

UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO

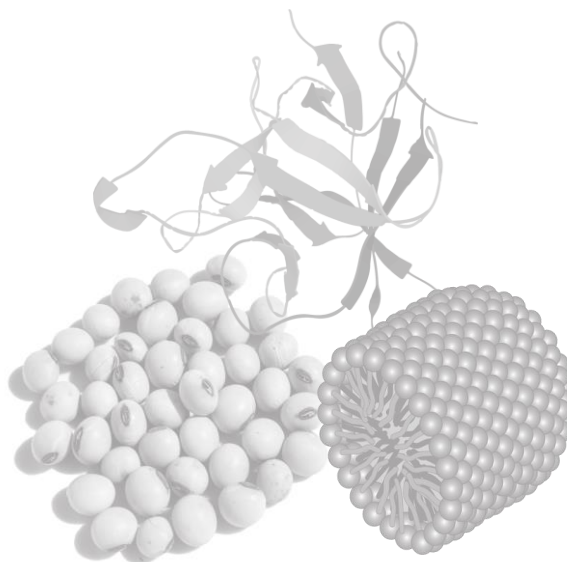
FACULTAD DE CIENCIAS BIOQUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



TESIS DOCTORAL

***DESARROLLO DE PROCESOS ALTERNATIVOS
PARA LA DETOXIFICACIÓN DE
SUBPRODUCTOS DE SOJA***

EZEQUIEL R. COSCUETA





UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO
FACULTAD DE CIENCIAS BIOQUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

Tesis para la obtención del Grado Académico de Doctor en Ciencias Biológicas

**“DESARROLLO DE PROCESOS ALTERNATIVOS PARA LA DETOXIFICACIÓN DE
SUBPRODUCTOS DE SOJA”**

Lic. Ezequiel Ricardo Coscueta

Director: Dra. Bibiana Beatriz Nerli

Co-director: Dra. Luciana Pellegrini Malpiedi

Instituto de Procesos Biotecnológicos y Químicos

UNR-CONICET

Rosario, Argentina

2017

Parte de los resultados obtenidos en el marco de esta tesis doctoral fueron publicados en:

Artículos publicados en Revistas Internacionales con referato

- ☞ **Coscueta, ER**, Pintado, MM, Picó, GA, Knobel, G, Boschetti, CE, P. Malpiedi, L y Nerli, BB (2017). *Continuous method to determine the trypsin inhibitor activity in soybean flour*. Food Chemistry, 214, 156-161, doi: 10.1016/j.foodchem.2016.07.056.
- ☞ Cordisco, E, Haidar, CN, **Coscueta, ER**, Nerli, BB y P. Malpiedi, L (2016). *Integrated extraction and purification of soy isoflavones by using aqueous micellar systems*. Food Chemistry, 213, 514-520, doi: 10.1016/j.foodchem.2016.07.001.
- ☞ **Coscueta, ER**, Amorim, MM, Voss, GB, Nerli, BB, Picó, GA y E. Pintado, MM (2016). *Bioactive properties of peptides obtained from Argentinian defatted soy flour protein by Corolase PP hydrolysis*. Food Chemistry, 198, 36-44, doi: 10.1016/j.foodchem.2015.11.068.

Artículos inéditos

- ☞ **Coscueta, ER**, P. Malpiedi, L y Nerli, BB. *Micellar systems of aliphatic alcohol ethoxilates as a sustainable alternative to extract soybean isoflavones*. Enviado para su publicación.
- ☞ Haidar, CN, **Coscueta, ER**, Cordisco, E, Nerli, BB y P. Malpiedi, L. *Selective removal of soy antinutritional factors by applying aqueous micellar two-phase systems*. Enviado para su publicación.

Comunicaciones orales en reuniones científicas nacionales e internacionales

- ☞ **Coscueta, ER**, P. Malpiedi, L y Nerli, BB (2016). *Extracción de isoflavonas de soja mediante sistemas micelares acuosos (SMAs) de bajo impacto*. IV Simposio Argentino de Procesos Biotecnológicos (SAPROBIO 2016), Buenos Aires, Argentina.
- ☞ **Coscueta, ER**, Nerli, BB, Picó, GA y E. Pintado, MM (2015). *Optimización del grado de hidrólisis y actividad antioxidante de hidrolizados de harina de soja con Cardosina y Corolasa PP*. XVI National Congress of Biotechnology and Bioengineering, Universidad Autónoma de Coahuila, Guadalajara, Jalisco, México.

- ☞ **Coscueta, ER**, Voss, GB, Amorim, MM, Nerli, BB, Picó, GA y E. Pintado, MM (2014). *Bioactive peptides obtained from defatted soy flour protein by Corolase PP hydrolysis*. Total Food Conference: Science and technology for the economic and sustainable exploitation of agri-food chain wastes and co-products. Norwich, Inglaterra.

Trabajos completos en reuniones científicas nacionales e internacionales

- ☞ **Coscueta, ER**, Campos, DA, E. Pintado, MM, P. Malpiedi, L y Nerli, BB (2017). *Sistemas micelares acuosos formados por alcoholes etoxilados: caracterización y efecto de sales cosmotrópicas*. XX Congreso Argentino de Fisicoquímica y Química Inorgánica (CAFQI 2017), Carlos Paz, Córdoba, Argentina.
- ☞ **Coscueta, ER**, Picó, GA, E. Pintado, MM, Knobel, G, Boschetti, C, P. Malpiedi, L y Nerli, BB (2016). *A novel continuous method to determine the antitrypsin inhibitor activity in soybean derivatives*. Bio.Iberoamérica 2016. Salamanca, España.
- ☞ **Coscueta, ER**, Amorim, MM, Voss, GB, Nerli, BB, Picó, GA y E. Pintado, MM (2015). *Identification of bioactive peptides from soy protein hydrolysates*. Microbiotec'15. Évora, Portugal.

Parte de los resultados publicados han sido distinguidos

Premio SAPROBIO 2016 a la mejor presentación de la sesión Bioprocesos en la Industria Alimentaria y de Remediación Ambiental para el trabajo: *Extracción de isoflavonas de soja mediante sistemas micelares acuosos (SMAs) de bajo impacto*. **Coscueta, ER**, P. Malpiedi, L y Nerli, BB.

Este trabajo de Tesis Doctoral ha sido realizado con las siguientes becas:

- ☞ Beca doctoral del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET-Argentina, 2015-2020). Directora: Dra. Bibiana B. Nerli.
- ☞ Beca FP7-PEOPLE-2013-IRSES-Marie Curie Actions (2014-2015). Directoras: Dra. Maria Manuela E. Pintado y Dra. Bibiana B. Nerli.

Parte de los resultados presentados en esta tesis han sido obtenidos durante estadias en el exterior en el marco de proyectos de cooperación:

Tareas de investigación y desarrollo llevadas a cabo en el Centro de Biotecnología e Química Fina, Escola Superior de Biotecnologia, Universidade Católica Portuguesa, en el marco del Programa Marie Curie Actions titulado “Biotechnologies to Valorise the regional food Biodiversity in Latin America” (BiValBi). Proyecto financiado por la Comisión Europea (2013-2016).



*“La felicidad sólo es real cuando es
compartida.”*

Christopher McCandless

Ya lo dijo Christopher McCandless, *«el núcleo básico del espíritu vivo de un hombre es su pasión por la aventura. La alegría de la vida proviene de nuestros encuentros con nuevas experiencias y, por lo tanto, no hay mayor alegría que tener un horizonte infinitamente cambiante, para que cada día tenga un sol nuevo y diferente»*.

Así es como aprendí a llevar la vida, persiguiendo metas y haciendo del propio camino una aventura. Ya lo dijo un viejo sabio *«el movimiento se aprende andando»*. Así hoy culmino una nueva etapa, llena de experiencias inolvidables, de aciertos, de errores, un aprendizaje de casi cuatro años. Y como en todo buen camino, viajé bajo un cielo lleno de estrellas, esas que alumbraron mi paso en la oscuridad de lo desconocido, aquellos astros a los que estaré siempre agradecido por acompañarme incansablemente....

- ☞ A mi familia, mi mayor tesoro y máximo orgullo, gracias a ellos estoy y soy quien soy. Ellos dieron alas a mis sueños, mi espíritu aventurero y me hicieron creer que podía ser todo lo que mi imaginación y determinación me permitieran.
- ☞ A mi amor, Debby, mi compañera incondicional, la gema invaluable con la que tuve la fortuna de ser premiado en este andar. Gracias por ser siempre mi motor, mi musa, mi amiga, mi todo.
- ☞ A esa dulce y sabia persona que me honró con su guía maternal y profesional, mi directora, Bibi. Muchas gracias por tus consejos, tus enseñanzas, tu buena onda infinita, estoy muy agradecido de haber tenido la suerte de conocerte y compartir juntos estos años, porque tu luz siempre me mostró el camino para ser, sobre todo, mejor persona.
- ☞ A essa grande mulher portuguesa, dedicada e incansável, um exemplo para todos os cientistas, Manuela Pintado. Obrigado por me ter recebido no seu grupo, sempre com os braços abertos, com todo o seu carinho e que me permitiu crescer como profissional e como pessoa.
- ☞ A mis grandes y viejos amigos y amigas de la vida, mis compañeros incondicionales, transversales al tiempo y la distancia. Gracias por tantas emociones, risas, tristezas, debates, viajes... vida, esa necesaria para alcanzar el verdadero éxito.
- ☞ Para os meus queridos Idiots e Tugas, um grande prémio que o velho continente me ofereceu, já são uma parte inesquecível de mim. Obrigado por me darem tudo, principalmente a vossa amizade.
- ☞ A Luciana y mis compañeros del IPROByQ y de Físicoquímica, a quienes voy a estar siempre agradecido por su buena onda, amistad, divertidos almuerzos, risas, en fin, por todo el compañerismo que tuvieron con este foráneo.

☞ A la Asociación Santafesina de Biotecnología (ASB), esos locos e incansables idealistas, con quienes compartimos tantos momentos, satisfacciones y frustraciones, pero siempre trabajando para el futuro, por la profesión que adoramos, la Biotecnología. Agradecido siempre por haberme dejado ser parte de este loco camino desde que sólo era un sueño de estudiantes y becarios.

Dicen que la curiosidad mató al gato, pero no dicen si lo que descubrió valió la pena.



COSUE 2017

ÍNDICE

Índice.....	I
Abreviaturas y Símbolos.....	VII
Abstract.....	XI
Resumen.....	XV
.....	1
PARTE I Introducción.....	1
CAPÍTULO 1- Estado del arte.....	5
1.1. Soja.....	5
1.1.1. La semilla sagrada.....	6
1.1.2. Producción y mercado.....	7
1.1.3. Productos proteicos de soja.....	9
1.1.3.1. Harina y sémola de soja.....	11
1.1.3.2. Concentrados proteicos de soja.....	13
1.1.3.3. Aislados proteicos de soja.....	15
1.1.4. Proteína de soja: propiedades nutricionales y biofuncionales.....	16
1.1.5. Isoflavonas.....	19
1.1.6. Factores antinutricionales.....	22
1.1.6.1. Inhibidores de tripsina.....	23
1.1.6.2. Oligosacáridos.....	26
1.1.6.3. Detoxificación.....	27
1.2. Sistemas extractivos acuosos.....	30
1.2.1. Sistemas bifásicos acuosos.....	30
1.2.2. Sistemas micelares acuosos.....	31
1.2.2.1. Surfactantes.....	31
1.2.2.2. Formación de micelas.....	34
1.2.2.3. Fenómeno de turbidez.....	36
1.2.3. Sistemas micelares de surfactantes no-iónicos.....	38

CAPÍTULO 2 – Objetivos	41
2.1. Objetivo general.....	41
2.2. Objetivos específicos.....	41
PARTE II Experimental	45
CAPÍTULO 3 - Materiales y Métodos.....	49
3.1. Materiales.....	49
3.2. Metodología.....	50
3.2.1. Espectrometría en IR medio (ATR-FTIR).....	50
3.2.2. Concentración micelar crítica (CMC).....	51
3.2.3. Punto de turbidez (PT)	51
3.2.4. Espectrometría de dispersión de luz (DLS/SLS).....	52
3.2.4.1. Dispersión dinámica de luz (DLS)	53
3.2.4.2. Dispersión estática de luz (SLS)	54
3.2.5. Parámetros morfológicos	55
3.2.5.1. Número de agregación	55
3.2.5.2. Área superficial de la región hidrofílica en la micela	56
3.2.5.3. Parámetro de empaquetado	56
3.2.5.4. Factor de Perrin	57
3.2.6. Preparación de harinas de soja con diferente actividad inhibitoria de tripsina (TIA) 58	
3.2.7. Extracción de inhibidores de tripsina (IT) y proteínas totales	58
3.2.8. Método de determinación de TIA discontinuo.....	59
3.2.9. Método de determinación de TIA continuo.....	59
3.2.9.1. Reactivos.....	59
3.2.9.2. Mediciones	60
3.2.9.3. Cálculos.....	61
3.2.9.4. Modificaciones adicionales	61
3.2.10. Preparación de aislados de proteína de soja.....	62
3.2.11. Hidrólisis enzimática con Corolase PP	62

3.2.12.	Determinación del grado de hidrólisis (GH).....	63
3.2.13.	Análisis por cromatografía de filtración por geles.....	63
3.2.14.	Electroforesis (SDS-PAGE).....	64
3.2.15.	Determinación de proteínas totales en solución (Pt)	64
3.2.16.	Determinación de la capacidad antioxidante	65
3.2.17.	Determinación de la capacidad inhibitoria sobre ECA	66
3.2.18.	Análisis unifactorial de las condiciones de extracción de IT.....	67
3.2.18.1.	Extracción a diferentes pH.....	67
3.2.18.2.	Cinética de extracción a pH 4,5	67
3.2.18.3.	Evaluación de los extractos.....	68
3.2.19.	Extracción de isoflavonas con diferentes solventes	68
3.2.20.	Contenido polifenólico total (CPT)	68
3.2.21.	Identificación de IFs por cromatografía en capa delgada	69
3.2.22.	Análisis multifactorial de cribado	69
3.2.23.	Optimización por superficies de respuesta.....	70
3.2.23.1.	Diseño compuesto central.....	70
3.2.23.2.	Diseño Box-Behnken.....	71
3.2.24.	Determinación de IFs por HPLC.....	73
3.2.25.	Producción de concentrados proteicos de soja.....	73
3.2.25.1.	Por acidificación	73
3.2.25.2.	Por utilización de SMAs.....	74
3.2.26.	Determinación de oligosacáridos por HPLC	75
3.2.27.	Parámetros de eficiencia de extracción de IFs y RFOs	75
3.2.28.	Simulación de sistema gastrointestinal in-vitro (SGI).....	76
3.2.29.	Análisis estadístico	77
PARTE III	Resultados y Discusión.....	79
CAPÍTULO 4	- Caracterización fisicoquímica de sistemas micelares acuosos	83
4.1.	Espectro IR de los surfactantes.....	85
4.2.	Concentración micelar crítica.....	85

4.3. Punto de turbidez.....	88
4.4. Comportamiento hidrodinámico de las micelas.....	91
4.5. Ensamblado y configuración micelar.....	95
4.6. Influencia de la temperatura.....	101
4.6.1. Diámetro hidrodinámico.....	101
4.6.2. Interacción IF-micela.....	103
4.7. Conclusiones parciales.....	107
CAPÍTULO 5- Indicadores de seguimiento y valoración del proceso de detoxificación	109
Control del contenido de inhibidores de tripsina.....	109
Propiedades bioactivas potenciales.....	110
5.1. Método continuo para determinar actividad inhibidora de tripsina en harina de soja.....	112
5.1.1. Método propuesto vs método estándar.....	112
5.1.2. Análisis de la curva de reacción y linealidad del ensayo.....	116
5.2. Bioactividad de la proteína de soja.....	118
5.2.1. Hidrólisis.....	119
5.2.2. Caracterización de los hidrolizados peptídicos.....	120
5.2.2.1. Cromatografía de filtración por geles.....	120
5.2.2.2. SDS-PAGE.....	122
5.2.3. Capacidad antioxidante de los hidrolizados.....	123
5.2.4. Capacidad inhibitoria sobre la actividad de ECA.....	125
5.3. Conclusiones parciales.....	126
CAPÍTULO 6- Condiciones de proceso: análisis exploratorio.....	129
6.1. Extracción acuosa de IT: influencia de pH y tiempo.....	132
6.1.1. Influencia del pH.....	132
6.1.2. Cinética de extracción a pH 4,5.....	133
6.2. Extracción de IF: análisis exploratorio.....	134
6.2.1. Eficiencia extractiva de diferentes solventes.....	134

6.2.2. Factores influyentes	136
6.3. Conclusiones parciales	140
CAPÍTULO 7- Optimización de procesos	141
7.1. Optimización de la extracción de IFs con GX.....	142
7.2. Optimización de la extracción de antinutrientes con SMAs.....	146
7.3. Conclusiones parciales	162
CAPÍTULO 8 - Producción de concentrados proteicos de soja	165
8.1. Caracterizando el proceso.....	167
8.1.1. Caracterización peptídica de los SWPs.....	168
8.1.2. Extracción de isoflavonas.....	170
8.1.3. Extracción de rafinosa/estaquirosa.....	173
8.2. Caracterizando el producto	174
8.2.1. Espectrometría IR.....	174
8.2.2. Contenido proteico y actividad inhibitoria de tripsina.....	178
8.2.3. Digestibilidad y bioactividad	180
8.3. Conclusiones parciales	185
PARTE IV Conclusiones	187
CAPÍTULO 9- Conclusiones generales	191
PARTE V Bibliografía	195
Referencias Bibliográficas	197

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

a_0	Área de la sección transversal de cada cabeza hidrofílica a nivel de la superficie de la micela
A_2	Segundo coeficiente del virial
ABC	Área bajo la curva de extinción de la fluorescencia
Abs	Absorbancia
ANOVA	Análisis de la varianza
ANS	1-anilino-8-naftaleno sulfonato de amonio
ATR	Reflectancia total atenuada
BAPNA	α -N-benzoilo-DL-arginina-p-nitroanilida
BCA	Ácido bicinconínico
BLS	Regresión por mínimos cuadrados bivariada
C	Concentración
CMC	Concentración micelar crítica
CPT	Contenido polifenólico total
CV	Coefficiente de variación
D^0	Coefficiente de difusión a dilución infinita
d_h^0	Diámetro hidrodinámico a dilución infinita
d_{anh}	Diámetro anhidro
d_h	Diámetro hidrodinámico
DLS	Dispersión dinámica de luz
D_m	Coefficiente de difusión medido
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTT	Dithiothreitol
ECA	Enzima convertora de angiotensina-I
EDFA	Extracción en dos fases acuosas
EJCR	Región elíptica de confianza conjunta
EM	Extracción micelar
F	Valor estadístico F

F_D	Factor de dilución
FI	Fase inferior
FP	Factor de Perrin
FS	Fase superior
FTIR	Espectrometría infrarroja con transformada de Fourier
GH	Grado de hidrólisis
GX	Genapol X-080
Hna	Harina de soja
IC	Intervalo de confianza
IC_{50}	Concentración capaz de inhibir el 50% de la actividad enzimática
$iECA$	Capacidad inhibitoria sobre la actividad de la enzima convertora de angiotensina-I
I_F	Intensidad de fluorescencia
IT	Inhibidores de tripsina
ITBB	Inhibidor de tripsina tipo Bowman-Birk
ITK	Inhibidor de tripsina tipo Kunitz
k_D	Parámetro de interacción de difusión
m	Pendiente de la curva de regresión
m/m	Masa en masa
m/V	Masa en volumen
Ma	Método clásico de concentrado proteico de soja
M_m	Masa molecular
Mp	Método propuesto de concentrado proteico de soja
n	Índice de refracción
N_A	Número de Avogadro
NaCit	Citrato de sodio
N_{ag}	Número de agregación
OE	Oxietilenos
ORAC	Capacidad de captación de radicales de oxígeno
P	Valor de prueba

<i>PdI</i>	Índice de polidispersidad
<i>PE</i>	Parámetro de empaquetado
POE	Polioxietilenos
<i>Ps</i>	Proteína soluble
<i>PT</i>	Punto de turbidez
<i>Pt</i>	Proteínas totales medidas por BCA
<i>Pt_K</i>	Proteínas totales medidas por Kjeldahl
<i>Pt_D</i>	Proteínas totales medidas por Dumas
R ²	Coefficiente de determinación
R ² _{ajd}	Coefficiente de determinación ajustado
RFO	Oligosacáridos de la familia de la rafinosa
<i>Rf</i>	Factor de retención
RSD	Desvío estándar de los residuos
SBA	Sistema bifásico acuoso
SD	Desvío estándar
SDS	Dodecilsulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
SLS	Dispersión estática de luz
SMA	Sistema micelar acuoso
SMDFA	Sistema micelar de dos fases acuosas
SPH	Hidrolizado de proteína de soja
SPI	Aislado de proteína de soja
<i>T</i>	Temperatura
<i>t</i>	Tiempo
TE	Equivalentes de Trolox
Tg7	Tergitol 15-S-7
Tg9	Tergitol 15-S-9
<i>TIA</i>	Actividad inhibitoria de tripsina
TIU	Unidades de inhibición de tripsina

TLC	Cromatografía en capa delgada
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
TRP	Tripsina
UR	Unidades relativas
\bar{v}	Volumen específico parcial
V/V	Volumen en volumen
V_{anh}	Volumen anhidro
V_E	Volumen de extracción por g de muestra
η	Viscosidad
λ	Longitud de onda
ρ	Densidad

ABSTRACT

In this thesis, a non-destructive detoxification process of soybean flour was proposed. The novel methodology would allow to extract two of its main antinutritional factors, protease inhibitors and indigestible oligosaccharides, preserving the nutritional quality and bioactive properties of the treated material. The possibility of simultaneously recovering soy isoflavones as another by-product of the process, together with the antinutrients was also evaluated. Aqueous micellar systems formed by ethoxylated aliphatic alcohols Genapol X-080 (GX), Tergitol 15-S-7 (Tg7) and Tergitol 15-S-9 (Tg9), all of them non-toxic and biodegradable surfactants, were assessed as potential extractants.

