

DESARROLLO DE UNA METODOLOGIA ANALITICA PARA CUANTIFICAR AZUCARES EN POROTO DE SOJA

Julietta Chale^{1}, María Soledad Moro², Abel Farroni²*

Palabras clave: HPLC, Sacarosa, Rafinosa, Estaquiosa, Oligosacáridos.

En el laboratorio de calidad de alimentos, suelos y agua se realizó el desarrollo y estandarización de una metodología para la separación, identificación y cuantificación de azúcares como sacarosa (S), rafinosa (R) y estaquiosa (E) por cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un detector de índice de refracción (HPLC-IR). Se realizó la puesta a punto de la técnica de extracción y cuantificación de azúcares solubles en agua en harina y poroto de soja.

INTRODUCCION

Debido al constante mejoramiento genético en los diferentes cultivos se han producido incrementos en los rendimientos por hectárea y cambios en el contenido de nutrientes (Azcona *et al.*, 2007). En relación a las harinas de soja, existen antecedentes que muestran diferencias en su valor nutricional según el país de origen (de Coca-Sinova *et al.*, 2008).

Estudios realizados en INTA (Azcona comunicación personal) mostraron que al comparar harinas de soja producidas en Argentina se observaron mejoras en la utilización de la energía bruta (EMV/EB) al reducirse el contenido de fibra cruda. En el mismo estudio se analizaron harinas de distinta procedencia (USA y Brasil) y se observó que la harina de USA presentó un contenido de fibra (3.69%) intermedio entre la baja fibra Argentina (4.06%) y la Brasileña (3.26%). A su vez, la que mejor EMV/EB presentó fue la harina de USA (69.2%), luego la Argentina (67.6%) y por último la Brasileña (66.8%). Estos resultados podrían estar asociados a diferencias en el contenido de polisacáridos de acuerdo con la procedencia de las muestras.

Según resultados preliminares obtenidos en INTA (PNPA 1126053 – Proyecto Específico de Nutrición de Monogástricos), en el caso de la soja integral, el contenido total de polisacáridos disminuye como consecuencia de una disminución del contenido de S, R y E. Por su parte, el contenido de polisacáridos de las distintas sojas producidas

en un mismo ambiente fue variable siendo los valores extremos 37,2% y 22,9%. Estos resultados indicarían que el contenido de azúcares varía según genotipo y zona (ambiente). Por otro lado, existen estudios que demuestran una correlación negativa entre el contenido de polisacáridos y el aprovechamiento de la energía (Iglesias *et al.*, 2015). Esto resalta la importancia de conocer las distintas fracciones químicas de azúcares y su efecto sobre la digestibilidad de la soja.

Existen varios métodos para determinar azúcares en poroto de soja incluyendo la cromatografía gaseosa, enzimáticos, que presentan el problema de no diferenciar estaquiosa y rafinosa y el método elegido para el presente trabajo, cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

En base a estos antecedentes, surge la importancia de determinar la relación entre el contenido de azúcares de distintas variedades de soja y la energía metabolizable del poroto de soja.

OBJETIVO

Desarrollar un método para la separación, identificación y cuantificación de azúcares libres como S, R y E presentes en poroto y harina de soja por HPLC-IR.

MATERIALES Y METODOS

Se utilizaron dos muestras diferentes, harina de soja (3330 Protoil) y poroto de soja (3312 INTA Oliveros 14-15), desactivadas a escala de laboratorio según protocolo establecido (Chale *et al.*, 2017). Además se probaron dos tiempos de ex-

1-Sección Aves.

2- Laboratorio de Calidad de Alimentos, Suelos y Agua. EEA Pergamino Av. Frondizi (Ruta 32) km 4.5 – (2700) Pergamino – Buenos Aires

* chale.julieta@inta.gob.ar

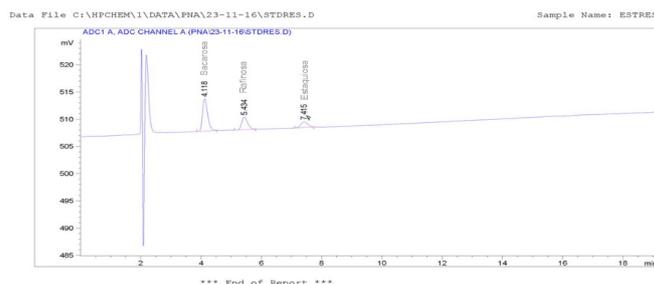


Figura 1. Cromatograma correspondiente a una mezcla de estándares de S, R y E. Sobre cada pico se indica el nombre del azúcar y el tiempo de retención en minutos.

tracción 30 y 60 min. El poroto de soja se molió en un molino de impacto refrigerado, se realizaron dos ciclos de 30 s utilizando un tamiz de 0,5 mm. Los lípidos se extrajeron con hexano por la metodología Twisselman utilizando 5 g de harina o poroto de soja molido.

