonas extraídas utilizando como sólido StrataX y una relación 1:4 entre muestra y sólido se muestran en las *figura 143 y 144*.

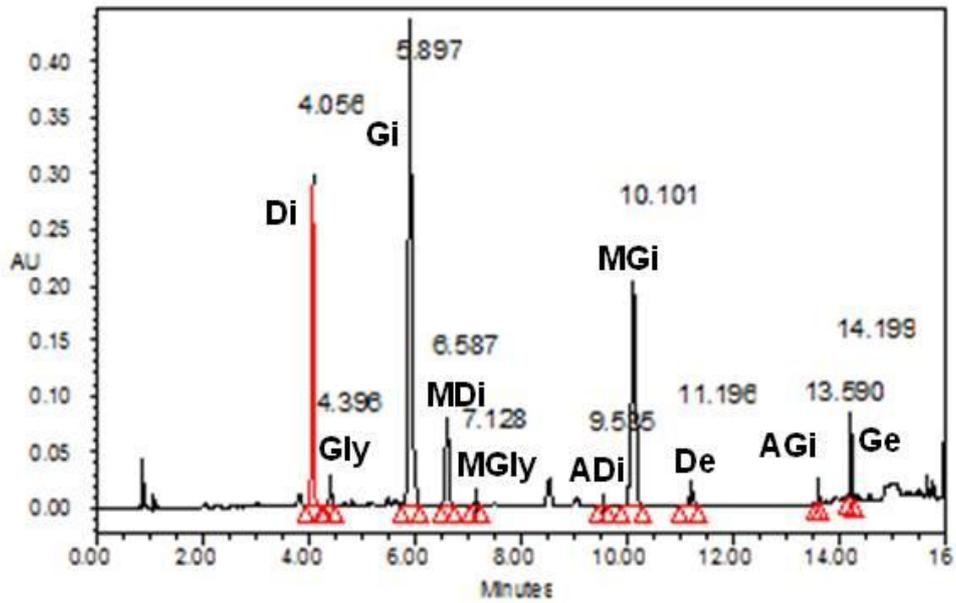


Figura 143. Cromatograma de las doce isoflavonas de soja del extracto de la elución con 90% de metanol y StrataX como sólido en una relación 1:4 por MSPD.

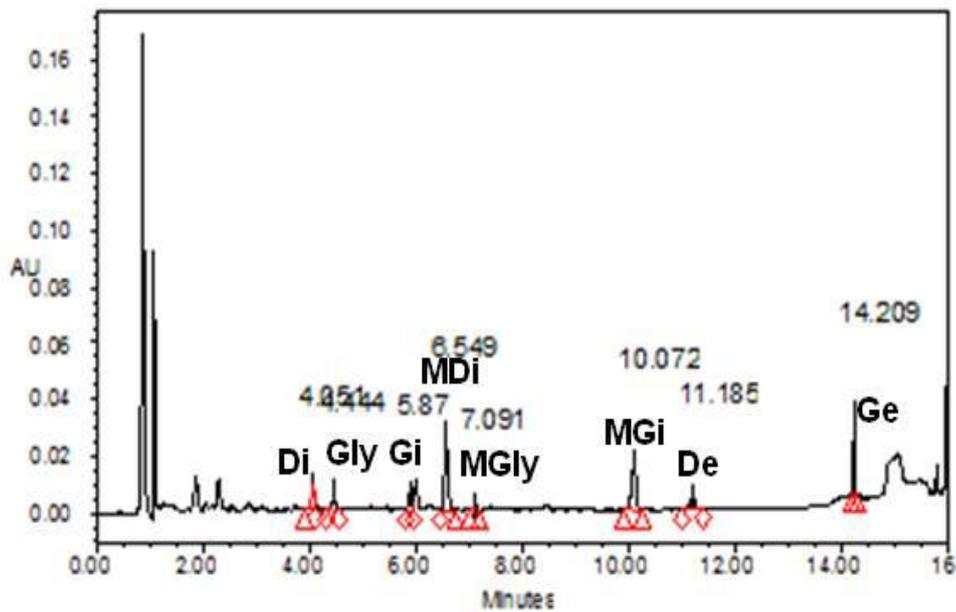


Figura 144. Cromatograma de las doce isoflavonas de soja del extracto del lavado con agua y StrataX como sólido en una relación 1:4 por MSPD.