As a starting point, the proposed micellar systems were characterized physico-chemically. The parameters and behavior patterns derived from their supramolecular organization, such as the critical micellar concentration (*CMC*), micellar size, morphology and the phase diagrams were determined since they are related to the tensoactive property, the hydrodynamic behavior and the solubilizing capacity of the systems. The *CMC* values were in the order of 10⁻³% m/m, thus evidencing the formation of micelles and therefore, extractive properties at concentrations much lower than those corresponding to other ethoxylated alkylphenolic alcohols. The cloud points of 46, 39 and 61 °C, obtained for GX, Tg7 and Tg9 aqueous systems (1% m/m) respectively, were sensitive to the presence of sodium citrate (NaCit 50-200 mM). Decreases around of 10 °C were observed in the presence of this salt, thus resulting in more adequate conditions for the recovery of labile molecules. Regarding the micellar size and morphology, it was observed that the assembly of GX and Tg7 was resolved in more asymmetric and larger micelles (greater mass, hydrodynamic diameter and aggregation number) than Tg9 one under the same conditions (1% m/m at 25 °C), this fact confirming the existence of a surfactant structure-micelle configuration relationship.

The extractive process applied on soybean flour was monitored and evaluated by quantifying the isoflavones and antinutrients (oligosaccharides of the raffinose family - RFOs- and trypsin inhibitors) present in the extracts. In addition, protein content and bioactivity (antioxidant and antihypertensive activities obtained by in-vitro gastrointestinal simulation system) were evaluated in both the extract and the treated flour. For the determination of trypsin inhibitors, a continuous methodology, based on the inhibition of tryptic activity against a specific chromogenic substrate, was developed. The proposed methodology exhibited several advantages regard to the traditional method thus being more suitable for monitoring industrial processes. It does not require either clarification or

reagent controls, it involves a drastic reduction of time and reaction volumes, and allows expressing the results in the same units as that of traditional method for interlaboratory comparative purposes.

The three surfactants (GX, Tg7 and Tg9) exhibited good capacity of extracting soy isoflavones when compared with other surfactants and even in relation to traditional organic solvents, the GX showing the best performance. An adequate experimental design, applied in a simple matrix, and its rigorous statistical analysis allowed to identify and optimize the variables that affect the extracting process (GX 11% m/m, pH 4.5, temperature 54 °C and time 60 min). An extrapolation of these conditions on the soybean flour, led to recover an isoflavone amount three times higher than that achieved by methanol, under identical conditions.

Regard to the antinutrients extraction, a Box-Behnken type design with application of the Derringer desirability function was used to determine the optimum conditions that simultaneously maximized the trypsin inhibitors and isoflavone extraction, and minimized the protein extraction. The optimum condition of 5% m/m of surfactant in 50 mM aqueous sodium citrate solution pH 4.5, at 45 °C for 45 min, was established for the three surfactants.

By applying the previously optimized conditions, a detoxification process was designed and carried out. The methodology consists of a first extractive stage with micellar systems, applied to soybean flour for 45 min at 45 °C, followed by phase separation of the extracts by incubation at temperatures above the corresponding cloud points for 15 min. The classic acidic method of obtaining soybean protein concentrate was carried out as a reference for comparative purposes. Different amounts of isoflavones were extracted when applied the proposed process with the three micellar systems, however, in all the cases the recovery was higher (34-55%) than that obtained with the classic methodology. For GX, the total extracted isoflavones were around 1,581 mg/g of flour, while for Tg7 and Tg9, 1,363 mg/g and 1,067 mg/g were obtained respectively. Although GX was more efficient than tergitols in the total amount extracted of isoflavones, the yields obtained in the micellar phase, after the second stage (phase separation), were similar for the three surfactants and close to 60-64%. With respect to the extraction of non-digestible oligosaccharides, no significant differences were observed among the three micellar systems, all of them showing a better performance than the classical methodology by extracting between 26-35% more of these sugars. After phase separation, 79-85% of these antinutrients was recovered in the aqueous phase, thus being separated from the isoflavones.

Finally, after the extraction with micellar systems, soy protein concentrates with more than 50% protein content and a reduced trypsin inhibition activity of approximately 90% were obtained. The quality indicators of these concentrates were like those obtained by the classic methodology. The in-vitro gastrointestinal simulation generated comparable antioxidant and antihypertensive activities. This allows affirming that the extraction with aqueous micellar systems is an interesting alternative for both detoxification of soy derivatives (such as flours/grits) and production of protein concentrates. On one hand, the proposed methodology is superior to the physical processes of destructive detoxification, since it allows both the recovery of valuable trypsin inhibitors in their native state, potentially applicable in oncological diseases, and the reduction of RFOs in the final product, thus overcoming the fails of classic roasting approach. On the other hand, this proposal surpasses the classic concentrate production with a greater non-destructive elimination of antinutritional factors and the recovery of higher amounts of isoflavones which are purified and concentrated as well.

RESUMEN

En el presente trabajo de tesis se planteó el desarrollo de un proceso de detoxificación no-destructivo de harinas de soja que permitiera extraer dos de sus principales factores antinutricionales, los inhibidores de proteasas y los oligosacáridos indigeribles, preservando la calidad nutricional y propiedades bioactivas del material tratado. Se evaluó la posibilidad de recuperar simultáneamente isoflavonas de soja como otro subproducto del proceso, junto a los mencionados antinutrientes. Se emplearon, como potenciales extractantes, sistemas micelares acuosos formados por los alcoholes alifáticos etoxilados Genapol X-080 (GX), Tergitol 15-S-7 (Tg7) y Tergitol 15-S-9 (Tg9), todos ellos surfactantes no-tóxicos y biodegradables.

Como punto de partida se caracterizaron fisicoquímicamente los sistemas micelares propuestos determinando parámetros y patrones de comportamiento vinculados a su organización supramolecular tales como la concentración micelar crítica (*CMC*), el tamaño y morfología micelar y las curvas de coexistencia de fases, ya que estos están vinculados al poder tensoactivo, al comportamiento hidrodinámico y a la capacidad solubilizante de los mencionados sistemas. Los valores de *CMC* resultaron del orden de 10^{-3} % m/m, evidenciando la formación de micelas y por ende propiedades extractivas a concentraciones muy inferiores a aquellas correspondientes a otros alcoholes etoxilados alquilfenólicos. Los puntos de turbidez de 46, 39 y 61 °C, obtenidos para sistemas acuosos al 1 % m/m de GX, Tg7 y Tg9 respectivamente, se mostraron sensibles a la presencia de citrato de sodio (NaCit 50-200 mM) descendiendo alrededor de 10 °C y mejorando las condiciones para la recuperación de moléculas lábiles. En relación con el tamaño y morfología micelar, analizando en forma comparativa los sistemas, se observó que el ensamblado de GX y Tg7 se resolvió en micelas más asimétricas y de mayor tamaño (mayores masa, diámetro hidrodinámico y número de agregación) que el Tg9 bajo las mismas condiciones (1 % m/m a 25 °C) pudiendo establecerse vínculos entre sus características estructurales y la configuración adoptada.

El seguimiento y valoración del proceso extractivo aplicado sobre harina de soja se realizó cuantificando las isoflavonas y los antinutrientes (oligosacáridos de la familia de la rafinosa -RFOs- e inhibidores de tripsina) extraídos y evaluando en paralelo en dicho extracto y en el material tratado, el contenido y bioactividad proteicos (actividades antioxidante y antihipertensiva obtenidas en un sistema de simulación gastrointestinal in-vitro). Particularmente, para la determinación de los inhibidores de tripsina, se desarrolló una metodología continua, basada en la inhibición de la actividad trípica frente a un

sustrato cromogénico específico, con ventajas comparativas que la hacen más adecuada para el seguimiento de procesos industriales que el método tradicionalmente utilizado. La misma no requiere de clarificación ni elaboración de blancos de reactivos, implica una drástica reducción del tiempo y volúmenes de reacción, y permite expresar sus resultados en las mismas unidades que el método tradicional a los fines comparativos interlaboratorio.

Se demostró que los tres surfactantes ensayados exhiben buenas cualidades extractivas de isoflavonas de soja en comparación a otros tensoactivos e inclusive en relación a solventes orgánicos tradicionales, destacándose el desempeño del GX. Preliminarmente, mediante un adecuado diseño experimental y su riguroso análisis con las herramientas estadísticas correctas, desarrollado sobre una matriz más simple, se logró identificar y optimizar las variables que afectan al proceso (GX 11 % m/m, pH 4,5; temperatura 54°C y tiempo 60 min). Una extrapolación de dichas condiciones, permitió recuperar a partir de harina de soja una cantidad de isoflavonas tres veces superior a la lograda por metanol, bajo idénticas condiciones.

En relación a la extracción de los antinutrientes, un diseño del tipo Box-Behnken con aplicación de la función deseabilidad de Derringer fue utilizado para determinar las condiciones óptimas que conjuntamente maximizan la extracción de los inhibidores de tripsina y de isoflavonas, y minimizan la extracción de material proteico nutricional. Se estableció, entonces, la condición óptima de 5% m/m de surfactante en solución acuosa de citrato de sodio 50 mM pH 4,5, a 45 °C durante 45 min, común a los tres surfactantes empleados.

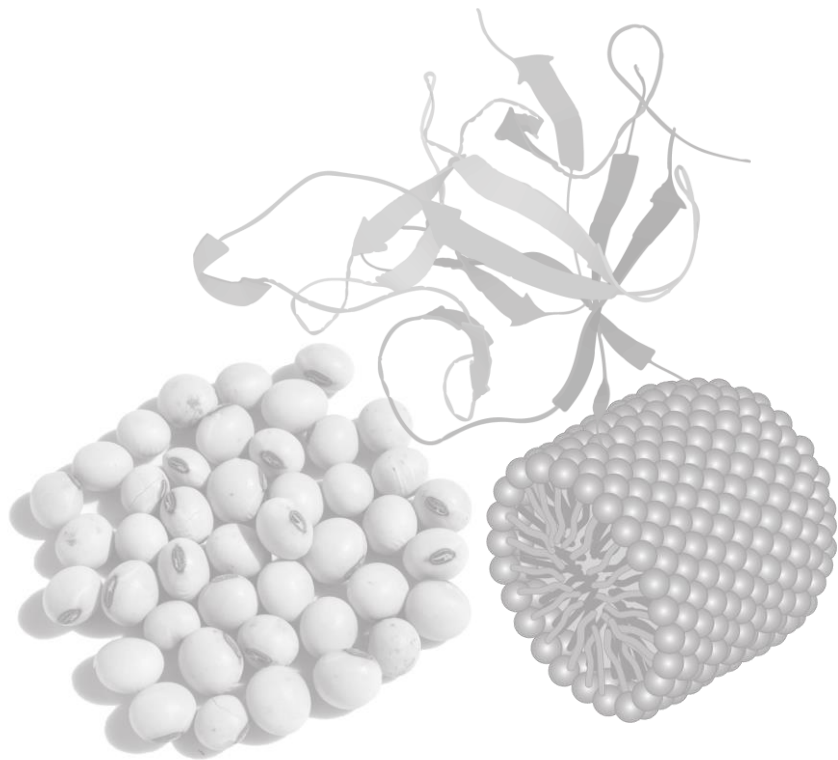
Aplicando las condiciones optimizadas precedentemente, se diseñó y llevó a cabo un proceso de detoxificación consistente en una primera etapa extractiva con sistemas micelares, aplicada sobre harina de soja durante 45 min a 45 °C, seguida de la separación de fases del extracto por incubación a temperaturas por encima de los correspondientes puntos de turbidez por 15 min. Paralelamente, como referencia, se utilizó el método ácido clásico de producción de concentrado proteico de soja. A partir del proceso propuesto se extrajeron diferentes cantidades de isoflavonas según el sistema micelar aplicado, pero siempre superiores (34 - 55%) a lo obtenido con la metodología clásica de concentrado. Para GX las isoflavonas totales extraídas rondaron 1,581 mg/g de harina, mientras que con Tg7 y Tg9 se lograron 1,363 mg/g y 1,067 mg/g respectivamente. Si bien GX fue más eficiente que los tergitoles en la cantidad total extraída de isoflavonas, los rendimientos alcanzados en la fase micelar, luego de la segunda etapa de separación de fases, fueron similares para los tres surfactantes y próximos al 60 - 64%. Con respecto a los

oligosacáridos no-digeribles, ningún sistema micelar se diferenció de los otros, pero todos fueron mejores que la metodología clásica, extrayendo entre 26 - 35% más de estos azúcares. Luego de la separación de fases, el 79-85 % de este antinutriente fue recuperado en la fase acuosa, separándose de las isoflavonas.

Finalmente, luego de la extracción con sistemas micelares se obtuvieron concentrados proteicos de soja con más de 50% de proteína y una actividad de inhibición de tripsina reducida en aproximadamente un 90%, valores similares a los obtenidos en el concentrado clásico. La simulación gastrointestinal in-vitro de estos productos generó actividades antioxidante y antihipertensiva comparables. Esto permite afirmar que los procesos con sistemas micelares acuosos son una interesante alternativa de detoxificación de derivados de soja, tales como las harinas/sémolas, y de producción de concentrados proteicos. La metodología propuesta, por un lado, es superadora de los procesos físicos de detoxificación destructivos, al permitir simultáneamente tanto la recuperación de inhibidores de tripsina en su estado nativo, los cuales son valorados como alternativas terapéuticas en dolencias graves como las oncológicas, así como la reducción en el producto final de otros factores antinutricionales, los RFOs, que enfoques clásicos como el tostado, no consiguen eliminar. Por otro lado, esta propuesta aventaja al concentrado clásico con una mayor eliminación no-destructiva de factores antinutricionales, así como la recuperación de mayor cantidad de isoflavonas y una purificación y concentración de las mismas.

PARTE I

Introducción



*“Otras especies animales también
son curiosas, pero la posibilidad de
preguntarnos «¿por qué?» es exclusivamente
humana.”*

Mario Livio

CAPÍTULO 1- Estado del arte

1.1. SOJA

La soja [*Glycine max* (L.) Merrill] es uno de los cultivos más antiguos del Lejano Oriente, proporcionando la mayor parte de las proteínas y grasas en la dieta de sus habitantes. En la actualidad esta leguminosa y sus subproductos son considerados como una de las fuentes alternativas de proteína de uso más difundido en el mundo para consumo animal y humano (35-40%). Su proteína proporciona la mayoría de los aminoácidos necesarios para la nutrición humana [1]. El conocimiento reciente de las propiedades nutricionales y funcionales ha aumentado considerablemente el interés y el consumo de la semilla y sus derivados en el mundo occidental. El consumidor actual busca productos más nutritivos y saludables, siendo conscientes de las consecuencias de la elección de alimentos y estilos de vida. Los productos a base de soja contienen fitoquímicos como isoflavonas, saponinas, fitoesteroles y péptidos bioactivos que promueven la salud [2]. Todo esto, sumado a su condición de ser la segunda mayor fuente de aceite vegetal en todo el mundo (después del aceite de palma), con una producción mundial de 320 millones de toneladas métricas por año [3,4], y a la utilización de su aceite como fuente de energía renovable

(biodiesel), ha convertido al cultivo de esta leguminosa en la actividad económica de mayor importancia del sector agropecuario argentino, siendo la provincia de Santa Fe el principal polo exportador tanto del grano como de sus subproductos [4,5].

1.1.1. La semilla sagrada

La semilla de soja (Fig. 1.1) está formada por un embrión, recubierto por una fina cáscara o tegumento, que está constituido por un eje embrionario y dos cotiledones conformados por células alargadas llenas de “cuerpos proteicos” esféricos y numerosos “esferosomas” de aceite. Una porción de 100 g de soja contiene aproximadamente 36,5 g de proteínas y 20 g de lípidos. Tanto las proteínas como el aceite que se obtienen de ella tienen gran demanda debido a sus diversos usos potenciales, ya sea a nivel industrial como para la alimentación animal y del hombre. Tal es así que, actualmente, representa el cultivo del cual el hombre obtiene la mayor cantidad de productos derivados, con múltiples aplicaciones para su vida y el medio donde se desenvuelve [5].



Figura 1.1. Porotos de *Glycine max* (L.) Merrill obtenidos localmente.

La soja, originaria del norte y centro de China, ha sido y continúa siendo un alimento milenario de los pueblos de Oriente. Hacia el año 3000 A.C. los chinos ya la consideraban una de las cinco semillas sagradas junto con el arroz, el trigo, la cebada y el mijo. En la India se promocionó su consumo a partir de 1735 y en el continente europeo, particularmente en Francia, se plantaron las primeras semillas provenientes de China en 1740. Veinticinco años más tarde, en 1765, se introdujo desde China y vía Londres en el continente americano, en Georgia, Estados Unidos. Los japoneses tomaron contacto con este cultivo después de la guerra chino-japonesa (1894-1895) y comenzaron a importar tortas de aceite de soja para usarlas como fertilizantes. En la cultura nipona se difundió la idea: "El que tiene soja, posee

carne, leche y huevo", en referencia directa a las múltiples propiedades de la oleo-leguminosa [5].

Los primeros cultivos de soja en la Argentina se hicieron en 1862, pero en aquellos años no encontraron eco en los productores agrícolas. En 1925 el entonces ministro de Agricultura, Tomás Le Bretón, introdujo nuevas semillas desde Europa y trató de difundir su cultivo, conocido en esa época entre los agrónomos del Ministerio como "arveja peluda" o "soja hispida" [5]. Cincuenta años atrás todavía no se tenía noción en el país del potencial económico y nutritivo de esta oleaginosa, y el desconocimiento sobre cómo lograr una cosecha exitosa hizo que los fracasos se acumularan, a tal punto que llegó a considerarse a la soja como "cultivo tabú" [5]. La primera exportación de soja argentina fue el 5 de julio de 1962. El buque Alabama zarpó de Buenos Aires con 6000 toneladas en su interior rumbo al puerto de Hamburgo, Alemania [5].

