

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.

La bibliografía analizada para desarrollar el presente trabajo básicamente cubrió los aspectos biológicos de las isoflavonas; su distribución en las semillas de soja y durante todo el proceso de manufactura de la bebida de soja y el tofu; la puesta a punto de métodos de extracción de isoflavonas desde las diferentes muestras y de la metodología analítica a utilizar.

Se elaboraron a escala de laboratorio e 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.

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 isoflavona, la genisteína, que se encuentra presente en la semilla de soja, como aglucona o como conjugados glucosílicos ⁽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, aterosclerosis 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 Nóbel 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 podría 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 hipocotiledon (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 polaridad, 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 potentemente 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-trihidroxiisoflavona) y daidzeína (4',7-dihidroxiisoflavona) y sus respectivos β -

glicósidos, 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-metoxiisoflavona) y su glicósido, 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-hidroxiisoflavona), 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).

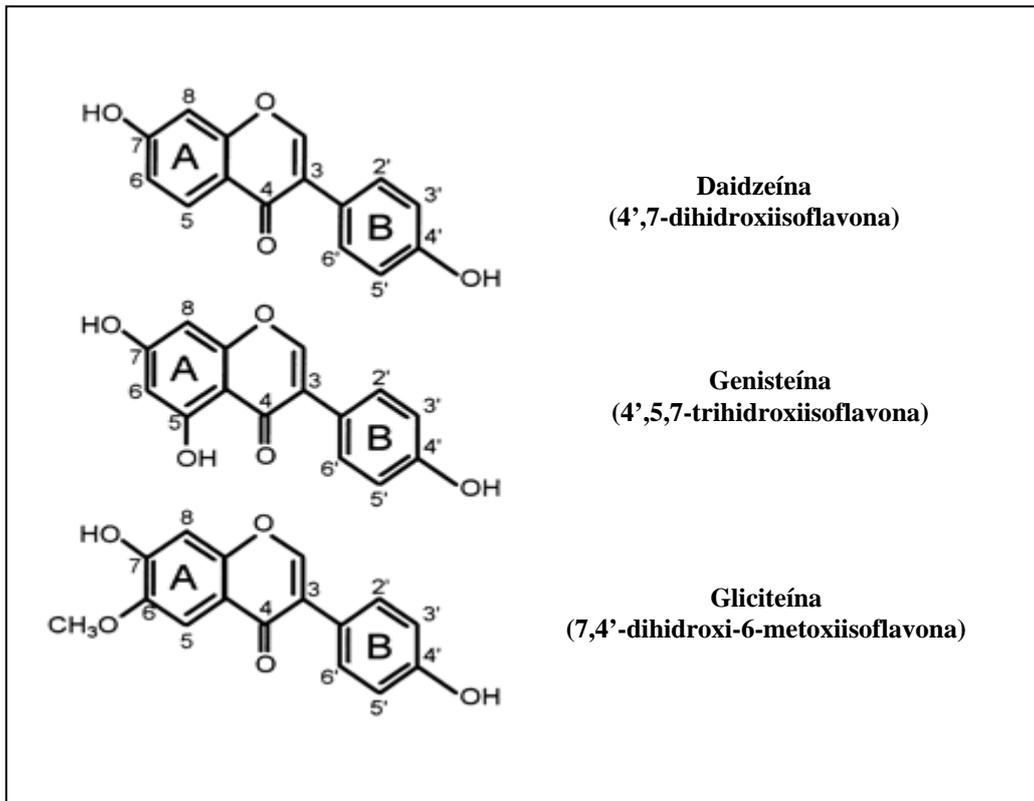


Figura 1: Estructura química de las isoflavonas primarias en el proto de soja (11).

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-etilfenol y dihidrogenisteína. Mientras que la daidzeína se convierte en α -desmetilangolesina, 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 17β-estradiol de los receptores estrogénicos (5).

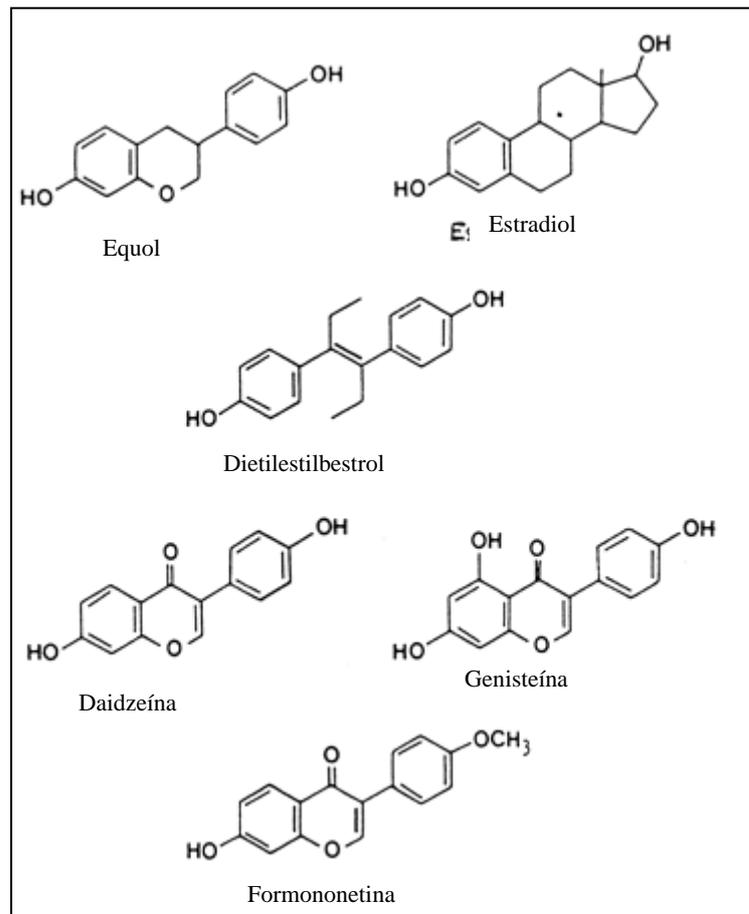


Figura 2: Comparación de las estructuras químicas del equol, formado en el tracto intestinal humano y animal, estradiol, dietilestilbestrol y otros fitoestrógenos de origen vegetal (9).

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 familia 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-esteroides (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 hipercolesterolémicas. 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 isoflavona 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 x

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 citoplasmática e inhibe las topoisomerasas 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 (1).

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 inducción 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 isoflavona 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 prepuberal, 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 (5).

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).

Aparte 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 aterosclerosis, una respuesta secundaria a la hipercolesterolemia y dislipemia, empeora la reactividad vascular coronaria. En un estudio realizado con monos rhesus ateroscleróticos, 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- Composición del Poroto de Soja

1.7.1- Características Macroscópicas

Los porotos de soja maduros son de forma casi esférica y varían considerablemente en tamaño, dependiendo de las condiciones de cultivo y crecimiento. Su diámetro generalmente varía entre 5 y 10 mm y su peso (dependiendo de la variedad) entre 50 y 400 mg.

Morfológicamente, la semilla de soja consta de tres partes principales, la llamada cobertura de la semilla (también conocida como testa o cáscara), los cotiledones y el germen (hipocotílico). La cobertura de la semilla forma la mayor parte externa de la semilla de soja. Contiene un área fácilmente identificable conocida como hilum que tiene un color distinto al resto de la cobertura de la semilla. Algunas variedades tienen un hilum negro, otros grises o color café. Debido a que el hilum oscuro puede contaminar los productos elaborados a partir de soja, las variedades de hilum claras son generalmente las preferidas para el procesamiento. Las variedades de campo comunes tienen una cobertura externa de color amarillo, pero existen algunas variedades de coberturas negras que también son cultivadas. En cualquier lote observado se podrán encontrar semillas verdes, cafés y semillas bicolor.

El color de la cobertura de la semilla es uno de los criterios considerados para clasificar el poroto soja para propósitos comerciales. La integridad de la cobertura de la semilla es también un importante criterio de calidad.

La semilla de soja es dicotiledónea, lo que significa que tiene dos cotiledones. La cobertura de la semilla mantiene a los dos cotiledones juntos. En el momento de remover la cobertura de la semilla, los dos cotiledones se separan. El germen también es desalojado en el proceso. El germen está ubicado arriba del hilum en el mismo eje y puede ser visto a través de la cobertura de la semilla en un poroto mojado.

Los cultivos de soja comerciales constituidos aproximadamente así: 8% cáscara, 90% cotiledón y 2% hipocotiledón (26, 27, 28).

1.7.2- Características Microscópicas

El cotiledón contiene la mayoría de la proteína y el aceite. El grueso de la proteína de soja está almacenado en cuerpos proteínicos dentro de las células del cotiledón. Estos cuerpos proteínicos tienen un diámetro de 2 a 20 micrones y el contenido proteínico de los cuerpos de aislados de proteína es del 80-90 %. Los cuerpos proteínicos, los cuales son frágiles, pueden ser tratados con calor y aislados con procedimientos adecuados. El aceite también está contenido en unas estructuras sub-celulares llamados cuerpos

lipídicos, estos son esféricos y mucho más pequeños en tamaño que los cuerpos proteínicos (26, 27).

1.7.3- Composición Química

La composición química del poroto de soja se resume en la tabla 1.

Humedad

Si bien la composición química está reportada en el peso en base seca, el poroto de soja contiene humedad. El contenido ideal de humedad para el almacenamiento a largo plazo es de aproximadamente 12 %.

Proteína

El poroto de soja contiene aproximadamente 40% de proteínas. La soja es limitante en aminoácidos azufrados cistina y metionina, pero contiene suficiente lisina para superar la deficiencia de lisina de los cereales.

Lípidos

En general, el contenido de aceite de la soja es del 20 % en base seca. Más del 80 % de los ácidos grasos constituyentes del aceite de soja son insaturados, siendo los ácidos oleico y linoleico los predominantes. Además, la soja también contiene de 7 a 9% de ácido linoleico triinsaturado. El aceite de soja crudo contiene aproximadamente el 2% de fosfolípidos también conocidas como gomas.

Hidratos de Carbono

Los porotos de soja enteros contienen aproximadamente el 35% de carbohidratos de peso en base seca.

Minerales

El contenido total de minerales de la soja se determinó por ceniza en 5% de peso en base seca.

Vitaminas

Casi todas las vitaminas principales, excepto la vitamina C y D están presentes en cantidades variables. Las vitaminas hidrosolubles tiamina, piridoxina y ácido fólico son las que están presentes en mayores proporciones.

Parte de la semilla	% de peso de la semilla	% (en base seca)			
		Proteínas Nx6.25	Lípidos	Carbohidratos (incl. fibra)	Cenizas
Cotiledón	90	43	23	43	5.0
Cáscara	8	9	1	86	4.3
Hipocotiledón	2	41	11	43	4.4
Semilla entera	100	40	20	35	4.9

Tabla 1: Composición química aproximada (29).

1.7.4- 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 (30).

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 (31). 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 poroto más rica en estos fitoestrógenos (32).

Nakamura Y. y colaboradores (33), en un estudio realizado en 2001, observaron que la composición de las isoflavonas difiere significativamente en los diferentes estadios 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 aglicona que en la forma glucósida. 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 (6OAcGlc) (6''-O-acetilgenistina, 6''-O-acetildaidzina, y 6''-O-acetilglicitina), y como malonil-glucósido (6OMalGlc) (6''-O-malonilgenistina, 6''-O-malonildaidzina, 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 (34), 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 (31).

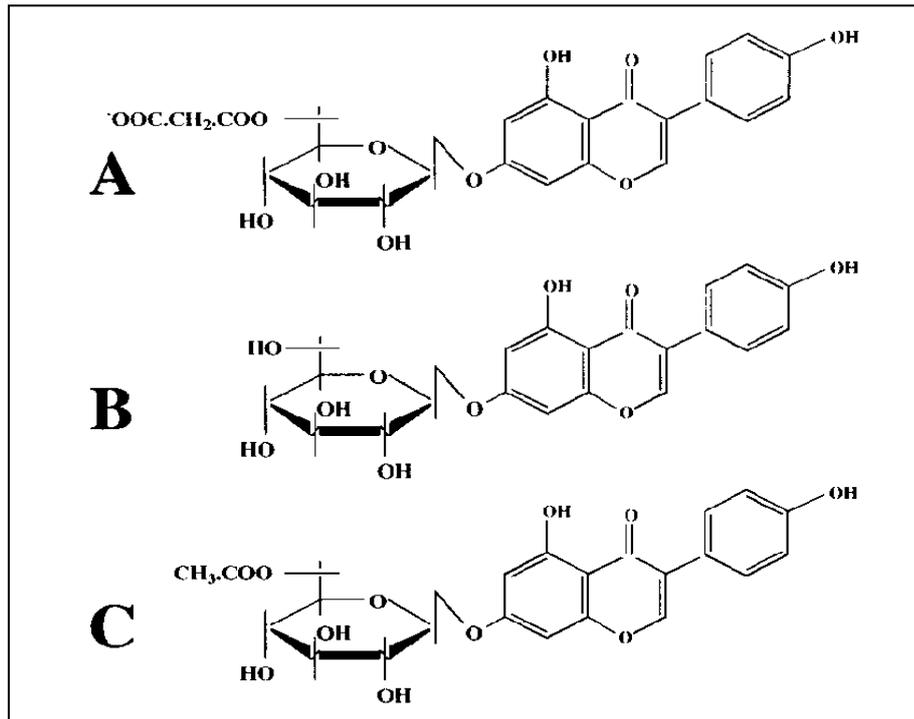


Figura 3: Estructuras químicas de los conjugados glucósidos de la genistéina encontrados en los alimentos de soja. **A**, 6''-O-malonil-β-glucósido; **B**, β-glucósido; **C**, 6''-O-acetil-β-glucósido (35).

Los alimentos de soja fermentados tales como el miso y el tempeh contienen las agluconas 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 (35) 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 6OMalGlc 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 6OMaGlc, pero en una relación mucho menor. Los conjugados 6OMaGlc fueron estables durante más de 24 horas a 4 °C, pero la conservación por varios días en frío también causó pérdidas de los mismos.

1.8.1- 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 6OAcGlc. Las formas 6''-O-Acetil 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 agluconas. La *cocción en horno* de los productos alimenticios da como resultado mayoritariamente los conjugados β -glucósidos, mientras que los *productos fritos* contienen más 6OAcGlc conjugados (31, 35).

Los procesos que involucran líquidos, tales como el lavado, el remojo y la ebullición, reducen el contenido de isoflavonas totales (34).

1.8.2-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 remojo 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 (31).

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

Pandjaitan y col. (36) 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 consiste en evaluar el contenido de las isoflavonas Genisteína y Daidzeína en soja y productos derivados.

Para realizar la investigación formulamos objetivos específicos detallados a continuación.

1. Desarrollar y validar un método cromatográfico capaz de identificar y cuantificar cada uno de estos analitos en las muestras seleccionadas.
2. Determinar las concentraciones de Genisteína y Daidzeína en porotos de soja sean o no manipulados genéticamente.
3. Simular procesos industriales a escala de laboratorio para obtener los sub-productos derivados de la soja: bebida o “leche” y tofu.
4. Cuantificar ambas isoflavonas en cada paso del proceso de obtención de los subproductos, incluidos los residuos okara y sobrenadante del tofu; y evaluar las posibles pérdidas de las mismas.
5. Evaluar la incidencia de los procesos tecnológicos sobre la concentración de isoflavonas, a saber, la temperatura de cocción de la bebida para la obtención de tofu y los diferentes coagulantes utilizados en la manufactura del tofu.
6. Cuantificación de las isoflavonas en harinas desgrasadas obtenidas directamente de industrias de la zona.

3- MATERIALES Y MÉTODOS

3.1- Muestras a analizar

Las muestras a estudiar fueron preparadas a escala de laboratorio imitando los procesos de industrialización. Para ser analizadas en el sistema cromatográfico debieron tratarse haciendo una preparación previa a la inyección en el equipo de HPLC o “clean up” de las mismas (3.2). Con este paso previo se obtienen extractos limpios y puros de manera de no contaminar con residuos las columnas cromatográficas y reducir o eliminar las posibles interferencias.