Para realizar la extracción de los azúcares se colocaron 200 mg de muestra en un tubo de centrifuga, se agregaron 7,5 ml de acetonitrilo (ACN), grado HPLC (LiChrosolv®, Merck) y 7,5 ml de agua para inyectable (API) provista por el Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas “Dr. Julio I. Maiztegui” filtrada con membrana de nylon 0,22 μm . Se agitó en vortex cada 5 min por 5 s durante 30 y 60 min. Se centrifugó a 5000 rpm por 15 min y se separó el sobrenadante. Se repitió la extracción juntando ambos sobrenadantes. El extracto se filtró por membrana de nylon de 0,22 μm a viales para HPLC.

Para calcular la recuperación se prepararon muestras enriquecidas con una cantidad conocida de estándar de sacarosa y luego se realizó la extracción como se detalla en el párrafo anterior.

Los estándares, las muestras y las muestras enriquecidas se analizaron utilizando un equipo HPLC 1050 (Hewlett-Packard) acoplado a un detector de Índice de Refracción HP 1047 A. Se separaron a través de una columna con grupos amino (Kromasil KR100-5NH₂ 250 x 4,6 mm y pre-columna G100-5-NH₂ KIT 4,6mm START KIT 100-5NH₂) utilizando como fase móvil ACN:H₂O (60:40) con un flujo de 1,5 ml/min a 30°C y un volumen de inyección 10 μl .

Para el presente ensayo se realizaron las curvas de calibración a partir de diluciones de estándares dentro del rango óptimo de concentración que se encuentra en la bibliografía para los distintos azúcares (González, *et al.*, 2009). Los rangos ensayados fueron para Sacarosa 100-2000 mg/l (*BioUltra*, for molecular biology, $\geq 99.5\%$, Sigma - Aldrich); Rafinosa 100-600 mg/l (D-(+)-Raffinose

pentahydrate – BioXtra, $\geq 99\%$ Sigma - Aldrich); y Estaquirosa 100-900 mg/l (Stachyose hydrate, $\geq 98\%$, Sigma - Aldrich). El porcentaje de azúcares se calculó integrando el área de los picos de los cromatogramas y aplicando la ecuación de la recta obtenida en las curvas de calibración. El resultado se expresó en g % en base seca (g de azúcar en 100 g de poroto de soja).

RESULTADOS

En la figura 1 se muestra un cromatograma correspondiente a una mezcla de estándares de los tres azúcares estudiados. Los tres estándares presentaron una completa separación con picos simétricos y luego de cada pico el cromatograma retomó la línea de base. Se calculó el factor de resolución (R) el cual es una medida cuantitativa del grado de separación de dos picos. Un valor de 1,5 representa una separación hasta la línea base de ambos picos y un valor de 1,0 representa una resolución del 90%. En algunos casos esto es suficiente para los cálculos del área de los picos (análisis cuantitativo). Valores de Rs < 1 indican solapamiento; valores de Rs ≥ 1 indican separación. El valor obtenido entre los picos de S y R fue de 1,827 y entre R y E fue de 2,225. Si bien el cromatograma presentado llega hasta los 15 minutos cuando se corrieron las muestras se observó que no aparecen picos después de los 10 minutos y se seleccionó este tiempo de corrida.

A continuación se muestran las curvas de calibración obtenidas con la ecuación de la recta para S (Figura 2), R (Figura 3) y E (Figura 4). Los tiempos de retención de los estándares fueron de 4, 5 y 7 min para S, R y E respectivamente.

En la tabla 1 se muestran los resultados obtenidos de las muestras fortificadas con sacarosa comparados con las muestras sin fortificar. A partir de la diferencia entre estos valores se calculó el porcentaje de recuperación para cada una de las extracciones a 30 minutos y 60 minutos.