El desarrollo de alimentos de segunda generación como queso de soja, análogos de carne y postres, durante las últimas décadas ha impulsado el surgimiento de un importante mercado alimenticio que aumenta en forma sostenida en el tiempo. Este marcado crecimiento es debido principalmente a un mayor interés de los consumidores en adquirir productos naturales y saludables, propiedades éstas que se han atribuido públicamente a los alimentos a base de soja. De hecho, su alto contenido de proteínas y la abundancia de vitaminas, minerales y fibra hacen que la soja sea un alimento importante en las dietas vegetarianas. Puede emplearse en la elaboración de una amplia variedad de alimentos, incluyendo soja amarilla madura, leche de soja (un sustituto adecuado de la leche de vaca para personas intolerantes a la lactosa), tofu, queso de soja, yogur de soja, nueces de soja, edamame, miso y otros [5].

1.1.2. Producción y mercado

Inicialmente, el mercado primario de soja en el mundo occidental era industrial, destacándose el requerimiento de su aceite para fabricar plásticos, adhesivos, fibras textiles, revestimientos de papel y espumas ignífugas. Más tarde, aumentó la demanda de harina de soja de alta calidad por su uso en diversos alimentos para animales como las aves de corral y los cerdos (la harina de soja es el residuo de alta proteína de la extracción de aceite de soja). A partir de 1930, comenzó a surgir el mercado occidental de sustitutos de proteínas de soja para el consumo humano. Luego, desde los años '50, y debido a la difusión de la calidad proteica de la soja y de la viabilidad económica de su cultivo, el consumo humano de esta oleo-leguminosa en el mundo occidental se ha venido incrementando en forma sostenida [5].

La producción de granos de soja en el mundo durante los últimos diez años ha crecido un 44%, partiendo de unas 222 y llegando a 320 millones de toneladas, en la campaña 2015/2016 [4]. La soja es uno de los cultivos de bajo volumen de producción, frente a los “pesos pesados” como el trigo, el maíz y el arroz que alcanzan, casi 2200 millones de toneladas. Para saber qué pasa con la soja en el mundo alcanza con mirar lo que ocurre en cuatro países: Estados Unidos, Brasil, Argentina y China; los tres primeros como productores y el gigante asiático como consumidor [4].

Estados Unidos es actualmente el principal productor mundial de soja, produciendo el 33% de la cosecha mundial. Brasil y Argentina juntos representan alrededor del 51% de la producción mundial. Durante los últimos años Estados Unidos, Brasil y Argentina produjeron siempre más del 80% de grano de soja a nivel mundial. En un segundo grupo de productores se encuentran China, Paraguay, India y Canadá. Sin embargo, es preciso señalar que estos países más todos los demás que cultivan soja en el mundo, no alcanzan en conjunto la producción de Argentina [4].

Desde los años 90', en Argentina, el cultivo ha crecido internamente en tal magnitud que forma parte de la agenda política, ambiental y económica de manera preponderante. En los últimos diez años este proceso mantuvo valores de crecimiento para la superficie sembrada del orden del 30%, y del 51% para la producción, mientras que para el rendimiento fue del 18% [4]. Esto muestra que el mayor crecimiento se dio por una expansión horizontal antes que por una mejora “vertical” (en la eficiencia de producción), lo que implica que se han incorporado nuevas áreas al cultivo, seguramente marginales y de mayor fragilidad, y/o se han desplazado áreas destinadas a otros cultivos o producciones. No sorprende, entonces, que la soja represente el rubro de exportación de mayor incidencia en el Producto Bruto Agropecuario del país y el mayor generador de divisas. Actualmente el cultivo ocupa una amplia zona ecológica que se extiende desde los 23 (en el extremo norte del país) hasta los 39 grados de latitud Sur, concentrándose principalmente en la Región Pampeana, donde representa el 55% de los casi 37 millones de hectáreas que se siembran, seguida muy de lejos por los cultivos de maíz y trigo que en conjunto constituyen el 26%. Un fenómeno similar ha ocurrido en Brasil, donde sobre unos 65,4 millones de hectáreas cultivables, casi el 50% se destinan a soja [4]. En Estados Unidos sobre unos 108 millones de hectáreas, poco más del 30% se utilizan para soja, mientras que el 55% son sembradas con maíz y trigo [4].

La producción total promedio de Argentina ronda hoy los 60 millones de toneladas [4]. Nuestro país se posiciona como el tercer país productor en el mundo, y como el primero

en la utilización de semilla de soja modificada genéticamente, y en la producción de aceite y harina, provenientes de la misma planta. Sin embargo, exporta muchas menos semillas en proporción a Estados Unidos y Brasil, dado que se ha privilegiado la industrialización y lo que exporta son aceites y harinas, productos de mayor valor agregado [4]. En la campaña 2016/2017, Argentina continúa ostentando el primer lugar como exportador mundial de aceite con 31,7 millones de toneladas vendidas. En esta campaña, según el USDA (Departamento de Agricultura de los Estados Unidos), nuestro país estaría exportando cerca de 1,4 millones de toneladas más que en el ciclo 2015/2016. En este producto, Argentina supera a Brasil quien despacharía cerca de 15 millones de toneladas de aceite y a Estados Unidos de América, país que ocuparía el tercer lugar con 10,8 millones de toneladas. Lo importante es que nuestro país crece en esta campaña en toneladas a exportar (las citadas 1,4 millones) mientras que sus principales competidores (Brasil y USA) se mantienen en niveles similares a años anteriores.

En la producción argentina de soja, Santa Fe es una provincia con relativa seguridad de cosecha, ya que la superficie sembrada perdida es en promedio inferior al 2%. Es la tercera provincia en importancia, detrás de Buenos Aires y Córdoba, con el 17,5% de la superficie sembrada, el 22% de la producción y un rendimiento promedio de 3200 kg/ha, por encima de la media nacional (2700 kg/ha) [4]. Por otro lado, es el principal polo exportador y de industrialización del grano, a través de sus puertos y de las industrias establecidas en las riberas del río Paraná.

1.1.3. Productos proteicos de soja

La soja no solo se ha convertido en un alimento cada vez más popular, sino que también ha atraído mucho interés por el efecto positivo que su alta ingesta produce en la salud de las poblaciones asiáticas [6]. Los alimentos a base de soja también contienen una amplia gama de metabolitos secundarios biológicamente activos que pueden conferir bioactividades importantes, en particular un efecto antioxidante [7]. Se ha sugerido que el consumo de la leguminosa puede reducir el riesgo de enfermedades crónicas, como las cardiovasculares y el cáncer [8], reducir el riesgo de osteoporosis y aliviar los síntomas de la menopausia [9]. Los fitoquímicos, a los que se pueden atribuir tales actividades, incluyen saponinas, fitatos, inhibidores de la proteasa, ácidos fenólicos, isoflavonas, lecitina, lectina y lunasin, destacándose estos últimos por su potencial anticancerígeno [10–12] y otros beneficios para la salud [13].

El término "proteínas de soja" se refiere típicamente a productos de soja secos procesados y comestibles distintos de las harinas de soja para animales. Las tres

consideraciones más importantes en la producción de proteína de soja son la funcionalidad del producto final, la cantidad de oligosacáridos indigeribles (rafinosa y estaquiosa) presentes y la palatabilidad o sabor del producto. También afecta al uso del producto final la cantidad de fibra presente.

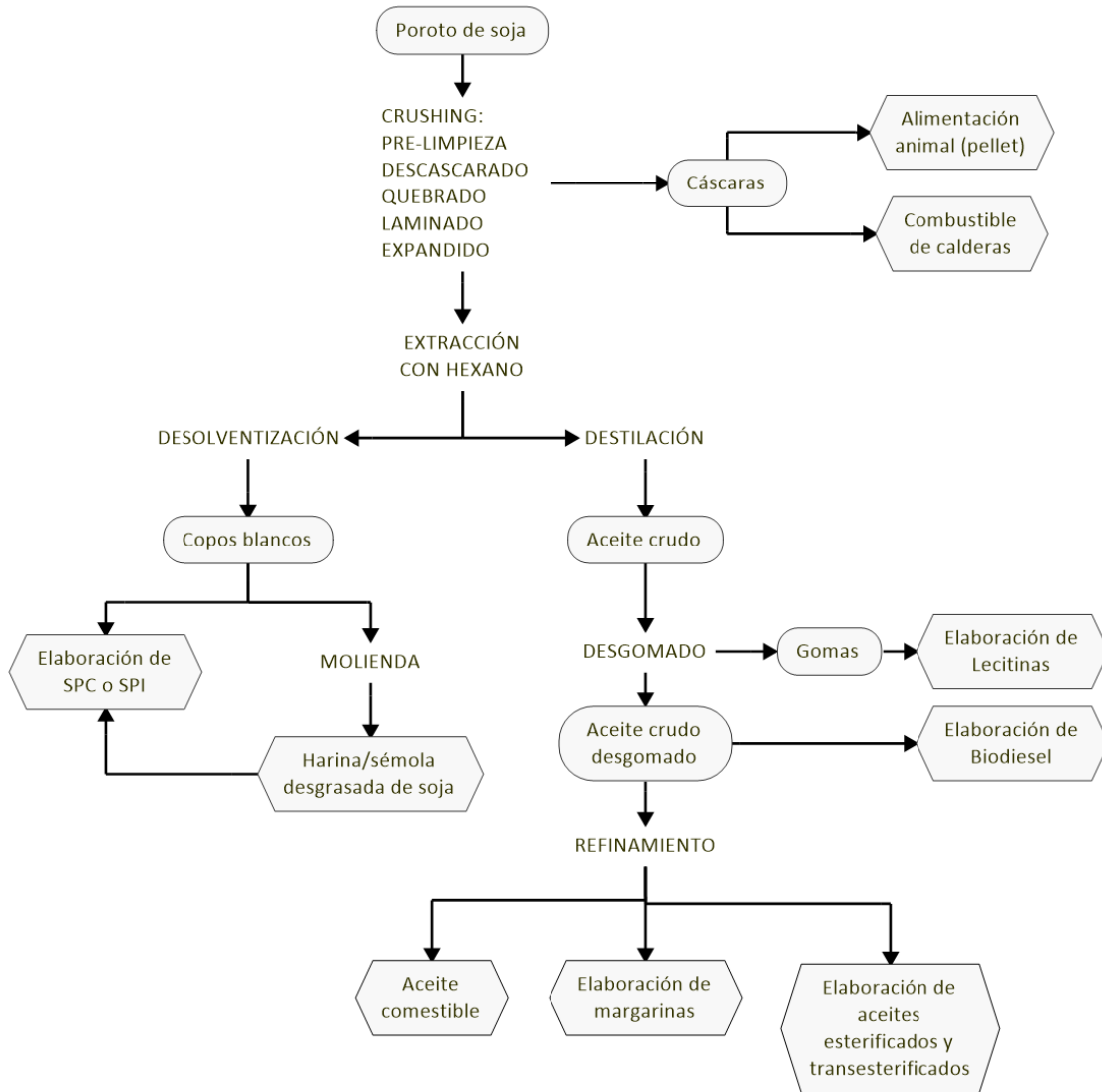


Figura 1.2. Diagrama de flujo del procesamiento general del poroto de soja en una planta de extracción de aceite.

La funcionalidad se refiere a las características que afectan el comportamiento de las proteínas en diversos alimentos durante el procesamiento, la fabricación, el almacenamiento y la preparación. Esta propiedad está determinada por muchos factores, pero en términos generales está directamente relacionada con la cantidad de proteínas solubles presentes. Aunque una proteína que no se solubiliza contiene básicamente los mismos grupos funcionales que una proteína soluble o "nativa", existe una diferencia en la

"accesibilidad" de estos grupos reactivos. La hidratación aún es posible en la proteína insoluble, pero el producto resultante es una suspensión en lugar de una solución. La grasa y el aceite también pueden ser absorbidos por la proteína insoluble, pero en menor grado que el agua.

Los procesos tradicionales para fabricar la mayoría de los productos de proteína de soja, como harinas y sémolas, concentrados de proteína de soja (SPC) o aislados de proteína (SPI), comienzan con los mismos pasos iniciales [14]. Como puede verse en la Fig. 1.2, el tratamiento comienza con la extracción del aceite (desgrasado) con hexano (para uso comestible o producción de biodiesel) seguida de una desolventización y molienda para la obtención de las harinas o sémolas proteicas. En general, es importante que los copos se desolventicen de una manera que minimice la cantidad de cocción o tostado para conservar un alto contenido de proteína soluble. Para esto se utilizan desolventizadores de vapor o desolventizadores tipo flash, resultando del proceso copos desgrasados y desolventizados "blancos" que constituyen el material de partida para la mayoría de los ingredientes proteicos comerciales.

1.1.3.1. *Harina y sémola de soja*

Las harinas y sémolas de soja son las formas menos refinadas de producto de proteína de soja que contienen aproximadamente 40-59 % de proteína, 6-8% de humedad, y variables cantidades de grasa. Estos productos se obtienen a partir de porotos limpios sin cáscara (para la harina entera, es decir con toda su grasa) o de los copos blancos descascarillados (para la harina desgrasada).

Para llamarse harina de soja, al menos el 97% del producto debe pasar a través de un tamiz estándar de 100 mallas [15]. Las sémolas tienen esencialmente la misma composición que la harina, pero una granulación más gruesa.

Las harinas de soja (o sémolas) se clasifican de acuerdo con su contenido de lípidos [15], conociéndose:

- ☞ *Harina de soja desgrasada*, obtenida de copos extraídos con solvente, contiene menos del 1% de aceite.
- ☞ *Harina de soja entera (con toda su grasa)*, hecha de porotos descascarados sin extraer, contiene aproximadamente 18 a 20% de aceite.

La composición típica de estos tipos de harinas de soja se muestra en la Tabla 1.1, en la que también se agrega la composición básica del poroto de soja para comparar. Dado que el contenido de humedad de los productos puede variar durante el almacenamiento, los

porcentajes de proteína, grasa, fibra y cenizas se expresan en base seca, aunque también se muestra un nivel típico de contenido de humedad.

Tabla 1.1. Análisis típicos de soja y harina de soja.

Producto	Proteína	Humedad	Grasa	Fibra	Cenizas
Porotos	42,6	11,0	20,0	5,3	5,0
Harina entera	46,6	5,0	22,1	2,1	5,2
Harina desgrasada	59,0	7,0	0,9	2,6	6,4

Valores de proteínas, grasa, fibras y cenizas como % en base; % Proteína = %N 6,25.

Fuente: Technology of Production of Edible Flours and Protein Products from Soy Bean - FAO [15].

Desde el punto de vista nutricional, estas harinas tienen un significativo contenido proteico y aportan todos los aminoácidos esenciales, pero la presencia de ciertos factores como: inhibidores de tripsina; lectinas (hemaglutininas); oligosacáridos indigeribles como rafinosa y estaquiosa; taninos y flavonoides [16] disminuyen su valor nutricional y por lo tanto su utilización masiva.



Figura 1.3. Harinas/semolas de soja blanca (A) y tostada (B), utilizadas en este trabajo.

Las harinas y sémolas de soja comerciales se clasifican además según su índice de solubilidad en nitrógeno (NSI) o su índice de dispersibilidad de nitrógeno (NDI) [15]. Estos parámetros indican el grado de desnaturalización de proteínas y, por lo tanto, la intensidad del tratamiento térmico que se ha aplicado al material de partida, normalmente para inactivar los factores antinutricionales termolábiles. Las harinas hechas con "copos blancos" (Fig. 1.3A) tienen valores de NSI de aproximadamente 80%, mientras que las hechas con copos tostados (Fig. 1.3B) muestran niveles de NSI de 10 a 20%. La especificación de un valor específico de NSI refleja, de hecho, un compromiso entre la necesidad de mantener las propiedades funcionales de las proteínas de soja y el deseo de

inactivar factores antinutricionales y eliminar el sabor “a poroto”, según el uso final del producto.

1.1.3.2. *Concentrados proteicos de soja*

Los concentrados comestibles de proteína de soja (SPC) son productos versátiles relativamente nuevos. Su disponibilidad como productos comerciales es del año 1959 [15]. En los últimos años se han convertido en ingredientes importantes y bien aceptados por muchas industrias de alimentos. En muchas aplicaciones, simplemente sustituyen a las harinas de soja y en otras tienen características específicas que no pueden ser homologadas con harinas de soja.

Históricamente la necesidad del desarrollo de concentrados de proteína de soja se debió principalmente para aumentar la concentración de proteínas y para mejorar el sabor, eliminando el sabor “a poroto”, característica organoléptica no deseada que restringe el consumo.

El SPC se prepara a partir de copos blancos (o harina sin desactivar) al eliminar la mayoría de los constituyentes solubles no proteicos. Hay tres métodos principales para la extracción de estos componentes de una manera selectiva, sin solubilizar las principales fracciones de proteína [15]. Estos no son diferentes métodos para fabricar el mismo producto, sino que cada uno produce un tipo diferente de concentrado, con distintas características y usos específicos. Estos métodos se conocen como:

- ☞ Lavado con alcohol y agua.
- ☞ Lavado ácido.
- ☞ Desnaturalización con calor y lavado con agua.

El segundo método, lavado ácido (Fig. 1.4), proporciona un concentrado con mayor contenido de proteína soluble y con mejores propiedades funcionales [17]. Adicionalmente, por tratarse básicamente de una extracción acuosa, resulta especialmente útil a los fines comparativos con otras metodologías de similares características. Este proceso se basa en la dependencia de la solubilidad de proteína con el pH. Considerando que la mayoría de las proteínas de soja presentan una mínima solubilidad en el rango de pHs 4,2 - 4,5 (región isoelectrica), es posible extraer los azúcares, sin solubilizar la mayoría de las proteínas, utilizando como disolvente, agua a la que se ha añadido un ácido. La harina se mezcla con agua en una proporción de aproximadamente 10 a 20:1, y se ajusta el pH alrededor de 4,5 con un ácido de grado alimenticio, típicamente ácido clorhídrico. La extracción se desarrolla durante aproximadamente 30 a 45 min a unos 40 °C. El residuo sólido húmedo se seca por

aspersión para eliminar agua y producir el concentrado proteico que tiene un contenido de proteína de aproximadamente 65-70%. El rendimiento de este proceso es aproximadamente 50-95% de proteína disponible.

El producto final de proceso de concentrado proteico es "moderadamente" funcional debido a una desnaturalización proteica parcial por la exposición ácida. Alrededor del 5 al 10% de los carbohidratos que quedan en los concentrados después de la lixiviación son azúcares solubles, cenizas y componentes menores, y el resto son polisacáridos insolubles [17]. El proceso de lavado con ácido tiene la ventaja obvia de usar un solvente no-inflamable, no-explosivo, no-tóxico y barato: el agua. Hasta cierto punto, esta también es la desventaja del proceso ya que la separación del sólido en el solvente es más difícil y menos completa, debido al hecho de que las escamas absorben cantidades considerables de agua y se hinchan. El extracto líquido que contiene azúcares, minerales, las fracciones de proteína que son solubles a pH 4,5 y otros componentes solubles se conoce generalmente como "suero", en analogía al proceso de fabricación de queso, y por su alto contenido en proteínas de suero se lo llama SWP del inglés *Soy Whey Protein*. A diferencia del suero de queso, sin embargo, el SWP no tiene ningún uso actual y debe ser desechado como residuo.

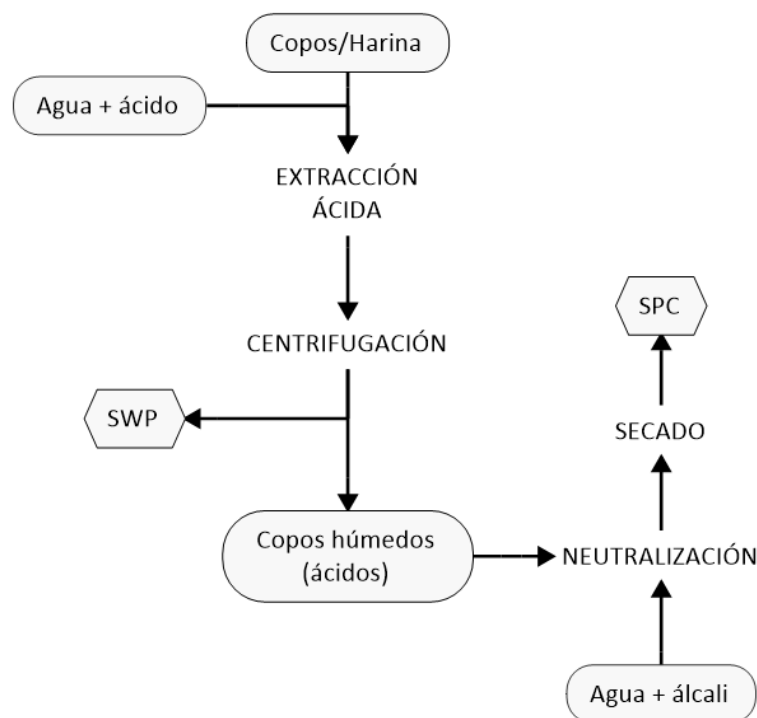


Figura 1.4. Diagrama de flujo del proceso productivo de SPC por lavado ácido.