3.1.1- Semillas

Las semillas de soja transgénicas y no modificadas genéticamente fueron provistas por productores de la localidad de Emilia, provincia de Santa Fe. Para hacer la evaluación utilizamos dos variedades de semillas no modificadas genéticamente identificadas como Soja no transgénica A y Soja no transgénica B; y cuatro variedades de semillas transgénicas: soja transgénica A, soja transgénica B, soja transgénica C y soja transgénica D.

3.1.2- Preparación de la bebida “leche” de soja

Las muestras de “leche” de soja se prepararon imitando procesos industriales a escala de laboratorio en el ITA mediante procedimientos publicados por W.J. Mullin y col. (37); los mismos se detallan a continuación.

Se remojaron las semillas de soja con agua durante un día a temperatura ambiente, se escurrieron, se lavaron con agua fría y se escurrieron nuevamente. La cantidad de agua agregada a las semillas fue la suficiente como para cubrirlas. La temperatura de trabajo fue la ambiente, aproximadamente 20°C. En estas condiciones se trituraron los porotos. Luego se calentó la mezcla a 60°C y se agitó durante 3 minutos. Por último se realizó una filtración de la suspensión, separación la “leche” y obtención de la pasta residual llamada okara (también para analizar).

3.1.4- Preparación del Tofu

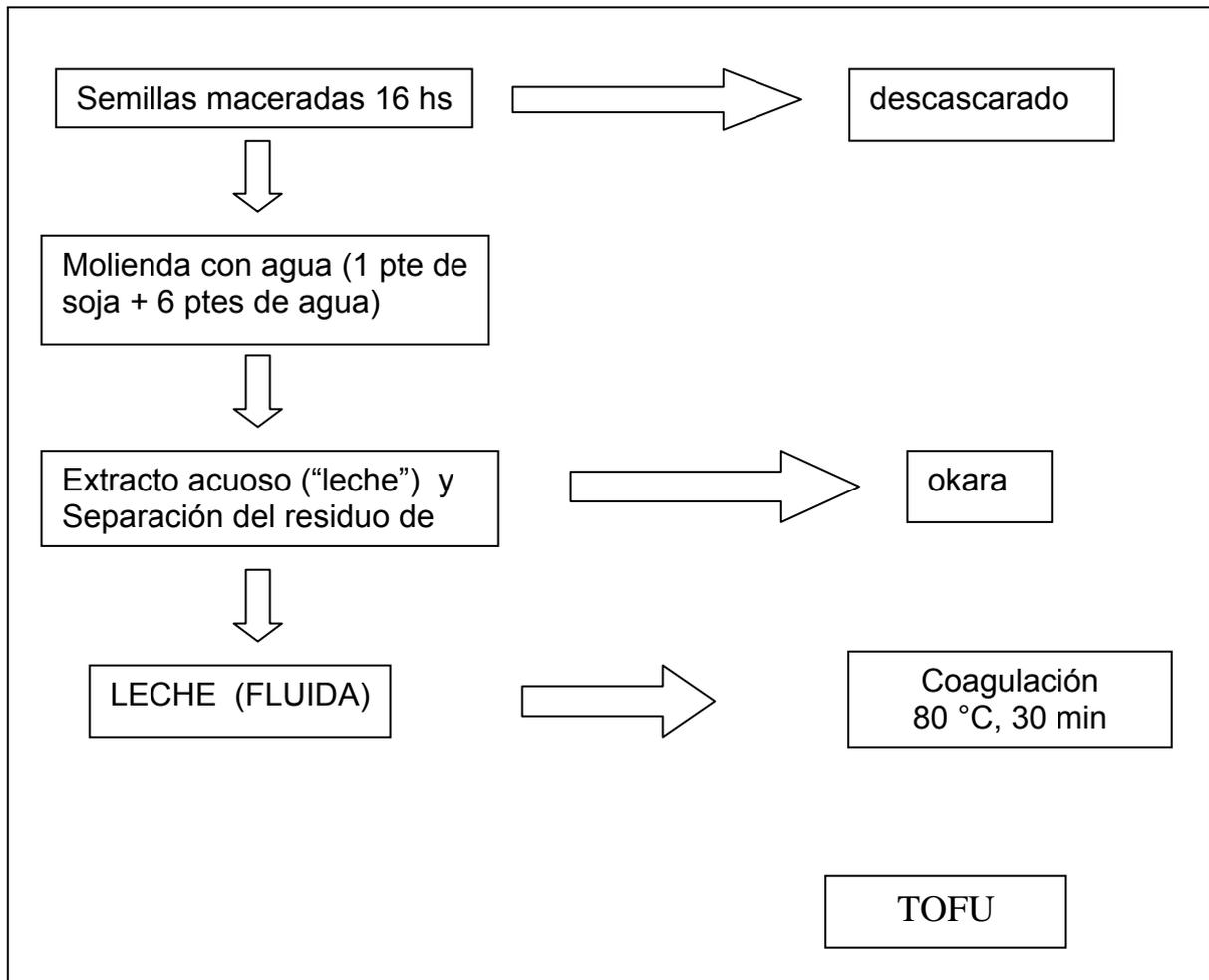
Para obtener las muestras de tofu a escala de laboratorio y también imitando procesos industriales se siguió paso a paso el proceso detallado por W.J. Mullin y col. (37).

Se calentó la “leche” de soja, obtenida en el punto anterior, en un recipiente sobre una placa caliente. El recipiente que contenía la muestra fue de un tamaño adecuado para prevenir cualquier pérdida de la muestra debido a la formación de espuma durante el calentamiento. Luego de que la temperatura de la leche alcanzó los 90 °C, se comenzó a agitar,

posteriormente se incrementó la temperatura de la leche a 98 °C y se mantuvo a esta temperatura durante 4 minutos con agitación para evitar que hierva. Se mezcló la “leche” de soja calentada y el coagulante suavemente durante 3 segundos (para asegurar una buena dispersión del coagulante) y se dejó reposar durante 30 minutos a temperatura ambiente. Luego se prensó cuidadosamente el gel con un paño fino de poliéster y se sumergió en agua corriente fría durante 1 hora. El tofu se retiró del agua fría y se escurrió. El agua obtenida durante el prensado se reservó para ser analizada.

A fines de evaluar la incidencia de los diferentes coagulantes en la calidad del tofu obtenido, se prepararon tofus con tres coagulantes diferentes. Sulfato de calcio ($\text{SO}_4\text{Ca}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$), cloruro de magnesio (Cl_2Mg) y glucono delta lactona (GDL). La preparación consistió en tomar 3 alícuotas 50 ml de leche cada una, obtenida en el punto anterior, y agregar a cada porción 86.1 mg de cada coagulante antes mencionado.

DIAGRAMA DE FLUJO DE LA PREPARACION DE BEBIDA DE SOJA Y TOFU a PARTIR DE SEMILLAS



3.1.5- Harinas

Las muestras de harina fueron provistas por industrias del sector, todas fueron harinas desgrasadas obtenidas a partir de soja transgénica no tratadas térmicamente.

3.2- Preparación de los extractos para ser inyectados en el sistema cromatográfico

A. Eldridge ⁽³⁸⁾ investigó la utilización de diferentes solventes para la extracción de las isoflavonas desde las semillas de soja y derivados y concluyó que los resultados más reproducibles y la máxima extracción se obtenía con una mezcla de metanol - agua al 80%. Nosotros hemos realizado el ensayo utilizando esta mezcla pero no obtuvimos resultados satisfactorios.

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. ⁽³⁹⁾ y se detallan en los puntos siguientes. Lin y col. ⁽⁴⁰⁾ estudiaron los efectos de la polaridad del solvente en la eficiencia de la extracción y observaron que solventes con mayor polaridad extrajeron cantidades significativamente mayores de isoflavonas.

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. Un S.I. ideal es aquel compuesto que está estructuralmente relacionado al analito y con una polaridad similar pero con un tiempo de retención que no se superponga con otros picos en el cromatograma. La mayoría de los compuestos utilizados como S.I. no están estructuralmente relacionados con los analitos o tienen tiempos de retención que se confunden con los de otros picos de isoflavonas. La flavona, usado como S.I., eluye mucho más tarde que la última isoflavona, la genisteína. Debido a que el uso de la flavona como S.I. aumenta en gran medida el tiempo de análisis para cada muestra, no sería un buen S.I.. La 2,4,4'-trihydroxideoxi-benzoína (THB), utilizado por T. Song y colaboradores (41) se ajustaría más a los requerimientos analíticos. Otros investigadores (38, 42) utilizan como S.I. la n-butirofenona.

3.2.1- Extracción de las isoflavonas desde las semillas de soja

Se molieron las semillas de soja crudas (2 g) con la cáscara, y mezclaron con 2 ml de ácido clorhídrico (HCL) 0.1 N y 10 ml de Acetonitrilo (AcN), luego se sometieron a agitación continua durante 2 horas a temperatura ambiente, y se filtraron primero a través de un papel de filtro Whatman N° 1 y luego a través de un filtro de 0.45 μm . A 1 ml del filtrado le agregamos 20 μl

de Falvona como estándar interno. Se aplicaron 20 μ l de este último al cromatógrafo.

3.2.2- Extracción de las isoflavonas desde la “leche” (bebida de soja)

Mezclamos 1 ml de “leche” (bebida de soja) con con 1 ml de HCL 0.1 N y 5 ml de AcN. Luego se sometió a agitación continua durante 2 horas a temperatura ambiente, y se filtró primero a través de un papel de filtro Whatman N° 1 y luego a través de un filtro de 0.45 μ m. A 1 ml del filtrado le agregamos 20 μ l de Falvona como estándar interno. Se aplicaron 20 μ l de este último al cromatógrafo.

3.2.3- Extracción de las isoflavonas desde el tofu

Se tomaron 2 g de tofu, y mezclaron con 2 ml de HCL 0.1 N y 10 ml de AcN, luego se sometieron a agitación continua durante 2 horas a temperatura ambiente, y se filtraron primero a través de un papel de filtro Whatman N° 1 y luego a través de un filtro de 0.45 μ m. A 1 ml del filtrado le agregamos 20 μ l de Falvona como estándar interno. Se aplicaron 20 μ l de este último al cromatógrafo.

3.2.4- Extracción de las isoflavonas del residuo okara

Se tomaron 2 g de okara, y mezclaron con 2 ml de HCL 0.1 N y 10 ml de AcN, luego se sometieron a agitación continua durante 2 horas a temperatura ambiente, y se filtraron primero a través de un papel de filtro Whatman N° 1 y luego a través de un filtro de 0.45 μm . A 1 ml del filtrado le agregamos 20 μl de Falvona como estándar interno. Se aplicaron 20 μl de este último al cromatógrafo.

3.2.4- Extracción de las isoflavonas del sobrenadante del tofu

Mezclamos 1 ml de sobrenadante del tofu con con 1 ml de HCL 0.1 N y 5 ml de AcN. Luego se sometió a agitación continua durante 2 horas a temperatura ambiente, y se filtró primero a través de un papel de filtro Whatman N° 1 y luego a través de un filtro de 0.45 μm . A 1 ml del filtrado le agregamos 20 μl de Flavona como estándar interno. Se aplicaron 20 μl de este último al cromatógrafo.

3.2.5- Extracción de las isoflavonas desde las semillas de soja

Se procedió igual que con las semillas, evitando obviamente el paso de molienda.

3.3- Método Analítico para la valoración de isoflavonas en soja y derivados

El método utilizado para la determinación de isoflavonas en todo tipo de muestras se basa casi exclusivamente en la técnica de cromatografía líquida de alta performance (HPLC) con detector ultravioleta (UV). Si bien algunos autores ⁽⁴³⁾ utilizaron el detector de fluorescencia a 254 nm para identificar la isoflavona Daidzeina haciendo uso de sus propiedades fluorescentes. También hemos visto que tanto Kim y col. ⁽³²⁾ como Mahungu y col. ⁽⁴⁴⁾ analizaron las isoflavonas por HPLC, con detector de arreglo de diodos; mientras que Prabhakaran y col. ⁽⁴⁵⁾ hicieron uso de una tecnología un poco más avanzada con su HPLC-MS (espectrómetro de masa).

Teniendo en cuenta la polaridad de estos analitos, las columnas más apropiadas para realizar la separación de los mismos son las de fase reversa rellenas con sílica unida a cadenas de 18 carbonos (RP-18).

3.3.1- Equipamiento analítico utilizado

Para el análisis cromatográfico se utilizó un Cromatógrafo Líquido LaChrom Hitachi equipado con:

- Interfase D-7000
- Bomba cuaternaria L-7100

- Horno de columna L-7300
- Detector UV-visible L-7400
- Detector Fluorométrico L-7480
- Sistema de manejo de equipo y de datos: HSM

La columna utilizada para realizar la separación fue una LichroCART 125-4, RP-18 (5 μm) de Agilent Technologies.

3.3.2- 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.

3.3.3- Condiciones Cromatográficas

Las isoflavonas absorben muy bien la luz UV a 262 nm, por ello elegimos esta longitud de onda para identificar y cuantificar estos fitoestrógenos tal como lo hizo Eldrige ⁽⁴⁶⁾.

La selección de la fase móvil depende del tipo de interacción de la misma con la muestra y de la fuerza de elusión necesaria para separar los analitos en un tiempo de análisis prudencial. La fase móvil elegida consistió en una mezcla de Acido Acético en agua (0.1%) y AcN, usada por Wang y Murphy

(47). Para lograr la separación deseada utilizamos un gradiente no lineal que se detalla a continuación:

Tiempo (min)	Ac. Acético 0.1 %	AcN
0	95	5
10	78	22
18	65	35
22	65	35
30	95	5

Tabla 2: Gradiente no lineal utilizado para la separación de Daidzeína, Genisteína y Flavona.

El caudal de la fase móvil fue de 1 ml/min.

Las corridas se realizaron a temperatura ambiente.

La figura 4 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 daidzeína (la más polar), luego genisteína y por último la Flavona.

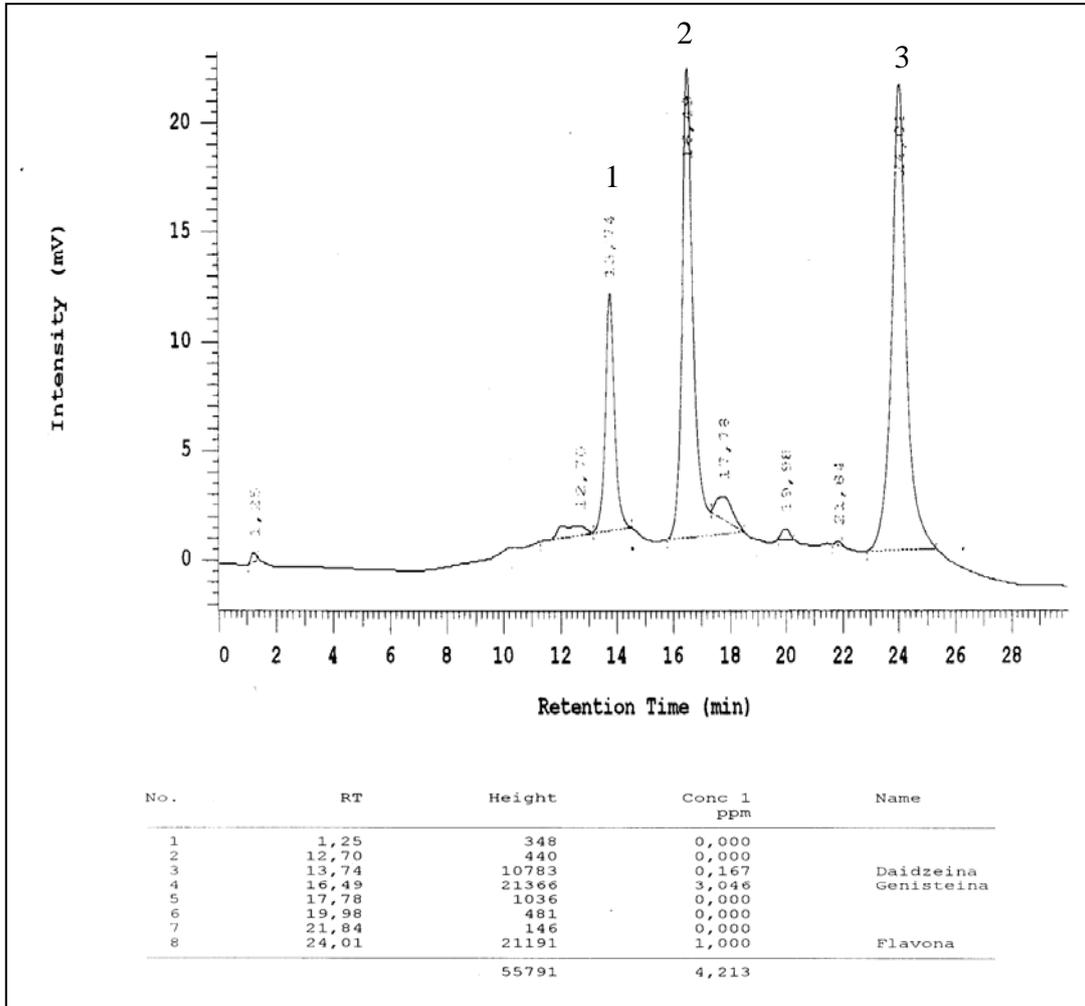


Figura 4: Comatograma correspondiente a una matriz fortificada con Daidzeína (1), Genisteína (2) y Estándar Interno Flavona (3), con los respectivos tiempos de retención.