4.3 ELECCIÓN DE LA RELACIÓN MUESTRA:SÓLIDO

Una vez elegido como mejor sólido dispersante el polimérico Strata X de la compañía Phenomenex se procede a optimizar la relación de cantidad de muestra y sólido para la extracción de las isoflavonas en las muestras de soja.

La optimización del sólido dispersante se ha realizado con una relación de muestra:sólido de 1:4. Tal y como se observó en los experimentos iniciales, mayores

cantidades de muestra (1:2) producían mayores pérdidas de isoflavonas por lo que se decide estudiar menores cantidades de muestra. Todas las extracciones se realizan por triplicado utilizando como sólido dispersante el polímero StrataX y con relaciones de 1:8 y 1:20.

Los datos obtenidos en los análisis realizados con las diferentes relaciones muestra:sólido dispersante se muestran en la *tabla 104*.

Tabla 104. Concentraciones ($\mu\text{g/g}$) y desviaciones estándar relativas en porcentaje (RSD) de las isoflavonas extraídas por MSPD con cada una de las relaciones muestra:sólido estudiadas. Cada experimento está realizado por triplicado ($n=3$).

90% Metanol						
Isoflavona	1:4		1:8		1:20	
	$\mu\text{g/g}$	RSD	$\mu\text{g/g}$	RSD	$\mu\text{g/g}$	RSD
Di	272	1,81	274	5,06	286	8,33
Gly	23,2	16,4	26,0	10,5	32,7	30,4
Gi	386	1,04	360	2,35	398	11,9
MDi	80,6	5,87	146	2,84	131	11,4
MGly	11,3	1,83	17,2	9,94	17,9	34,6
ADi	3,66	8,53	4,13	8,68	6,09	2,02
MGi	226	6,66	257	1,09	226	5,72
De	33,8	14,5	39,5	1,43	62,2	2,06
AGi	7,50	5,68	9,86	0,60	17,2	0,46
Ge	18,2	12,9	14,0	6,66	6,89	7,81
Agua						
Isoflavona	1:4		1:8		1:20	
	$\mu\text{g/g}$	RSD	$\mu\text{g/g}$	RSD	$\mu\text{g/g}$	RSD
Di	18,6	6,46	18,0	15,8	25,6	17,8
Gly	6,01	0,06	0,00		0,00	
Gi	16,9	0,45	18,9	16,3	26,4	12,3
MDi	16,6	17,8	12,5	14,2	26,7	12,0
MGly	1,83	19,4	5,38	18,1	9,34	9,87
ADi	0,00		0,00		0,00	
MGi	11,7	17,1	14,5	21,3	0,00	
De	8,03	8,03	8,01	3,53	78,4	12,2
AGi	0,00		0,00		0,00	
Ge	0,00		0,00		0,00	

De forma clara, lo que se observa al disminuir la cantidad de muestra, en concreto cuando la relación entre muestra y sólido es de 1:8, es que la variabilidad disminuye sin comprometer la cuantificación. Por lo tanto, y según los resultados obtenidos, se puede concluir que de las relaciones muestra:sólido estudiadas la que mejores resultados proporciona es 1:8.

El método optimizado final es el que se muestra en la *tabla 105* y el cromatograma del extracto de elución superpuesto al obtenido con el lavado, donde se observa que las pérdidas en el lavado pueden considerarse despreciables, se muestra en la *figura 145*.

Tabla 105. Condiciones optimizadas de extracción de isoflavonas por MSPD.

Peso muestra	62,5 mg
Sólido	Strata™ X (Phenomenex)
Peso sólido	0,500 g
Tiempo mezcla	10 minutos
Lavado	10 mL de agua
	Recoger, congelar a -20°C y liofilizar
	Redisolver en 1 mL de metanol para análisis
Elución	10 mL de metanol acuoso al 90%
	Recoger y evaporar a 50°C bajo corriente de nitrógeno
	Redisolver en 1 mL de metanol para análisis

4.4 REPRODUCIBILIDAD DEL MÉTODO OPTIMIZADO

Una vez obtenido el método de extracción por dispersión de matriz en fase sólida optimizado se aplica a dos muestras comerciales de soja (Soja1 y Soja2). Se realiza la extracción de las dos muestras con las condiciones óptimas por triplicado durante dos días (n=6). Los resultados obtenidos se muestran en la *tabla 106*.

Tabla 106. Resultados aplicando el método optimizado de extracción por MSPD. La concentración se expresa en µg/g, la reproducibilidad en desviación estándar relativa en porcentaje (n=6), la desviación estándar relativa intra- e inter-día también en porcentaje (n=3).

