

Ludueña, Beatriz;Mastandrea, Carlos;Chichizola, Carlos;Franconi, Ma. Cecilia
Isoflavonas en soja, contenido de daidzeína y genisteína y su importancia biológica
Bioquímica y Patología Clínica, Vol. 71, Núm. 1, -, 2007, pp. 54-66
Asociación Bioquímica Argentina
Argentina

Disponible en: <http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=65111118009>

**Bioquímica y
Patología Clínica**

Bioquímica y Patología Clínica
ISSN (Versión impresa): 1515-6761
info@aba-online.org.ar
Asociación Bioquímica Argentina
Argentina

Isoflavonas en soja, contenido de daidzeína y genisteína y su importancia biológica

Beatriz Ludueña¹

Carlos Mastandrea²

Carlos Chichizola³

Ma. Cecilia Franconi⁴

1- Bioquímica, Master en Ciencia y
Tecnología de Alimentos

2- Bioquímico, Especialista en Toxicología

3-Bioquímico, Especialista en
Endocrinología

4-Bioquímica.

Lugar de Trabajo:

Alkemy-Center Lab,
San Lorenzo 2780
(3000) Santa Fe, Argentina

Enviar Correspondencia a:

Beatriz Ludueña
San Lorenzo 2780
(3000) Santa Fe, Argentina
TE: 0342-4551615
e-mail: bluduena@alkemyweb.com
web: alkemyweb.com

RESUMEN

La soja, hoy en día, es muy conocida en todo el mundo, especialmente en países orientales, por sus efectos beneficiosos sobre la salud humana. Siendo Argentina uno de los países productores de soja más importante, es muy poco lo que su población conoce y consume de esta oleaginosa y los subproductos derivados de la misma.

Existe una amplia bibliografía que detalla los numerosos efectos saludables de la soja, entre ellos se destacan los efectos anticancerígenos, antioxidantes, cardiovasculares. Los componentes de la soja más activos biológicamente son conocidos como fitoestrógenos y dentro de este grupo se encuentran las isoflavonas. Debido a que estas últimas poseen una gran similitud estructural con los estrógenos humanos, la asociación de las mismas con la disminución de los síntomas peri y post menopáusicos está ampliamente estudiada.

Se elaboraron a escala de laboratorio imitando procesos industriales, bebida de soja y tofu a partir de diferentes variedades de semillas transgénicas y no transgénicas obtenidas de productores de la zona.

El método desarrollado y validado consistió en cromatografía líquida de alta performance (HPLC) con detección ultravioleta (UV), que identificó y cuantificó eficazmente las dos isoflavonas analizadas: Daidzeína y Genisteína.

Evaluamos el contenido de las mismas en las semillas y en cada subproducto de la elaboración.

Los resultados obtenidos mostraron una gran variabilidad en el contenido de ambas isoflavonas en los diferentes tipos de semillas analizadas. Por otro lado, se observó cómo los procesos de industrialización de los subproductos derivados inciden sobre el contenido de las isoflavonas, notándose pérdidas importantes de las mismas en todos los pasos de elaboración de la bebida y tofu estudiados.

Palabras claves | soja, isoflavonas, fitoestrógenos, cromatografía líquida de alta performance (HPLC).

SUMMARY

Soybean, nowadays, is very well-known anywhere in the world, specially in eastern countries, by its beneficial effects on the human health. Being Argentina one of the producing countries of more important soybean, it is very little what its population knows and consumes of this oily one and the by-products derived from the same one.

An ample bibliography exists that details the numerous healthful effects of the soybean, among them the anticancerigenic effects stand out, antirust, cardiovascular. The most active components of the soybean biologically are known as phytoestrogens and within this group they are isoflavones. Because these last ones have a great structural similarity with human estrogens, the association of same with the diminution of the menopausics symptoms peri and post widely is studied.

They were elaborated on laboratory scale and imitating industrial processes, drink of soybean and tofu from different varieties of obtained transgenics and nontransgenics seeds from producers of the zone.

The developed and validated method consisted of of high performance liquid chromatography (HPLC) with ultraviolet detection (UV), that it identified and it quantified the two effectively isoflavones analyzed: Daidzein and Genistein.

We evaluated the content of the daizein and genistein in the seeds and each by-product of the elaboration.

The obtained results showed to a great variability in the content of both isoflavones in the different types from analyzed seeds. On the other hand, it was observed how the processes of industrialization of derived by-products affect the content of isoflavones, noting important losses of same in all the steps of elaboration of the studied drink and tofu.

Keywords | soybean, isoflavones, phytoestrogens, liquid chromatography of high performance (HPLC).

1- INTRODUCCIÓN

Algunos vegetales contienen ciertos fitoquímicos no-nutricionales que ejercen acciones protectoras sobre la salud humana. Estos principios activos de origen vegetal, conocidos como fitoestrógenos, se clasificaron en dos grandes grupos: lignanos e isoflavonas, con peso molecular y estructuras parecidas al estradiol (la hormona femenina más importante) [1]. En las plantas, las isoflavonas específicas presentes varían ampliamente, y con regularidad se acumulan sólo bajo condiciones específicas de estrés. Una excepción a esto es el alto nivel constitutivo del fitoestrógeno isoflava-na, la genisteína, que se encuentra presente en la semilla de soja, como agluconas o como conjugados glucosídicos [2]. Los mecanismos por los cuales estos fitoestrógenos influyen sobre la producción hormonal, metabólica y acciones biológicas parecen depender de sus propiedades agonistas-antagonistas estrogénicas. Se postula que estos químicos vegetales poseen dos acciones biológicas importantes: la unión a receptores de hormonas y a enzimas metabolizantes de hormonas. Por otro lado, existe una conexión epidemiológica entre dietas semivegetarianas y baja incidencia de enfermedades crónicas degenerativas como cáncer dependiente de hormonas, cáncer de colon, atherosclerosis y enfermedades coronarias [1].

El poroto de soja es una fuente rica en isoflavonas. Las isoflavonas más importantes encontradas en este cereal son genisteína, daidzeína y gliciteína [3].

Las ventas de productos de soja han aumentado mucho en los últimos años, y esto se puede atribuir a un aumento de conciencia de los consumidores de que los productos derivados de soja son alimentos saludables. Si bien los compuestos activos de las proteínas de soja no se determinaron claramente, un gran número de estudios sugieren que las isoflavonas son el grupo más benéfico de los componentes de la soja [4].

1.1- ORIGEN DE LAS ISOFLAVONAS

Las isoflavonas poseen una larga data en la historia de la ciencia. Frecuentemente mencionadas como estrógenos débiles, fueron sintetizadas químicamente antes de conocerse la estructura de los esteroides de mamíferos, en los años 1920-1930. Un poco más tarde, Wieland y Windaus recibieron el premio Nobel por este descubrimiento a pesar de que fue una estructura errónea. Recién en 1940 las isoflavonas re-emergieron de la oscuridad como principios estrogénicos en el trébol rojo que causó infertilidad en ovejas en el oeste de Australia [5].

Mientras los esteroides son un producto del metabolismo de bacterias, hongos y plantas; las isoflavonas son producidas sólo por plantas y hongos.

La primera flavona se encontró en un alga verde-azulada (cianobacteria) que habita las playas de ríos y lagos y po-

dría ser el resultado de una deshidrogenación introduciendo dobles enlaces en los anillos esteroideos.

Las isoflavonas pueden aislarse de la mayor parte de los tejidos de las plantas, incluyendo hojas, tallos, raíces, flores, semillas y germen. En germen y brotes se encuentran en abundancia y parecen regular procesos fisiológicos importantes para el crecimiento de la planta [1].

1.2- PRINCIPALES FUENTES DE ISOFLAVONAS

Existen por lo menos 220 especies de vegetales que contienen isoflavonas [6-7].