3.4- Análisis Estadístico de los Resultados

La experimentación se realizó sobre un diseño factorial en bloques totalmente aleatorizados, y para el tratamiento estadístico de datos y evaluación de resultados se aplicó un Modelo Lineal Generalizado (48, 49).

Anexo 1.

Los resultados obtenidos se expresaron en valor promedio \pm desvío estándar y se evaluaron mediante el análisis de ANOVA, con un nivel de confianza del 95%. Este análisis fue realizado utilizando el software de análisis estadístico STATGRAPH Plus 3.0.

4- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1- Validación del Método Cromatográfico

4.1.1- Preparación de una matriz libre de analitos

A la hora de evaluar cada uno de los parámetros de validación, fue necesario preparar una matriz de características similares a las muestras a analizar, pero que no contenga los analitos buscados. Para ello tomamos cáscara de soja, que contiene concentraciones casi no detectables de isoflavonas y le realizamos cuatro extracciones sucesivas con la mezcla HCL-AcN para asegurarnos la extracción completa de las isoflavonas. En Anexos (Figura A.1) se muestra un cromatograma correspondiente a una corrida de la cáscara de soja antes del tratamiento para obtener la matriz libre de isoflavonas.

4.1.2- Linealidad

La linealidad del método desarrollado se evaluó mediante las curvas de calibrado, las cuales fueron calculadas realizando diluciones por duplicado de las soluciones madres de los standards de Genisteína y Daidzeína en una matriz libre de isoflavonas. Para Daidzeína las concentraciones usadas fueron: 0.28, 0.56, 0.84, 1.12, 1.4, 2.1, 2.8 ppm. Mientras que para

Genisteína las concentraciones fueron: 0.39, 0.78, 1.17, 1.56, 1.95, 2.93, 3.9 ppm. Como Standard Interno utilizamos una solución de Flavona.

Las curvas de calibrado obtenidas a partir del área de los picos cromatográficos en relación con el área del Standard interno, las ecuaciones de las rectas y los respectivos coeficientes de correlación lineal (r) se detallan a continuación:

Concentración de Daidzeína	Área Daidzeína / Área Flavona
0.28	0.648
0.28	0.695
0.56	0.853
0.56	0.886
0.84	1.344
1.12	1.508
1.12	1.501
1.4	1.853
2.1	3.975
2.1	3.919
2.8	4.785
2.8	4.96

Tabla 3: Concentraciones utilizadas para realizar la curva de calibrado y relaciones de áreas de picos de Daidzeína en función a Flavona.

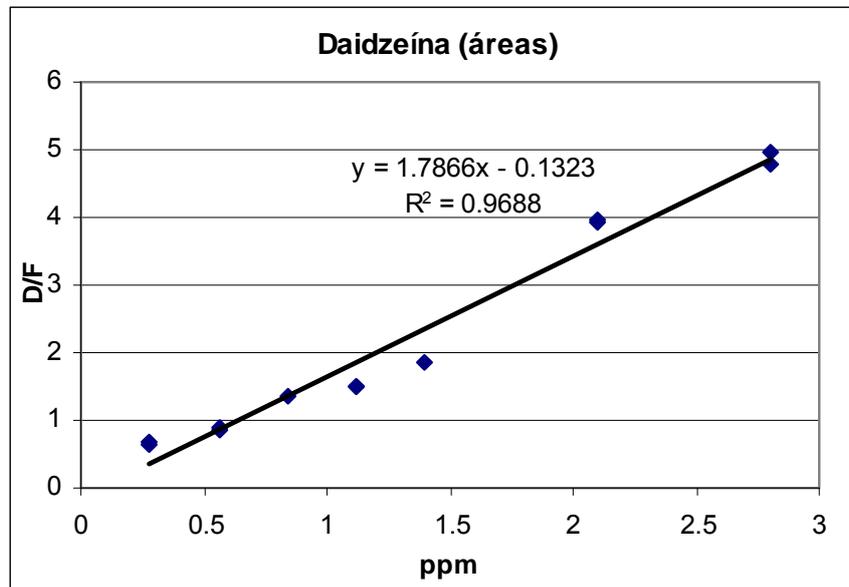


Figura 5: Curva de calibrado de Daidzeína, ecuación de la misma y coeficiente de linealidad r^2 .

<i>Estadísticas de la regresión</i>	
Coefficiente de correlación múltiple	0.98427098
Coefficiente de determinación R^2	0.96878937
R^2 ajustado	0.9656683
Error típico	0.30811571
Observaciones	12

Tabla 4: Estadísticas de regresión arrojada por Excel para la curva de calibrado vista en la figura 5.

Concentración de Genisteína	Área Genisteína / Área Flavona
0.39	0.132
0.39	0.128
0.78	0.219
0.78	0.216
1.17	0.31
1.56	0.425
1.56	0.41
1.95	0.502
2.925	0.763
2.925	0.766
3.9	0.842
3.9	0.988

Tabla 5: Concentraciones utilizadas para realizar la curva de calibrado y relaciones de áreas de picos de Genisteína en función a Flavona.

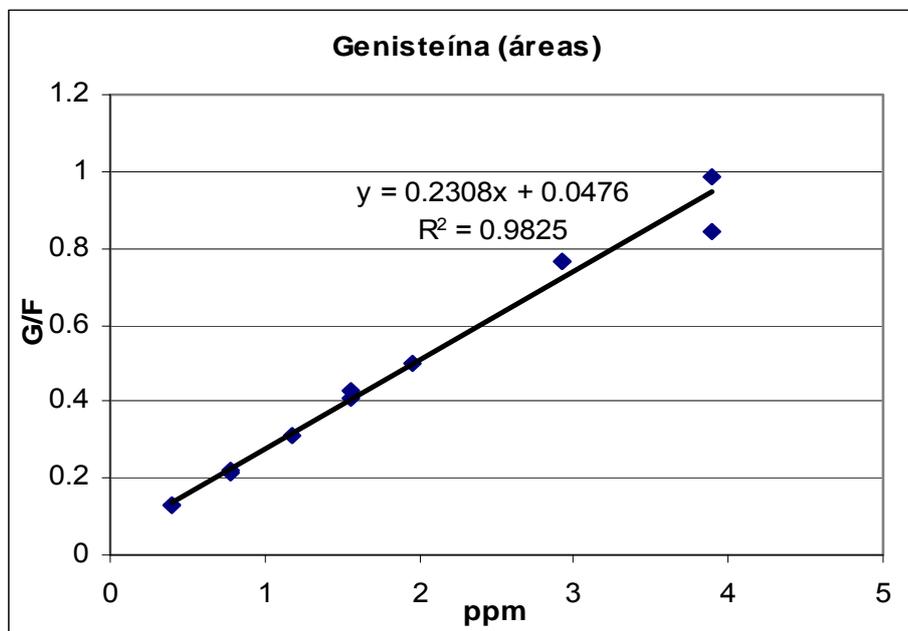


Figura 6: Curva de calibrado de Genisteína, ecuación de la misma y coeficiente de linealidad r^2 .

<i>Estadísticas de la regresión</i>	
Coeficiente de correlación múltiple	0.99119721
Coeficiente de determinación R ²	0.98247191
R ² ajustado	0.9807191
Error típico	0.04125156
Observaciones	12

Tabla 6: Estadísticas de regresión arrojada por Excel para la curva de calibrado vista en la figura 6.

4.1.3- Límites de Detección y Cuantificación

Según la bibliografía consultada (50, 51), *límite de detección* (LD) de un analito es aquella concentración que proporciona una señal en el instrumento significativamente diferente de la señal de una muestra en blanco o señal de fondo. Para siete réplicas del blanco, la medida es 3 veces la desviación estándar del blanco.

Límite de cuantificación (LC) se define como la concentración de analito que produce una señal suficientemente mayor que el blanco que puede detectarse. Es la concentración típica que produce una señal 10 veces superior la desviación estándar del blanco en el instrumento.

Para calcular los LD y LC tomamos una alícuota de la matriz libre de isoflavonas de soja (considerada muestra blanco) y la corrimos siete veces consecutivas. Con los valores obtenidos hallamos la Desviación Standard (DS). A continuación se tabularon los datos arrojados por el sistema cromatográfico y los cálculos realizados para calcular estos límites.

	Daidzeina (ppm)	Genisteína (ppm)
Corrida 1	0.027	0
Corrida 2	0.027	0.005
Corrida 3	0.031	0.006
Corrida 4	0.012	0
Corrida 5	0.012	0.006
Corrida 6	0.024	0.064
Corrida 7	0.038	0.097
DS	0.010	0.039
LD (ppm)	0.029	0.117
LC (ppm)	0.096	0.389

Tabla 7: Concentraciones de Daidzeina y Genisteina presentes en la matriz (blanco), DS de las mismas y LD y LC calculados según se mencionó antes.

De esta manera, los correspondientes LD y LC fueron para Daidzeina LD: 0.029 ppm y LC: 0.117 ppm. Mientras que para Genisteina los valores obtenidos fueron LD: 0.096 ppm y LC: 0.389 ppm.

4.1.4- Presición - Coeficientes de Variación (CV%)

Para evaluar la variabilidad en los resultados obtenidos, calculamos los coeficientes de variación intra-ensayo y coeficientes de variación inter-ensayo.

Fortificamos nuevamente otra alícuota de matriz libre de isoflavonas con 0.7 ppm de Daidzeina y 0.975 ppm de Genisteina; para el **CV% intra-ensayo** analizamos esta muestra 3 veces sucesivas el mismo día. Calculamos el promedio y la desviación estándar (DS) y luego:

$$CV\% = DS / \text{Promedio} * 100$$

Los resultados obtenidos fueron:

	D (ppm)	G (ppm)
Corrida N° 1	0.581	0.807
Corrida N° 2	0.594	0.848
Corrida N° 3	0.595	0.849
Promedio	0.590	0.835
DS	0.008	0.024
CV%	1.32	2.87

Tabla 8: Concentraciones de Daidzeina (D) y Genisteina (G), promedios y DS de las mismas, y CV% calculados según se mencionó antes.

Los coeficientes de variación intra-ensayo obtenidos para cada isoflavona fueron: para Daidzeína de 1.32 % y para Genisteína de 2.87 %.

Para el **CV% inter-ensayo** analizamos la misma muestra que utilizamos para calcular los CV% intra-ensayo durante cinco días sucesivos y realizamos los cálculos correspondientes, obteniendo los siguientes resultados:

	D (ppm)	G (ppm)
Día 1	0.598	0.797
Día 2	0.505	0.636
Día 3	0.557	0.694
Día 4	0.642	0.766
Día 5	0.561	0.746
Promedio	0.573	0.728
DS	0.051	0.064
CV%	8.91	8.73

Tabla 9: Concentraciones de Daidzeína (D) y Genisteína (G), promedios y DS de las mismas, y CV% calculados según se mencionó antes.

Los coeficientes de variación inter-ensayo obtenidos fueron: para Daidzeína 8.91 % y para Genisteína 8.73 %.

4.1.5- Exactitud - Recuperación

La evaluación de la exactitud del método analítico desarrollado la realizamos determinando los porcentajes de recuperación (%R) de cada isoflavona.

Para efectuar los cálculos de Recuperación utilizamos una cáscara de soja y la fortificamos con 0.933 ppm de daidzeína y 0.975 ppm de genisteína. En primer lugar, realizamos la cuantificación de la cáscara sin fortificar y luego determinamos por triplicado la misma fortificada con las concentraciones antes detalladas, obteniendo los siguientes resultados:

La cáscara de soja sin fortificar, arrojó concentraciones de 0.25 ppm de daidzeína y 3.773 ppm de genisteína.

En la tabla siguiente se muestran los valores obtenidos para la cáscara de soja fortificada:

	D ppm	G ppm
Fortif. 1	1.252	4.607
Fortif. 2	0.939	4.246
Fortif. 3	1.415	4.956
Promedios	1.202	4.603

Tabla 10: Concentraciones de Daidzeína (D) y Genisteína (G) y los promedios obtenidos de la cáscara de soja fortificada.

La ecuación utilizada para el cálculo de recuperación fue la siguiente:

$$\%R = [(Conc. Promedio del fortificado - Conc. inicial) / Conc. añadida] * 100$$

Los cálculos realizados se muestran en la siguiente tabla:

	Conc. Promedio del fortificado – Conc. inicial	%R
Daidzeína	$1.02 - 0.25 = 0.952$	$0.952 / 0.933 = 102.0$
Genisteína	$4.603 - 3.773 = 0.83$	$0.83 / 0.975 = 85.1$

Tabla 11: Paso a paso el cálculo de los % de recuperación para cada una de las isoflavonas analizadas.

De esta manera, para Daidzeína la recuperación fue de 102 %; mientras que para Genisteína 85.1 %.

4.2- Análisis de los datos obtenidos

Tal como se indicó en Materiales y Métodos para realizar la separación y cuantificación de las isoflavonas por HPLC se utilizó un gradiente no lineal de una mezcla de ácido acético al 0.1% en agua y AcN. Con este sistema de solventes se logró una buena separación de ambas isoflavonas y del estándar interno en las diferentes muestras procesadas.

La totalidad de las muestras fueron analizadas por triplicado, y se realizaron los cálculos de promedio y desviación estándar que son los que aparecen en las correspondientes tablas y figuras.

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 12. Las muestras analizadas corresponden a dos variedades de soja no transgénica y cuatro variedades de soja transgénica. En la tabla se muestran los promedios y desvíos standard de las concentraciones de ambas isoflavonas expresados en μg de isoflavonas /g de muestra, o sea partes por millón (ppm).

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 (34).

Los rangos de variabilidad son muy marcados, esto también lo observaron Simonne y col. (52) en su trabajo publicado el año 2000 donde analizaron diferentes variedades de sojas comerciales.

	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 12: 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).

Comparando los contenidos de Daidzeina y Genisteina mediante el análisis estadístico de ANOVA, encontramos que no hay diferencias estadísticamente significativas ($p = 0.3539$) en las concentraciones de Genisteina; mientras que si existen diferencias ($p = 0.0000$) en las concentraciones de 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

Por cuestiones operativas y de disponibilidad de cromatógrafo, de las dos variedades de soja no transgénica, evaluamos las concentraciones de Daidzeina y Genisteina durante el proceso de elaboración de los productos derivados de la variedad la B. Mientras que de las semillas transgénicas, se realizaron y evaluaron los productos del proceso de elaboración de las variedades las D, E y F.

4.2.2.1- Soja No Transgénica B

Para evaluar el efecto del proceso de elaboración en el contenido de daidzeina y genisteina, en primer lugar procesamos soja no transgénica B 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. La figura A.2 de Anexos muestra un cromatograma correspondiente a una corrida de extracto de semilla de esta variedad de soja.