Los concentrados de proteína de soja, obtenidos por los diferentes métodos, tienen aproximadamente la siguiente composición, sobre una base libre de humedad:

Tabla 1.2. Composición típica de SPC.

Componente	Composición (%)
Proteína	70
Carbohidratos insolubles	20
Grasas	1
Cenizas	5 - 8

Fuente: Technology of Production of Edible Flours and Protein Products from Soy Bean - FAO [15].

Los SPCs se caracterizan también por la disminución de su índice de solubilidad de proteína respecto del material de partida. Sin embargo, es posible aumentar este parámetro mediante un procesamiento extra, como por ejemplo la neutralización con álcali del concentrado proveniente de lavado ácido. Concentrados hechos por los procesos de calor y lavado de agua son irreversiblemente desnaturizados y de color más oscuro. Concentrados hechos por lavado con alcohol tienen bajas NSI (10 a 15 %), debido a la desnaturización de la proteína por la mezcla alcohol-agua.

Los concentrados de proteína de soja son relativamente suaves ya que gran parte del sabor característico de poroto normalmente se elimina por el proceso de extracción. Los oligosacáridos flatulentos presentes en harina de soja también se eliminan eficazmente, siendo que el contenido de rafinosa y estaquiosa se reduce a valores próximos o inclusive inferiores al 0,1-0,3% y 0,3-0,05% , respectivamente [17].

El concentrado de proteína de soja normalmente cuesta entre 2 y 2,5 veces más que la harina de soja desgrasada. Teniendo en cuenta el contenido proteico relativo de estos dos productos, el costo por unidad de proteína es de aproximadamente 80% más alto en el concentrado, lo que da cuentas del valor que agrega este proceso simple a la materia prima.

Al igual que las harinas de soja, el SPC se utiliza en los productos alimenticios por sus características nutricionales, por sus propiedades funcionales o por ambos. Nutricionalmente, las características atractivas de los concentrados son: su alto contenido de proteínas, la casi ausencia de factores antinutricionales como inhibidores de tripsina y otros, la ausencia de azúcares flatulentos y el contenido sustancial de fibra dietética.

1.1.3.3. *Aislados proteicos de soja*

Los aislados proteicos de soja (SPI) son la forma más concentrada de productos comercialmente disponibles de proteína de esta semilla. Contienen más del 90% de proteína, en base seca.

Básicamente, la producción de los SPIs se realiza a partir de soja desgrasada o copos. Inicialmente, la proteína se solubiliza en agua, separando luego la solución del residuo sólido. Finalmente, la proteína se precipita de la solución por acidificación, se separa y se seca. En la producción de SPI para uso alimentario, a diferencia del SPI para uso industrial, se tiene cuidado de minimizar la modificación química de las proteínas durante el procesamiento.

Al tratarse de una proteína casi pura, el aislado proteico presenta menores niveles de olores desagradables, sabor, color y factores antinutricionales que los SPCs y sobre todo que las harinas/sémolas. Además, la alta concentración de proteínas proporciona la máxima flexibilidad de formulación cuando se incorporan en productos alimenticios.

A pesar de las muchas ventajas del SPI, el proceso productivo es muy costoso y sólo se recupera entre un 33-50% de las proteínas iniciales en el proceso [17]. Sumado a esto, la exposición de las proteínas a ácidos y álcalis produce una parcial desnaturalización, sumada al alto contenido salino residual en el producto. Este último problema se soluciona aplicando un desalinizado con membranas, proceso que aumenta aún más el costo productivo.

El precio de SPI es de cinco a siete veces mayor que el de la harina de soja desgrasada. Sobre una base de peso de proteína igual, la relación de costo de estos dos productos es casi 3:1.

1.1.4. Proteína de soja: propiedades nutricionales y biofuncionales

La proteína dietaria es una fuente importante de energía (4 kcal/g de proteína) y aminoácidos esenciales, que son necesarios para el crecimiento y el mantenimiento de funciones fisiológicas como la reparación de tejidos y la señalización celular. La soja contiene aproximadamente 40% de material proteico, considerándose como una proteína “completa”, ya que provee todos los aminoácidos esenciales para la nutrición humana, tales como lisina y metionina. De acuerdo al método de evaluación de calidad proteica PDCAAS (del inglés “The Protein Digestibility Corrected Amino Acid Score”) la proteína de soja presenta un valor biológico de 0,96, que es comparable con el de la carne vacuna (0,92) y la leche (1,0), e indica una alta satisfacción de los requerimientos aminoacídicos humanos [15]. En base a esto, la calidad nutricional de los subproductos de soja se vincula directamente con el contenido porcentual de proteína, su composición aminoacídica y su bajo contenido de antinutrientes (compuestos con efectos fisiológicos adversos para la digestión y absorción de nutrientes). Se utilizan como indicadores de estas propiedades

ciertos parámetros como el contenido de proteína soluble, el índice de polidispersibilidad y el contenido de antinutrientes (inhibidor de tripsina, rafinosa) [18,19].

Luego de la ingesta, las proteínas se descomponen durante la digestión en péptidos debido a la acción de enzimas endógenas del sistema gastrointestinal. Estos péptidos son inactivos dentro de la secuencia de la proteína original, pero después de que se liberan por hidrólisis enzimática, ejercen diversas funciones fisiológicas. Investigaciones recientes han demostrado que los péptidos de diferentes fuentes, tales como productos lácteos, plantas, animales y mariscos tienen una amplia gama de bioactividades, por ejemplo, capacidad antimicrobiana [20], inmunomoduladora [21], antihipertensiva [22], antioxidante [23], entre otras. Los péptidos bioactivos también pueden ser producidos por enzimas exógenas comerciales [24]. El mayor número de péptidos bioactivos aislados hasta la fecha proviene de las proteínas de la leche. Sin embargo, la soja es una fuente alternativa importante de estos compuestos bioactivos [25,26].

El interés en el consumo de productos de soja aumentó considerablemente desde que la Administración de Alimentos y Drogas de los Estados Unidos (FDA) difundió que “25 g de proteína de soja al día, como parte de una dieta baja en grasas saturadas y colesterol podría reducir el riesgo de dolencias cardíacas” [27–31]. Además de la prevención de las enfermedades cardiovasculares, diferentes estudios han demostrado que el consumo de proteína de soja tiene varios otros efectos positivos sobre la salud que incluyen actividad antioxidante [32–34], antihipertensiva [35–38], reducción del nivel de colesterol [31,39,40] y de grasa corporal [41], prevención de la osteoporosis [42] y reducción de la incidencia de cáncer de estómago [43], colorrectal [44] y mamario [45–47].

Entre las mencionadas bioactividades, la capacidad antioxidante se considera entre las más importantes. Los procesos oxidativos tienen efectos perjudiciales en la salud humana y la calidad de los alimentos. En el cuerpo, los oxidantes causan daño de las membranas lipídicas, las proteínas estructurales y el ADN, lo que conduce a enfermedades degenerativas como el cáncer, la disminución del sistema inmunitario, enfermedades cardiovasculares y el proceso de envejecimiento [48]. En los alimentos, la oxidación de los lípidos, que es catalizada por el calor, la luz, las enzimas o los metales, conduce a malos sabores y olores que afectan negativamente la función y la calidad nutricional de los alimentos. Además, esta calidad se degrada aún más por la cooxidación de proteínas y vitaminas [49]. Debido a los riesgos potenciales que presentan los antioxidantes sintéticos para la salud (por ejemplo, hidroxianisol butilado -BHA, hidroxitolueno butilado -BHT, galato de propilo -PG y butilhidroquinona terciaria -TBHQ), el empleo de antioxidantes

naturales ha ganado un creciente interés [50]. Se ha informado que los péptidos exhiben actividad antioxidante debido a sus propiedades para eliminar radicales libres, donar electrones y/o quelar metales [48].

Por otro lado, la capacidad antihipertensiva es una bioactividad que se busca con especial interés entre los compuestos presentes en los alimentos. La hipertensión se ha establecido como un importante problema crónico de salud en proporciones epidémicas. Se considera un factor de alto riesgo con complicaciones tales como aterosclerosis, accidente cerebrovascular (ACV), infarto de miocardio y enfermedad renal en etapa terminal [51]. Uno de los instrumentos más importantes en los mamíferos para mantener la homeostasis de la presión arterial y el balance hídrico y salino, es el sistema renina-angiotensina. La enzima convertidora de angiotensina-I (ECA) es un factor clave en el sistema mencionado para regular la presión arterial ya que su inhibición permite controlar la hipertensión [52]. Los inhibidores sintéticos, tales como captopril, enalapril, alacepril y lisinopril, están disponibles comercialmente, pero su uso está restringido debido a posibles efectos adversos, que incluyen tos, alteraciones del gusto y erupciones cutáneas [53]. Por lo tanto, se ha prestado especial atención a los efectos inhibidores sobre la ECA que presentan algunos nutraceuticos de origen biológico. Particularmente, se ha encontrado que algunos péptidos bioactivos provenientes de fuentes naturales tienen marcado efecto como inhibidores de la ECA y antihipertensivos [22,51-62]. Estos péptidos son muy valiosos porque se absorben fácilmente en el organismo, y, por lo tanto, pueden llegar a ser una gran alternativa a los fármacos sintéticos [53].

En este contexto, debe tenerse presente que las proteínas constituyen el 35-40% del peso seco de la soja. La mayoría de éstas en el proteoma de soja (aproximadamente 70-83%) tienen función de almacenamiento, siendo la glicinina (tipo legumina 11S) y la β -conglucina (tipo vicilina 7S) las más abundantes. El restante contenido proteico de las semillas de soja comprende a los inhibidores de tripsina Kunitz y Bowman-Birk, lectina, alergeno P34, proteína de unión a sacarosa, ureasa, oleosinas (que se reconocieron bioactivas y alergénicas) y varias proteínas de baja abundancia [63,64].

En las últimas décadas se han reportado el potencial antioxidante y antihipertensivo de fracciones proteicas de soja así como el aislamiento y caracterización estructural de los péptidos más activos [33,65-68]. Las propiedades antioxidantes de hidrolizados enzimáticos de proteínas de soja se han atribuido al efecto cooperativo de numerosas propiedades [65], que incluyen la capacidad de: eliminar radicales libres, actuar como complejante de iones metálicos, desactivar radicales derivados de oxígeno, y prevenir la

penetración de vesículas lipídicas por parte de iniciadores de la oxidación lipídica [32]. Además, se ha demostrado la actividad inhibitoria sobre la enzima convertora de angiotensina-I (ECA) de varios péptidos bioactivos de soja [33,36].

1.1.5. Isoflavonas

Distintas investigaciones han permitido detectar componentes bioactivos en los vegetales (fitoquímicos) con importantes efectos beneficiosos para la salud. Entre ellos, las isoflavonas (IFs) forman parte de una subclase de un grupo mayor de fitoquímicos, llamados flavonoides, que se hallan en una gran variedad de vegetales, especialmente en la soja.

Las IFs están presentes en dos formas químicas (Fig. 1.5): la forma libre o agliconas (daidzeína, gliciteína y genisteína) y sus conjugados o β -glucósidos (es decir, daidzina, glicitina y genistina). Estos últimos, a su vez, pueden conjugarse como malonil/acetilglucósidos (es decir, 6'-O-malonildaidzina, 6'-O-acetildaidzina, 6'-O-malonilglicitina, etc.) [69] resultando en un total de 12 isoflavonas. La soja contiene aproximadamente el 90% de las isoflavonas totales en la forma conjugada, junto con pequeñas cantidades de su forma libre. El contenido de isoflavonas en el poroto de soja sin procesar, es de aproximadamente 1 mg/g con un rango posible de 0,4 a 2,4 mg/g. La abundancia relativa de la genisteína, incluidos los respectivos derivados, es la más alta (alrededor del 50% del contenido de isoflavonas), seguida de daidzeína (40%) y gliciteína (10%). Sin embargo, se ha demostrado que la gliciteína es más biodisponible que otras isoflavonas, seguida de la genisteína [70]. La mayoría de las isoflavonas están asociadas con proteínas de la soja, y muy poca presencia en la fracción lipídica. En su estado natural, la mayoría de las isoflavonas existen como glucósidos inactivos (genistina, daidzina y glicitina), que son sensibles al calor y se convierten en isoflavonas malonil-beta-glucosiladas cuando se calientan. Por otro lado, las agliconas (formas activas) son bastante estables a alta temperatura [71].

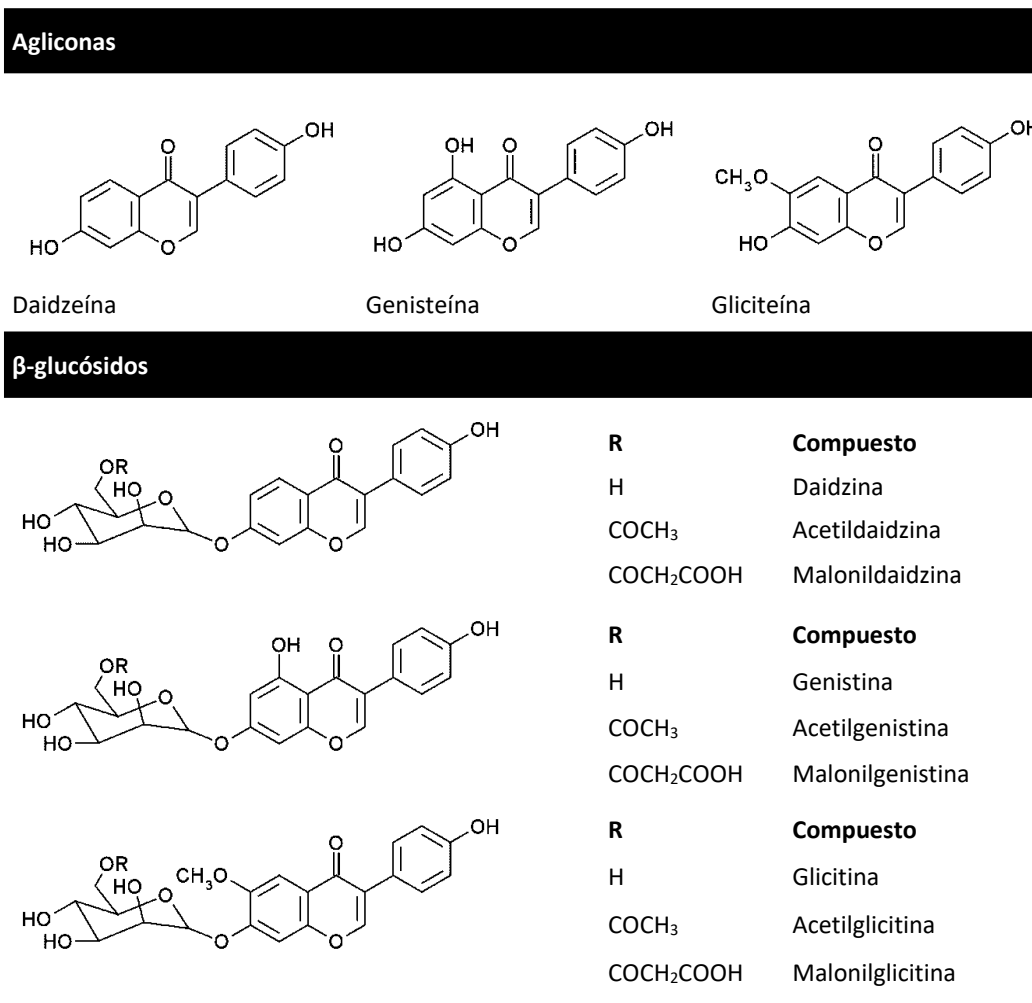


Figura 1.5. Estructura química de las principales isoflavonas de soja.

Cuando se ingieren, las isoflavonas se metabolizan extensamente en el tracto intestinal, se absorben, se transportan al hígado y se someten a reciclaje enterohepático. Las glucosidasas bacterianas intestinales rompen los restos de azúcar y liberan las isoflavonas biológicamente activas como agliconas. Las agliconas pueden ser absorbidos directamente en el adulto y también pueden ser biotransformadas por microorganismos a los metabolitos específicos, equol, desmetilangolensina y p-etilfenol [72]. Todos estos fitoestrógenos se eliminan, principalmente por el riñón, y por lo tanto comparten las características fisiológicas y el comportamiento de los estrógenos endógenos [72]. Entre las formas gliconadas, los β-glucósidos son más fáciles de hidrolizar que los 6'-O-malonilglucósidos y los 6'-O-acetilglucósidos [72].

Los efectos fisiológicos de las isoflavonas, particularmente daidzeína y genisteína, incluyen su actividad estrogénica y antioxidante [73,74], reducción de los niveles de colesterol en suero sanguíneo [29,75], reducción del riesgo de enfermedad cardiovascular [75,76], prevención de los síntomas de la menopausia [77], osteoporosis [78,79], obesidad

y diabetes [80,81], favorecen funciones cognitivas [82,83] y, lo que es más importante, actúan como anticancerígenos [84–98].

Las isoflavonas tienen potentes propiedades antioxidantes, comparables a las de la conocida vitamina E [74,99,100]. La genisteína es el antioxidante más potente entre las isoflavonas de soja, seguido de la daidzeína. La genisteína parece aumentar la producción de superóxido dismutasa (SOD) que elimina los radicales libres. La capacidad de esta aglicona para actuar como antioxidante también puede explicar el efecto anticancerígeno de esta isoflavona. Además, el consumo de alimentos ricos en antioxidantes/polifenoles podría impartir efectos protectores trombóticos y cardiovasculares a través de la inhibición de la hiperactivación o agregación plaquetaria [101].

Como clase, las isoflavonas se han estudiado por su actividad preventiva del cáncer más que cualquier otro componente de soja. La administración dietética de isoflavonas puras y/o mezclas de IFs previene la inducción de cáncer en varios órganos en animales de laboratorio, incluyendo las glándulas sexuales accesorias [45,94,102,103], glándula mamaria [104], piel [105] y tracto gastrointestinal [106–108]. Sin embargo, es importante señalar que, aunque las isoflavonas demuestran actividad preventiva del cáncer en un número sustancial de sistemas modelo de carcinogénesis, la actividad protectora de esta clase de agentes no es universal. Por ejemplo, se ha informado que la genisteína aumenta la incidencia de cáncer de colon en ratas [109] y estimula el crecimiento de cánceres de mama inducidos por carcinógenos en ratas ovariectomizadas [110].

Aunque la mayoría de los estudios de quimiopreención con isoflavonas puras se han realizado con genisteína, muchas otras isoflavonas también confieren protección contra la inducción del cáncer [88–90]. Estos datos sugieren que la administración de soja entera o una mezcla de isoflavonas de soja, en lugar de una sola isoflavona purificada, puede constituir una estrategia superior para optimizar la eficacia quimiopreventiva [91].

Dadas las implicancias potenciales en la salud, el interés en el estudio de estos flavonoides se mantuvo durante las últimas cuatro décadas. Más de 10000 artículos científicos, revisiones y libros han aparecido solo sobre isoflavonas a nivel global [111–113]. Estos estudios han abierto puertas para el uso de alimentos y bebidas de primera generación a base de soja (leche de soja/bebida de soja, tofu, natto, tempeh, etc.) y productos de segunda generación (productos horneados a los que se han agregado ingredientes a base de soja). Diferentes métodos de recuperación de IFs han sido patentados [114–116] y más productos de isoflavonas purificadas ahora están disponibles comercialmente como píldoras, concentrados o extractos.