La mayor concentración de isoflavonas en semillas comestibles se encontró en la raíz de *Pueraria lobata*, seguida por la soja y el garbanzo. Todas las especies de poroto de soja analizadas resultaron ser las fuentes más ricas de genisteína, el fitoestrógeno biológicamente más activo. En todas las legumbres analizadas, las cantidades de genisteína excedieron a las de daidzeína. Analizando harina de centeno, grano de centeno fraccionado y muestras de pan de centeno y otros cereales se encontraron solo trazas de isoflavonas. Se analizaron muestras de té negro, verde y una variedad negra y se encontraron bajos niveles de isoflavonas. Además se detectó genisteína y daidzeína en cerveza [1].

La soja y sus derivados son la mayor fuente de isoflavonas en la dieta [8,9]. Se encuentran mayoritariamente en una subfamilia de las Leguminosae, la Papilionoideae. Se recuperaron ocasionalmente en otras pocas familias tales como Compositae, Iridaceae, Myristaceae y Rosaceae [1].

En la segunda generación de alimentos con soja, elaborados mediante la incorporación de ingredientes de soja a una extensa variedad de alimentos manufacturados, el contenido neto de isoflavonas disminuye. La salsa de soja, por ejemplo, contiene muy pocas isoflavonas [9].

Las isoflavonas están presentes predominantemente como glicósidos y en consecuencia son compuestos altamente polares. Los análisis realizados en numerosos alimentos de soja indican que las isoflavonas se encuentran más concentradas en aquellos a base de germen de soja derivados del hipocotiledón [8,10].

El poroto de soja crudo contiene entre 2 y 4 mg de isoflavonas totales por gramo en base seca. Los alimentos de soja difieren en su concentración de isoflavonas, pero todos los tradicionales, tales como el tofu y la "leche" de soja entre otros, son fuentes ricas de isoflavonas. Debido a su alta popularidad, la salsa y el aceite de soja no contienen isoflavonas. Mientras que la harina de soja es rica en isoflavonas; el aislado de proteínas de soja contiene menores cantidades [10]. En poblaciones occidentales la ingesta diaria dietaria de isoflavonas es casi nula (<1 mg/d) debido a que los productos de soja más frecuentemente consumidos en estos países son los aceites y la lecitina de soja, desprovistos de estos fitoquímicos [8].

1.3- CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DE LAS ISOFLAVONAS

Son químicos derivados de fenoles heterocíclicos que exhiben una estructura cerrada similar a los estrógenos. Derivan biosintéticamente de la unión de un precursor aromático (hidroxicinamil coenzima-A ester) con un alifático (malonil coenzima-A). Como compuestos fenólicos típicos, actúan como potentes antioxidantes. Como compuestos aromáticos conjugados actuarían protegiendo potenteamente contra la luz UV y atenuando la luz visible [1].

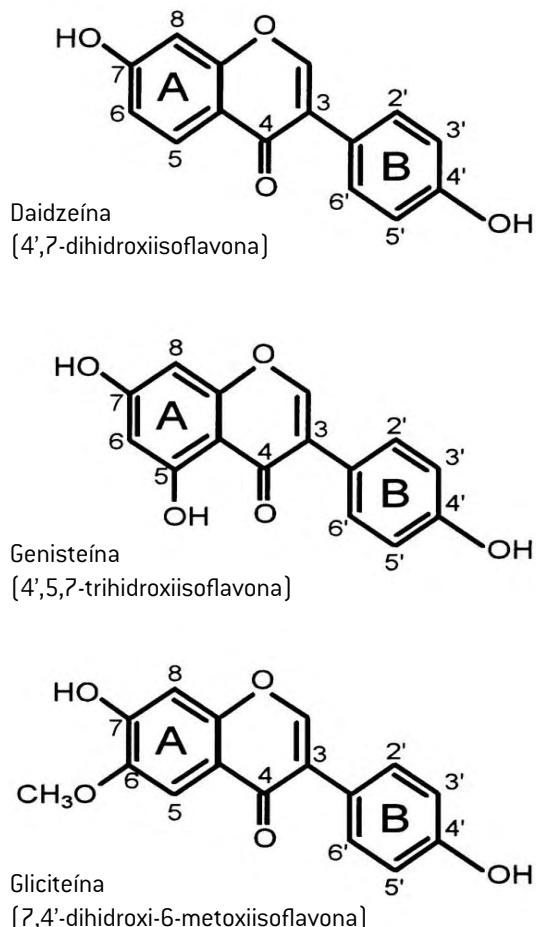
La característica estructural básica de las isoflavonas es el núcleo flavona, compuesto por dos anillos bencénicos (A y B) unidos por un anillo pirano heterocíclico (C) (Figura 1). La posición del anillo benzoico B divide a las flavonas en dos clases: flavonas (posición 2) e isoflavonas (posición 3). Las isoflavonas primarias en el poroto de soja son genisteína [4',5,7-trihidroxiisoflava] y daidzeína [4',7-dihidroxiisoflava] y sus respectivos β -glucósidos, genistina y daidzina (los azúcares se unen en la posición 7 del anillo A). En el poroto de soja también se encuentra en menor cantidad gliciteína [7,4'-dihidroxi-6-metoxiisoflava] y su glucósido, glicitina. En alimentos de soja no-fermentados, las isoflavonas están

presentes fundamentalmente como conjugados, mientras que en los productos de soja fermentados, predominan las agliconas [11].

Además de las isoflavonas encontradas en el poroto de soja, la microflora intestinal puede convertir la daidzeína en varios productos diferentes, incluyendo el isoflavonoide equol (7-hidroxiisoflava), dihidrodaidzeína, y O-desmetilangolensin. Debido a las diferencias en las microfloras intestinales, la producción de equol ocurre en aproximadamente 1 de cada 3 individuos consumidores de soja. Se postuló que en humanos, la genisteína es metabolizada a dihidrogenisteína y 6'-hidroxi-O-desmetilangolensina [11].

Se reportaron aproximadamente 364 agliconas de isoflavonas. Los compuestos más investigados e interesantes con relación a la estrogenicidad son: genisteína, daidzeína, biocanina A y formononetina. La genisteína es el principio activo que presenta la mayor afinidad al receptor de estrógenos. El metoxiderivado, biocanina A, no se une a este receptor pero es estrogénico *in vivo*. La daidzeína posee mayor afinidad al receptor de estrógenos que su metoxiderivado, la formononetina, pero ambas son estrógenos débiles *in vivo*. La metilación podría ser el mecanismo por el cual la potencia estrogénica de las isoflavonas se ve reducida. La diferencia de potencia entre la genisteína y la daidzeína se debe a la presencia del grupo 5-OH en la genisteína [1].

Figura 1: Estructura química de las isoflavonas primarias en el poroto de soja [11].



1.4- METABOLISMO DE LAS ISOFLAVONAS EN EL ORGANISMO HUMANO

La forma química en que se encuentran las isoflavonas influye en la actividad biológica, la biodisponibilidad y los efectos fisiológicos [8].

Hidrólisis

Cuando estos compuestos son ingeridos, los glucósidos de las isoflavonas de soja son hidrolizados por glucosidasas intestinales, produciendo un aumento de las agliconas daidzeína, genisteína y gliciteína. Esta hidrólisis se lleva a cabo en el colon proximal a través de enzimas bacterianas [8,9,12].

Biotransformación

Las agliconas pueden ser absorbidas o metabolizadas a diferentes compuestos símil-hormonas con capacidades para unirse con baja afinidad a los receptores estrogénicos. Así, la genisteína se metaboliza a p-etylfenol y dihidrogenisteína. Mientras que la daidzeína se convierte en O-desmetilangolensina, equol y otros metabolitos. Esta vía de metabolización es clínicamente relevante para la eficacia de las isoflavonas de soja debido a que la potencia estrogénica del equol es un orden de magnitud más alta que la de su precursor, la daidzeína [8,12].

Conjugación y Excreción

Al igual que los estrógenos, las isoflavonas sufren una circulación enterohepática. Luego estas isoflavonas conjugadas son excretadas por vía renal y biliar. La excreción urinaria máxima de las isoflavonas y sus metabolitos ocurre entre las 24 horas

posteriores a la ingesta del alimento. Estudios realizados reportaron además, la excreción urinaria de los metabolitos de las isoflavonas como el equol^[9, 12-14].