Isoflavona	Soja1				Soja2			
	µg/g	RSD	RSD intra	RSD inter	µg/g	RSD	RSD intra	RSD inter
Di	280	5,96	4,23	5,93	267	4,21	3,08	3,25
Gly	22,8	12,6	13,6	7,98	27,0	7,79	6,80	5,36
Gi	391	5,03	1,90	6,04	361	1,65	1,61	1,95
MDi	152	3,00	1,70	3,10	138	6,36	1,81	7,80
MGly	12,2	15,3	14,1	16,8	15,3	15,4	6,10	17,38
ADi	3,92	4,96	2,83	5,48	4,11	5,65	5,18	4,37
MGi	268	2,26	2,15	1,00	255	1,89	1,73	1,81
De	46,2	4,36	4,16	4,85	40,1	2,11	1,51	2,09
AGi	9,88	2,07	1,56	1,76	9,97	1,49	0,95	1,53
Ge	22,3	10,7	9,01	11,1	15,8	14,2	6,62	16,6

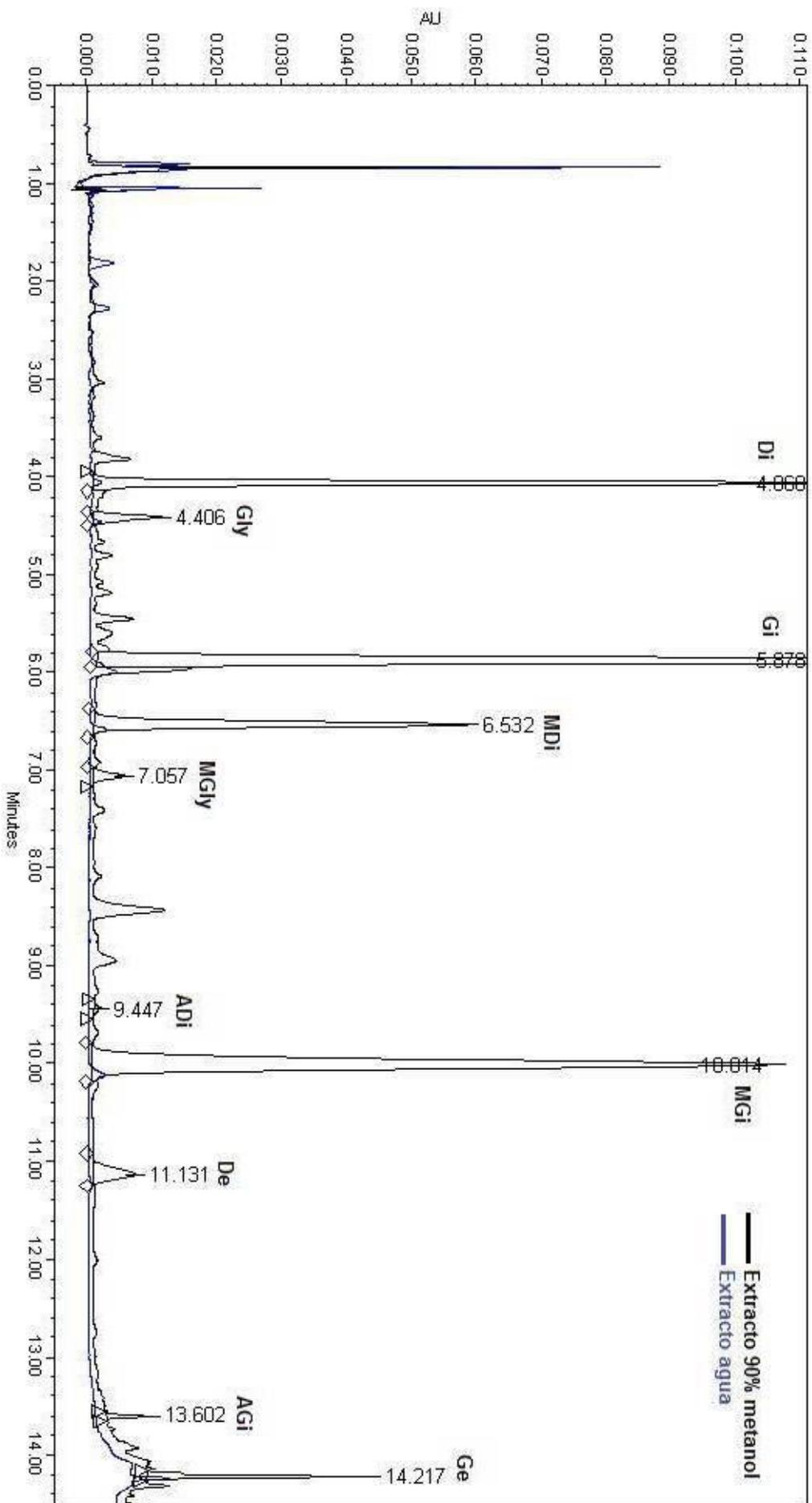


Figura 145. Cromatogramas superpuestos del extracto de isoflavonas de la muestra de soja en la fase de elución (90% metanol), en negro, y en la fase de lavado (agua), en azul, con el método optimizados de extracción por dispersión de matriz en fase sólida (MSPD).

La reproducibilidad del método, medida como desviación estándar relativa, es menor del 16% con variabilidades intra-día menores del 14% e inter-día menores del 18%.

Teniendo en cuenta el tiempo de extracción, que es menor de 30 minutos, el tiempo de evaporación de las muestras (unos 15 minutos) y su posterior análisis (35 minutos), además del bajo consumo de disolventes, podemos decir que se trata de un método de análisis barato y rápido para la extracción de isoflavonas en soja.

5 CONCLUSIONES

Se ha desarrollado un método de extracción por dispersión de matriz en fase sólida (MSPD) para isoflavonas en soja.

El método desarrollado utiliza como sólido dispersante uno de los sorbentes poliméricos más utilizados para la extracción en fase sólida de las isoflavonas, el llamado Strata™ X de la compañía Phenomenex. Se ha comprobado que el comportamiento de estos sorbentes poliméricos es superior al de los sorbentes convencionales de sílica con fase de C₁₈ unida.