En la tabla 13 se observan los valores obtenidos en la cuantificación de las isoflavonas. Estos datos se graficaron y la Figura 7 muestra una disminución en la concentración de daidzeína cuando se obtiene la bebida (“leche”) a partir de la soja y concentraciones muy parecidas tanto en la bebida como en el residuo okara. En tofu la daidzeína no fue detectada por nuestro sistema cromatográfico.

	Soja	Bebida ("leche")	Okara	Tofu
Daidzeína (ppm)	1.08 ± 0.26	0.30 ± 0.42	0.36 ± 0.10	ND
Genisteína (ppm)	4.18 ± 0.89	1.72 ± 0.14	4.22 ± 0.71	0.86 ± 0.12

Tabla 13: Contenido de Daidzeína y Genisteína durante el proceso de elaboración de la bebida de soja y tofu a partir de soja no transgénica B.

Por otro lado se graficaron los valores de genisteína y en la Figura 8 podemos observar que la concentración de genisteína disminuye cuando se procesa bebida a partir de soja, y disminuye más en la elaboración del tofu. Quedando una buena concentración de esta isoflavona en el residuo okara.

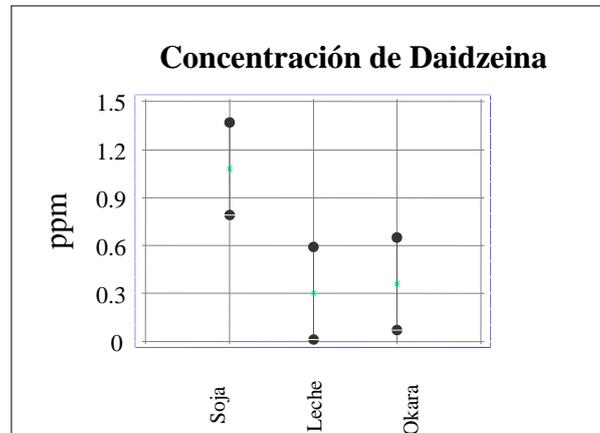


Figura 7: Comportamiento de la concentración de daidzeina en cada paso del procesamiento de la soja no transgénica B.

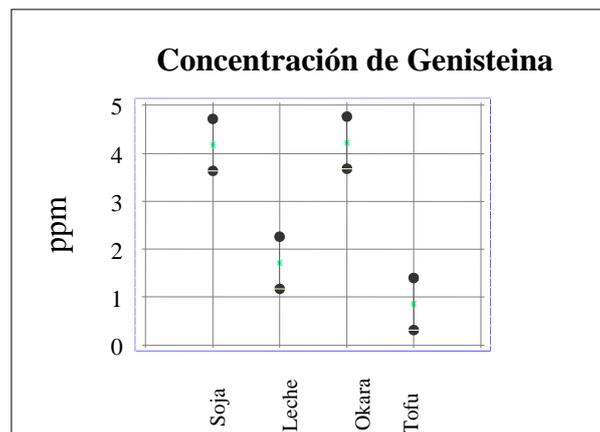


Figura 8: Comportamiento de la concentración de genisteina en cada paso del procesamiento de la soja no transgénica B.

Para hacer un análisis de composición de isoflavonas en cada paso del proceso de elaboración, debemos primero adoptar un balance de masas típico de referencia que describa el contenido de sólidos de cada subproducto. El mismo se detalla a continuación.

1000 g semillas	Sólidos totales iniciales = 870 g.	
Sólidos en Bebida “Leche”	502 g	es el 57.5 % de sólidos iniciales
Sólidos en Okara	368 g	es el 42.3 % de sólidos iniciales
Sólidos en Tofu	441 g	es el 50.7 % de sólidos iniciales
Sólidos en suero	61 g	es el 7 % de sólidos iniciales

En función a estos datos, podemos calcular la distribución de las isoflavonas en cada uno de los subproductos (bebida, okara, tofu y suero o sobrenadante del tofu) teniendo en cuenta los porcentajes de sólidos retenidos en cada paso.

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 ⁽⁴⁷⁾ obtuvieron 36% de recuperación en una evaluación similar.

Murphy y col. ⁽⁵⁴⁾ 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. ⁽⁵⁵⁾

4.2.2.2- Soja Transgénica variedad D

La misma evaluación se realizó en soja transgénica variedad D, la Tabla 14 y las Figuras 9 y 10 muestran los datos correspondientes para ambas isoflavonas. En la Figura 10 se observa que la pérdida de Genisteina, 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. Las figuras A.3 - A.8 corresponden a cromatogramas de cada una de las diferentes muestras obtenidas a partir de esta variedad de soja.

	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	161.68 ± 24.30	4.64 ± 0.24

Tabla 14: 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.

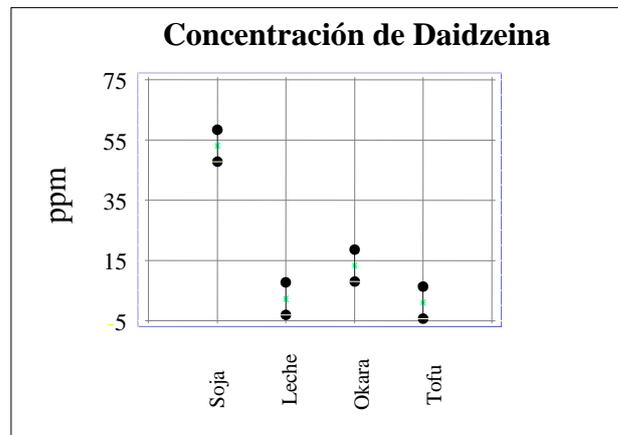


Figura 9: Comportamiento de la concentración de daidzeina en cada paso del procesamiento de la soja transgénica variedad B.

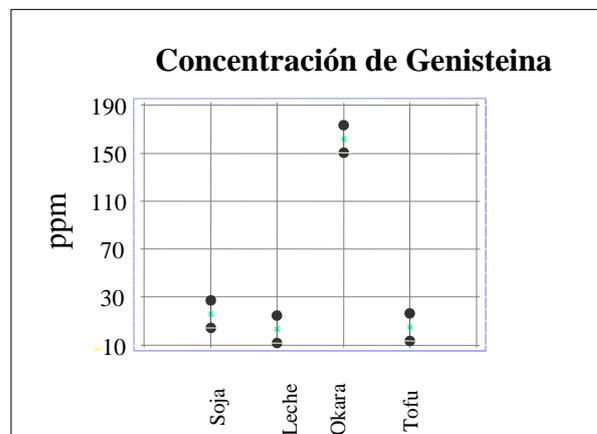


Figura 10: Comportamiento de la concentración de daidzeina en cada paso del procesamiento de la soja transgénica variedad B.

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 8.9%; 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.

4.2.2.3- Soja Transgénica variedad E

Esta variedad fue la que mostró menores concentraciones de Daidzeína y Genisteína en la semilla, lo que muestra la gran fluctuación que existe en el contenido de estas isoflavonas en las diferentes variedades de soja.

Realizamos, como con las otras muestras, el proceso de elaboración de bebida y tofu y estos son los datos hallados: para las semillas de 20.44 ± 1.23 y 0.16 ± 0.12 ppm; bebida: 1.19 ± 0.09 ppm de Daidzeína y Genisteína fue no detectable; okara: 12.84 ± 2.05 y 0.23 ± 0.11 ; y para tofu: 1.82 ± 0.90 y 0.12 ± 0.10 ppm respectivamente para cada isoflavona.

En cuanto a los datos de la distribución de las isoflavonas en cada subproducto. Los valores encontrados fueron: en la bebida 3.9% para

Daidzeína. En okara 30.5% y 69.3%; y en tofu 5.2% y 43.5% para Daidzeina y Genisteina respectivamente.

4.2.2.4- Soja Transgénica variedad F

Los resultados obtenidos en la evaluación del contenido de daidzeina y genisteina durante proceso de industrialización de esta variedad transgénica fueron los siguientes: para las semillas de 54.19 ± 4.92 y 38.28 ± 3.48 ppm; bebida: 2.06 ± 0.04 y 32.33 ± 0.89 ppm; okara: 8.21 ± 0.55 y 45.12 ± 12.22 ; y para tofu: 33.45 ± 12.39 y 24.19 ± 3.75 ppm respectivamente para cada isoflavona. Estos datos muestran una clara pérdida de ambas isoflavonas cuando se procesa la bebida de soja, mientras que se observa una muy buena recuperación de genisteina y daidzeina en el tofu.

La distribución de las isoflavonas en cada subproducto es la siguiente: en la bebida 2.5% y 56% para Daidzeína y Genisteína respectivamente. En okara 7.4% y 57.3%; y en tofu 36% y 36.8% para Daidzeina y Genisteina respectivamente.

Estos datos graficados en la figura 11, muestran la variación del contenido de isoflavonas durante todo el proceso de elaboración de bebida de soja y tofu.

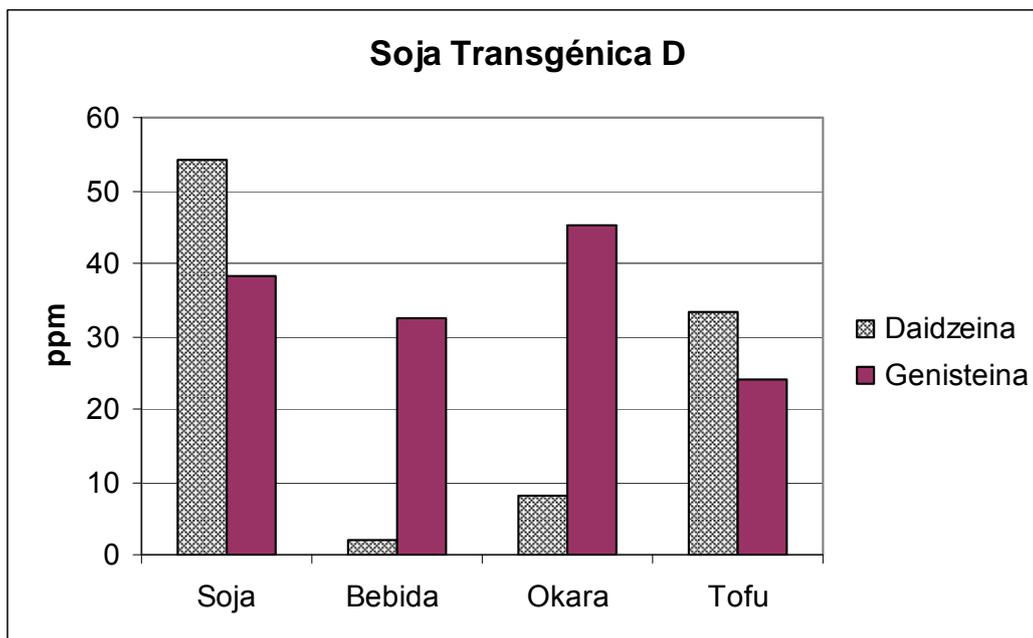


Figura 11: Contenido de Daidzeina y Genisteina durante el proceso de elaboración de la bebida de soja y tofu a partir de soja transgénica variedad F.

4.2.3- Evaluación del contenido de isoflavonas en tofus obtenidos con diferentes coagulantes

Uno de los objetivos propuestos fue evaluar la incidencia de los diferentes coagulantes utilizados en la elaboración del tofu sobre las concentraciones de daidzeina y genisteina. Para ello elaboramos, a escala de laboratorio y a partir de bebida de soja de la variedad transgénica F, tres tofus coagulados con: sulfato de calcio (SO_4Ca), cloruro de magnesio (ClMg) y glucano delta lactona (GDL) (en la página 99 de Anexos se muestran los datos obtenidos en un proceso típico de producción de tofus con los tres coagulantes). Los

valores de Daidzeina y Genisteina encontrados se detallan en la tabla 15. Luego de cuantificar el contenido de ambas isoflavonas y de realizar el tratamiento estadístico de los datos concluimos que, si bien se observa una mayor concentración de Daidzeina en el tofu obtenido con el coagulante SO_4Ca y una mayor concentración de Genisteina en el tofu obtenido con el coagulante cloruro de Mg, no existen diferencias significativas en las concentraciones de ambas isoflavonas presentes en los tres tipos tofus ($p > 0.05$) para un nivel de confianza del 95%. Los valores de p fueron, para daidzeina $p = 0.2344$ y para genisteina $p = 0.1171$. Aplicamos el Modelo Lineal Generalizado a estas muestras y los resultados arrojados por el software se detallan en Anexos, páginas 100-107.

Las Figuras 12 y 13 muestran los rangos de concentraciones de ambas isoflavonas.

	Tofu (SO_4Ca)	Tofu (Mg)	Tofu (GDL)
Daidzeina (ppm)	33.45 ± 12.39	28.84 ± 4.01	21.68 ± 0.06
Genisteina (ppm)	24.19 ± 3.75	25.14 ± 3.75	19.32 ± 0.91

Tabla 15: Contenido de Daidzeina y Genisteina en cada uno de los tofus elaborados partir de soja transgénica variedad F, con los diferentes coagulantes.

Varios reportes indicaron que el proceso de coagulación puede causar pérdidas considerables de isoflavonas (47). Jackson y colaboradores (53) reportaron que las isoflavonas pueden formar complejos con las proteínas en el poroto, los cuales pueden liberarse al suero durante la coagulación. En

contraposición a nuestros resultados, en el mismo trabajo usaron como coagulantes GDL y SO_4Ca para obtener el tofu y encontraron que GDL resultó más eficiente que SO_4Ca en cuanto al contenido de isoflavonas en el producto final. Por otro lado, Kao y colaboradores ⁽⁵⁶⁾ compararon la efectividad del sulfato de calcio y cloruro de calcio a la misma concentración sobre los contenidos de isoflavonas en tofu, y obtuvieron una mayor recuperación de isoflavonas con el sulfato de calcio como coagulante. En este trabajo también se demostró que con sulfato de calcio como coagulante, se produjo un tofu de mayor calidad con estructura blanda y suave.

El estudio realizado por Prabhakaran y col. ⁽⁴⁵⁾ sobre el efecto de los diferentes coagulantes en los niveles de isoflavonas y en las propiedades físicas del tofu determinó que la concentración de estos fitoestrógenos varió con el tipo de coagulante siendo el sulfato de calcio el que dio origen a un tofu de mejor calidad.

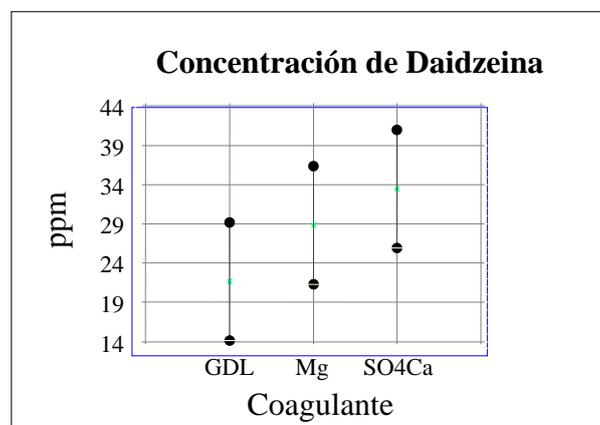


Figura 12: Contenido de Daidzeina en tofus de Soja Transgénica D obtenidos con diferentes coagulantes.

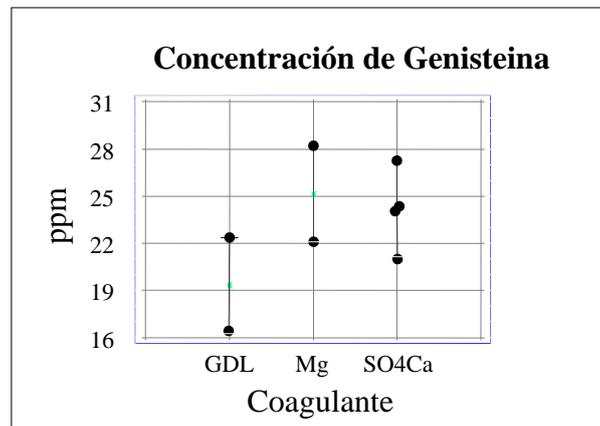


Figura 13: Contenido de Genisteína en tofus de Soja Transgénica D obtenidos con diferentes coagulantes.