La vida media de la daidzeína y genisteína en plasma es de 7.9 h en adultos, la concentración pico ocurre 6 a 8 hs después de la administración del compuesto puro; mientras que la mayor parte de las mismas se excreta en las primeras 24 horas^[8, 12, 15].

Estudios realizados por Watanabe y col. mostraron que administrando iguales cantidades de genisteína y daidzeína a un grupo de personas voluntarias, las concentraciones en plasma de genisteína fueron siempre más altas que las de daidzeína, mientras que la excreción urinaria de daidzeína fue mucho más elevada que la de genisteína^[14, 16].

Farmacocinéticamente se estableció que el volumen de distribución en adultos es grande, indicando una extensa distribución tisular. Se observó una eliminación más rápida de isoflavonas presentes en una matriz líquida que en una sólida^[12].

Cuando se consume soja regularmente, los niveles de isoflavonas en plasma exceden las concentraciones de estradiol plasmáticas^[8].

1.5 - ACCIONES BIOLÓGICAS

1.5.1- ACCIÓN DE LAS ISOFLAVONAS SOBRE LOS RECEPTORES ESTROGÉNICOS

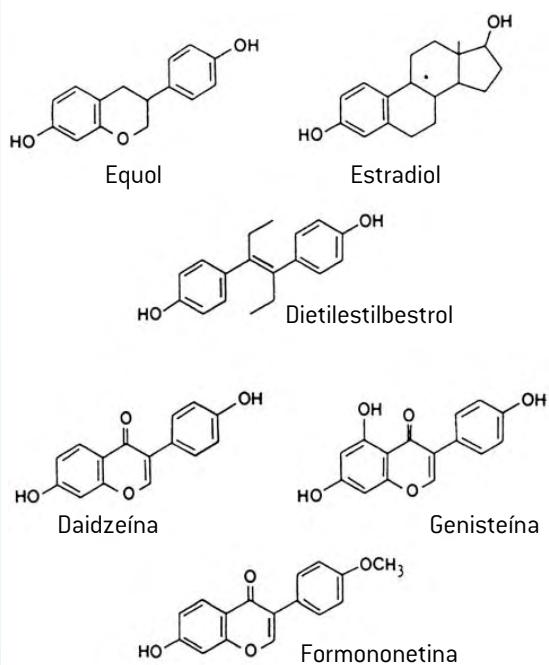
Las isoflavonas son sorprendentemente similares en estructura química a los estrógenos humanos. El anillo fenólico es un elemento estructural clave en la mayoría de los compuestos que se unen a los receptores de estrógenos. Si se superponen las estructuras del metabolito equol y el estradiol, se observa que son virtualmente superponibles; la distancia entre los grupos oxhidrilos de cada extremo de ambas moléculas es casi idéntica (Figura 2).

Analizando solamente la estructura de estos compuestos, no resulta raro que las isoflavonas se unan a los receptores de estrógenos (ER), si bien sus acciones pueden ser agonistas y antagonistas de estrógenos^[8]. La acción estrogénica de las isoflavonas, bioquímicamente se basa en que puede aparentemente desplazar el H³ unido al 17'-estradiol de los receptores estrogénicos^[5].

Luego de la unión del estrógeno al receptor, el complejo se contacta con un sitio específico del DNA de la célula para la transcripción de genes determinados y la inducción de respuestas estrogénicas en el tracto reproductivo, tales como hipertrofia, hiperplasia, etc. Los fitoestrógenos son estrógenos débiles, por lo tanto su menor afinidad al receptor da como resultado un complejo menos estable y con capacidad reducida para transformarse^[6].

El reciente descubrimiento de un segundo receptor de estrógenos complica la comprensión del mecanismo de acción de las isoflavonas. Kuiper clonó un nuevo miembro de la fa-

Figura 2: Comparación de las estructuras químicas del equol, formado en el tracto intestinal humano y animal, estradiol, dietilestilbestrol y otros fitoestrógenos de origen vegetal^[9].



milia de receptores nucleares, llamado ER β para distinguirlo del clásico ER α , ambos receptores pueden jugar diferentes roles en la regulación de los genes. La extensa distribución de los receptores en los tejidos y las afinidades de unión de los ligandos a estos, podría explicar la acción selectiva de los estrógenos en los distintos tejidos. Se observó que el ER β se encuentra en cerebro, hueso, vejiga y epitelio vascular, todos tejidos que responden a la terapia de reemplazo hormonal clásica en mujeres menopáusicas. Por otro lado, las afinidades de unión de los diferentes compuestos estrogénicos revelan que tanto los fitoestrógenos como algunos xenoestrógenos ambientales tienen afinidades significativamente más altas a los ER β que a los ER α , lo que indicaría que este nuevo receptor puede ser importante para la acción de estrógenos no-esteroideos^[8].

1.5.2- ESTROGENICIDAD VS. ANTIESTROGENICIDAD

Los fitoestrógenos son interesantes desde el punto de vista biológico debido a que exhiben, tanto *in vitro* como *in vivo*, actividades estrogénicas y antiestrogénicas débiles.

Los primeros efectos estrogénicos de los fitoestrógenos se observaron como disturbios en el sistema reproductor ovino. Las isoflavonas estimulan la hipertrofia uterina en animales de laboratorio, exhibiendo de esta manera sus acciones estrogénicas. Cuando se administra en modelos animales,

genisteína junto con estradiol, la primera funciona como un antiestrógeno, disminuyendo el efecto del estradiol en el útero^[9].

1.6- EFECTOS CLÍNICOS

1.6.1- MUJERES PREMENOPÁUSICAS

Estudios realizados en mujeres premenopáusicas sugieren que las dietas que contienen fitoestrógenos pueden producir efectos estrogénicos. Una ingesta diaria de proteína vegetal texturizada (TVP) con 45 mg de isoflavonas modificó el ciclo menstrual de mujeres premenopáusicas sanas prolongando su duración. Este efecto no ocurre con proteínas de soja libres de isoflavonas, por lo tanto da evidencia de que las dietas que contienen fitoestrógenos ejercen un efecto endocrino-modulador y que ocurre a nivel del eje hipotálamo-hipófisis-gonadal^[8,17].

La duración del ciclo menstrual, mostrado como dato epidemiológico, es uno de los factores de riesgo para el cáncer de mama, si bien las razones de esta asociación no son del todo claras. El ciclo promedio en países occidentales, en los cuales el riesgo de cáncer de mama es alto, es de 28-29 días, mientras que en mujeres japonesas es de 32 días donde el riesgo de cáncer de mama es cuatro a cinco veces menor^[8].

Las concentraciones de fitoestrógenos en orina y plasma de mujeres japonesas con dieta tradicional son altas, como así también en las vegetarianas; y la incidencia de cáncer de mama, de endometrio y de ovario en este grupo de mujeres es bajo. Un estudio confirmó la idea que las dietas ricas en fitoestrógenos pueden ofrecer un efecto protector beneficioso, demostrándose una relación inversa entre el riesgo de cáncer de mama y la excreción de fitoestrógenos urinarios^[8].

1.6.2- MUJERES POSTMENOPÁUSICAS

Los datos epidemiológicos muestran que con una dieta rica en isoflavonas, existe una reducción del 40 al 55% de los síntomas postmenopáusicos en un período de 12 semanas de consumo. Se reportaron efectos de estas sustancias tanto sobre el epitelio vaginal de estas mujeres, como así también en los sofocos de calor característicos de esta etapa. Los estudios sugieren que estos fitoestrógenos son capaces de actuar como estrógenos débiles, particularmente en presencia de bajo status de estrógenos endógenos, como en el caso de las mujeres postmenopáusicas^[8].

Estudios realizados recientemente demostraron que las isoflavonas de soja *per se*, cuando se consumen como constituyentes de aislados de proteínas de soja, bajan las concentraciones de LDL-colesterol y la relación LDL/HDL-colesterol en mujeres postmenopáusicas normo e hipercolesterolemicas.