Por otro lado, no sólo deben considerarse las bondades de estos compuestos, ya que también han sido considerados como disruptores endocrinos potentes, debido a su actividad mimética de estrógenos, convirtiéndose así en desencadenantes potenciales de fertilidad reducida [117–120]. Además, el alto consumo de isoflavonas de soja en niños asiáticoamericanos se ha asociado con un mayor riesgo de síndrome de Kawasaki [121]. Estos controvertidos efectos necesitan más investigaciones para ser aclarados. Mientras tanto, eliminar las IFs de la dieta de la población general y reservarlas para aplicaciones específicas es una conducta adecuada para ser adoptada [122]. De esta forma, el desarrollo de procesos escalables para recuperar IFs de subproductos de soja permitirá tanto obtener un extracto enriquecido en IFs, consumible por aquellas personas susceptibles de sus propiedades benéficas, como generar productos derivados de soja más pertinentes para poblaciones sensibles a sus efectos adversos.

1.1.6. Factores antinutricionales

A pesar de las numerosas características nutricionales favorables, la soja contiene también una variedad de compuestos bioactivos antinutricionales o antinutrientes que exhiben efectos fisiológicos indeseables impidiendo la absorción de nutrientes (Tabla 1.3). Dentro de estos compuestos antinutricionales se destacan la lipoxigenasa, inhibidores de proteasas, lectina y otros, aunque en cantidades más pequeñas, como taninos, oligosacáridos, saponinas, alcaloides, compuestos fenólicos y fitatos. Para mejorar la retención y utilización de proteínas y minerales de soja en el tracto digestivo, la inactivación de los factores antinutricionales se presenta como una necesidad y a la vez como una problemática importante a resolver para las industrias alimenticias e investigadores [123]. Los estudios realizados por Vijaya Raghavan, Harper y Kienholz (1974) [124] mostraron una asociación directa entre el procesamiento y la disponibilidad de proteína cuando se utilizaba la harina de soja como alimento para pollos. Los autores demostraron que la harina de soja procesada mejoraba el peso ganado por el pollo en el transcurso del tiempo y vincularon este efecto a la desnaturalización de factores antinutricionales durante el procesamiento [124].

Tabla 1.3. Factores antinutricionales en soja.

Termosensibles	Termoestables
Inhibidores de tripsina	Saponinas
Antivitaminas	Alérgenos
Fitatos	Factores de flatulencia
Lectina	
Lipooxigenasa	

Adoptado de Vagadia y col., 2017 [1].

En relación con el impacto generado por la ingesta de estos factores antinutricionales, se han reportado diferentes efectos adversos. Por ejemplo, los fitatos son agentes quelantes minerales, por lo tanto, dificultan la absorción de minerales. Algunos oligosacáridos como la rafinosa y la estaquiosa, generan flatulencia e hinchazón, mientras que la lipoxigenasa es responsable del sabor indeseable formado por la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados [125–127]. Entre todos los antinutrientes presentes en una amplia variedad de alimentos, se distinguen los inhibidores de tripsina ya que afectan la utilización de proteínas y su digestión. Por ejemplo, no se recomienda alimentar con soja cruda a animales monogástricos como aves de corral y cerdos, ya que la presencia de inhibidores de tripsina y lectinas dará como resultado un retraso en el crecimiento, una menor eficiencia alimenticia e hipertrofia pancreática [128].

1.1.6.1. *Inhibidores de tripsina*

Los inhibidores de tripsina (IT) son una clase única de proteínas que se encuentran en la soja cruda, constituyendo alrededor del 6% de la proteína total [129]. Éstos pertenecen a un grupo de sustancias (inhibidores de proteasas) que se consideran multifacéticas por sus diversas actividades biológicas. Por un lado, encontramos las actividades antinutricionales, las cuales son indeseables en la alimentación humana y animal. Por otro lado, los inhibidores de proteasas exhiben una amplia gama de actividades biológicas que han concitado mucho interés, principalmente debido a sus posibles aplicaciones en la agricultura y en la medicina [130,131].

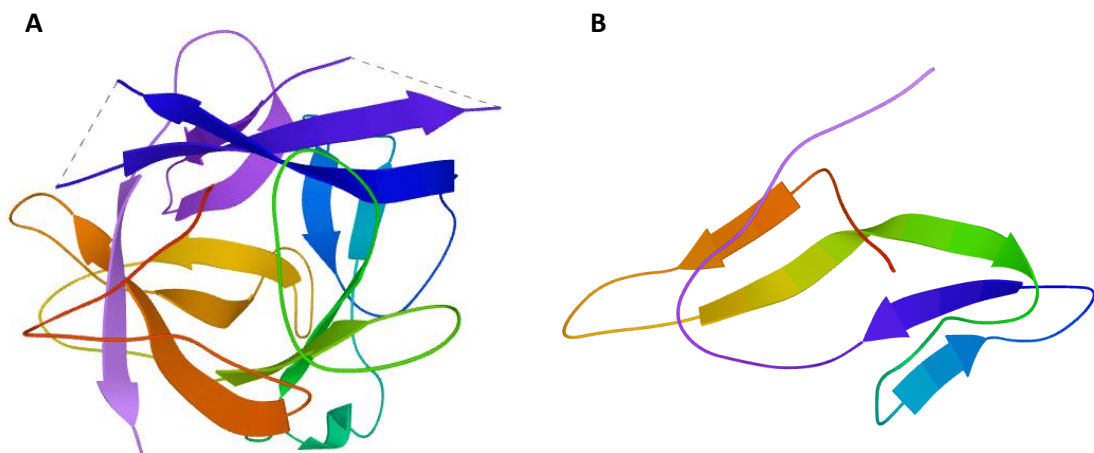


Figura 1.6. Estructuras tridimensionales de los inhibidores de tripsina de soja tipo Kunitz (A) y tipo Bowman-Birk (B). Imágenes obtenidas de la Protein Data Bank in Europe (www.ebi.ac.uk).

Desde el punto de vista antinutricional, los ITs reducen la actividad de la tripsina y, en menor medida, de la quimotripsina. Así, perjudican la digestión de proteínas en animales monogástricos y algunos animales rumiantes jóvenes [128]. En soja se presentan dos clases principales de inhibidores de tripsina (Fig. 1.6): Kunitz (ITK) y Bowman-Birk (ITBB). El primero, ITK, con una masa molecular aproximada de 21,5 kDa, tiene una especificidad dirigida principalmente hacia la tripsina en una relación molar de 1:1 [132]. El ITBB, con una masa molecular de 7,8 kDa, es capaz de inhibir tanto la tripsina como la quimotripsina en sitios reactivos independientes [132].

La tripsina y la quimotripsina son dos serino-proteasas importantes, sobre todo la primera, para la digestión de proteínas en organismos vivos. La tripsina (TRP) es una proteína globular con una masa molecular de 24 kDa con 220 residuos. Esta proteína enzimática se produce en el páncreas en su forma inactiva llamada "tripsinógeno", que luego se activa durante la digestión cuando ingresa al intestino delgado [133]. La ingestión de inhibidores de tripsina puede dar como resultado la formación de un complejo TRP-IT irreversible que produce una caída de la actividad enzimática en el intestino, lo que interfiere en el proceso de digestión proteica [134]. Por otro lado, al intentar compensar esta caída de la actividad, el páncreas aumenta su producción enzimática, lo que promueve una pérdida fecal excesiva de enzimas pancreáticas ricas en aminoácidos azufrados que no puede compensarse con la proteína de soja dietaria [135,136].

Diferentes estudios se han centrado en la evaluación de la digestibilidad de la proteína de soja in-vitro. Trabajando con soja y leche de soja, Su y Chang (2002) [137] encontraron que la digestibilidad proteica en ambos productos era próxima al 75%. Shin, Kim y Kim (2013) [138] hallaron valores dentro de ese mismo rango, entre 74,4% y 77,1%, excepto para la harina de soja cocida al vapor, cuya digestibilidad alcanzó el 88,7%. En un estudio in-vivo, ratas alimentadas con un extracto de soja cruda inactivada mostraron un crecimiento mejorado en comparación con las ratas control alimentadas con soja cruda no tratada [139]. Feng y col. (2007) [140] encontraron que las actividades de proteasa total y tripsina en el duodeno y el yeyuno de lechones alimentados con harina de soja fermentada aumentaron debido a la inactivación de los ITs. Por otro lado, Liener (1970) [141] ha comparado la digestibilidad de varias fuentes de proteínas, incluyendo maní, soja y proteína animal, observando que los valores registrados para la soja eran mucho más bajos en comparación con otras fuentes, debido a la presencia de ITs y otros antinutrientes de esta leguminosa [141,142].

Los inhibidores de tripsina son sensibles a la desnaturalización por calentamiento. En ese sentido, algunos estudios han demostrado que el tratamiento térmico de la harina de soja, como forma de disminuir el nivel de inhibidores de la tripsina, aumenta el crecimiento de pollos [143] y de pez gato [144]. Sobre la base de esta evidencia, la gran mayoría de los productos de soja utilizados para la alimentación del ganado son tratados térmicamente para eliminar cualquier efecto antinutricional asociado con la alimentación de la soja cruda.

En contraposición a los efectos negativos que los inhibidores de proteasas tienen en la nutrición, diferentes estudios les han asignado ciertas bioactividades beneficiosas. Los mismos se han utilizado para mejorar la resistencia de las plantas a patógenos e insectos [145–148], así como agentes antimicrobianos [149,150] y agentes anticancerígenos [151–154].

Los datos epidemiológicos demuestran una asociación inversa entre el consumo humano de dietas ricas en inhibidores de proteasas y el riesgo de cáncer de mama, colon y próstata, entre otros tejidos [155–157]. Asimismo, ciertos trabajos demuestran que los inhibidores de tripsina de soja y un concentrado de ITBB, denominado por los autores como BBIC, pueden inhibir la carcinogénesis en animales de laboratorio [158].

A partir de la extensa literatura al respecto, ITBB (y BBIC) demuestra una serie de actividades biológicas que podrían poner de manifiesto su eficacia en la quimioprevención. ITBB inhibe la generación de especies de oxígeno activado en células epiteliales de próstata [159] y la inducción del daño del ADN y/o facilita su reparación, suprimiendo así los eventos genéticos que conducen a la iniciación del tumor [160]. ITBB también inhibe la angiogénesis en el ensayo de membrana corioalantoidea de pollo [161], sugiriendo un posible mecanismo para suprimir el crecimiento de tumores macroscópicos. Más allá del análisis de los mecanismos moleculares, encontramos que BBIC demuestra una actividad preventiva contra el cáncer en sistemas de bioensayo tanto in-vitro como in-vivo [157]. In-vitro, ITBB inhibe la proliferación de una variedad de líneas celulares de cáncer humano, incluidas las derivadas de cánceres de próstata humanos, de mama y de pulmón [162–164]. In-vivo, se ha encontrado que ITBB inhibe la carcinogénesis en el colon [165,166], esófago [167], hígado [168], pulmón [169,170] y la cavidad oral [171,172]. BBIC, si bien es un inhibidor menos potente de la carcinogénesis prostática que otros agentes como la dehidroepiandrosterona [173] y el ácido 9-cis-retinoico [174], disminuye la incidencia de neoplasia de próstata en ratas tratadas con carcinógenos [92,175]. Los resultados de los ensayos clínicos iniciales son prometedores, ya que se ha informado que los niveles de dosis no tóxicas de BBIC inducen la regresión de la leucoplasia oral, una lesión preneoplásica en

la cavidad oral [176], e incluso reduce el volumen de próstata y los niveles de antígeno prostático específico en pacientes con hiperplasia benigna de próstata [177]. Además, BBIC previene el daño cutáneo inducido por la luz solar y reduce el riesgo de formación y progresión de tumores cutáneos [178]. De interés es la observación de que BBIC no tiene toxicidad genética [179,180]. Estos resultados demuestran que tanto ITBB como BBIC previenen y suprimen la carcinogénesis y la progresión del cáncer sin toxicidad en muchos experimentos [156,157].

Si bien la literatura sobre los efectos benéficos del ITK es menor que para ITBB, los hallazgos reportados son prometedores. En un estudio de 2004 [170] se encontró que la suplementación dietética de ITK regula eficientemente el mecanismo involucrado en la entrada en circulación vascular de las células tumorales (intravasación) durante el proceso metastásico. El tratamiento con ITK también puede ser beneficioso para pacientes con cáncer de ovario con o en riesgo de metástasis diseminada peritoneal [170]. Recientemente, da Silva Bezerra y col. (2016) [181] purificaron un inhibidor de tripsina tipo Kunitz de semillas de *Inga vera*, caracterizándolo por varias actividades biológicas tales como actividades insecticidas, antimicrobianas y anticancerígenas. Incluso, amblyomin-X (código GenBank: AAT68575), una proteína recombinante inhibidora de proteasas tipo Kunitz identificada en la biblioteca de ADNc de glándulas salivales de la garrapata *Amblyomma cajennense*, ha demostrado inducir efectos pro-apoptóticos en diferentes líneas celulares tumorales [182,183]. Los efectos antiinflamatorios de ITK también se han examinado sobre la letalidad inducida por lipopolisacáridos bacterianos (LPS) [184,185] y radiación UV [186]. Estos hallazgos pueden identificar propiedades anticancerígenas y antiinflamatorias de ITK y pueden ser relevantes para el uso de este compuesto en la modulación del cáncer y la inflamación [184].

Dentro de este marco, más allá de las problemáticas nutricionales que los inhibidores de tripsina de la soja generan en los animales y en la población general, se desprende el interés en desarrollar una metodología de detoxificación no-destructiva que brinde la posibilidad de recuperarlos para su aplicación beneficiosa en algunos sectores de la población, principalmente aquellos afectados por determinadas patologías oncológicas.

1.1.6.2. Oligosacáridos

La soja puede causar flatulencia si el nivel ingerido es suficientemente alto. Los carbohidratos solubles en la soja consisten principalmente en sacarosa y galacto-oligosacáridos (4 al 6% de materia seca de la soja) de la familia de la rafinosa (RFO) [187,188]. Los RFOs, que comprenden principalmente rafinosa y estaquiosa (Fig. 1.7) y en

menor medida verbascosa, pueden provocar flatulencia y malestar abdominal en animales monogástricos y en el hombre, debido a la falta de la enzima α -galactosidasa, necesaria para hidrolizar los enlaces α -galactosídicos [189,190].

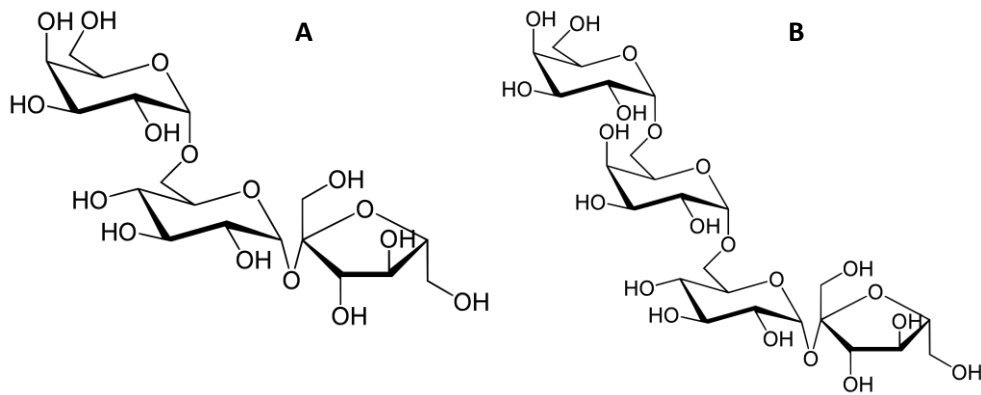


Figura 1.7. Estructuras de los oligosacáridos rafinosa (A) y estaquiosa (B).

Los RFOs se degradan en cierta medida en el intestino delgado por acción de algunos microorganismos (76 a 88% para estaquiosa, 31 a 65% para rafinosa y 32 a 55% para verbascosa), lo que resulta en la producción de dióxido de carbono e hidrógeno [187]. En algunos casos, la acumulación de gas rectal flatulento provoca dolor abdominal, náuseas y diarrea. Los lechones destetados alimentados con una dieta libre de RFOs suplementada con 2% de estaquiosa o alimentados con harina de soja han mostrado una mayor incidencia de diarrea en comparación con los cerdos alimentados con una dieta de control [190]. Por otro lado, la fermentación de estos galacto-oligosacáridos produce efectos negativos sobre la digestibilidad de nutrientes y la disponibilidad de energía de la harina de soja. Gallos alimentados con harina de soja con bajas concentraciones de oligosacáridos han presentado valores de energía neta metabolizable total más altos que aquellos alimentados con harina de soja convencional [191]. La eliminación de polisacáridos de los productos de soja es, por lo tanto, un factor importante para mejorar su valor nutritivo.

1.1.6.3. Detoxificación

La prevención y eliminación de la toxicidad producida por toxinas de origen químico o natural, implica el conocimiento de cuáles son las de mayor incidencia, de su estructura y de la capacidad reactiva con otras moléculas que permitan su transformación en otras estructuras no-tóxicas o que puedan interferir con otros procesos metabólicos.

La FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación) estableció que un proceso de descontaminación resulta apropiado cuando permite cumplir con los siguientes criterios [192]:

- ☞ Destruir, inactivar o eliminar la toxina.
- ☞ No producir residuos tóxicos o carcinogénicos en productos finales o en alimentos obtenidos a partir de animales que se alimentaron de una dieta detoxificada.
- ☞ Mantener el valor nutritivo y la aceptabilidad del producto.
- ☞ No alterar las propiedades tecnológicas importantes de forma significativa.

Los métodos de descontaminación o detoxificación dependen no solo de las características físicas del alimento, sino también de los componentes que tenga y de la aplicación final que se le dará al producto. Sin embargo, ningún tratamiento por sí mismo puede eliminar totalmente el agente contaminante, siendo necesario un control integrado del proceso. Podemos citar los siguientes métodos:

- ☞ *Métodos físicos:* Comprenden operaciones de reducción de tamaño, tratamientos térmicos, adsorción, absorción, entre otros, los cuales han presentado éxito para el control de algunos agentes tóxicos según la especie y tipo de toxina. A menudo la aplicación de estos métodos no es suficiente y se requiere de procedimientos adicionales de detoxificación [193].
- ☞ *Métodos químicos:* Estos involucran inactivación a través de reacciones químicas, alta presión o extracción usando un solvente orgánico, álcalis, ácidos o una combinación de estos.
- ☞ *Métodos microbiológicos:* Comprenden procesos fermentativos que se originan por la adición de ciertas levaduras con capacidad de adsorber las toxinas presentes, reduciendo la contaminación [192].

En el caso de la soja, la “detoxificación” o eliminación de los antinutrientes se realiza a través de una amplia variedad de procesos que pueden aplicarse antes o después de la extracción del aceite dependiendo de las características del producto final deseado, la escala de producción y los costos operativos y de capital [128,194]. El tratamiento físico destructivo es el enfoque clásico más extendido para inactivar los inhibidores de tripsina. Dentro de ellos, el tostado del material, luego de la extracción del aceite, es el más empleado comercialmente y se basa en la inactivación de los antinutrientes termolábiles (ITs y lectinas), los cuales se desnaturalizan por calor, pierden actividad y se tornan digeribles. Sin embargo, este proceso debe realizarse por intervalos de tiempo acotados y en condiciones controladas de humedad y temperatura, ya que un tratamiento excesivo produce un amarronamiento del material debido a las reacciones de Maillard, una disminución de la digestibilidad proteica [195,196] y la destrucción indiscriminada de otros nutrientes esenciales presentes en la leguminosa [197–200]. Por otro lado, un calentamiento deficiente

no produce la inactivación completa de los antinutrientes, particularmente de las lectinas, reportadas como más resistentes al calor que los factores antitripticos.

El secado convencional forzado y el tostado son algunos de los métodos comunes de tratamiento térmico utilizados para la eliminación de los inhibidores de tripsina [201,202]. El tostado en un secador de tambor rotatorio o un secador de grano convencional se realiza a temperaturas que varían entre 110 y 170 °C, que pueden inactivar la actividad inhibitoria de los ITs hasta en un 85%, y llevar simultáneamente la humedad de semillas de soja a un valor óptimo para el almacenamiento. El tratamiento térmico en horno a 200 °C durante 20 min también reduce significativamente la actividad de los inhibidores de tripsina en la harina de soja integral [203]. Pero una de las principales desventajas de este método es la cocción no-uniforme y una distribución de temperatura desigual, especialmente cuando el espesor del lecho de secado es irregular [127]. El secado convencional con aire caliente a 100 °C durante dos horas reduce la actividad de IT a límites seguros, en un 80%, sin afectar la solubilidad de nitrógeno ni el color de la harina [197].