4.2.4- Comparación del contenido de daidzeína y genisteína en tofus de soja variedad E procesados a diferentes temperaturas

Tal como muestra la tabla 16, comparamos el contenido de ambas isoflavonas en tofus procesados a diferentes temperaturas, en frío, a 20 °C, 42 °C y 55 °C para observar si existe variación en la calidad del tofu desde el punto de vista de la concentración de daidzeína y genisteína. No encontramos diferencias estadísticamente significativas en las concentraciones de daidzeína ($p = 0.829$) con un 95% de confianza; mientras que si existen diferencias en la concentración de genisteína ($p = 0.0003$). Analizando los datos mostrados más abajo, vemos que en el tofu

procesado a 20 °C la concentración de genisteína disminuyó considerablemente, mientras que a 42° y 55° la concentración de genisteína aumentó, este incremento puede deberse a la conversión desde las formas glicosiladas a agliconas por efecto de la temperatura tal como lo menciona Coward y colaboradores (35) en su trabajo publicado en 1998.

	Frío	20 °C	42 °C	55 °C
Daidzeina (ppm)	1.42 ± 0.54	1.82 ± 0.90	1.84 ± 0.66	1.76 ± 0.19
Genisteina (ppm)	2.68 ± 1.15	0.12 ± 0.10	5.28 ± 1.17	5.64 ± 0.91

Tabla 16: Contenido de Daidzeina y Genisteina en tofu de soja trágénica variedad E, procesados a diferentes temperaturas.

Chien y col. (57) estudiaron cinéticamente la conversión y degradación de las isoflavonas durante los tratamientos térmicos y observaron que al inicio del proceso de calentamiento las velocidades de conversión de las diferentes formas glicosiladas de las isoflavonas se incrementaron con el aumento de la temperatura transformándose paulatinamente en agliconas. Con temperaturas superiores a 200°C recién se produjo degradación de estas últimas.

4.2.5- Tratamiento térmico de la leche durante la preparación del tofu

Para evaluar si la temperatura de calentamiento de la bebida durante la preparación del tofu incide sobre el contenido de isoflavonas, se tomaron alícuotas de bebida de soja y se sometieron a 90°C en dos períodos de tiempo; una entre 2 y 3 minutos y la otra durante 10 minutos. Luego se cuantificó el contenido de ambas isoflavonas y observamos que en la muestra tratada durante más tiempo existe una pequeña disminución de ambas isoflavonas tal como lo muestra la tabla 17. Haciendo el tratamiento estadístico de los datos, encontramos que para la concentración de Daidzeina no existen diferencias estadísticamente significativas ($p = 0.2638$). Mientras que para el contenido de Genisteina hay diferencias estadísticamente significativas ($p = 0.011$) para un nivel de confianza del 95%.

	90 °C; 2-3 minutos	90 °C; 10 minutos
Daidzeina (ppm)	0.31 ± 0.01	0.29 ± 0.02
Genisteina (ppm)	2.17 ± 0.02	1.62 ± 0.21

Tabla 17: Contenido de Daidzeina y Genisteina en bebida de soja con tratamiento térmico.

H. Huang y colaboradores en su trabajo recientemente publicado ⁽⁵⁸⁾, trataron térmicamente una muestra de leche de soja a 95, 121 y 140°C en un determinado período de tiempo. La genisteína mostró mayor estabilidad al calor que daidzeína y gliciteína. Con temperaturas superiores a 95 y 121 °C hubo un incremento del contenido de genisteína en las etapas tempranas del calentamiento, posiblemente debido a la conversión de genistina (glucósido) a genisteína (aglicona). Calentando la muestra a 140 °C por más de 15 segundos o un tratamiento prolongado a 95 y 121 °C, causaron una disminución lenta en el contenido de genisteína.

Por otra parte, Kao y colaboradores ⁽⁵⁶⁾ evaluaron los efectos del tiempo de cocción sobre el contenido de isoflavonas en la leche de soja y observaron que las tres agliconas estudiadas (daidzeína, gliciteína y genisteína) no mostraron cambios significativos luego de 30 minutos de cocción a 100°C. En cambio, los contenidos de daidzin, glicitin y genistin aumentaron. En este estudio tanto la leche como el tofu fueron producidos en un medio caliente acuoso, lo cual podría llevar a la formación de derivados glucósidos. Además, la alta temperatura de cocción (100°C) puede inhibir la acción de la β -glucosidasa. Por los resultados obtenidos, concluyeron que el contenido total de isflavonas podría cambiar debido a la conversión a derivados durante la cocción.

Prabhakaran y col. ⁽⁵⁹⁾ en sus investigaciones sobre el efecto de la temperatura de cocción durante la manufactura de la bebida de soja

concluyó que los procesos térmicos elevados no influyeron en la concentración de isoflavonas.

4.2.6- 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 18 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.

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

Tabla 18: Concentraciones de Daidzeína y Genisteína de las diferentes harinas desgrasadas analizadas.

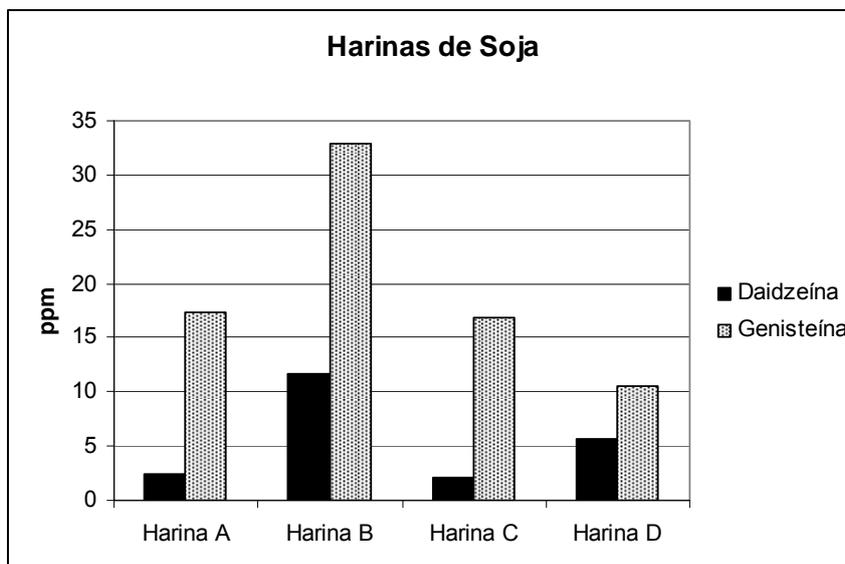


Figura 14: Representación gráfica de las concentraciones de Daidzeína y Genisteína de las diferentes harinas desgrasadas analizadas.

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. (60) 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.

En cuanto a la elaboración de tofu a partir de bebida de soja, la variable tipo de coagulante incidió en las concentraciones de Daidzeína y Genisteína. Por otro lado, la variable temperatura de procesamiento de tofu influyó en menor medida sobre las concentraciones de las isoflavonas, fundamentalmente sobre Genisteína.

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, N° 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 Science. 69: 3. 77-86. 2004.
5. Barnes S. Soy Isoflavones– Phytoestrogens and What Else? J. Nutr. 134: 1225S-1228S. 2004.
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 Newfoundland. 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. 9, 193-200. 1998.

8. Stechell, K. and Cassidy, A.. Dietary Isoflavones: Biological Effects and Relevance to Human Health. J. of Nutrition.129: 758-767. 1999.
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. Wilmont, B.. Wijerstne, www.aces.uiuc.edu.
27. Berk, Zeki. Technology of production of edible flours and protein products from soybeans. Technion, Israel Institute of Technology. Haifa, Israel. 1992.
28. Pouzet, A. Conociendo la soja. *Aceites y Grasas.* Junio de 1997.
29. Cheftel, J.C., Cuq, J.L. and Lorient, D. "Proteines Alimentaires". Tec & Doc Lavoisier, Paris. 1985.
30. Eldridge, A. and Kwolek, W. Soybeans isoflavones: effect of environment and variety on composition. *J. Agric. Food Chem.* 31:394-396. 1983.
31. Murphy, P., Barua, K., Hauck, C. Solvent extraction selection en the determination of isoflavones in soy foods. *J. Chrom. B.* 777:129-138. 2002.

32. 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.
33. 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.
34. 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.
35. 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.
36. 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.
37. Mullin, W. J., Fregeau-Reid, J., Butler, M., Poysa, V., Woodrow, L., Jessop, D., Raymond, D.. An interlaboratory test of a procedure to assess soybean quality for soymilk and tofu production. Food Research International. 34:669-677. 2001.

38. Eldridge, A.. Determination of isoflavones in soybeans flours, protein concentrates, and isolates. *J. Agric. Food Chem.* 30:353-355. 1982.
39. 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.
40. Lin, F. and Giusti, M. Effects of solvent polarity and acidity on the extraction efficiency of isoflavones from soybeans (*Glycine max*). *J. Agric. Food Chem.* 53 (10), 3795-3800. 2005.
41. Song, T., Barua, K., Bussman, G. and Murphy, P.. Soy Isoflavone analysis: quality control and a new internal standard. *Am. J. Clin. Nutr.* 68:1474S-1479S. 1998.
42. Jones, A., Price, K. and Fenwick, G.. Development and application of a High-performance Liquid Chromatographic method for the analysis of phytoestrogens. *J. Sci. Food Agric.* 46:357-364. 1989.
43. Murphy, P.. Separation of genistin, daidzin and their aglucones, and coumestrol by gradient high-performance liquid chromatography. *J. Chromatography.* 211, 166-169. 1981.
44. Mahungu, S., Diaz-Mercado, S., Schwenk, M., Singletary, K., and Faller, J.. Stability of isoflavones during Extrusion Processing of Corn/Soy Mixture. *J. Agri. Food Chem.* 47, 279-284. 1999.
45. Prabhakaran, M., Perera, C., Valiyaveetil, S. Effect of different coagulants on the isoflavone levels and physical properties of prepared firm tofu. *Food Chem.* 99, 492-499. 2006.

46. Eldridge, A.. High-performance liquid chromatography separation of soybean isoflavones and their glucosides. *J. Chromatography*. 234, 494-496. 1982.
47. Wang, H.J. and Murphy, P.A.. Mass balance study of isoflavones during soybean processing. *J. Agric. Food Chem.* 44, 2377-2383. 1996.
48. Massart, D L; Dijkstra, A; Kaufman, L. "Evaluation and optimization of laboratory methods and analytical procedures". Elsevier Scientific Pub. Co., Amsterdam, 1978.
49. Montgomery, D. C. "Diseño y Análisis de experimentos". Grupo Editorial Iberoamérica, México DF, 1991.
50. Métodos Normalizados para el análisis de aguas potables y residuales. 17º Edición. APHA-AWWA-WPCF. Ediciones Díaz de Santos S.A. Madrid (España). Pág. 1-2; 1-6. 1992.
51. Miller, J.C. y Miller, J.N.. Estadística para Química Analítica. 2º Edición Addison-Wesley Iberoamericana. Estados Unidos. 1993.
52. Simonne, A., Smith, M., Weaver, D., Vail, T., Barnes, S., and Wei, C.. Retention and changes of soy isoflavones and carotenoids in immature soybean seeds (Edamame) during processing. *J. Agri. Food Chem.* 48, 6061-6069. 2000.
53. Jackson, C., Dini, J., Lavandier, C. Rupasinghe, H., Faulkner, H., Poyse, V., Buzzell, D., DeGrandis, S. Effects of processing on the content and composition os isoflavones during manufacturing of soy beverage and tofu. *Process Biochem.* 37. 1117-1123. 2002.

54. Murphy, P. Phytoestrogen content of processed soybean products. Food Technology. January 1982.
55. 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.
56. Kao, T., Lu, Y., Hsieh, H., Chen, B. Stability of isoflavone glucosides during processing of soymilk and tofu. Food Research Internacional. 37. 891-900. 2004.
57. Chien, J., Hsieh, H., Kao, T., and Chen, B. Kinetic model for studying the conversion and degradation of isoflavones during heating. Food Chem. 91, 425-434. 2005.
58. Huang, Huihua; Liang, Hanhua; Kwok, Kin-Chor. Effect of thermal processing on genistein, daidzein and glycitein content in soymilk. J. Science Food Agric. 86:7, 1110-1114. 2006.
59. Prabhakaran, M., Perera, C. Effect of extraction methods and UHT treatment conditions on the level of isoflavones during soymilk manufacture. Food Chem. 99, 231-237. 2006.
60. Batt, H., Thomas, R., Rao, A.. Characterization of isoflavones in membrane-processed soy protein concentrate. J. Food Science. 68, Nro. 1. 2003.

7. ANEXOS

7.1- El modelo lineal generalizado

El modelo lineal generalizado es precisamente una generalización del modelo lineal general. En síntesis, un modelo lineal especifica la relación (lineal) que existe entre una respuesta o variable dependiente (Y) y un conjunto de variables predictoras, X s de forma que se expresa

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + \dots + b_kX_k$$

Donde b_0 es el coeficiente de regresión para la intercepción y los valores b_i son los coeficientes de regresión (para las variables 1 a k) computados a partir de los datos.

En situaciones específicas muchas relaciones no pueden ser descritas por una ecuación lineal simple, por dos razones

Distribución de la variable dependiente. Puede tener una distribución discreta, (p.ej., la selección o preferencia de un consumidor entre tres productos alternativos).

Función enlazada o ligada. Una segunda razón de inadecuado modelo lineal es que el efecto de los predictores sobre la variable dependiente no resulte lineal en su naturaleza, sino que por ejemplo resulte función de una potencia

El modelo lineal generalizado se puede utilizar para predecir respuestas en variables dependientes con distribuciones discretas y para variables dependientes que no se encuentran linealmente relacionadas con las variables predictoras. Se lo podría describir como una extensión de la regresión lineal múltiple para una sola variable, por lo que resulta esencial comprender los fundamentos de tal regresión para entender al modelo lineal general.

Introducción a los cálculos para resolver la ecuación de regresión múltiple

En la ecuación

$$Y = b_0 + b_1 X.$$

La variable Y se expresa en términos de una constante (b_0) y del producto entre la pendiente (b_1) por la variable X

b_0 también se define como la intercepción al origen y b_1 como el coeficiente de regresión. En el caso de la regresión múltiple donde operan dos o más variables predictoras, no puede visualizarse la superficie de regresión mediante un espacio de dos dimensiones aunque los cálculos son una extensión directa del caso para una sola variable. Generalizando entonces, los procedimientos de regresión múltiple estimarán una ecuación lineal de la forma

$$Y = b_0 + b_1 X_1 + b_2 X_2 + \dots + b_k X_k$$

Dónde k : número de variables independientes y los coeficientes de regresión ($b_1 \dots b_k$) representan las contribuciones de cada variable independiente a la predicción de la variable dependiente. Esta clase de correlación también se conoce como *correlación parcial*.

La superficie de regresión (o una línea en el caso de una regresión simple, un plano o más en una regresión múltiple) expresa la mejor predicción de la variable dependiente en función de las dadas variables independientes. La desviación desde el punto mas cercano predicho respecto a un punto experimental observado se llama *residual*. La distribución de los valores residuales puede utilizarse como criterio de mejor predicción, y específicamente en problemas de regresión la superficie generada se computa de modo que se minimice la suma de los cuadrados de las desviaciones de esa superficie, así este procedimiento recibe la denominación de *estimación por cuadrados mínimos*.