Esta acción podría asociarse con la reducción del riesgo de enfermedades arteriocoronarias^[18].

1.6.3- EFECTOS ANTICANCERÍGENOS

Las isoflavonas presentan actividad anticarcinogénica *in vivo*. Animales de laboratorio alimentados con una dieta fortificada con soja, muestran menor proliferación de células tumorales mamarias luego de la estimulación con agentes inductores directos e indirectos^[9,19].

La genisteína es la isoflavaona de mayor interés hasta el presente; *in vitro*, en líneas celulares humanas posee efectos proliferativos (estrogénicos) y antiproliferativos (antiestrogénicos). En líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 receptor de estrógenos (ER) positivas, estos efectos son bifásicos y dependen de la concentración, a bajas concentraciones de genisteína (10^{-5} – 10^{-8} M) estimula el crecimiento celular y a altas concentraciones (10^{-4} – 10^{-5} M) lo inhibe. A bajas concentraciones la genisteína compite con el estradiol por la unión al ER con una concentración inhibitoria media de 5×10^{-7} M y estimula la expresión del pS2 mRNA, un marcador específico de actividad símil estrógeno mediado por ER^[9].

Se postula que la genisteína, y quizás otros fitoestrógenos, inhibe el crecimiento de células tumorales por intervención en la actividad de la tirosina quinasa de los receptores del factor de crecimiento activado y de la tirosina quinasa citooplasmática e inhibe las tropoisomerasas de DNA, las cuales son esenciales para la transducción de señales mitogénicas^[9]. Resultados de un estudio reciente en células de cáncer de mama humana reveló que la genisteína posee acciones estrogénicas; en un rango de concentración fisiológicamente relevante, actuaría como un agonista reemplazante de estrógenos y como un regulador del crecimiento. El efecto antiestrogénico de los fitoestrógenos se observó *in vivo*; a concentraciones de 10 a 100 veces más altas que el estradiol son capaces de competir con los estrógenos endógenos, unirse al receptor de estrógenos y prevenir un crecimiento estimulado por estrógenos^[11].

CÁNCER DE PRÓSTATA

Estudios epidemiológicos mostraron una buena correlación entre la disminución del riesgo de cáncer de próstata y la alta consumición de alimentos de soja, que provoca un aumento en los niveles de fitoestrógenos (isoflavonas) en sangre^[20]. El fitoestrógeno genisteína, un inhibidor de la 5-α-reductasa, fue detectado en fluido prostático humano como un agente inductor de apoptosis (muerte celular). Davis y colaboradores^[21] investigaron el efecto inhibitorio de la genisteína sobre el crecimiento de células de cultivos y su efecto sobre la expresión de genes involucrados en la regulación del ciclo celular y la apoptosis. Estos investigadores encontraron que la genisteína puede modular genes específicos involucrados en la inhibición del crecimiento celular y en la apoptosis.

Lamartiniere y colaboradores^[22] evaluaron la protección de la genisteína contra el cáncer de próstata realizando una in-

ducción química con N-metilnitrosurea al cáncer de próstata en ratas. La genisteína de la dieta inhibió el desarrollo de adenocarcinomas invasivos de manera dosis-dependiente.

CÁNCER DE MAMA

Se observó que la genisteína inhibe el crecimiento de células de mama cancerígenas *in vitro*. Por otro lado esta isoflava-na también inhibe un proceso conocido como angiogénesis [crecimiento de nuevos vasos sanguíneos], este proceso es esencial para que los tumores aumenten su tamaño. Esto indica que compuestos que puedan inhibir la angiogénesis, podrían inhibir el crecimiento del cáncer. Además, la actividad antioxidante de estas isoflavonas protegería a las células del daño de los radicales libres, los cuales iniciarían el proceso del cáncer^[23].

En 2002, Lamartiniere y colaboradores^[22] demostraron en un estudio realizado con ratas, que el tiempo de exposición a la genisteína es importante para la quimioprevención del cáncer. Observaron que la quimioprevención ejercida por la genisteína contra el cáncer de mama es efectiva luego de tratamientos efectuados con dicha isoflavona en estado puberal y prepupal, pero no luego de tratamiento con genisteína solo en la vida adulta. Datos epidemiológicos soportan este concepto; mujeres asiáticas que han consumido tofu durante la adolescencia pero no en la vida adulta tienen una menor incidencia de cáncer de mamas comparado con aquellas que nunca consumieron tofu o solo lo han hecho en la vida adulta^[15].

1.6.4- EFECTOS CARDIOVASCULARES

Los efectos hipocolesterolémicos de las proteínas de soja se conocen desde hace más de 30 años. Estudios realizados en animales muestran que la sustitución de las proteínas animales de la dieta por proteínas de soja, reduce las concentraciones plasmáticas de colesterol total y LDL-colesterol. El mecanismo exacto de este efecto parecería ser multifactorial. Las proteínas de soja poseen el efecto de aumentar la excreción fecal de ácidos biliares y alterar la síntesis de estos ácidos, uno de los mecanismos responsables de la regulación de la homeostasis del colesterol. La secreción hepática del colesterol también se encuentra incrementada^[8, 24].

A parte de los efectos sobre los lípidos, podrían existir otros beneficios de los fitoestrógenos que serían relevantes para la disminución del riesgo de enfermedades cardiovasculares. Las propiedades antioxidantes, que ejercerían una acción cardioprotectora, pueden contribuir a reducir la oxidación de los lípidos. Se observó que la genisteína incrementa la resistencia a la oxidación del LDL-colesterol *in vitro*, y esta isoflavona es el antioxidante más potente de la soja^[8, 25].

La ateroesclerosis, una respuesta secundaria a la hiperoles terolemia y dislipemia, empeora la reactividad vascular coronaria. En un estudio realizado con monos rhesus ateroescleróticos, se vio que las isoflavonas pueden reducir la reactividad

vascular coronaria por aumento de la dilatación sanguínea; si bien el mecanismo de este efecto sobre el endotelio no es del todo claro. Se observó también que la genisteína inhibe el proceso de coagulación, un promotor clave en la formación de la placa ateromatosa y que este efecto estaría mediado por la inhibición de factores de crecimiento tales como el factor de crecimiento derivado de plaquetas y alteraciones en la formación de trombina. El mecanismo estaría relacionado con la potente inhibición ejercida por la genisteína sobre la tirosina quinasa, enzima importante en la síntesis de trombina y en el proceso de inflamación general^[8].

1.7- DISTRIBUCIÓN DE LAS ISOFLAVONAS EN EL POROTO DE SOJA

La concentración de las isoflavonas (expresada en % en peso) es más alta en el hipocotiledon y más baja en la cáscara. El cotiledon posee alrededor del 20% del contenido de las isoflavonas glucosídicas. La distribución de las isoflavonas individuales también es diferente en el hipocotiledon y en el cotiledon. En el hipocotiledon, las más abundantes son las formas glucosídicas daidzina y glicitina, mientras que en el cotiledon se encuentran aproximadamente 20 veces más de genisteína que en el hipocotiledon^[26].

El germen de soja representa la matriz que contiene concentraciones de isoflavonas de 6 a 10 veces más altas que las encontradas en otros alimentos de soja. El germen de soja comercial recibe un paso de tostado seco intenso. Este paso de calentamiento altera la distribución de las isoflavonas más que el calor por extrusión^[27]. Kim y col. en su trabajo recientemente publicado compararon la composición de las isoflavonas en las diferentes partes de la semilla de soja y encontraron que el germen es la parte del porto más rica en estos fitoestrógenos^[28].

Nakamura Y. y colaboradores^[29], en un estudio realizado en 2001, observaron que la composición de las isoflavonas difiere significativamente en los diferentes estadíos de crecimiento de los porotos. El porcentaje de agliconas disminuye desde los borotes hacia el poroto inmaduro y luego al maduro, mientras que el porcentaje de glucósidos aumenta en orden contrario. La actividad biológica de las isoflavonas es más fuerte en la forma aglica que en la forma glucosida. Esto indicaría que las isoflavonas tales como daidzeína, gliciteína y genisteína tienen un rol específico durante las etapas de crecimiento del poroto.