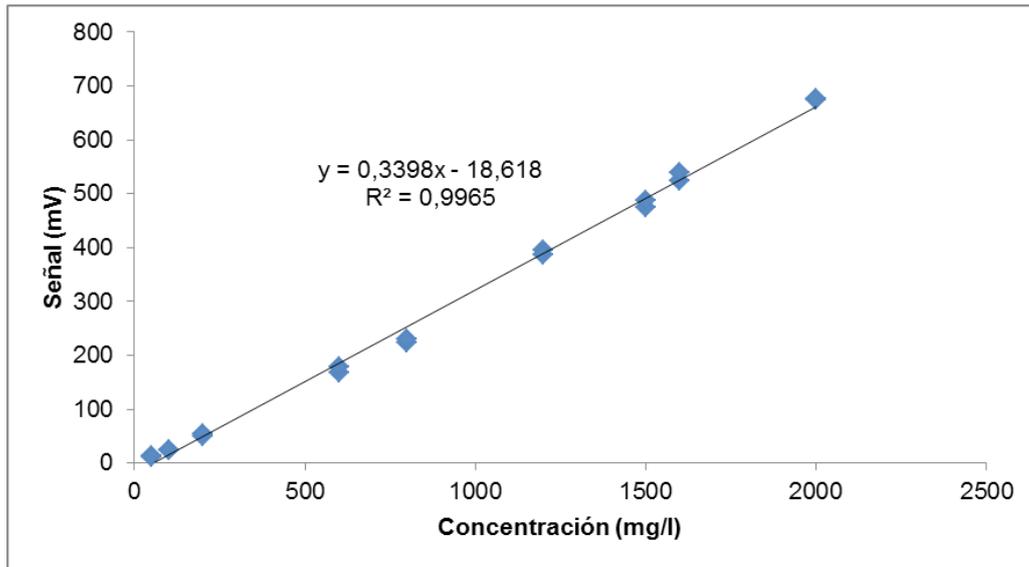


Figura 2. Curva de calibración sacarosa

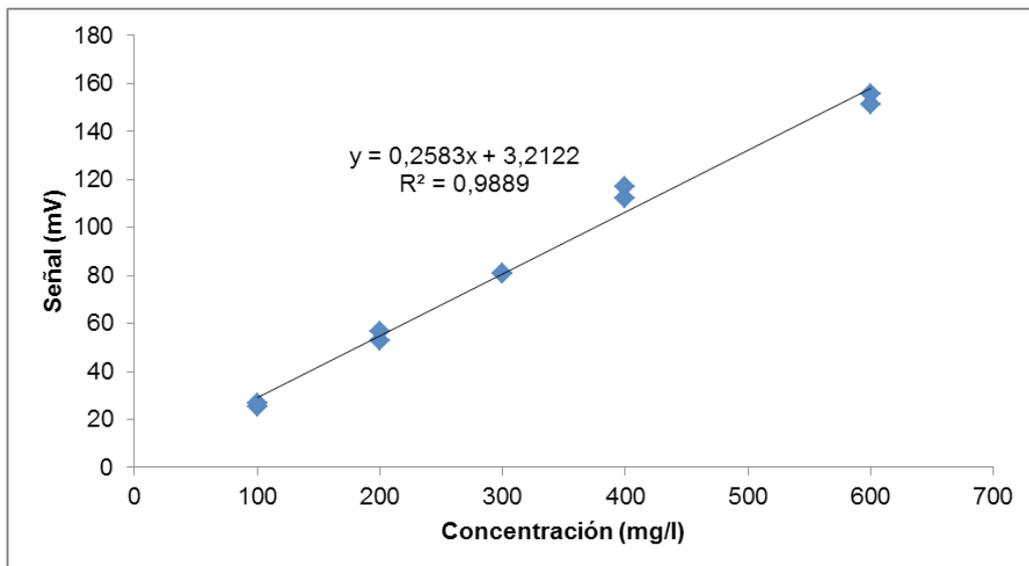


Figura 3. Curva de calibración refinosa.