Mediante notación matricial se resuelven convenientemente los cálculos necesarios:

supongamos existen n observaciones de Y ; y asociados a ellos hay n observaciones o valores de k variables diferentes X . Así, representamos por Y_i , X_{ik} , y e_i a las observaciones de la variable dependiente, de las k variables independientes y de los i ésimos desconocidos residuales. Agrupando en forma de matrices tenemos la expresión del modelo de regresión múltiple

$$Y = Xb + e$$

Donde **b**: vector columna de 1 (para la intercepción) + *k* coeficientes de regresión desconocidos. Como se debe satisfacer el criterio de minimizar la suma de los cuadrados de los residuales, se encuentran los coeficientes mediante la resolución del conjunto de ecuaciones normales

$$X'Xb = X' Y$$

$$(X'X)^{-1}X'Xb = (X'X)^{-1}X' Y$$

o

$$b = (X'X)^{-1}X' Y$$

Esta expresión aparentemente simple y general resuelve la ecuación de regresión en el término de 2 matrices (**X** e **Y**) y tres operaciones consecutivas: 1) transposición de matrices, 2) multiplicación de matrices y 3) inversión matricial

(p.ej. hallar $A^{-1}AA = A$, para una matriz A)

Para el modelo lineal generalizado se puede reemplazar el vector **Y** de *n* observaciones de la variable dependiente única, por una matriz **Y** de las *n* observaciones de *m* diferentes variables; y de la misma forma, se reemplazará el **b** vector de los coeficientes de regresión para una variable

única Y , por una matriz que posee un vector de coeficientes b para cada una de las m variables dependientes

El modelo lineal general avanza un paso más allá del modelo de regresión múltiple al permitir transformaciones o combinaciones lineales de las múltiples variables dependientes. La ejecución de la operatoria se simplifica recurriendo a alguno de los múltiples paquetes estadísticos disponibles.

7.2- FIGURAS Y TABLAS

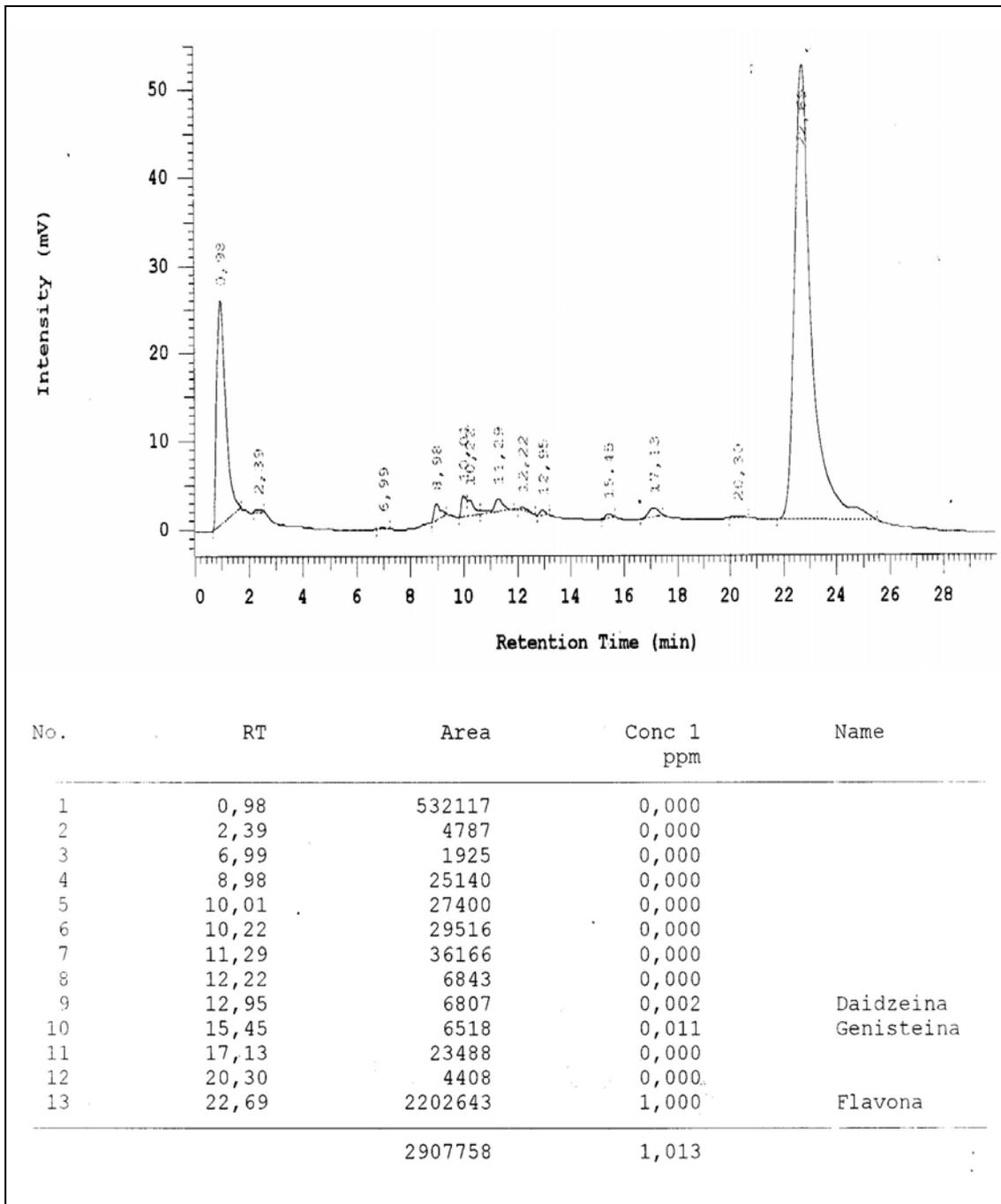


Figura A1: Cromatograma correspondiente a cascara de soja previo al tratamiento de obtención de una matriz libre de isoflavonas.

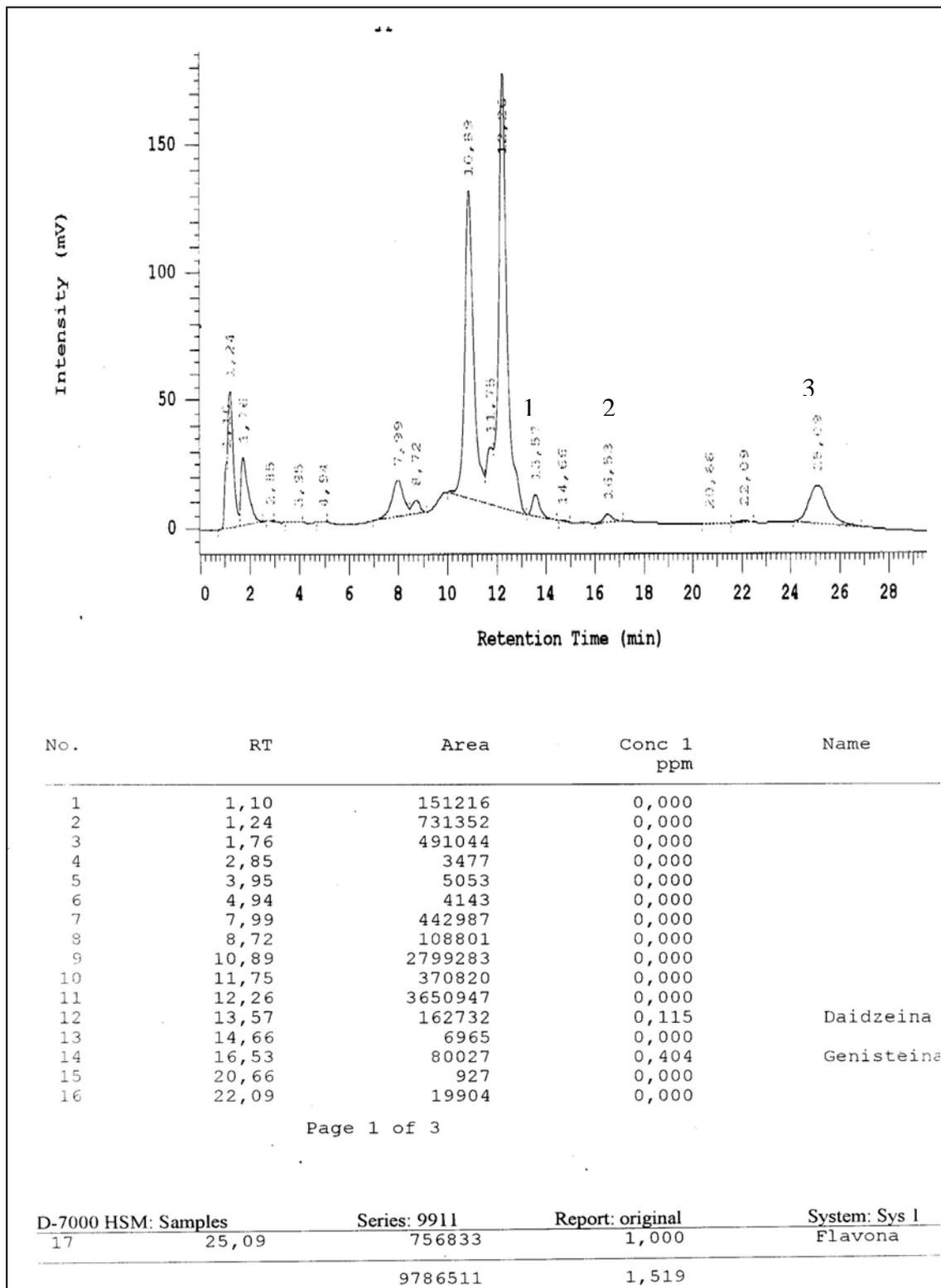


Figura A2: Cromatograma correspondiente a soja no transgénica B.
Daidzeina (1); Genisteina (2); Flavona (3).

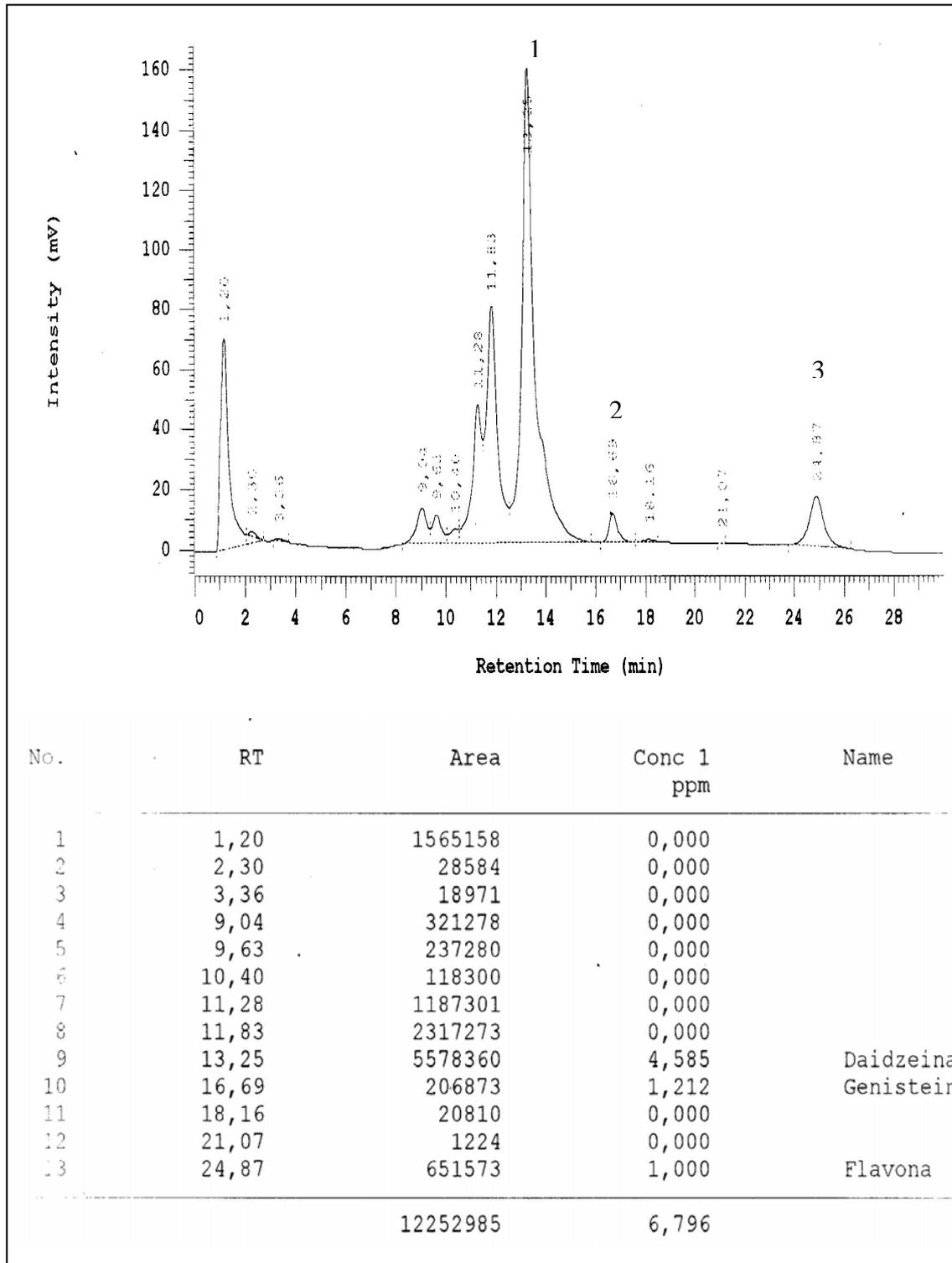


Figura A3: Cromatograma correspondiente a soja transgénica D diluida.
Daidzeina (1); Genisteina (2); Flavona (3).

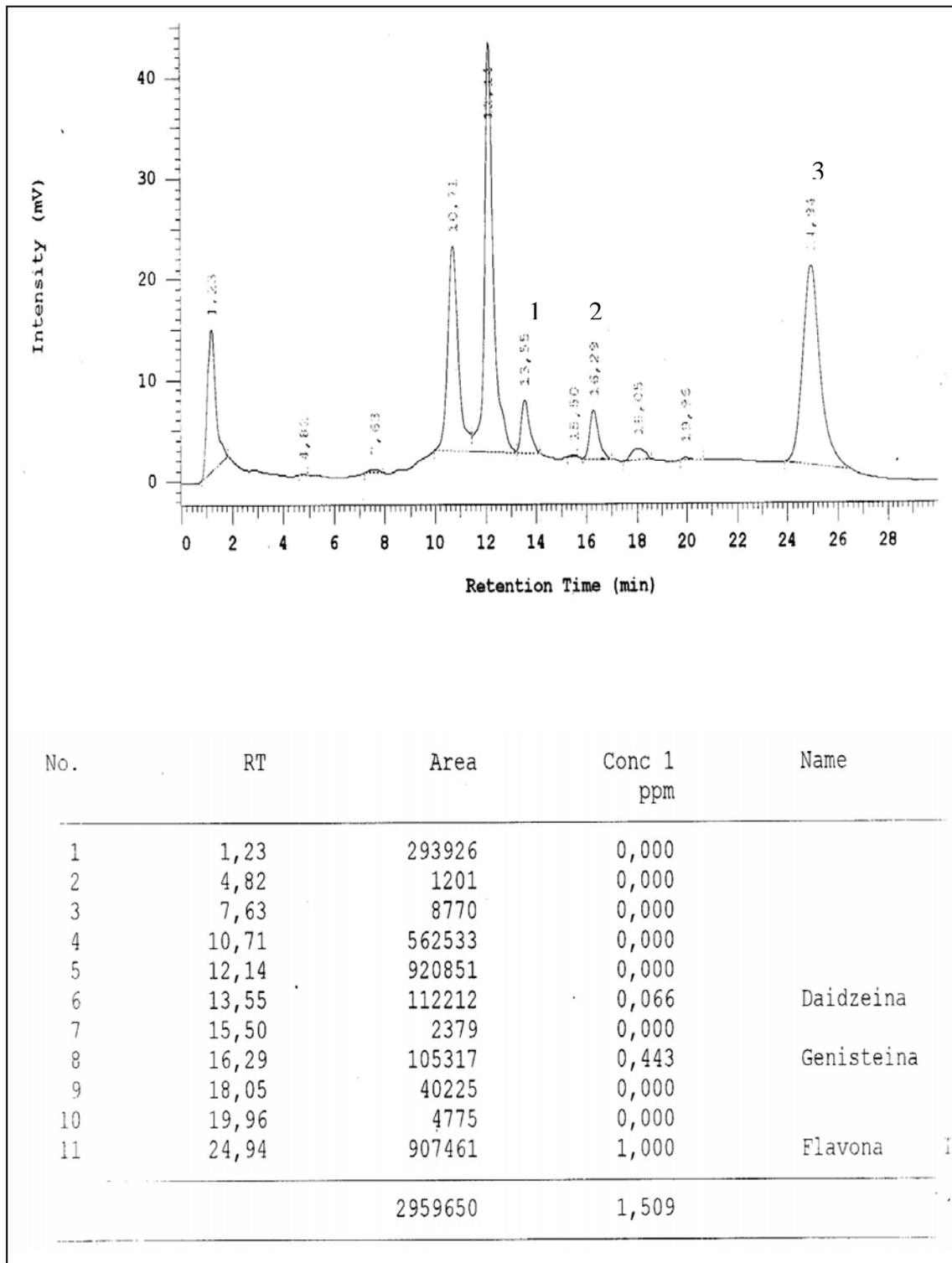


Figura A4: Cromatograma correspondiente a bebida de soja no transgénica B. Daidzeina (1); Genisteina (2); Flavona (3).