1.8 - BIOQUÍMICA DE LAS ISOFLAVONAS EN EL POROTO DE SOJA

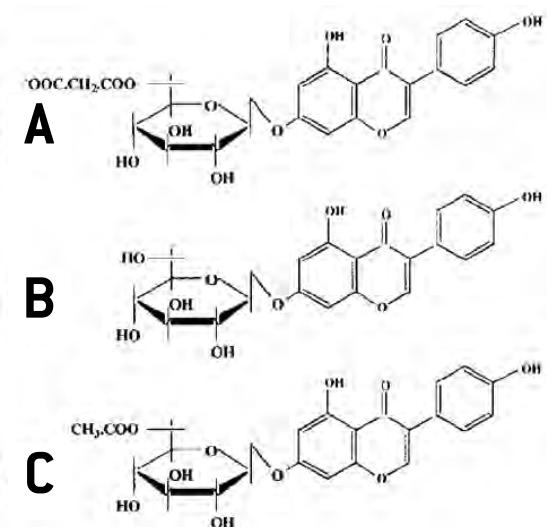
En el poroto de soja crudo, las tres familias más importantes de isoflavonas, la genisteína, la daidzeína, y la gliciteína, se encuentran en una relación de aproximadamente 6:3:1 respectivamente. Cada una de estas existe en cuatro formas

químicas, como agliconas (genisteína, daidzeína y gliciteína), como β -glucósidos (genistina, daidzina, y glicitina), como acetil-glucósido (60AcGlc) [6"-O-acetilgenistina, 6"-O-acetildaidzina, y 6"-O-acetilglicitina], y como malonil-glucósido (60MalGlc) [6"-O-malonilgenistina, 6"-O-malonildaizina, y 6"-O-malonilglicitina] ^[3]. Debido a la hipótesis de que las formas agliconas podrían ser las más bioactivas, conocer el efecto del procesamiento sobre la composición exacta de las isoflavonas y sus cuatro formas es muy importante ^[30], figura 3.

En los porotos de soja crudos no procesados, la forma predominante de las isoflavonas es el 6"-O-Malonil. Estas formas malonil se decarboxilan durante el tiempo de extracción para originar las formas acetil ^[27].

Los alimentos de soja fermentados tales como el miso y el tempeh contienen las agliconas no conjugadas de las isoflavonas, mientras que los alimentos no fermentados (“leche” de soja, tofu, harina, concentrado de proteína de soja) contienen sus β -glucósidos conjugados. Coward y colaboradores ^[31] recuperaron las isoflavonas por extracción en caliente, con solventes orgánicos acuosos tales como acetonitrilo, etanol o metanol. Este estudio mostró que los conjugados glucósidos de las isoflavonas fueron fácilmente alterados durante la extracción, procesamiento y cocción. Los conjugados 60MalGlc fueron inestables al calor. El calentamiento acuoso, como en el caso de la extracción con metanol acuoso, causó la conversión hacia los conjugados β -glucósidos. La extracción a temperatura ambiente también condujo a pérdidas de los conjugados 60MalGlc, pero en una relación mucho menor. Los conjugados 60MalGlc fueron estables durante más de 24 horas a 4 °C, pero la conservación por varios días en frío también causó pérdidas de los mismos.

Figura 3: Estructuras químicas de los conjugados glucósidos de la genisteína encontrados en los alimentos de soja. A, 6"-O-malonil- β -glucósido; B, β -glucósido; C, 6"-O-acetyl- β -glucósido ^[31]



1.9- INFLUENCIA DEL PROCESAMIENTO INDUSTRIAL SOBRE EL CONTENIDO Y LA COMPOSICIÓN DE LAS ISOFLAVONAS

Se observó que la *molienda* para producir la harina de soja y la *extracción con hexano* para remover las grasas no altera la conjugación glucosídica. El *calor*, como en el tostado de la harina de soja o la extrusión usada para producir proteína vegetal texturizada (TVP), causa pérdidas de dióxido de carbono y lleva a la formación de cantidades sustanciales de los conjugados 60AcGlc. Las formas 6"-O-Acetyl solo se encuentran en los productos de soja que son sometidos a un tratamiento con calor seco. La *extracción acuosa en caliente*, usada para producir el tofu o la “leche” de soja, resulta casi en su totalidad en la formación de conjugados β -glucósidos. La *fermentación*, para producir miso y tempeh, causa una pérdida de glucósidos para formar las agliconas. La *cocción en horno* de los productos alimenticios da como resultado mayoritariamente los conjugados β -glucósidos, mientras que los *productos fritos* contienen más 60AcGlc conjugados ^[27, 31]. Los procesos que involucran líquidos, tales como el lavado, el remojado y la ebullición, reducen el contenido de isoflavonas totales ^[30].

1.10- ACCIÓN DE LAS β -GLUCOSIDASAS ENDÓGENAS

En los productos de soja que son procesados con agua, las β -glucosidasas nativas de la soja están activas previo al tratamiento con calor generando las agluconas, como en el remojado de los granos de soja previo al proceso de la “leche” de soja. Mientras que el proceso de fermentación de los alimentos de soja para producir miso y tempeh da como resultado la producción de agluconas por acción de las β -glucosidasas microbianas ^[27].

Cuando los porotos son remojados en agua, la enzima β -glucosidasa endógena hidroliza las formas glicósidas a sus formas agluconas. La enzima β -glucosidasa puede hidrolizar la genistina completamente y formar genisteína estequiométricamente.

Pandjaitan y col. ^[32] evaluaron las condiciones de mayor actividad hidrolítica de estas enzimas durante el proceso de obtención del concentrado de proteína de soja. Concluyeron que el pH óptimo es de 5; la temperatura óptima es de 50 °C; y el tiempo de incubación es de 1 hora.

2- OBJETIVOS

El objetivo principal del presente trabajo consistió en analizar el contenido de las isoflavonas genisteína y daidzeína en porotos de soja, sean o no manipulados genéticamente y en subproductos del aprovechamiento industrial del poroto seleccionando diferentes líneas de producción: harina desgra-

sada, "leche" (bebida de soja), tofu; y evaluar las posibles pérdidas de estas isoflavonas durante el proceso de elaboración. Como objetivo complementario se planteó desarrollar y poner a punto la metodología analítica apropiada para las diversas matrices involucradas en estos estudios sobre isoflavonas.