Según Kaur, Sharma, Dar y Singh (2012) [204], el tratamiento tanto con calor seco como calor húmedo es eficaz para la inactivación de compuestos bioactivos como IT en el salvado de cereales. Sin embargo, para mejorar la digestibilidad proteica y reducir el tiempo de procesamiento requerido para la inactivación de los factores antinutricionales, es crucial remojar la soja a temperatura ambiente como pretratamiento. Se observa que el remojo puede eliminar efectivamente los inhibidores de proteasas y otros factores indeseables tales como azúcares no-digeribles en el agua, reduciendo así el tiempo de cocción en un 70%. Remojar semillas de soja en agua durante dos horas seguido de tratamiento térmico resultó en un aumento en la inactivación total en un 40% en comparación con los frijoles sin remojar [205].

Entre otras metodologías de detoxificación empleadas pueden mencionarse la extrusión, la micronización, esterilización por autoclavado, tecnología de tratamiento térmico dieléctrico, tratamiento infrarrojo y el tratamiento químico enzimático [1], pero todas ellas resultan inconvenientes para ser aplicadas a macroescala, por sus elevados costos. Además, todas son destructivas, lo que no permite la revalorización de los propios antinutrientes, considerando las bioactividades beneficiosas que se les conoce. Un proceso no-destructivo que permite revalorizar los antinutrientes, pero que aún no se aplica con ese fin, es la producción de concentrados de proteínas (SPCs). El problema, en este caso, radica en la falta de tecnologías que permitan separar los diferentes fitoquímicos remanentes en los extractos, de un modo sustentable desde el punto de vista industrial.

1.2. SISTEMAS EXTRACTIVOS ACUOSOS

En las últimas décadas, las nuevas técnicas extractivas desarrolladas tuvieron como campo de aplicación principal el aislado y enriquecimiento de compuestos bioactivos a partir de productos naturales. Estas técnicas se basan en la separación bifásica (o multifásica) causada por la combinación de agua, disolventes orgánicos, líquidos iónicos, polímeros, sales y otras. Dentro de las diferentes alternativas de esta técnica se destacan la extracción dispersiva líquido-líquido, extracción micelar (EM) y extracción en dos fases acuosas (EDFA) [206–213]. Tanto EDFA y EM pueden ser equivalentes si se trabaja con sistemas micelares a temperaturas por encima de su punto de turbidez. Estas metodologías han sido ampliamente aplicadas en la extracción y pre-concentración de una amplia variedad de compuestos tales como iones metálicos, proteínas hidrófilas y, especialmente, pequeñas moléculas orgánicas. Son técnicas respetuosas con el medio ambiente, así como procesos eficientes y selectivos que pueden desarrollarse de forma continua, preservan la naturaleza del material, permiten ahorrar energía y pueden ser fácilmente escalados [208–210,212,214–219].

1.2.1. Sistemas bifásicos acuosos

Los sistemas de dos fases acuosas o bifásicos acuosos (SBAs) son aquellos que presentan dos fases líquidas acuosas inmiscibles que se forman bajo ciertas condiciones "críticas" de temperatura, fuerza iónica o concentración de polímero. Las fases típicamente muestran diferente densidad y se separan espontáneamente en una fase superior y otra inferior [220]. Dado que cada fase tiene un contenido mayoritario en agua (60 a 95% m/m), los SBAs permiten la regulación del pH y el agregado de iones o co-solutos estabilizantes, siendo por este motivo especialmente aptos para la partición selectiva de componentes lábiles como biopartículas y biomoléculas.

Una gran cantidad de pares de compuestos pueden generar sistemas bifásicos, que incluyen:

- ☞ Sistemas de polímero/polímero, que pueden comprender polímeros de carácter no-iónico y polielectrolitos
- ☞ Sistemas de polímero/sal, formados típicamente por sales con aniones cosmotrópicos como las de fosfato, sulfato o citrato
- ☞ Sistemas termosensibles polímero/agua
- ☞ Sistemas alcohol/sal
- ☞ Sistemas polímero/líquido-iónico
- ☞ Sistemas de surfactante/agua

Además de existir SBAs con distintas composiciones, cada tipo de sistema es sensible a variables diferentes, tales como temperatura, pH, co-solutos añadidos (sales o tampones orgánicos), así como también la masa molecular de los polímeros, su ramificación y grado de sustitución. Manipulando y optimizando las composiciones de equilibrio de cada una de las fases inmiscibles, es posible inducir un comportamiento de partición diferencial de una mezcla de analitos, haciendo que ciertas moléculas tengan una mayor afinidad por una fase respecto de la otra. Esto puede explotarse con fines de purificación, siendo un método alternativo para la separación de biomoléculas que reduce el número de pasos y, por lo tanto, reduce el costo total [221].

1.2.2. Sistemas micelares acuosos

En las últimas décadas se han desarrollado diferentes técnicas extractivas basadas en la capacidad solvente y de fraccionamiento que poseen ciertas soluciones de surfactantes. Las interesantes características extractivas líquido-líquido de los SBAs formados por estos sistemas han permitido desarrollar la metodología EDFA [222].

1.2.2.1. Surfactantes

Los surfactantes, también conocidos como tensoactivos, se encuentran entre los productos más versátiles de la industria química y aparecen en presentaciones tan diversas como en los aceites de motor que utilizamos en nuestros automóviles, los fármacos que tomamos cuando estamos enfermos y los detergentes que utilizamos para limpiar nuestra ropa y nuestros hogares. En las últimas décadas se ha extendido el uso de los surfactantes a áreas de alta tecnología como la impresión electrónica, el registro magnético, la biotecnología, la microelectrónica y la investigación viral [223].

Un surfactante (una contracción del término en inglés “surface-active agent”) o tensoactivo es una sustancia que, cuando está presente a baja concentración en un sistema heterogéneo, tiene la propiedad de adsorberse en la interface y alterar significativamente propiedades de dicha superficie como la tensión (interfacial/superficial) y la energía libre. El término *interfacial* refiere al caso general de dos fases inmiscibles cualesquiera y el término *superficial* se restringe a la situación donde una de las fases del sistema es un gas, generalmente aire.

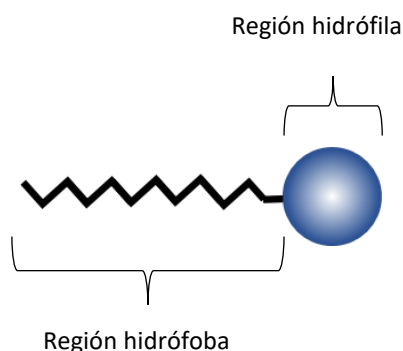


Figura 1.8. Representación esquemática de molécula de surfactante.

Los tensoactivos tienen una estructura molecular característica que consiste en un grupo que tiene muy poca atracción por el disolvente, conocido como grupo liófilo, junto con otro que tiene una gran atracción por el disolvente, llamado grupo hidrófilo. Esto se conoce como una estructura anfipática. Como puede verse representado en la Fig. 1.8, en medio acuoso estas moléculas anfipáticas tienen una cabeza polar hidrófila y una cola lipófila (hidrófoba), consistente en una cadena hidrocarbonada lineal o ramificada aromática o alifática. Cuando una molécula con este tipo de estructura se disuelve en un dado solvente, el grupo liófilo puede distorsionar la estructura de dicho solvente, aumentando la energía libre del sistema. Cuando eso ocurre, el sistema responde de alguna manera con el fin de minimizar el contacto entre el grupo liófilo y el solvente. En el caso de un surfactante disuelto en medio acuoso, el grupo liófilo (hidrófilo) distorsiona la estructura del agua (rompiendo enlaces de hidrógeno entre las moléculas de agua y estructurando el agua en las proximidades del grupo hidrófilo). Como resultado de esta distorsión, algunas de las moléculas tensoactivas son expulsadas a la interface del sistema, con sus grupos hidrofóbicos orientados en oposición al solvente para minimizar el contacto con las moléculas de agua. La superficie del agua se cubre entonces con una sola capa de moléculas tensoactivas con sus grupos hidrofóbicos orientados predominantemente hacia el aire (Fig. 1.9). Dado que las moléculas que conforman el aire son esencialmente de naturaleza no polar (al igual que los grupos hidrofóbicos), la interacción grupo hidrófilo-aire es más estable que la previa a la migración (grupo hidrófilo-agua), resultado en una disminución en la energía libre superficial (tensión superficial) del agua. Por otro lado, la presencia del grupo hidrófilo (hidrófilo) evita que el tensoactivo se expulse completamente del disolvente como una fase separada, ya que eso requeriría la deshidratación del grupo hidrófilo. Por lo tanto, la estructura anfipática del surfactante causa, no solo la acumulación del tensoactivo en la superficie y la reducción de la tensión superficial del agua, sino también cierto ordenamiento en la superficie dado por la orientación del grupo hidrófilo hacia la fase acuosa y la del grupo hidrofóbico lejos de ella.

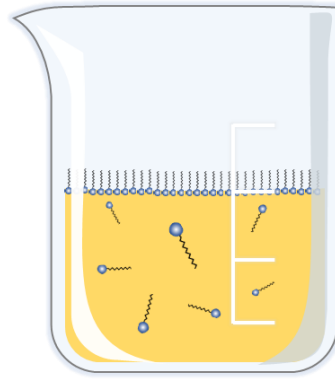


Figura 1.9. Solución acuosa de un surfactante.

Las estructuras químicas, potenciales porciones liófbas y liofílicas de la molécula de surfactante, varían con la naturaleza del disolvente y las condiciones de uso. En un disolvente altamente polar como el agua, el grupo liófbico puede ser una cadena de hidrocarburo, fluorocarbono o siloxano de longitud adecuada, mientras que, en un disolvente menos polar, solo algunos de estos pueden ser adecuados (por ejemplo, cadenas de fluorocarbono o siloxano en polipropilenglicol). Los grupos iónicos o altamente polares pueden actuar como grupos liofílicos en un disolvente polar tal como agua, mientras que, en un disolvente no-polar tal como heptano, pueden actuar como grupos liófbicos. Además, al variar las condiciones de temperatura y uso (por ejemplo, presencia de electrolitos o aditivos orgánicos), pueden ser necesarias modificaciones en la estructura de los grupos liófbico y liofílico para mantener la actividad superficial a un nivel adecuado. Por lo tanto, para la actividad superficial en un sistema particular, la molécula de tensoactivo debe tener una estructura química que sea anfífilica en ese disolvente en las condiciones de uso.

En medio acuoso, el grupo hidrofóbico es habitualmente un residuo de hidrocarburo de cadena larga, y con menos frecuencia una cadena de hidrocarburo o siloxano halogenada u oxigenada. El grupo hidrofílico es un grupo iónico o altamente polar. Dependiendo de la naturaleza del grupo hidrofílico, los surfactantes se clasifican en [223]:

- ☞ *Aniónico*: La porción hidrófila de la molécula tiene carga eléctrica negativa.
- ☞ *Catiónico*: La porción hidrófila tiene carga positiva.
- ☞ *Zwitterionico*: Ambas cargas positivas y negativas pueden estar presentes en la porción hidrófila.
- ☞ *No-iónico*: La porción hidrófila no tiene carga iónica aparente.

Las diferencias en la naturaleza de los grupos hidrofóbicos suelen ser menos pronunciadas que las de la naturaleza del grupo hidrofílico. En general, son residuos de

hidrocarburos de cadena larga. Sin embargo, incluyen estructuras tan diferentes como [223]:

- ☞ Grupos alquilo de cadena larga lineal (C₈-C₂₀)
- ☞ Grupos alquilo de cadena larga ramificada (C₈-C₂₀)
- ☞ Residuos de alquilbenceno de cadena larga (C₈-C₁₅)
- ☞ Residuos de alquilnaftaleno (grupos alquilo C₃ y de mayor longitud)
- ☞ Derivados de colofonia (la colofonia se obtiene de resinas vegetales)
- ☞ Polímeros de óxido de propileno de alto peso molecular (derivados de polioxipropilenglicol)
- ☞ Grupos de perfluoroalquilo de cadena larga
- ☞ Grupos de polisiloxano
- ☞ Derivados de lignina

El aumento en la longitud del grupo hidrofóbico: 1) disminuye la solubilidad del agente tensoactivo en agua y aumenta su solubilidad en solventes orgánicos; 2) provoca un empaquetamiento más cercano de las moléculas del surfactante en la interfaz (siempre que el área ocupada por el grupo hidrofílico en la interfaz lo permita); 3) aumenta la tendencia del surfactante a adsorberse en una interfaz o formar agregados, llamados micelas.

Por otro lado, las unidades de polioxietileno (POE) en la porción hidrofílica, disminuyen el carácter hidrofóbico o aumentan la hidrofiliidad del tensoactivo, aumentando la solubilidad del surfactante.

1.2.2.2. *Formación de micelas*

Para soluciones acuosas, cuando la concentración de las moléculas de surfactante aumenta por encima de un determinado valor, denominado concentración micelar crítica (CMC) [223], los monómeros se asocian espontáneamente formando agregados de tamaño coloidal (micelas) y originan lo que se conoce como sistema micelar acuoso (SMA).

El proceso de formación micelar (Fig. 1.10) se relaciona con un efecto hidrofóbico. Al disolverse un surfactante en agua, se produce la formación de estructuras ordenadas de moléculas de agua alrededor de sus colas hidrófobas (Fig. 1.10A), para así minimizar las fuerzas de repulsión. La formación de la micela es un mecanismo de aglomeración molecular con una orientación de la región hidrófoba hacia el interior de la estructura formada, que permite eliminar el contacto entre las cadenas no-polares y el agua (Fig. 1.10B). Consecuentemente, se produce un cambio entrópico positivo, asociado a la desestructuración de las moléculas de agua alrededor de la región hidrofóbica,

contribuyendo favorablemente al cambio de energía libre de agregación y, por ende, al proceso de formación micelar [224].

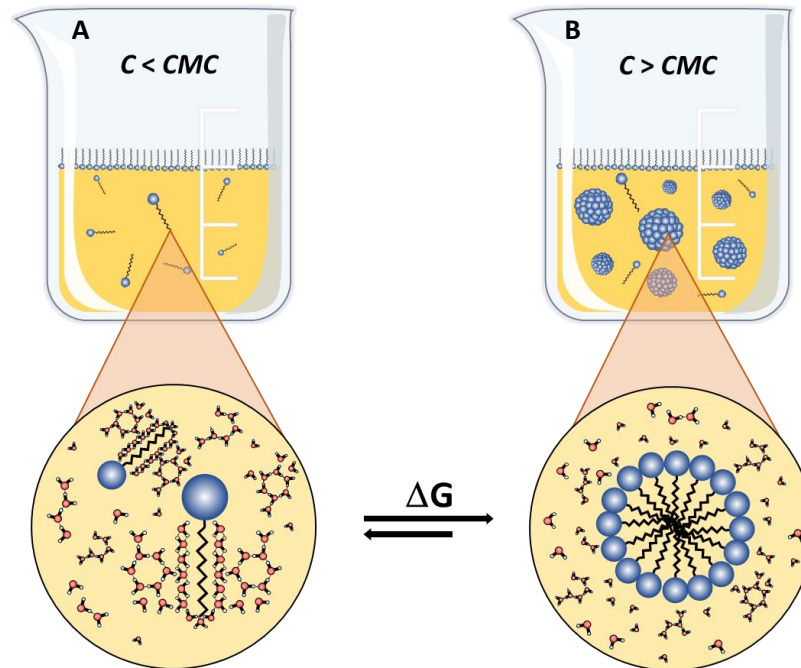


Figura 1.10. Proceso de micelización. **A)** Concentración de surfactante (C) inferior a la CMC a esa temperatura. Moléculas del disolvente (agua) estructuradas alrededor de las colas hidrofóbicas para estabilizar la molécula de surfactante en la solución. **B)** C superior a la CMC a esa temperatura. Aglomerados moleculares (micelas) presentes en el seno de la solución.

La forma de la micela producida es importante para determinar diversas propiedades del SMA, como su viscosidad, su capacidad para solubilizar material insoluble en agua y su punto de turbidez. Las configuraciones principales que pueden adoptar las micelas son [223]:

- ☞ Estructuras esféricas relativamente pequeñas (número de agregación < 100 , Fig. 1.11A)
- ☞ Estructuras cilíndricas alargadas, micelas en forma de varilla con extremos hemisféricos (elipsoides prolatos, Fig. 1.11B)
- ☞ Estructuras lamelares o laminares grandes y planas (elipsoides oblatos extendidos en forma de disco, Fig. 1.11C)
- ☞ Estructuras vesiculares (estructuras más o menos esféricas que consisten en micelas lamelares de dos capas dispuestas en una o más esferas concéntricas, Fig. 1.11D)

La región interior de la micela, que contiene los grupos hidrofóbicos, tiene un radio aproximadamente igual a la longitud de la cadena hidrofóbica completamente extendida. Se

crea que la fase acuosa penetra en la micela más allá de los grupos hidrofílicos, llegando inclusive a los primeros grupos metileno de la cadena hidrofóbica adyacente. Por lo tanto, es útil dividir el interior de la micela en una región externa que puede ser penetrada por agua y una interna de la que se excluye el agua [225].

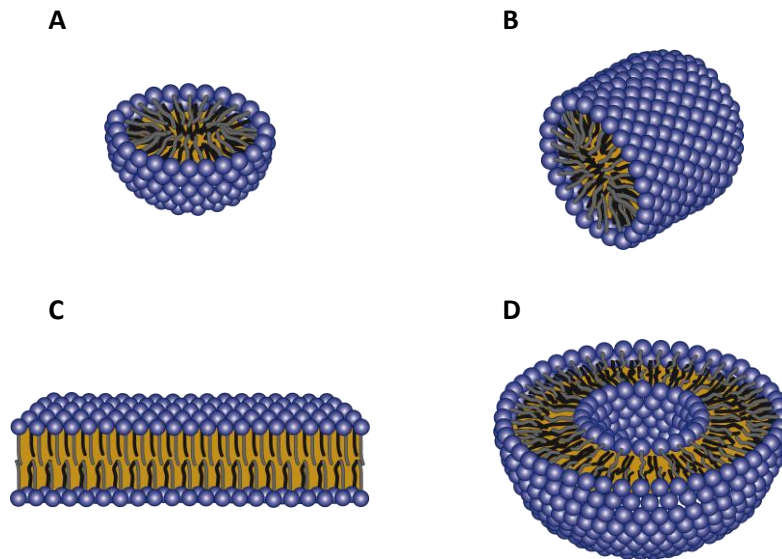


Figura 1.11. Principales configuraciones micelares: **A)** esférica; **B)** cilíndrica; **C)** laminar; **D)** vesicular.

Los cambios en la temperatura, concentración de surfactante, aditivos en la fase líquida y grupos estructurales en el surfactante pueden causar cambios en el tamaño, forma y número de agregación de la micela, variando la estructura desde esférica a elipsoides e inclusive hasta laminar [226]. Por ejemplo, si se añaden pequeñas cantidades de compuestos apolares o poco polares a una solución acuosa de un surfactante por encima de su *CMC*, estos materiales normalmente insolubles en agua pueden solubilizarse en las micelas. Esta solubilización provoca generalmente un aumento en el número de agregación de la micela, y a medida que aumenta la cantidad de material solubilizado por éstas, la agregación continúa aumentando hasta que se alcanza el límite de solubilización [223]

1.2.2.3. Fenómeno de turbidez

Los SMAs de la mayoría de surfactantes no-iónicos etoxilados se vuelven turbios luego de alcanzar una temperatura conocida como punto de turbidez (*PT*). Al calentarse por encima del *PT*, la dispersión coloidal forma dos pseudo-fases acuosas, una de ellas rica en micelas (fase micelar) y la otra (fase acuosa) con una concentración de surfactante próxima a la *CMC* a esa temperatura (Fig. 1.12). Estos sistemas se conocen como sistemas micelares de dos fases acuosas (SMDFAs).