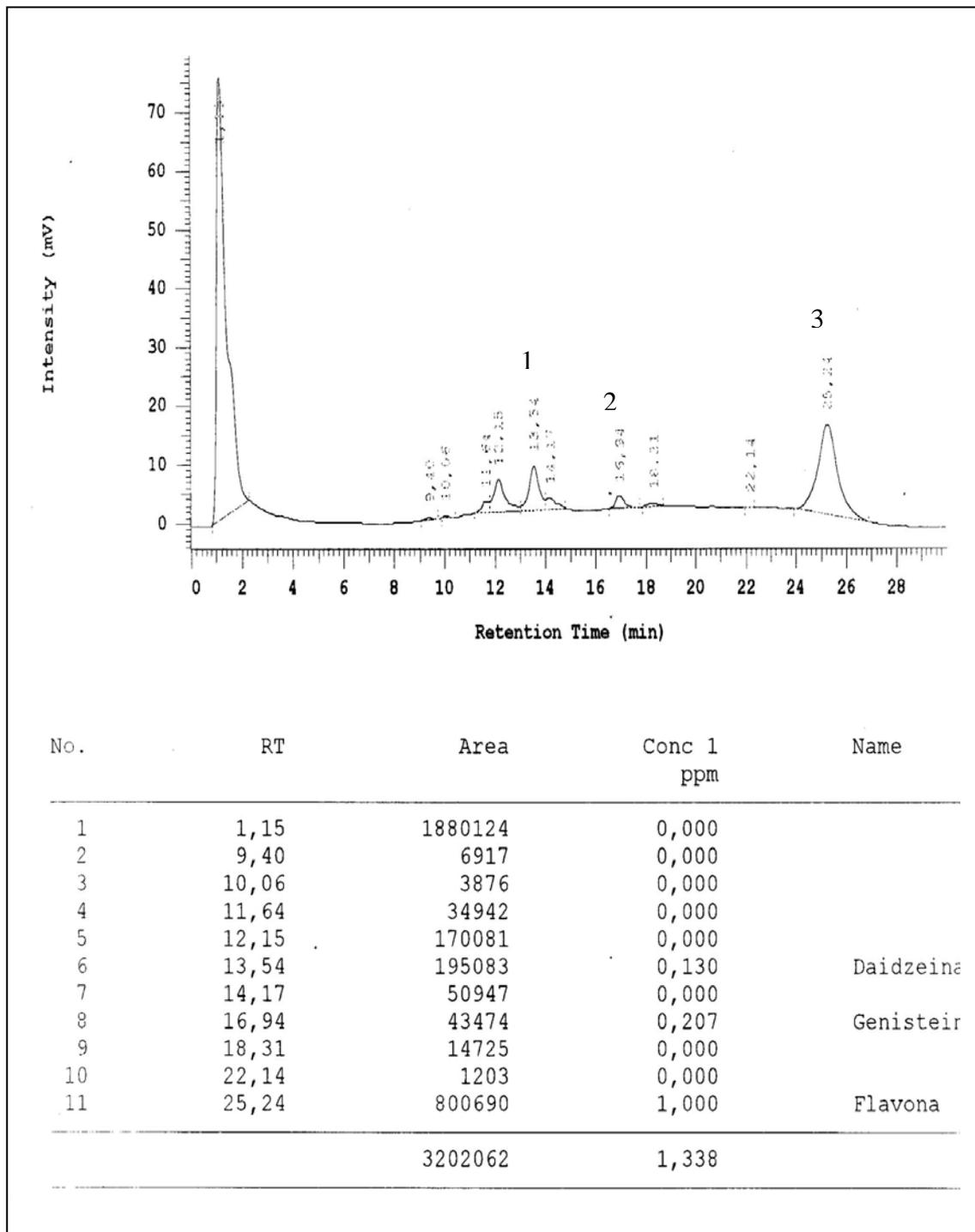


Figura A5: Cromatograma correspondiente a bebida de soja transgénica D diluida. Daidzeina (1); Genisteina (2); Flavona (3).

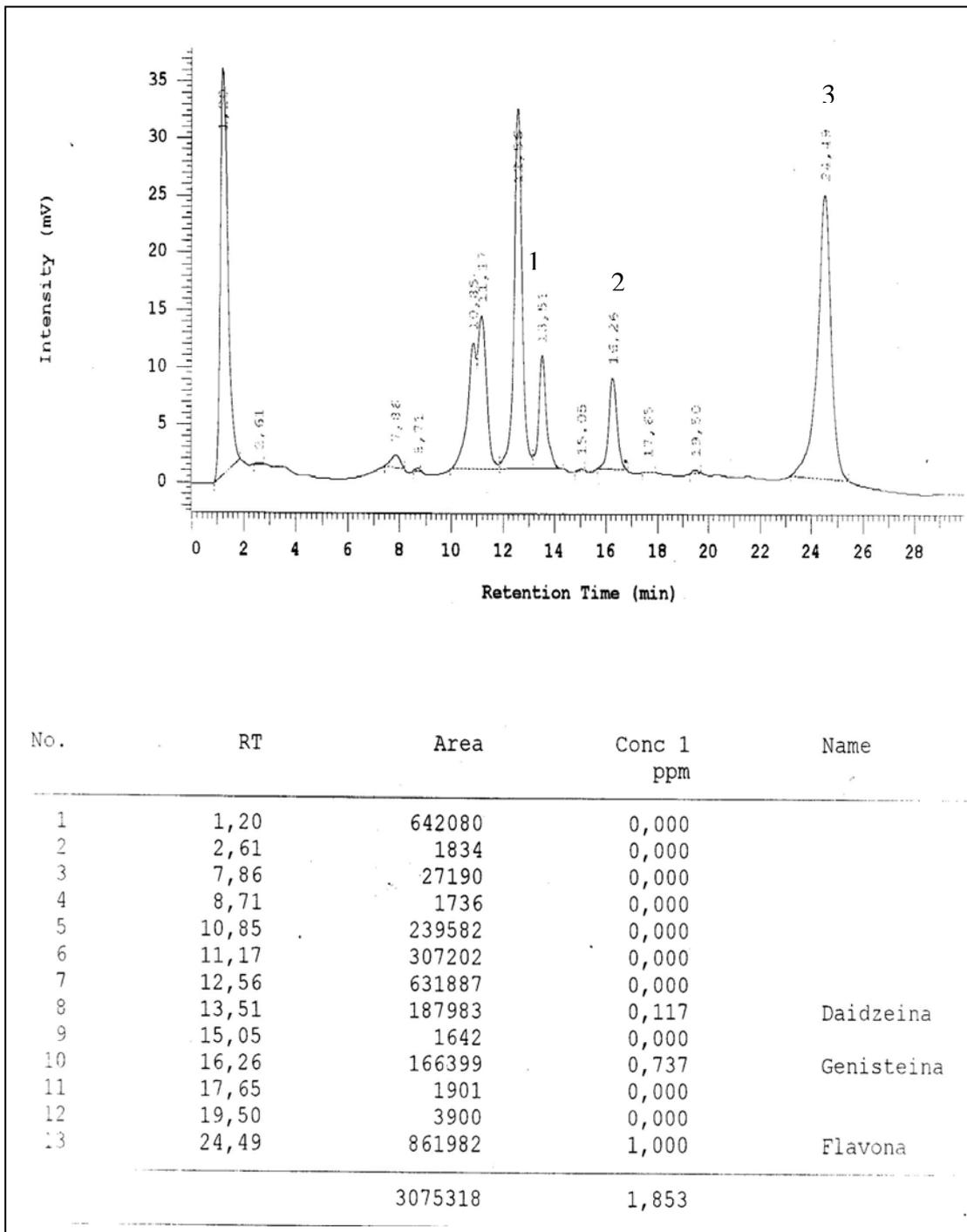


Figura A6: Cromatograma correspondiente a okara de soja no transgénica
D. Daidzeina (1); Genisteina (2); Flavona (3).

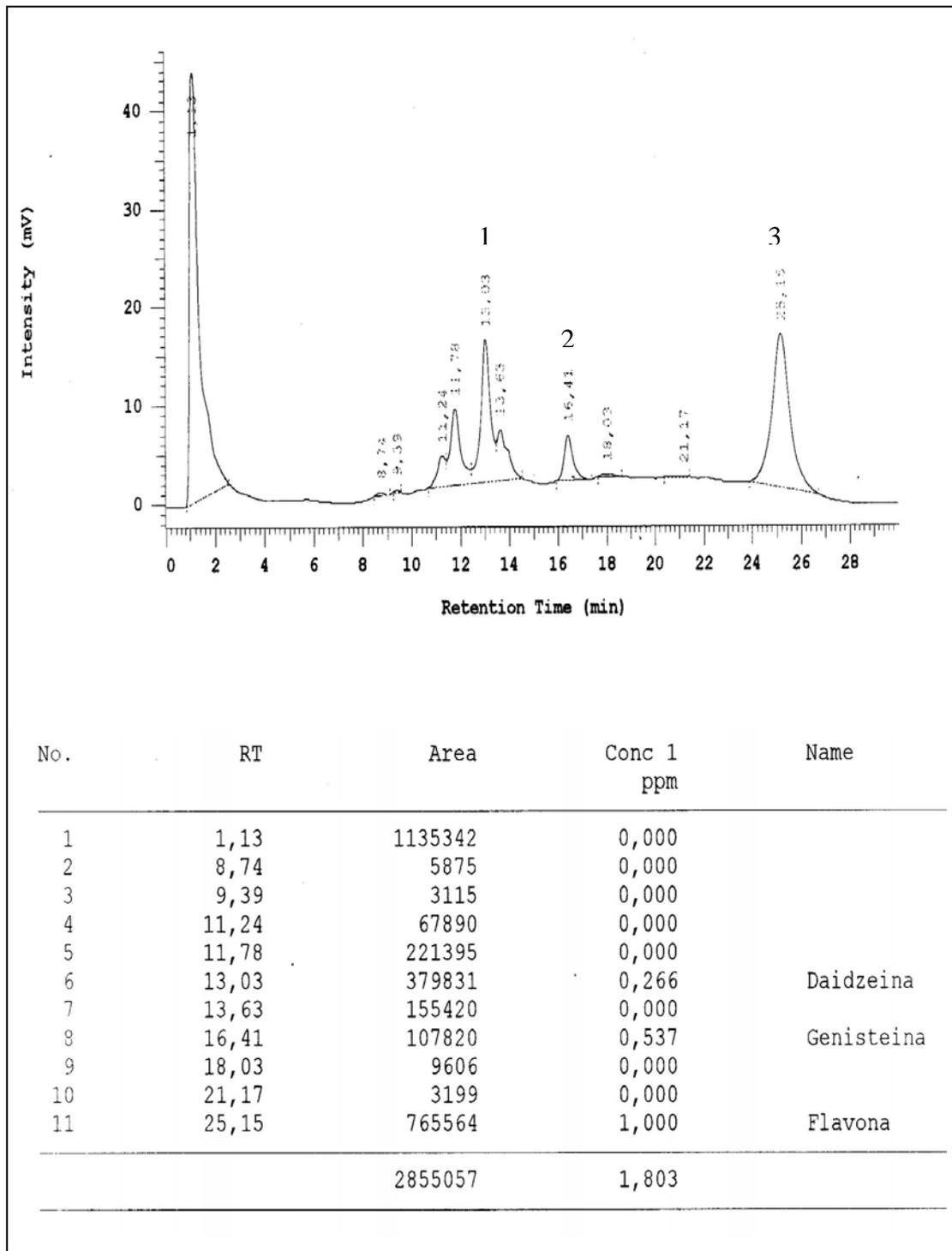


Figura A7: Cromatograma correspondiente a tofu de soja transgénica D diluido. Daidzeina (1); Genisteina (2); Flavona (3).

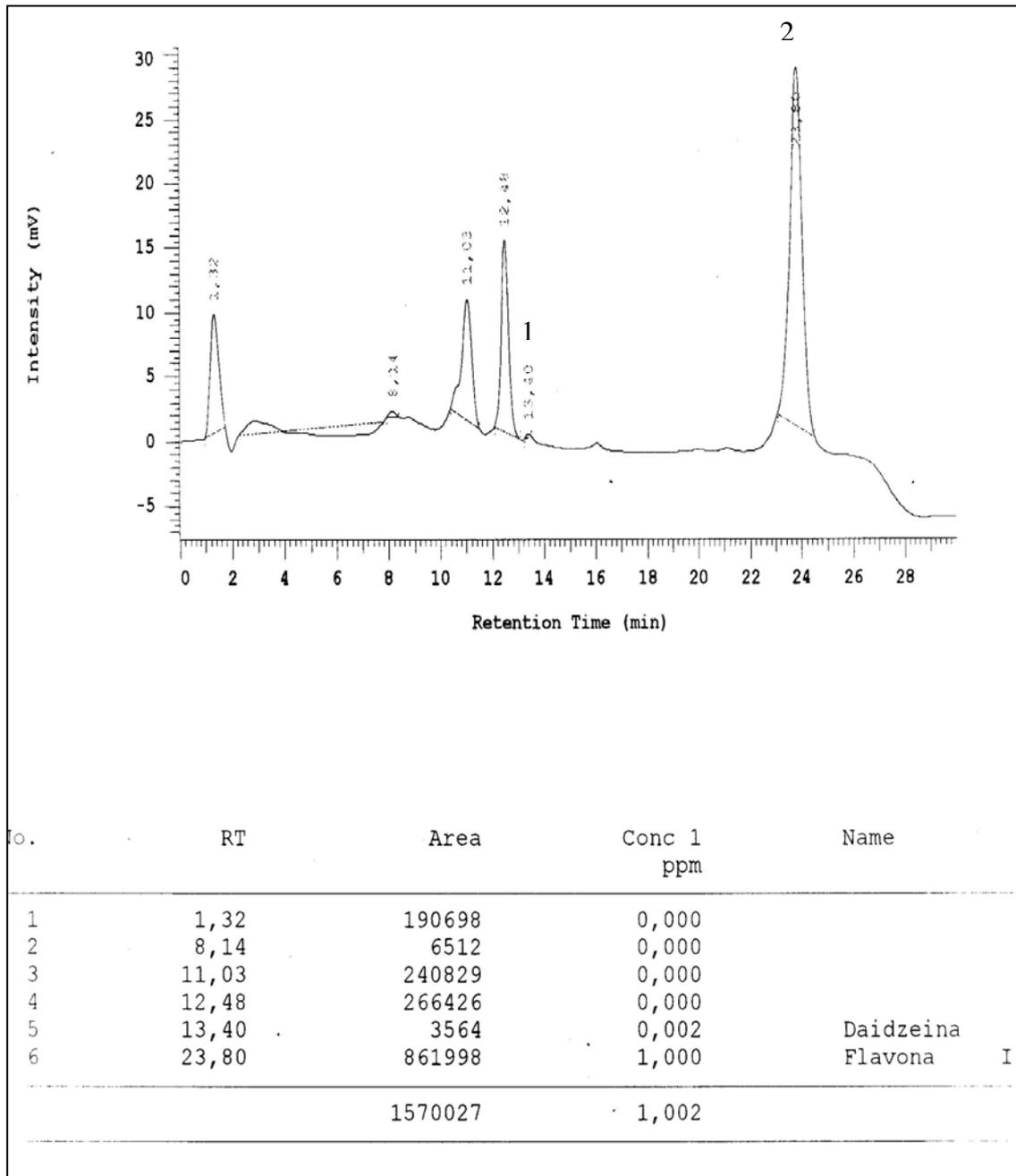


Figura A8: Cromatograma correspondiente a sobrenadante de tofu de soja no transgénica D. Daidzeina (1); Flavona (2). En el mismo se observa que las concentraciones de Daidzeina y Genisteina no son detectadas por el sistema cromatográfico.

	sulfato de calcio	GDL	magnesio cloruro
mL leche (replicado por 3)	50.00	50.00	50.00
ST leche (%)	8.26	8.26	8.26
masa ST (g)	4.13	4.13	4.13
ST suero (%)	2.20	2.45	2.46
Volumen suero (ml)	34.79	28.46	31.72
masa ST en suero (g)	0.77	0.70	0.78
" volumen coágulo" (ml)	15.21	21.54	18.28
rendimiento coágulo (%)	22.12	15.94	18.32
masa coágulo seco (g)	3.36	3.43	3.35
% ST coágulo / ST "leche"	81.46	83.12	81.11

Tabla A1: Datos de una corrida típica de producción de tofu a escala de laboratorio con los tres coagulantes. ST: sólidos totales, GDL: glucono delta lactona.