3 - MATERIALES Y MÉTODOS

3.1- MUESTRAS

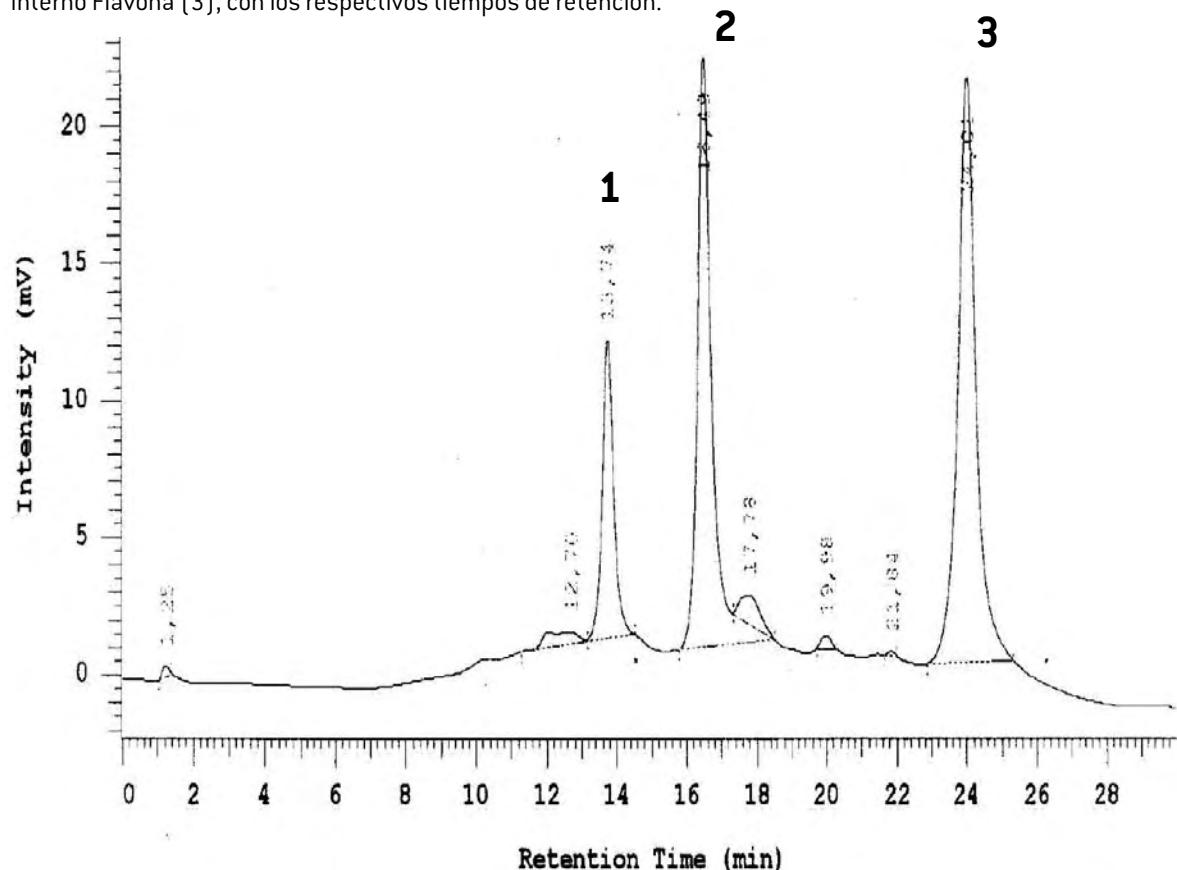
Las semillas de soja orgánicas y modificadas genéticamente fueron provistas por industrias del sector; igualmente las

de harinas desgrasadas. Además se procuraron semillas no tratadas térmicamente directamente de productores. Las muestras de "leche" de soja y tofu se prepararon a escala de laboratorio mediante procedimientos publicados por W.J. Mullin y col. [33].

Los procesos de extracción se realizaron tal cual lo detallaron Wang H. y Murphy P en su trabajo publicado en 1994 en el Journal Agricultural Food Chem. [34]*

Debido a que existen ciertas pérdidas en los pasos de extracción de las isoflavonas, se debe usar un standard interno (S.I.) para precisar la cuantificación de las mismas; en nuestro trabajo utilizamos Flavona con S. I.

Figura 4: Comatograma correspondiente a una matriz fortificada con Daidzeína (1), Genisteína (2) y Estándar Interno Flavona (3), con los respectivos tiempos de retención.



No.	RT	Height	Conc 1 ppm	Name
1	1,25	348	0,000	
2	12,70	440	0,000	
3	13,74	10783	0,167	Daidzeína
4	16,49	21366	3,046	Genisteína
5	17,78	1036	0,000	
6	19,98	481	0,000	
7	21,84	146	0,000	
8	24,01	21191	1,000	Flavona
		55791	4,213	

3.2- MÉTODO ANALÍTICO PARA LA VALORACIÓN DE ISOFLAVONAS

3.2.1- EQUIPAMIENTO ANALÍTICO UTILIZADO

Para el análisis cromatográfico se utilizó un Cromatógrafo Líquido LaChrom Hitachi. La columna utilizada para realizar la separación fue una LichroCART 125-4, RP-18 (5 µm) de Agilent Technologies.

3.2.2- PATRONES Y REACTIVOS

Los patrones utilizados para la identificación y cuantificación de las isoflavonas, Genistein, Daidzein, y flavona fueron obtenidos de ICN. Todos los solventes utilizados (metanol, AcN, agua) fueron de calidad HPLC. El ácido acético utilizado para la fase móvil también fue de calidad HPLC.

3.2.3- CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS

Las isoflavonas absorben la luz UV a 262 nm, por ello elegimos esta longitud de onda tal como lo hizo Eldridge^[35]. La fase móvil elegida consistió en una mezcla de Ácido Acético en agua (0.1%) y AcN, usada por Wang y Murphy^[36]. Para lograr la separación deseada utilizamos un gradiente no lineal. El caudal de la fase móvil fue de 1 ml/min. Las corridas se realizaron a temperatura ambiente.

La figura 4 (Ver página anterior) muestra un cromatograma típico de las isoflavonas analizadas correspondiente a una

corrida de mezcla de testigos y estándar interno. Las mismas se separan de acuerdo a su polaridad. Primero aparece la daidzeina (la más polar), luego genisteína y por último la Flavona.

4- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1- VALIDACIÓN DEL MÉTODO CROMATOGRÁFICO

(Ver Tabla 1)

4.2- ANÁLISIS DE LOS DATOS OBTENIDOS

4.2.1- CONTENIDO DE ISOFLAVONAS EN SEMILLAS DE DIFERENTES VARIEDADES DE SOJA

El contenido de isoflavonas en las semillas utilizadas para la comparación se detalla en la tabla 2. Las muestras analizadas corresponden a dos variedades de soja no transgénica y cuatro variedades de soja transgénica.

Encontramos que en las semillas de sojas no transgénicas el contenido de genisteina fue mayor al de daidzeina; mientras que en las sojas transgénicas se observó lo inverso, la concentración de genisteina fue menor que la de daidzeina; tal como lo describe la bibliografía consultada^[30].

Los rangos de variabilidad son muy marcados, esto también lo observaron Simonne y col.^[52] en su trabajo publicado el

Tabla 1: Parámetros de validación. C.V.%: coeficiente de variación porcentual.
L.D.: límite de detección. L.C.: límite de cuantificación.

	DAIDZEINA	GENISTEINA
LINEALIDAD	$y = 1.0627x + 0.3427$ r = 0.9904	$y = 0.2431x + 0.032$ r = 0.9988
L. D.	0.029 ppm	0.096 ppm
L. C.	0.117 ppm	0.389 ppm
C.V.% INTRAENSAYO	1.32 %	2.87 %
C.V.% INTERENSAYO	8.91 %	8.73%
RECUPERACION	102 %	85.1%

Tabla 2: Comparación de Concentraciones de Daidzeina y Genisteina en las diferentes Variedades de Soja. Soja No Transgénica A [S.No T. A]; Soja No Transgénica B [S. No T. B]; Soja Transgénica C [S.T.C]; Soja Transgénica D [S. T. D]; Soja Transgénica E [S. T. E]; Soja Transgénica F [S. T. F].

	S. No T. A	S. No T. B	S. T. C	S. T. D	S. T. E	S. T. F
Daidzeina (ppm)	5.28 ± 0.27	1.08 ± 0.26	50.2 ± 5.9	53.12 ± 11.05	20.44 ± 1.23	54.19 ± 4.92
Genisteina (ppm)	27.84 ± 0.46	4.18 ± 0.89	41.79 ± 7.06	15.66 ± 2.31	0.16 ± 0.12	38.28 ± 3.48

Tabla 3: Contenido de Daidzeina y Genisteina durante el proceso de elaboración de la bebida de soja y tofu a partir de soja no transgénica B.

	Soja	Bebida (“leche”)	Okara	Tofu
Daidzeina (ppm)	1.08 ± 0.26	0.30 ± 0.42	0.36 ± 0.10	ND
Genisteina (ppm)	4.18 ± 0.89	1.72 ± 0.14	4.22 ± 0.71	0.86 ± 0.12

Tabla 4: Contenido de Daidzeina y Genisteina durante el proceso de elaboración de la bebida de soja y tofu a partir de soja desgrasada transgénica variedad D.