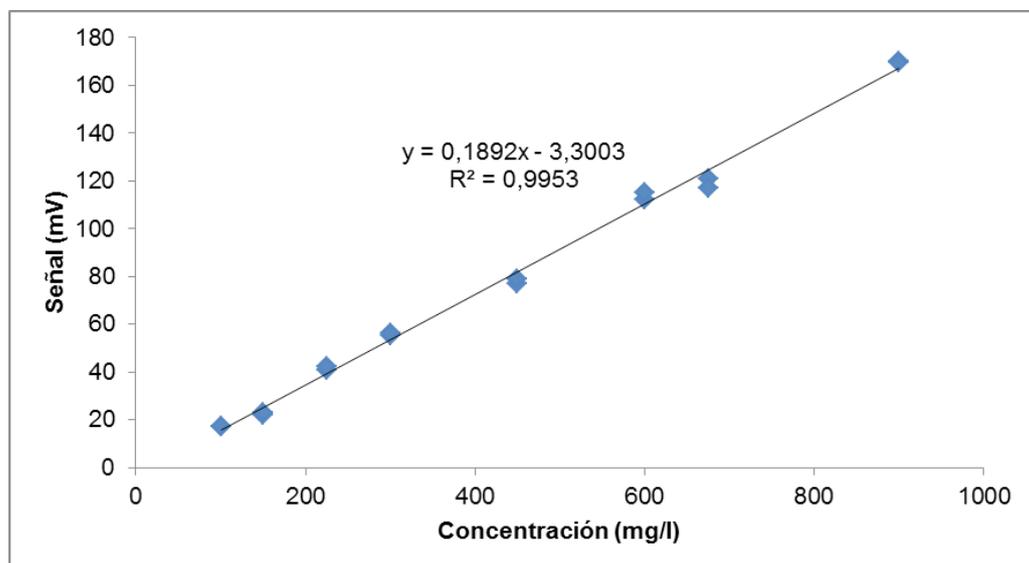


Figura 4. Curva de calibración estaquiosa.

**Tabla 1.** Porcentaje de recuperación de sacarosa

| Muestra | Tiempo (min) | Agregado de S (mg) en 0,2 g de muestra | Sacarosa (mg/0,2 g muestra) | Recuperación (mg) | Recuperación (%) |
|----------------|--------------|--|-----------------------------|-------------------|------------------|
| Poroto de soja | 30 | - | 16,6 | 10,3 | 81,7 |
| Poroto de soja | 30 | 12,6 | 26,9 | | |
| Poroto de soja | 60 | - | 15,9 | 10,9 | 87,2 |
| Poroto de soja | 60 | 12,5 | 26,8 | | |
| Harina de soja | 30 | - | 17,8 | 10,8 | 87,8 |
| Harina de soja | 30 | 12,3 | 28,6 | | |
| Harina de soja | 60 | - | 17,5 | 11,0 | 88,0 |
| Harina de soja | 60 | 12,5 | 28,5 | | |

Todas las recuperaciones fueron superiores al 80% que es el valor mínimo aceptable según las normas de la United States Pharmacopeial, 2018. Cuando se extrajo durante 60 minutos no se observó un incremento significativo de la recuperación.

CONCLUSIONES

Se desarrolló la metodología para la cuantificación de azúcares por HPLC estandarizando los parámetros cromatográficos como flujo, fase móvil, temperatura y tiempo de corrida de 10 min. Con los parámetros establecidos se logró una buena separación e identificación con los tiempos de retención de los estándares S, R y E. Se realizaron las curvas de calibración para la cuantificación de los azúcares.

El tiempo de extracción de azúcares solubles en agua de 30 min presentó una recuperación aceptable de S (>80 %) y permite hacer más eficientes los tiempos de análisis.

La metodología establecida puede ser utilizada para la cuantificación de azúcares libres en soja.

BIBLIOGRAFIA

Azcona, J. O., Iglesias, B. F., Morao, L. R., & Schang, M. J. (2007). Composición de ingredientes argentinos: maíz y soja. *I Congreso Argentino de Nutrición Animal* (pp. 89-96). Parque Norte - Buenos Aires: CAENA.

Iglesias, B. F., Azcona, J. O., Schang, M. J., & Charrière, M. V. (2015, 9). Avances en la caracterización nutricional de maíz y soja. *Agroindustria*(136), 18-30.

González, M., Hermida, M., Sueiro, S., Serrano, M. P., & G.G., M. (2009). Estudio comparativo del contenido en azúcares (sacarosa, estaquiosa y rafinosa) de la harina de soja según procedencia. *AIDA, XIII Jornadas sobre Producción Animal*, Tomo I, 211-213.

Chale, J., Iglesias, B. F., Azcona, J. O., Charrière, M. V., Cabrera, A. M., & Christeler, B. (2017). Desarrollo de una metodología para el desactivado de poroto de soja a escala de laboratorio. *Agroindustria*, 35(145), 62-65.

United States Pharmacopeial USP41 (2018) <1225> Validation of compendial procedure <<



DECARGAR ARTÍCULO