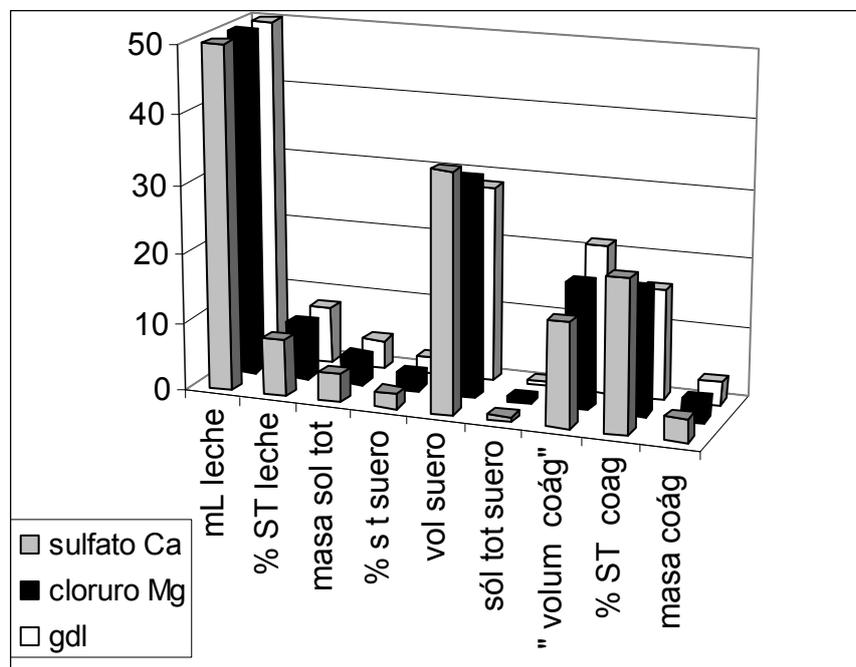


Figura A9: Gráfico de los datos mostrados en la tabla A1.

General Linear Models

Number of dependent variables: 2

Number of categorical factors: 1

Number of quantitative factors: 3

Analysis of Variance for R d g

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio
Model	0,00702095	8	0,000877619	641,51
Residual	0,0000123125		90,00000136805	
Total (Corr.)	0,00703326	17		

Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
coag	0,0000126552	2	0,00000632762	4,63	0,0415
daidz	0,0000583922	1	0,0000583922	42,68	0,0001
genist	0,0000376833	1	0,0000376833	27,55	0,0005
rendim	3,50598E-7	1	3,50598E-7	0,26	0,6249
daidz*daidz	0,0000234756	1	0,0000234756	17,16	0,0025
genist*genist	0,0000105248	1	0,0000105248	7,69	0,0216
rendim*rendim	3,43685E-7	1	3,43685E-7	0,25	0,6282
Residual	0,0000123125	9	0,00000136805		
Total (corrected)	0,00703326	17			

Expected Mean Squares

Source	EMS
coag	(8)+Q1
daidz	(8)+Q2
genist	(8)+Q3
rendim	(8)+Q4
daidz*daidz	(8)+Q5
genist*genist	(8)+Q6
rendim*rendim	(8)+Q7
Residual	(8)

F-Test Denominators

Source	Df	Mean Square	Denominator
coag	9,00	0,00000136805	(8)
daidz	9,00	0,00000136805	(8)
genist	9,00	0,00000136805	(8)
rendim	9,00	0,00000136805	(8)
daidz*daidz	9,00	0,00000136805	(8)
genist*genist	9,00	0,00000136805	(8)
rendim*rendim	9,00	0,00000136805	(8)

Variance Components

Source	Estimate
Residual	0,00000136805

R-Squared = 99,8249 percent

R-Squared (adjusted for d.f.) = 99,6693 percent

Standard Error of Est. = 0,00116964

Mean absolute error = 0,000614892

Durbin-Watson statistic = 1,76638 (P=0,0601)

Residual Analysis

	Estimation	Validation
n	18	
MSE	0,00000136805	
MAE	0,000614892	
MAPE	0,599632	
ME	2,08167E-16	
MPE	-0,00822579	

Analysis of Variance for Suma D G

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Model	167568,0	8	20946,0 *****		0,0000
Residual	2,18279E-10	9	2,42532E-11		
Total (Corr.)	167568,0	17			

Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
coag 1,0000	5,16988E-26	2	2,58494E-26	0,00	
daidz	0,526725	1	0,526725 *****		0,0000
genist	32,5137	1	32,5137 *****		0,0000
rendim 1,0000	4,91138E-25	1	4,91138E-25	0,00	
daidz*daidz 1,0000	2,84343E-24	1	2,84343E-24	0,00	
genist*genist 1,0000	2,50739E-24	1	2,50739E-24	0,00	
rendim*rendim	4,91138E-25	1	4,91138E-25	0,00	1,0000
Residual	2,18279E-10	9	2,42532E-11		
Total (corrected)	167568,0	17			

Expected Mean Squares

Source	EMS
coag	(8)+Q1
daidz	(8)+Q2
genist	(8)+Q3
rendim	(8)+Q4
daidz*daidz	(8)+Q5
genist*genist	(8)+Q6
rendim*rendim	(8)+Q7
Residual	(8)

F-Test Denominators

Source	Df	Mean Square	Denominator
coag	9,00	2,42532E-11	(8)
daidz	9,00	2,42532E-11	(8)
genist	9,00	2,42532E-11	(8)
rendim	9,00	2,42532E-11	(8)
daidz*daidz	9,00	2,42532E-11	(8)
genist*genist	9,00	2,42532E-11	(8)
rendim*rendim	9,00	2,42532E-11	(8)

Variance Components

Source	Estimate
Residual	0,0

R-Squared = 100,0 percent

R-Squared (adjusted for d.f.) = 100,0 percent

Standard Error of Est. = 0,00000492475

Mean absolute error = 2,31898E-10

Durbin-Watson statistic = 0,000855917 (P=0,0000)

Residual Analysis

	Estimation	Validation
n	18	
MSE	2,42532E-11	
MAE	2,31898E-10	
MAPE	2,04151E-10	
ME	-2,31898E-10	
MPE	-2,04151E-10	

The StatAdvisor

This pane summarizes the results of fitting 2 general linear statistical model relating 2 dependent variables to 4 predictive factors. Since the P-value in the first ANOVA table for R d g is less than 0.01, there is a statistically significant relationship between R d g and the predictor variables at the 99% confidence level.

The R-Squared statistic indicates that the model as fitted explains 100,0% of the variability in R d g. The adjusted R-squared statistic, which is more suitable for comparing models with different numbers of independent variables, is 100,0%. The standard error of the estimate shows the standard deviation of the residuals to be 0,00000492475.

This value can be used to construct prediction limits for new observations by selecting the Reports option from the text menu. The mean absolute error (MAE) of 0,000614892 is the average value of the residuals. The Durbin-Watson (DW) statistic tests the residuals to determine if there is any significant correlation based on the order in which they occur in your data file. Since the P-value is greater than 0.05, there is no indication of serial autocorrelation in the residuals.

The output also summarizes the performance of the model in fitting the data, and in predicting any values withheld from the fitting process. It displays:

- (1) the mean squared error (MSE)
- (2) the mean absolute error (MAE)
- (3) the mean absolute percentage error (MAPE)
- (4) the mean error (ME)
- (5) the mean percentage error (MPE)

Each of the statistics is based on the residuals. The first three statistics measure the magnitude of the errors. A better model will give a smaller value. The last two statistics measure bias. A better model will give a value close to 0.0.

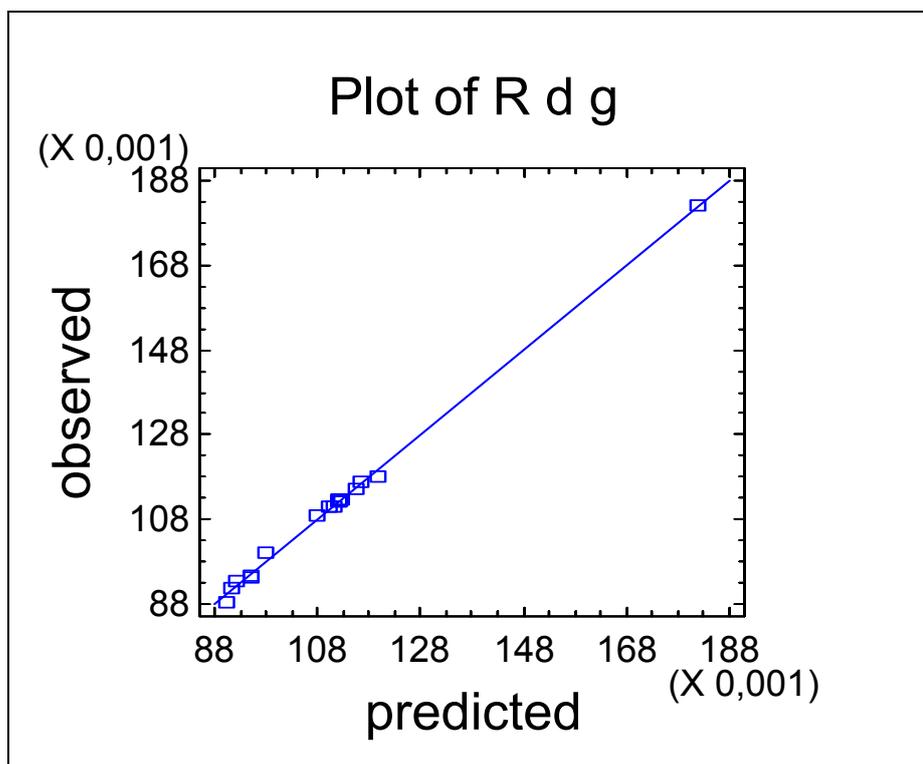


Figura A10: Gráfico de Relación Daidzeina (d), Genisteína (g), valores predichos vs valores observados.

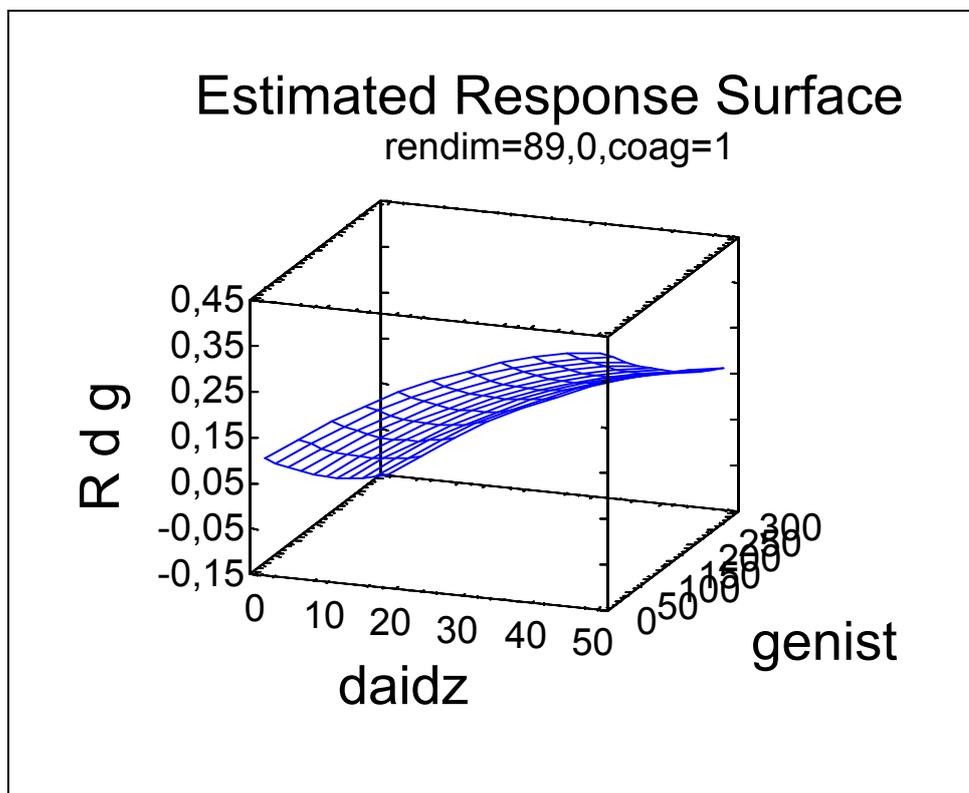


Figura A11: Gráfico de Relación Daidzeína (d), Genisteína (g), vs cada constituyente

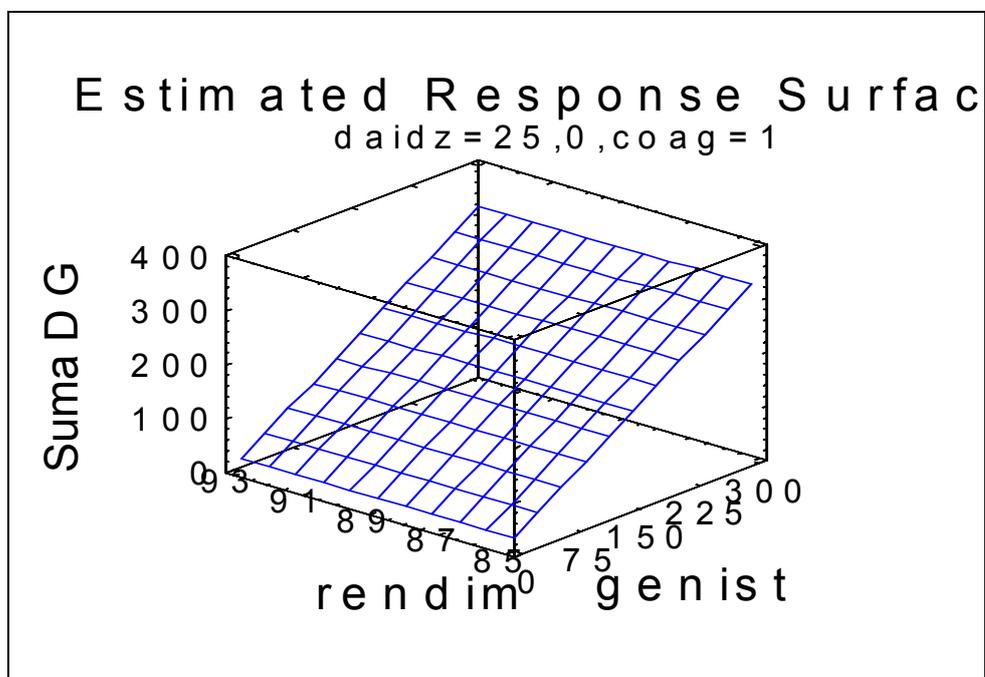


Figura A12: Gráfico de Suma Daidzeina (d), Genisteína (g), vs rendimiento y concentración de Genisteína.