	Semilla	Bebida (“leche”)	Okara	Tofu
Daidzeina (ppm)	53.12 ± 11.05	2.24 ± 0.59	13.22 ± 2.53	0.92 ± 0.12
Genisteina (ppm)	15.66 ± 2.31	2.88 ± 0.43	10.17 ± 2.43	4.64 ± 0.24

año 2000 donde analizaron diferentes variedades de sojas comerciales.

Comparando los contenidos de Daidzeina y Genisteina mediante el análisis estadístico de ANOVA, encontramos que hay diferencias estadísticamente significativas ($p = 0.0000$) en las concentraciones de Genisteina y Daidzeina, para un nivel de confianza de 95%.

4.2.2- CONTENIDO DE ISOFLAVONAS EN LOS SUBPRODUCTOS DE LA INDUSTRIALIZACIÓN DE LAS DIFERENTES VARIEDADES DE SOJA

SOJA NO TRANSGÉNICA

Para evaluar el efecto del proceso de elaboración en el contenido de daidzeina y genisteina, procesamos soja no transgénica elaborando a escala de laboratorio, tal como se detalló en Materiales y Métodos, la bebida de soja y luego el tofu. Analizamos el contenido de ambas isoflavonas en cada paso del proceso de elaboración, la bebida (“leche”), el okara, tofu y residuo acuoso del tofu o suero. En este último producto del proceso no se detectaron las isoflavonas analizadas por lo que no aparecen valores en tablas y figuras.

En la tabla 3 se observan los valores obtenidos en la cuantificación de las isoflavonas.

Así el contenido de Daidzeína encontrado en la bebida representa el 18.1 %, expresado en base seca, del contenido total de esta isoflavona en la semilla seca. Mientras que el contenido de Genisteína en la bebida es el 27.2 % del contenido total en semilla.

Para el okara los porcentajes fueron 16% y 48.9% para Daidzeína y Genisteína respectivamente. La pérdida de isoflavonas a través de este residuo fue considerable.

Finalmente para el tofu obtuvimos solamente Genisteína que representó el 12.1% de la concentración inicial en semillas.

Estos resultados podemos compararlos con los encontrados por Jackson y colaboradores ^[53] en su trabajo realizado en 2002, donde evaluaron el efecto del procesamiento de manufactura de la bebida de soja y el tofu sobre el contenido de isoflavonas totales. La recuperación de isoflavonas desde el poroto de soja hasta el tofu fue del 67% en este estudio; mientras que Wang y Murphy ^[36] obtuvieron 36% de recuperación en una evaluación similar.

Murphy y col. ^[37] evaluaron el contenido de fitoestrógenos en subproductos de soja y también encontraron disminuciones significativas de las concentraciones de genisteína en todos los productos examinados (bebida y tofu). Resultados similares encontraron Wang y col. ^[38]

SOJA TRANSGÉNICA

La misma evaluación se realizó en soja transgénica variedad D (semilla Nidera 8000), la Tabla 4 muestra los datos correspondientes para ambas isoflavonas. Se observa que la pérdida de Genisteína, durante el proceso de elaboración de la bebida y el tofu, se produce fundamentalmente en el residuo okara. Al igual que en la variedad anterior, en el residuo acuoso del tofu no detectamos isoflavonas.

La distribución de las isoflavonas en cada subproducto difirió de la encontrada en la variedad anterior. En la bebida estos valores fueron de 2.8% y 11.7% para Daidzeína y Genisteína respectivamente. En okara 12.1% y 31.6%; y en tofu 1.02% y 17.3% para Daidzeína y Genisteína respectivamente. Las pérdidas nuevamente son importantes, y podemos suponer que también existen pérdidas de isoflavonas en el agua de remojo, pero esta última no fue analizada.

Se analizaron de igual modo las otras variedades de soja transgénicas arribando a resultados similares a los encontrados en la variedad anterior.

Tabla 5: Concentraciones de Daidzeina y Genisteina de las diferentes harinas desgrasadas analizadas.

	Harina A	Harina B	Harina C	Harina D
Daidzeina (ppm)	2.40 ± 0.12	11.72 ± 0.74	2.16 ± 0.26	5.7 ± 0.58
Genisteina (ppm)	17.4 ± 1.09	32.97 ± 0.55	16.86 ± 0.79	10.58 ± 0.67

4.2.3- CONTENIDO DE ISOFLAVONAS EN DIFERENTES HARINAS DESGRASADAS DE SOJA

Tal como se expresó en Materiales y Métodos, se analizaron muestras de harinas de soja desgrasadas para evaluar el contenido de Daidzeína y Genisteína. Tomamos cuatro harinas provistas por industrias de la zona. Por cuestiones prácticas las denominamos como Harina A, B, C y D. La tabla 5 muestra los resultados obtenidos para cada una de las mismas.

Se observa una marcada variación en el contenido de isoflavonas en las diferentes variedades estudiadas, pero en todas las concentraciones de Genisteína superaron a la de Daidzeína.

El análisis estadístico arrojó para Daidzeína y Genisteína $p = 0.000$, es decir, que existen diferencias estadísticamente significativas entre todos los tipos de harinas procesadas. En un trabajo realizado por Batt y col. (39) donde se cuantificó el contenido de isoflavonas en harinas de soja desgrasadas industriales, las concentraciones fueron muy variables encontrando mayor cantidad de Daidzeína que Genisteína. De todos modos, las muestras contenían un alto porcentaje de isoflavonas glicosiladas.

5- CONCLUSIONES

El método cromatográfico desarrollado y validado es un método sencillo, preciso y de buena sensibilidad. Resultó eficazmente útil para analizar el contenido de Genisteína y Daidzeína en las muestras procesadas.

Observando los datos obtenidos en la cuantificación de Genisteína y Daidzeína, en las diferentes variedades de soja, vemos que existe una importante fluctuación en las concentraciones de las agliconas, especialmente en las variedades transgénicas. Nuestros hallazgos nos parecen interesantes porque observamos una inversión en la relación de las isoflavonas analizadas. En las variedades no transgénicas el contenido de Genisteína es mayor que el de Daidzeína, mientras que esta relación cambia en las variedades modificadas genéticamente. Sobre todo si tenemos en cuenta que la Genisteína es el fitoestrógeno biológicamente más activo. No hemos encontrado referencias de estudios anteriores donde se analicen las relaciones de concentración de isoflavonas en variedades de soja modificadas y no modificadas genéticamente.

Respecto a la evaluación de las concentraciones de estos

fitoestrógenos en los sub-productos derivados de la soja, encontramos que existen pérdidas de los mismos a lo largo del proceso de elaboración. El residuo okara mostró una retención importante de isoflavonas durante la preparación de la bebida de soja a partir del poroto, lo que explicaría la caída en la concentración de Daidzeína y Genisteína en los productos derivados. Respecto al residuo o suero del tofu, no hemos encontrado pérdidas importantes de ambas isoflavonas ya que en todos los casos tanto Daidzeína como Genisteína no fueron detectadas por nuestro sistema cromatográfico.

Las concentraciones de las isoflavonas Genisteína y Daidzeína en semillas de soja y subproductos varían dramáticamente. En primer lugar la manipulación genética tiene, impacto significativo sobre la composición y cantidad de Genisteína y Daidzeína en las semillas. En segundo lugar los procesos tecnológicos de manufactura también afectan las concentraciones de estas isoflavonas.

Resulta importante profundizar la investigación de los efectos de las condiciones de procesos sobre la retención de las isoflavonas. Aún más, son necesarios nuevos procesos tecnológicos o modificaciones de los procesos ya existentes para minimizar las pérdidas de los fitoestrógenos durante los mismos.