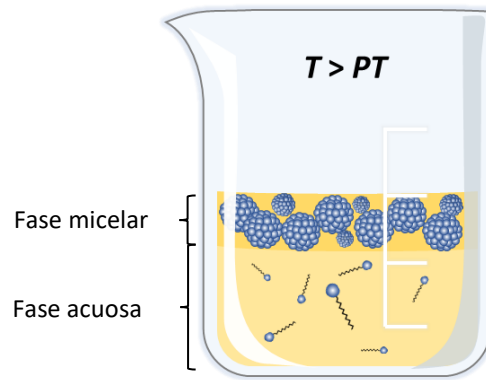


Figura 1.12. Separación de fases cuando la temperatura (T) del sistema micelar supera al punto de turbidez (PT).

El mecanismo por el cual se produce este fenómeno aún no está completamente claro [223,227]. Algunos autores han propuesto como causa de la diferenciación de fases el aumento en el número de agregación micelar (un aumento en el tamaño de la micela) que ocurre al incrementarse la temperatura [228,229]. Lindman y Wennerstroem (1991) [229] han sugerido que el proceso sería originado por un cambio en las interacciones micelares, que son repulsivas a bajas temperaturas, pero predominantemente atractivas a altas temperaturas. Nilsson y col. (1983) [230] han explicado el fenómeno del punto de turbidez sobre la base del proceso de deshidratación que se produce en la capa externa de micelas de detergentes no-iónicos cuando aumenta la temperatura. También debe considerarse que la constante dieléctrica del agua disminuye al aumentar la temperatura, haciéndolo un disolvente más pobre para la porción hidrófila de la molécula de surfactante [231]. Por otro lado, se ha demostrado que la división de fases resulta de la competencia entre el factor entrópico (que favorece la miscibilidad de las micelas en el agua) y el entálpico (que favorece la separación), haciendo que el fenómeno de turbidez y separación de fases sea reversible [231]. El restablecimiento de las condiciones iniciales de la solución impulsa a las micelas a fusionarse con la fase acuosa, produciendo de nuevo un sistema de una sola pseudo-fase.

Una vez alcanzado el PT , la estratificación en una fase inferior y otra superior se produce debido a la diferencia en la densidad de ambas [232]. La fase micelar no necesariamente se encontrará en un mismo estrato para todos los sistemas, ya que las densidades relativas de ambas fases pueden variar según la naturaleza del detergente. Por ejemplo, los SMDFAs de Triton X-100 presentan la fase rica en micelas en la capa inferior del sistema, mientras que dicha fase se ubica en el estrato superior de los SMDFAs de Genapol X-080.

Es sabido que la temperatura de separación de fases y las propiedades fisicoquímicas de los sistemas micelares acuosos dependen no sólo de la estructura y concentración del surfactante, sino también de la presencia de otros compuestos como sales o ligandos [211,233,234]. En muchas aplicaciones prácticas, relacionadas con detergentes no-iónicos, se adicionan electrolitos al medio que pueden dar lugar a una modificación de ambas interacciones intramicelar e intermicelar [235]. Aunque estas interacciones son relativamente débiles, en comparación con aquellas presentes en sistemas de surfactantes iónicos, son suficientemente significativas para alterar tanto las propiedades estructurales como dinámicas de las micelas, determinando el comportamiento del detergente en una cierta aplicación. En consecuencia, es muy importante lograr una comprensión fundamental de cómo los electrolitos pueden afectar las propiedades micelares de los surfactantes no-iónicos. Investigaciones acerca del efecto de los electrolitos sobre dichas propiedades han demostrado que el punto de turbidez se modifica sustancialmente por su adición, siendo el resultado de una fuerte interacción ión-micela y/o ión-agua, lo que puede ser acompañado por profundos cambios estructurales y afectar sus diferentes propiedades fisicoquímicas [223,236-248].

1.2.3. Sistemas micelares de surfactantes no-iónicos

Los surfactantes no-iónicos representan una clase importante de anfífilos, que encuentran amplias aplicaciones en formulaciones industriales y farmacéuticas, y son ampliamente utilizados en la investigación bioquímica en membranas y en procesos de extracción y purificación de compuestos de origen biológico [242,249-251]. Según lo indicado por Katsoyannos y col. [251], los sistemas micelares que utilizan surfactantes no-tóxicos (entre los no-iónicos generalmente son los que no presentan cadenas alifáticas ramificadas o restos aromáticos) son apropiados para el aislamiento de antioxidantes naturales, que luego se pueden usar en aplicaciones dietéticas. Hoy en día, se emplean separaciones de fase líquida-líquida de micelas de detergentes no-iónicos o zwitteriónicos (EM y EDFA), mientras que el uso de especies surfactantes cargadas es todavía limitado [216,227,252-254]. Entre los surfactantes no-iónicos, los polietoxilados (POEs) son los más numerosos e interesantes técnicamente [242], destacándose por su uso difundido Triton (X-100 y X-114), Brij (-30, -56 y -97), Genapol (X-080) y en menor proporción, los Tergitales (15-S-X), entre otros [209,210,216,221,232,239,241,254-260].

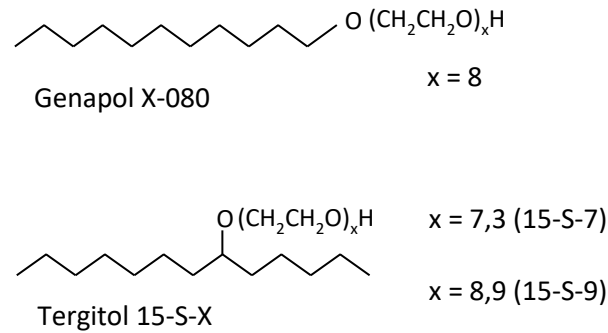


Figura 1.13. Estructuras moleculares del alcohol primario etoxilado Genapol X-080 y los alcoholes secundarios etoxilados Tergitol 15-S-X (15-S-7 y 15-S-9).

Genapol X-080 (GX) es un surfactante no-iónico estructurado del tipo de los alcoholes alifáticos primarios etoxilados, con una cadena hidrofóbica de 12 alquilos y 8 OEs (grupos oxietilenos) en su región hidrofílica (Fig. 1.13). Por su parte, los surfactantes no-iónicos Tergitol 15-S-7 (Tg7) y Tergitol 15-S-9 (Tg9) son mezclas de alcoholes alifáticos secundarios etoxilados con 11-15 carbonos en la cadena alquilo hidrofóbica y con un número medio de OEs de 7,3 y 8,9 respectivamente, como cabeza hidrofílica (Fig. 1.13). Tanto GX como los tergitoles son biodegradables y no-tóxicos. Además, presentan la cualidad de ser transparentes en la región UV 240-280 nm, facilitando el seguimiento de procesos de purificación de moléculas aromáticas o con dobles enlaces conjugados que adsorben en esa zona espectral.

Utilizando la metodología de EDFA (extracción en dos fases acuosas), se han aplicado con éxito SMAs de GX para recuperar y cuantificar vitaminas A y E a partir de suero humano [261], recuperar polifenoles de aguas residuales en la extracción de aceite de oliva [216] y del orujo del vino [211]. De particular interés para el presente trabajo han sido los reportes sobre los sistemas micelares de GX que han sido usados para extraer daidzeína de *Puerariae radix* [262] e isoflavonas totales de soja [263], aunque los resultados fueron disímiles.

Por su parte, SMDFAs de Tg7 y Tg9 se han utilizado para extraer hidrocarburos aromáticos policíclicos de soluciones acuosas [210], así como en la separación y pre-concentración de contaminantes orgánicos en suelos y de aguas residuales [214]. Recientemente, la aplicación de EM (extracción micelar) con sistemas de estos dos surfactantes también se consideró para la recuperación de carotenoides de macroalgas marrones [250]. SMAs de Tg7 también fueron aplicados para extraer ácidos grasos en cultivos de microalgas [215,260]. Sin embargo, aún no se ha aplicado ninguno de los surfactantes de la familia de los tergitoles en la recuperación de fitoquímicos presentes en la soja.

CAPÍTULO 2 – Objetivos

2.1. OBJETIVO GENERAL

El *objetivo general* de este trabajo de tesis doctoral es desarrollar una estrategia extractiva con sistemas micelares formados por alcoholes alifáticos etoxilados, que permita detoxificar subproductos de soja preservando/mejorando la calidad nutricional y propiedades bioactivas proteica.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para el logro del objetivo general del trabajo se propusieron los siguientes *objetivos específicos*:

- i) *Caracterizar los sistemas micelares formados por los alcoholes alifáticos etoxilados pertenecientes a las series Genapol X (Genapol X-080) y Tergitol 15-S (Tergitol 15-S-7 y Tergitol 15-S-9).*

Se determinarán parámetros fisicoquímicos y patrones de comportamiento asociados al proceso de autoensamblado de los surfactantes, tales como la concentración micelar crítica, las curvas de coexistencia de fases, la morfología y el tamaño de las micelas, entre otros. Se analizarán los resultados obtenidos, los efectos observados en presencia de ciertas sales y se vincularán con la estructura del surfactante, entendiéndose esto como un prerrequisito para la comprensión y comparación del desempeño extractivo de los diferentes sistemas.

ii) Definir los indicadores de seguimiento y valoración del proceso de destoxificación de harina de soja.

La eficiencia extractiva se medirá por la reducción en el contenido de antinutrientes y por la calidad nutricional/biofuncional de las muestras sometidas al proceso. Los antinutrientes más significativos presentes en harina de soja, tales como inhibidores de proteasas y oligosacáridos no digeribles, se determinarán mediante técnicas que sean sencillas y aplicables a nivel industrial. Para ello se trabajará en la simplificación, reducción de costos y tiempos, de protocolos ya reportados en la literatura. El valor nutricional de las harinas de soja, pre y post tratamiento, se estimará midiendo el contenido de proteína soluble y la bioactividad proteica (capacidad antioxidante y actividad inhibitoria de la enzima convertora de angiotensina-I). Esto se llevará a cabo mediante la adaptación de técnicas ya valoradas sobre otras matrices. Se complementarán estos resultados con estudios de digestibilidad *in-vitro*.

iii) Explorar el proceso de lixiviado de harina de soja y evaluar la potencial capacidad extractiva de isoflavonas de los sistemas micelares propuestos.

Se analizarán los factores más relevantes del proceso de lixiviado, tales como el pH y el tiempo, de modo de definir las condiciones que maximicen la extracción de inhibidores de proteasas y minimicen la pérdida del contenido proteico del material tratado. Adicionalmente, se evaluará la habilidad extractiva de isoflavonas, potenciales subproductos del proceso extractivo, por parte de los sistemas micelares propuestos. La viabilidad y conveniencia de esta alternativa se definirá en base a la comparación rigurosa de estos resultados con los obtenidos con otros sistemas/solventes tradicionales.

iv) Optimizar la extracción con los sistemas micelares seleccionados.

Mediante la utilización de arreglos experimentales adecuados que permitan el uso de herramientas estadísticas rigurosas, se cribarán las variables que afecten significativamente la extracción con los sistemas de Genapol X-080, Tergitol 15-S-7 y Tergitol 15-S-9, y se modelarán las respuestas (contenido de inhibidores de proteasas, proteína y polifenoles en los extractos). Se determinarán las condiciones óptimas que

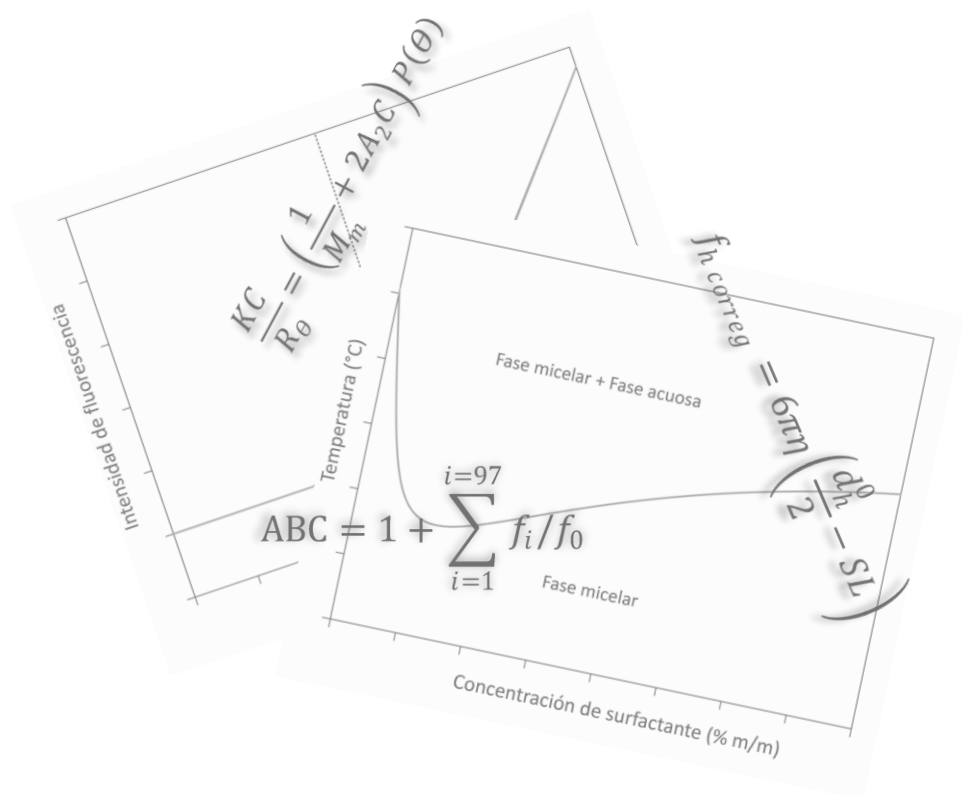
permitan maximizar la recuperación de isoflavonas e inhibidores de tripsina en el lixiviado y minimizar la caída del nivel proteico en la matriz tratada.

v) *Diseñar una estrategia de detoxificación de harina de soja, basada en la utilización de los sistemas micelares.*

En base a los resultados obtenidos a partir de los restantes objetivos, se propondrá y llevará a cabo un proceso extractivo sobre harina de soja con los sistemas micelares seleccionados. El mismo se evaluará con los indicadores de seguimiento definidos precedentemente. Se compararán los resultados con los obtenidos por una estrategia convencional a fin de concluir sobre las fortalezas y debilidades de la metodología propuesta.

PARTE II

Experimental



*“El pensamiento lógico puro no
puede brindarnos ningún conocimiento del
mundo empírico; todo conocimiento de la
realidad empieza en la experiencia y termina
en ella.”*

Albert Einstein

CAPÍTULO 3 - Materiales y Métodos

3.1. MATERIALES

Los surfactantes Genapol X-080 (GX), Tergitol 15-S-7 (Tg7), Tergitol 15-S-9 (Tg9), Triton X-114 (TX114) y dodecil sulfato de sodio (SDS) se obtuvieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE. UU.). Se adquirieron polietilenglicoles de masa molecular 8000 (PEG8000) y 600 (PEG600) de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE. UU.).

Harinas de soja desgrasadas sin desactivar (blanca) y desactivada (tostada), ambas obtenidas de Molinos Río de la Plata (San Lorenzo, Argentina). Una muestra de harina comercial adicional, fue obtenida en un comercio local.

Tripsina (bovina) cristalina desalinizada (TRP), pepsina de cerdo (800-1000 U/mg de proteína), pancreatina (4xUSP), enzima conversora de angiotensina-I (peptidil-dipeptidasa A, EC 3.4.15.1, 5,1 U/mg), α -N-benzoilo-DL-arginina-*p*-nitroanilida (BAPNA) cristalino, sales biliares y trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-croman-2 carboxílico)

fueron obtenidos de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE. UU.) y utilizados sin purificación adicional. El complejo enzimático comercial Corolase PP se adquirió de AB Enzymes GmbH (Darmstadt, Alemania). La L-serina se adquirió en Merck (Darmstadt, Alemania). La fluoresceína [3',6'-dihidroxispiro (isobenzofuran-1[3H],9'[9H]-xanten)-3-ona] se adquirió de Fisher Scientific (Hanover Park, IL). El AAPH [2,2'-azobis (2-amidi-nopropano) dihidrocloruro] se adquirió en Aldrich (Milwaukee, WI). El tripéptido Abz-Gly-Phe(NO₂)-Pro se obtuvo de Bachem Feinchemikalien (Bubendorf, Switzerland). El Tris [tris(hidroximetil)aminometano] se obtuvo de Fluka (GmbH, Germany).

Los patrones de isoflavonas (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.) se disolvieron en metanol puro hasta obtener las siguientes concentraciones: daidzina 1,5-80,0 µg/mL; daidzeína 0,3-17,0 µg/mL; genistina 0,7-40,0 µg/mL y genisteína 0,2-13,0 µg/mL. Las tabletas de isoflavona de soja, conteniendo 79 mg IF/g, se compraron en una farmacia local.

Metanol (MetOH) y etanol (EtOH) absolutos fueron de calidad HPLC, y se usaron tal como se recibieron sin purificación adicional. Todos los demás reactivos fueron de calidad analítica y se usaron sin purificación adicional.

Se utilizó agua desionizada para preparar todas las soluciones.

3.2. METODOLOGÍA

3.2.1. Espectrometría en IR medio (ATR-FTIR)

Se realizaron mediciones en infrarrojo medio aplicando transformada de Fourier, caracterizando primero los surfactantes estudiados y luego la harina de soja y concentrados proteicos producidos como se describe en la Sección 3.2.25. Todos los espectros fueron adquiridos como media de 30 mediciones y una resolución de 4 cm⁻¹, en la región de 4000–500 cm⁻¹ y se expresaron como absorbancia estandarizada según el máximo de cada espectro. Para el caso de la harina y concentrados, la segunda derivada de la banda de amida I se utilizó para identificar los diferentes componentes espectrales, realizándose posteriormente una deconvolución espectral con un ajuste gaussiano [264,265]. El análisis de FTIR se llevó a cabo en un espectrómetro de infrarrojo, modelo ABB MB3000 (ABB, Switzerland), equipado con un detector de sulfato triglicina deuterado y provisto de un accesorio horizontal de reflexión única MIRacle™ (PIKE Technologies, USA), para reflectancia total atenuada (ATR), con una placa de cristal de diamante/Se.

3.2.2. Concentración micelar crítica (CMC)

Las CMCs de los surfactantes Tergitol 15-S-7 y Tergitol 15-S-9 fueron determinadas siguiendo la metodología presentada por Zana, Lévy y Kwetkat (1998) [266], con algunas modificaciones. La misma se basa en el empleo del compuesto fluorescente 1-anilino-8-naftaleno sulfonato de amonio (ANS) como sonda sensible a entornos hidrofóbicos.

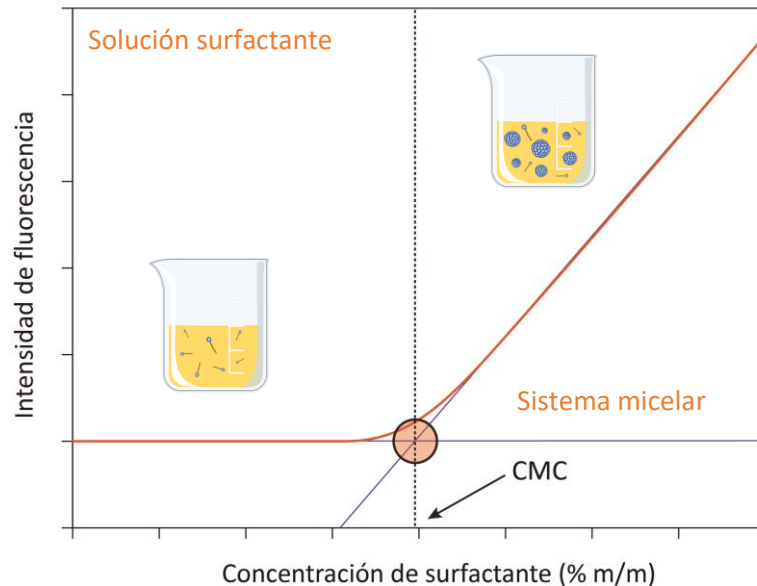


Figura 3.1. Diagrama típico de la dependencia de la intensidad de fluorescencia del ANS con respecto a la concentración de surfactante.