Además del sólido dispersante se ha optimizado la cantidad de muestra y la cantidad de sólido utilizado para la extracción obteniendo los mejores resultados para una relación 1:8, respectivamente.

La aplicación del método optimizado da lugar a reproducibilidades menores del 16% y repetibilidades inter-día e intra-día aceptables.

La gran ventaja de este procedimiento de extracción es el bajo consumo de disolvente orgánico requerido; en cada repetición sólo se gastan 11 mL de metanol.

Además, es un método que no requiere de grandes montajes instrumentales; sólo se necesita un mortero de cristal y un evaporador de muestras si es preciso.

El tiempo total de extracción también se reduce considerablemente si se compara con otros métodos convencionales, que pueden llegar a durar horas, y a los que hay que añadir tratamientos posteriores a la extracción y previos al análisis. En el caso de la extracción mediante MSPD la duración total del proceso, es decir, desde que se comienza con la extracción hasta que la muestra se inyecta en el sistema, es de 45 minutos, siendo el tiempo de extracción unos 25 min.

Las condiciones suaves de este método, temperatura ambiente y presión atmosférica, suponen una gran ventaja frente a otros métodos que requieren condiciones más agresivas a la hora de detectar el perfil íntegro de las isoflavonas presentes en las muestras; con este método se pueden evitar posibles interconversiones y/o degradaciones como las que se han comentado en el capítulo 1 de esta tesis.

Aunque todo apunta a que la extracción mediante MSPD da lugar a un método de análisis adecuado, sería necesaria la aplicación del mismo a un número de muestras elevado y de distinta naturaleza para poder sacar conclusiones más robustas. Por lo que este trabajo es una iniciación a la aplicación de la técnica de extracción de isoflavonas en muestras de alimentos que serviría en un futuro a su aplicación y optimización en un amplio rango de alimentos.