Nuestro trabajo suma un humilde aporte a tan necesarios avances en este campo, teniendo en cuenta especialmente la importancia de obtener alimentos saludables y que respondan a las exigencias cada vez más altas de los consumidores en orden a alcanzar una mejor calidad de vida.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Manzur,W.,and Adlercreutz,H..Natural and anthropogenic environmental oestrogens: the scientific basis for risk assessment. Naturally occurring oestrogens in food. Pure & Appl. Chem., Vol. 70, Nº 9, 1759-1776. 1998.
2. Métodos de investigación en Fitoestrógenos. Química, análisis y propiedades biológicas. SOYANOTICIAS. www.ag.uiuuc.edu. Diciembre de 1998.
3. Kurzer, M. S. Dietary phytoestrogens. Annu. Rev. Nutr. 17:353-381. 1997.
4. Uzzan, M. and Labuza, T. Critical issues in R&D of Soy Isoflavone-enriched foods and dietary supplements. J. Food Scince 2004 ;69: 77-86.
5. Barnes S. Soy Isoflavones— Phytoestrogens and What Else? J. Nutr. 2004 ; 134: 1225S-1228S.

6. Rickard and Thompson, L.. Phytoestrogens and Lignans: Effects on Reproduction and Chronic Disease. S. Antinutrients and Phytochemicals in Food. Fereidoon Shahidi EDITOR. Memorial University of Newfomdlan. American Chemical Society, Washington DC. 1997.
7. Mazur,W., Duke,J., Wahala,K., Rasku,S., and Adlercreutz, H.. Isoflavonoids and lignans in legumes: nutritional and health aspects in humans. Nutritional Biochemistry 1998; 9: 193-200.
8. Stechell, K. and Cassidy, A.. Dietary Isoflavones: Biological Effects and Relevance to Human Health. J. of Nutrition 1999; 129: 758-767.
9. Murkies, A., Wilcox, G. and Davis, S.. Phytoestrogens. J. of Clin. Endocrinology & Metabolism Vol. 83, No. 2, 297-303. 1998.
10. Anderson, J.W.. Isoflavone concentration in soyfoods. www.soyfoods.com.
11. Messina, Mark J.. Legumes and soybeans: overview of their nutritional profiles and health effects. Am. J. of Clin. Nutrition, Vol. 70, No. 3, 439S-450S. 1999.
12. Stechell, K.. Absorption and Metabolism of Soy Isoflavones from Food to Dietary Supplements and Adults to Infants. J. of Nutrition. 130:654S-655S. 2000.
13. Stechell, K.. Phytoestrogens: the biochemistry, physiology, and implications for human health of soy isoflavones. Am. J. Clin. Nutr. 68:1333S-1346S. 1998.
14. Andlauer, W. et al. Absorption and metabolism of genistein in isolated rat small intestine. J. of Nutr. 130:843-846. 2000.
15. Watanabe, S., Yamaguchi, M., Sobue, T., Takahashi, T., Miura, T., Arai, Y., Mazur, W., Wahala, K. and Adlercreutz, H.. Pharmacokinetics of Soybean Isoflavones in Plasma, Urine and Feces of Men after Ingestion of 60 g Baked Soybean Powder (Kinako). J. of Nutr. 128:1710-1715. 1998.
16. Zhang, Y., Song, T., Cunnick, J., Murphy, P. and Hendrich, S.. Daidzein and Genistein Glucuronides in vitro are Weakly Estrogenic and Activate Human Natural Killer Cells at Nutritionally Relevant Concentrations. J. of Nutr. 129:399-405. 1999.
17. Cassidy, A., Bingham, S. and Setchell, K.D.. Biological effects of a diet of soy protein rich in isoflavones on the menstrual cycle of premenopausal women. Am. J. Clin. Nutr. 60:333-340. 1994.
18. Wangen, K.E., Duncan, A., Xu, X., and Kurzer, M.. Soy isoflavones improve plasma lipids in normocholesterolemic and mildly hypercholesterolemic postmenopausal women. Am. J. Clin. Nutr. 73:225-231. 2001.
19. Coward, L., Barnes, N., Setchell, K., Barnes, S.. Genistein, Daidzein, and their B-glycoside conjugates: antitumor isoflavones in soybean foods from american and asian diets. J. Agri. Food Chem. 41, 1961-1967. 1993.
20. Adlercreutz, H., Mazur, W., Bartels, P., Elomaa, V., Watanabe, S., Wahala, K., Landstrom, M., Lundin, E., Bergh, A., Damber, J., Aman, P., Widmark, A., Johansson, A., Zhang, J. and Hallmans, G. . Phytoestrogens and prostate disease. J. Nutr. 130:658S-659S. 2000.
21. Davis, Joanne, N., et al. Molecular mechanism of cell growth inhibition and apoptosis induced by isoflavone-genistein in prostate cancer cell lines. Proc. Amer. Assoc. Cancer Res. 39. 1998.
22. Lamartiniere, C., Cotroneo, M., Fritz, W., Wang, J., Mentor-Marcel, R. and Elgavish A. Genistein chemoprevention: Timing and mechanisms of action in Murine Mammary and Prostate. J. Nutr. 132: 552S-558S. 2002.
23. Hasler, Clare, M.. Phytoestrogens and Breast Cancer. Proc. Amer. Assoc. Cancer Res. 39. 1998.
24. Brouns, F.. Soya isoflavones: a new and promising ingrediente for the health foods sector. J. Agri. Food Chem. 35, 187-193. 2002.
25. Stechell, K.. Soy Isoflavones. Benefits and risks from nature's Selective Estrogen Receptor Modulators [SERMs]. J. Am. College of Nutr. 20:354S-362S. 2001.
26. Eldridge, A. and Kwolek, W. Soybeans isoflavones: effect of environment and variety on composition. J. Agric. Food Chem. 31:394-396. 1983.
27. Murphy, P., Barua, K., Hauck, C. Solvent extraction selection en the determination of isoflavones in soy foods. J. Chrom. B. 777:129-138. 2002.
28. Kim, J., Hong, S., Jung, W., Yu, C., Ma, K., Gwag, J., Chung, I. Comparison of isoflavones composition in seed, embryo, cotyledon and seed coat of cooked-with-rise and vegetable soybean (*Glycine max L.*) varieties. Food Chem. 15 September 2006.
29. Nakamura, Y., Kaihara, A., Yoshii, K., Tsumura, Y., Ishimitsu, S. and Tonogai, Y. Content and Composition of Isoflavonoids in Mature or Immature Beans and Bean Sprouts Consumed in Japan. J. Health Science. 47(4) 394-406. 2001.
30. Grün, I., Adhikari, K., Li, C., Lin, B., Zhang, J. and Fernando, L.. Changes en the profile of Genistein, Daidzein, and their conjugates during thermal processing of Tofu. J. Agric. Food Chem. 49:2839-2843. 2001.
31. Coward, L., Smith, M., Kirk, M. and Barnes, S.. Chemical modification of isoflavones during cooking and processing. Am. J. Clin. Nutr. 68:1486S-91S. 1998.
32. Pandjaitan, N., Hettiarachchy, N. and Ju, Z.U.. Enrichment of Genistein in soy protein concentrate with β -glucosidase. J. Food Sc. 65:3. 403-407. 2000.
33. Cheftel, J.C., Cuq, J.L. and Lorient, D. "Proteines Alimentaires". Tec & Doc Lavoisier, Paris. 1985.
34. Wang, H. and Murphy, P. Isoflavone composition of American and Japanese soybeans in Iowa: effects of variety, crop year, and location. J. Agric. Food Chem. 42: 1674-1677. 1994.
35. Eldridge, A.. High-performance liquid chromatography separation of soybean isoflavones and their glucosides. J. Chromatography. 234, 494-496. 1982.

■ Isoflavonas en soja, contenido de Daidzeina y Genisteina y su importancia biológica

36. Wang, H.J. and Murphy, P.A.. Mass balance study of isoflavones during soybean processing. *J. Agric. Food Chem.* 44, 2377-2383. 1996.
37. Murphy, P. Phytoestrogen content of processed soybean products. *Food Technology*. January 1982.
38. Wang, C., Ma, Q., Pagadala, S., Sherrard, M., and Krishnan, P.. Changes of isoflavones during processing of soy protein isolates. *J. AOCS*, 75. Nro. 3. 1998.
39. Batt,H.,Thhmas,R.,Rao,A..Characterizationofisoflavones in membrane-processed soy protein concentrate. *J. Food Science*. 68, Nro. 1. 2003.