6 BIBLIOGRAFÍA

1. Barker, S.A., *Matrix solid-phase dispersion*. Journal of Chromatography A, 2000. **885**(1-2): p. 115-127.
2. Kristenson, E.M., U.A.T. Brinkman, and L. Ramos, *Recent advances in matrix solid-phase dispersion*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2006. **25**(2): p. 96-111.
3. Barker, S.A., *Matrix solid phase dispersion (MSPD)*. Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 2007. **70**(2): p. 151-162.
4. Bogialli, S. and A. Di Corcia, *Matrix solid-phase dispersion as a valuable tool for extracting contaminants from foodstuffs*. Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 2007. **70**(2): p. 163-179.
5. García-López, M., P. Canosa, and I. Rodríguez, *Trends and recent applications of matrix solid-phase dispersion*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2008. **391**(3): p. 963-974.
6. Capriotti, A.L., et al., *Recent trends in matrix solid-phase dispersion*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2013. **43**(0): p. 53-66.
7. Barker, S.A., A.R. Long, and C.R. Short, *Isolation of drug residues from tissues by solid phase dispersion*. J Chromatogr, 1989. **475**: p. 353-61.
8. Barker, S.A., *Applications of matrix solid-phase dispersion in food analysis*. Journal of Chromatography A, 2000. **880**(1-2): p. 63-68.
9. Xiao, H.B., et al., *Determination and identification of isoflavonoids in Radix astragali by matrix solid-phase dispersion extraction and high-performance liquid chromatography with photodiode array and mass spectrometric detection*. Journal of Chromatography A, 2004. **1032**(1-2): p. 117-124.
10. Capriotti, A.L., et al., *Recent developments in matrix solid-phase dispersion extraction*. Journal of Chromatography A, 2010. **1217**(16): p. 2521-2532.
11. Rodríguez, I., M.P. Llompert, and R. Cela, *Solid-phase extraction of phenols*. Journal of Chromatography A, 2000. **885**(1-2): p. 291-304.
12. Kristenson, E.M., et al., *Miniaturized automated matrix solid-phase dispersion extraction of pesticides in fruit followed by gas chromatographic-mass spectrometric analysis*. Journal of Chromatography A, 2001. **917**(1-2): p. 277-286.
13. Žiaková, A., E. Brandšteterová, and E. Blahová, *Matrix solid-phase dispersion for the liquid chromatographic determination of phenolic acids in Melissa officinalis*. Journal of Chromatography A, 2003. **983**(1-2): p. 271-275.
14. Teixeira, D.M. and C.T.d. Costa, *Novel methods to extract flavanones and xanthenes from the root bark of Maclura pomifera*. Journal of Chromatography A, 2005. **1062**(2): p. 175-181.
15. Teixeira, D.M., et al., *Comparison between sample disruption methods and solid-liquid extraction (SLE) to extract phenolic compounds from Ficus carica leaves*. Journal of Chromatography A, 2006. **1103**(1): p. 22-28.
16. Karasová, G., et al., *Comparison of Several Extraction Methods for the Isolation of Benzoic Acid Derivatives from Melissa officinalis*. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 2006. **29**(11): p. 1633-1644.
17. Manhita, A.C., D.M. Teixeira, and C.T. da Costa, *Application of sample disruption methods in the extraction of anthocyanins from solid or semi-solid vegetable samples*. Journal of Chromatography A, 2006. **1129**(1): p. 14-20.

18. Bajer, T., et al., *Comparison of various extraction techniques for isolation and determination of isoflavonoids in plants*. Journal of Separation Science, 2007. **30**(1): p. 122-127.
19. Canosa, P., et al., *Determination of parabens and triclosan in indoor dust using matrix solid-phase dispersion and gas chromatography with tandem mass spectrometry*. Anal Chem, 2007. **79**(4): p. 1675-81.
20. Dopico-García, M.S., et al., *Solid-phase extraction versus matrix solid-phase dispersion: Application to white grapes*. Talanta, 2007. **74**(1): p. 20-31.
21. Minuti, L. and R. Pellegrino, *Determination of phenolic compounds in wines by novel matrix solid-phase dispersion extraction and gas chromatography/mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 2008. **1185**(1): p. 23-30.
22. Barfi, B., M. Hadjmohammadi, and M. Kasaai, *Determination of daidzein and genistein in soybean and its waste by matrix solid-phase dispersion extraction and HPLC*. Monatshefte für Chemie - Chemical Monthly, 2009. **140**(10): p. 1143-1148.
23. Visnevschi-Necrasov, T., et al., *Optimization of matrix solid-phase dispersion extraction method for the analysis of isoflavones in Trifolium pratense*. Journal of Chromatography A, 2009. **1216**(18): p. 3720-3724.
24. Bogialli, S., et al., *A Simple and Rapid Assay for Analyzing Residues of Carbamate Insecticides in Vegetables and Fruits: Hot Water Extraction Followed by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004. **52**(4): p. 665-671.
25. Dawidowicz, A.L. and D. Wianowska, *PLE in the analysis of plant compounds: Part I. The application of PLE for HPLC analysis of caffeine in green tea leaves*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2005. **37**(5): p. 1155-1159.
26. Rostagno, M.A., M. Palma, and C.G. Barroso, *Solid-phase extraction of soy isoflavones*. Journal of Chromatography A, 2005. **1076**(1-2): p. 110-117.