El procedimiento consistió en la mezcla de 990 μL de muestra (soluciones con concentraciones crecientes de Tg7 y Tg9 en el rango $0\text{-}10^{-2}$ % m/m) y 10 μL de una solución 3,2 mg/mL de ANS en microtubos (tipo eppendorf) de 1,5 mL. Luego de homogeneizar e incubar cada sistema a 25 $^{\circ}\text{C}$ durante 2 min, se tomaron 200 μL de cada medio para realizar las medidas de fluorescencia en un lector de microplacas FLUOstar OPTIMA (BMG Labtech, Offenburg, Alemania). Se seleccionaron como longitud de onda de excitación y emisión 350 y 485 nm respectivamente, valores correspondientes al pico emisor del ANS. El equipo fue controlado por el programa FLUOstar Galaxy v.1.32 R2 para medición de fluorescencia, provisto por el fabricante. Se utilizaron microplacas de poliestireno negro de 96 pocillos (Nunc, Dinamarca) para el ensayo. Los datos se expresaron como dispersiones de tres experimentos independientes y la CMC se determinó mediante la intersección de dos regresiones lineales de primer orden (Fig. 3.1), aplicada a dichos datos.

3.2.3. Punto de turbidez (PT)

Se determinó el punto de turbidez (PT) de diferentes soluciones de los surfactantes GX, Tg7 y Tg9 mediante el método, descrito por Watanabe y Tanaka (1978) [267], que

consiste en la detección visual de la temperatura a la que una solución de concentración conocida de un determinado surfactante se vuelve nebulosa.

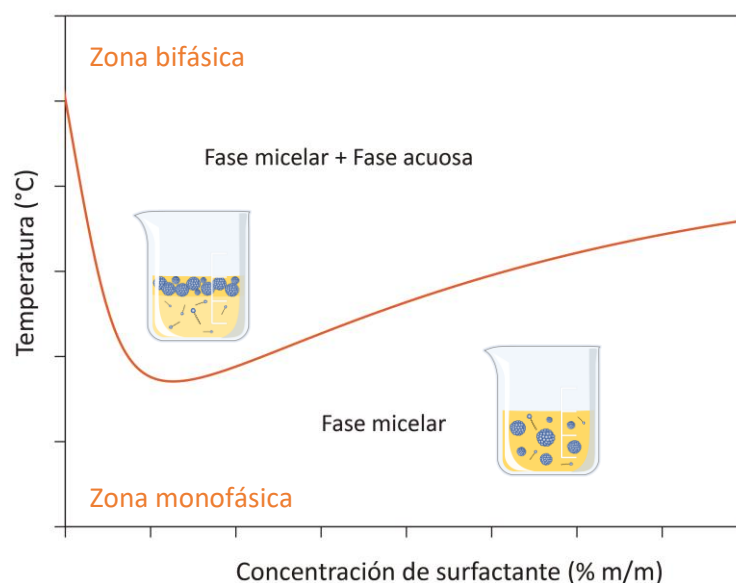


Figura 3.2. Diagrama típico de coexistencia de fases para sistemas micelares acuosos de surfactantes no-iónicos. La curva representa las temperaturas de *PT* según la concentración de surfactante.

Para ello, se prepararon 5 mL de sistemas conteniendo surfactante (0-10% m/m para ambos tergitoles y sólo al 1% m/m para GX) y NaCit (50, 100 y 200 mM) a pH 4,5, homogenizados durante 1 h a temperatura ambiente. Estos sistemas fueron colocados en un baño transparente de ultra-precisión CT 52 (SI Analytics) a 22 °C (temperatura a la cual se observó una clara y única fase en todos los casos) durante 30 min. Transcurrido este tiempo, comenzó a aumentarse la temperatura de manera escalonada, con incrementos de 0,1 °C, dejando estabilizar 5 min en cada temperatura. La aparición de una nebulosa estable en una solución se tomó como el inicio de la división de fases, siendo la temperatura para la cual se observó este fenómeno el correspondiente *PT* de dicha solución. Para el caso de los tergitoles, los valores de punto de turbidez observados se graficaron en función de la correspondiente concentración de surfactante, obteniéndose así los diagramas de coexistencia característicos (Fig. 3.2) para cada sistema surfactante/sal. Se realizaron tres repeticiones de cada experimento para ponderar el desvío muestral.

3.2.4. Espectrometría de dispersión de luz (DLS/SLS)

Las medidas DLS/SLS fueron hechas en un ángulo de detección constante de 173 ° mediante la tecnología llamada NIBS (Non-Invasive Back-Scatter) que permite reducir el efecto conocido como dispersión múltiple y la influencia de contaminantes en la muestra. Se utilizó el espectrómetro de correlación fotométrica Zetasizer NanoZSP (Malvern

Instruments Ltd., UK), que permite la medida de tamaños de partículas entre 0,6 nm y 6 µm. Este equipo está provisto de un láser He-Ne de 10 mW con una longitud de onda de emisión de 633 nm. Los datos fueron adquiridos y analizados mediante el software Zetasizer v. 7.11 (Malvern Instruments Ltd., UK). En todos los casos se utilizó una cubeta de vidrio de apertura cuadrada PCS1115 (Malvern Instruments Ltd., UK).

3.2.4.1. *Dispersión dinámica de luz (DLS)*

Se utilizó DLS para medir la distribución de tamaños de las micelas en soluciones de surfactante con una concentración 0,01 g/mL (1% m/m). Todas las muestras analizadas fueron filtradas con filtros de membrana de 0,45 µm (Millipore, Billerica, MA, USA), con previa saturación de la membrana con la respectiva muestra, para evitar pérdidas de partículas por adsorción. Las medidas se realizaron a temperatura variable según cada muestra, luego de 4 minutos de incubación, reportándose la media de tres experimentos independientes.

DLS mide la variación de las intensidades de dispersión de luz de una suspensión en el tiempo. Proporciona información sobre el movimiento aleatorio de las partículas y, por lo tanto, puede utilizarse para medir el coeficiente de difusión de las mismas. Teniendo en cuenta este tipo de movimiento, la señal fluctuante de la intensidad de dispersión, puede procesarse generando una función de autocorrelación, $g(\tau)$, donde τ es el tiempo de retraso o relajamiento. Para una suspensión monodispersa de partículas rígidas y globulares, la función de autocorrelación viene dada por:

$$g(\tau) = A \exp(-2q^2 D_m \tau) + B \quad (3.1)$$

donde D_m es el coeficiente de difusión traslacional; A es una constante óptica que depende del diseño del instrumento; q es la magnitud del vector de onda de luz dispersa y B es la línea de base.

Luego, el radio hidrodinámico (R_h), y consecuentemente el diámetro hidrodinámico (d_h) pueden estimarse a partir del valor de D_m obtenido, utilizando la ecuación de Stokes-Einstein:

$$R_h = \frac{k_B T}{6\pi\eta_0 D_m} \quad (3.2)$$

donde k_B es la constante de Boltzmann ($1,380648813 \cdot 10^{-23}$ g cm²/s² K); T es la temperatura absoluta de la solución; y η_0 es la viscosidad del solvente (0,0089, 0,0090, 0,0093 y 0,0101 g/s cm, para agua, NaCit 50 mM, NaCit 100 mM y NaCit 200 mM respectivamente a 298 K).

Debe tenerse presente que a medida que aumenta la concentración de micelas, éstas pueden interactuar entre sí afectando su velocidad de difusión y por tanto el diámetro hidrodinámico medido. La siguiente relación, propuesta por Debye, representa la dependencia del coeficiente de difusión medido (D_m) con la concentración del surfactante en la muestra (C):

$$D_m = D^0(1 + k_D C) \quad (3.3)$$

donde D^0 es el coeficiente de difusión en régimen de dilución infinita y k_D es el parámetro de interacción de difusión. Para estimar este efecto se realizaron medidas de D_m empleando soluciones acuosas de surfactantes de concentraciones: 0,001; 0,0025; 0,005; 0,0075 y 0,01 g/mL en agua y en sistemas tamponados a pH 4,5 con NaCit (50 mM, 100 mM y 200 mM). Las medidas se efectuaron por triplicado, luego de 2 min de incubación, reportándose el valor medio.

La ordenada al origen del gráfico D_m vs C , conocido como diagrama dinámico de Debye, corresponde a D^0 y la pendiente de la curva ajustada es $k_D D^0$. Por lo tanto, k_D puede calcularse a partir de la pendiente de esta curva. El diámetro hidrodinámico d_h , calculado mediante la ecuación 3.2 a partir de D_m , depende de las interacciones y se lo conoce como diámetro hidrodinámico “aparente” mientras que aquel obtenido empleando D^0 , simbolizado como d_h^0 , puede considerarse como el diámetro hidrodinámico “verdadero”. Por su lado k_D puede interpretarse, entonces, como una medida de las interacciones entre las micelas.

Finalmente, cabe mencionar que, al aplicar la técnica de DLS, para el caso de funciones de correlación monomodales, es aconsejable utilizar el *análisis de acumulados* en lugar del *método de distribución*, ya que es un procedimiento simple y robusto que no hace ninguna suposición sobre la distribución de tamaños de la muestra. Los parámetros obtenidos por el mismo son el valor medio para el tamaño (Z-promedio) y la amplitud de la curva de dispersión conocida como Índice de Polidispersidad (PDI). El Z-promedio es un valor calculado de diámetro basado en la intensidad y es comparable con otros resultados sólo si se utiliza el mismo ángulo de dispersión. Todos los valores de d_h informados corresponden a los valores de Z-promedio.

3.2.4.2. Dispersión estática de luz (SLS)

La masa media de las micelas en los sistemas estudiados, se determinó por SLS midiendo la intensidad de luz dispersada por la muestra a diferentes concentraciones y aplicando la ecuación de Rayleigh:

$$\frac{KC}{R_{\theta}} = \left(\frac{1}{M_m} + 2A_2C \right) P(\theta) \quad (3.4)$$

donde R_{θ} , razón de Rayleigh, es la fracción de la luz incidente dispersada por la muestra; M_m es la masa molecular promedio de las partículas de la muestra; A_2 es el segundo coeficiente del virial; C es la concentración de la solución (en g/mL); $P(\theta)$ es la dependencia angular de la intensidad de dispersión de la muestra y K es una constante óptica que se define:

$$K = \frac{2\pi^2 n_0^2}{N_A \lambda_0^4} \left(\frac{dn}{dC} \right)^2 \quad (3.5)$$

siendo N_A el número de Avogadro; λ_0 , la longitud de onda del láser (633 nm); n_0 , el índice de refracción del solvente y dn/dC , el cambio diferencial del índice de refracción con la concentración en el rango de trabajo (entre 0,001 – 0,01 g/mL).

El estándar utilizado en el presente trabajo fue tolueno, dado que presenta razones de Rayleigh adecuadamente altas y conocidas en un amplio rango de longitudes de onda y temperaturas.

La representación gráfica de $\frac{KC}{R_{\theta}}$ vs C se conoce como diagrama estático de Debye y permite la determinación tanto de M_m como de A_2 . Gráficos lineales como los obtenidos en el presente trabajo, permitieron despreciar la dependencia angular de la intensidad de dispersión ($P(\theta) = 1$, según la ecuación 3.4).

Se emplearon soluciones acuosas de surfactantes de concentraciones: 0,001; 0,0025; 0,005; 0,0075 y 0,01 g/mL en agua y en medios tamponados a pH 4,5 con NaCit (50, 100 y 200 mM). Las medidas se efectuaron por triplicado, luego de 2 min de incubación, reportándose el valor medio. Para determinar la constante óptica K , necesaria en el cálculo de la masa molecular, se midió la variación del índice de refracción con la concentración (dn/dC) mediante el detector diferencial de índice de refracción (n) K-2301 (Knauer GmbH, Germany), con un ángulo de medida de 45 ° y una fuente de luz de 950 ± 30 nm. Todas las muestras analizadas fueron filtradas con filtros de membrana de 0,45 μm (Millipore, Billerica, MA, USA), con previa saturación de la membrana con la respectiva muestra, para evitar pérdidas de partículas por adsorción. La temperatura de trabajo fue 25 °C.

3.2.5. Parámetros morfológicos

3.2.5.1. Número de agregación

El número de agregación micelar (N_{ag}) se calculó como el cociente entre el M_m (masa molecular media de las micelas) y la masa molecular de un monómero de surfactante.

3.2.5.2. Área superficial de la región hidrofílica en la micela

En la superficie total de la micela, el área que corresponde a cada molécula de surfactante, a_0 , es un parámetro estructural que desempeña un papel importante en la geometría y el empaquetamiento micelar [268], controlando la magnitud de las repulsiones estéricas entre los grupos hidrofílicos [269]. Este parámetro se determinó suponiendo geometría esférica, por lo cual se calculó el diámetro correspondiente a una micela anhidra (d_{anh}) como:

$$d_{anh} = 2 \sqrt[3]{\frac{3V_{anh}}{4\pi}} \quad (3.6)$$

donde V_{anh} es el volumen anhidro medio de las micelas, calculado a partir de los datos de M_m y del volumen específico parcial (\bar{v}):

$$V_{anh} = \frac{\bar{v} M_m}{N_A} \quad (3.7)$$

Con el fin de obtener los valores de volumen específico parcial de GX, Tg7 y Tg9, se llevaron a cabo mediciones de la densidad (ρ) de soluciones de surfactante en el rango de concentraciones de trabajo, no observándose diferencias significativas en ningún caso. Esto puede deberse principalmente a que las densidades de los tres surfactantes puros son muy próximas a la del agua a la temperatura de trabajo (1,0501 g/cm³ para GX, 0,9890 g/cm³ para Tg7 y 1,0016 g/cm³ para Tg9). Siguiendo lo sugerido por Molina-Bolívar, Aguiar y Ruiz (2001) [242] para Triton X-100, se tomó como medida alternativa para estimar el \bar{v} a la inversa de las densidades de los surfactantes puros (0,9524 cm³/g para GX, 1,0111 cm³/g para Tg7 y 0,9984 cm³/g para Tg9).

Finalmente, el a_0 se calculó a partir de la siguiente expresión:

$$a_0 = \frac{\pi d_{anh}^2}{N_{ag}} \quad (3.8)$$

3.2.5.3. Parámetro de empaquetado

Israelachvili y col. (1977) [270], y Mitchell y Ninham (1981) [271] han desarrollado una teoría de la estructura micelar, basada en la geometría de varias formas micelares y el espacio ocupado por los grupos hidrófilos e hidrófobos de las moléculas tensioactivas. El volumen ocupado por los grupos hidrófobos en el núcleo micelar (V_{hf}), la longitud del grupo hidrófobo en el núcleo l_c y el área de la sección transversal, a_0 , ocupada por el grupo hidrófilo

en la superficie, se utilizaron para calcular el parámetro de empaquetado (PE), que determina la forma de la micela [272]:

$$PE = \frac{V_{hf}}{l_c a_0} \quad (3.9)$$

Según Tanford [272],

$$V_{hf} = 27,4 + 26,9N_c \quad \text{expresado en } \text{Å}^3 \quad (3.10)$$

$$l_c \leq 1,5 + 1,265N_c \quad \text{expresado en } \text{Å} \quad (3.11)$$

donde N_c es el número de átomos de carbono de la cadena inscrita en el núcleo micelar (el número total de carbonos que la componen o uno menos). Para cadenas alifáticas saturadas, l_c puede ser hasta el 80% de la cadena completamente extendida.

Tabla 3.1. Estructura micelar según valores de PE

Valor de PE	Estructura de la micela
$0 - \frac{1}{3}$ (0 – 0,3)	Esférica en medio acuoso
$\frac{1}{3} - \frac{1}{2}$ (0,3 – 0,5)	Cilíndrica en medio acuoso
$\frac{1}{2} - 1$ (0,5 – 1)	Lamelar en medio acuoso

3.2.5.4. Factor de Perrin

El factor de Perrin o de forma (FP) es una medida de cómo la conformación de la partícula se desvía de la forma esférica. FP se define como el cociente entre el coeficiente de fricción hidrodinámico corregido ($f_{h,correg}$) y aquel correspondiente a la partícula esférica anhidra equivalente (f_{anh}). Los valores de f_{anh} y $f_{h,correg}$ se calcularon como se muestra a continuación:

$$f_{anh} = 6\pi\eta_0 \frac{d_{anh}}{2} \quad (3.12)$$

$$f_{h,correg} = 6\pi\eta \left(\frac{d_h^0}{2} - SL \right) \quad (3.13)$$

donde η_0 es la viscosidad del medio y SL es el espesor de una sola capa de solvente ($SL = 0,25$ nm), valor que se sustrae al radio hidrodinámico ($d_h^0/2$) [273]. Esta corrección, descuenta el efecto que la capa de hidratación micelar tiene en el f_h determinado experimentalmente.

Luego se obtuvo:

$$FP = \frac{f_{h\text{ correg}}}{f_{anh}} \quad (3.14)$$

El valor de FP fue utilizado para estimar el cociente axial para partículas elipsoidales [273].

3.2.6. Preparación de harinas de soja con diferente actividad inhibitoria de tripsina (TIA)

Para extender el rango de actividad antitriptica (TIA) a analizar por los métodos de determinación de TIA discontinuo (convencional) y continuo (propuesto en este trabajo), algunas de las muestras de harina fueron sometidas en nuestro laboratorio a tratamientos de desactivación térmica suaves y moderados. Estos se llevaron a cabo incubando muestras en horno (calor seco) a dos temperaturas (80 y 100 °C), durante diferentes períodos de tiempo (1; 1,5 y 2,5 h). A continuación, se describe la nomenclatura utilizada para la identificación de cada muestra y su respectivo tratamiento:

- ☞ Muestra 1: Harina de soja desgrasada sin tratamiento térmico de desactivación (blanca).
- ☞ Muestra 2: Harina de soja desgrasada sometida a calentamiento en horno a 80 °C, 1 h.
- ☞ Muestra 3: Harina de soja desgrasada sometida a calentamiento en horno a 100 °C, 1,5 h.
- ☞ Muestra 4: Harina de soja desgrasada desactivada por el proveedor (tostada).
- ☞ Muestra 5: Harina de soja desgrasada comercial.
- ☞ Muestra 6: Harina de soja desgrasada comercial sometida a calentamiento en horno a 100 °C, 2,5 h.

3.2.7. Extracción de inhibidores de tripsina (IT) y proteínas totales

La extracción de IT se realizó mezclando 1,00 g de harina de soja (tratada/no tratada) con 50,00 mL de NaOH 10 mM y agitando durante 3 h a temperatura ambiente, según el método estándar propuesto por Kakade y col. (1974) [274] que posteriormente fue modificado [275]. Un paso final de centrifugación por 10 min a 3500 rpm, permitió separar

el sobrenadante (extracto de harina soja) para los ensayos de actividad inhibitoria de tripsina (*TIA*) y proteínas totales en solución.

3.2.8. Método de determinación de *TIA* discontinuo

Se siguió el método descrito por Kakade y col. (1974) modificado (AOCS, 2009) [275] basado en la capacidad del IT de inhibir la actividad de la tripsina (TRP) frente a un sustrato cromogénico específico: N-alfa-Benzoil-DL-Arginin p-Nitroanilida (BAPNA). La reacción entre TRP y BAPNA en ausencia de IT (extracto de harina soja) se llevó a cabo durante 10 min a 37 °C y fue detenida mediante adición de ácido acético al 30% (V/V). La mezcla de reacción se centrifugó durante 15 min a 10000 rpm y se filtró a través de papel Watman N° 2 para así obtener un sobrenadante clarificado. Luego se determinó la absorbancia del producto de la reacción, p-nitroanilina, a 410 nm. La preparación de las soluciones de TRP y BAPNA, todos los pasos del protocolo y el cálculo final se realizaron siguiendo exactamente el método de AOCS (2009) [275]. Los resultados se expresaron en unidades de inhibición de tripsina (TIU, por sus siglas en inglés) por gramo de harina de soja, TIU/g.

Cada TIU se define como el cambio de 0,01 unidades de absorbancia a 410 nm por 10 mL de sistema reactante después de 10 min de reacción en tampón Tris pH 8,20, 50 mM a 37 °C.

3.2.9. Método de determinación de *TIA* continuo

El método modificado propuesto, tiene el mismo fundamento que el discontinuo, pero en este caso la determinación de la actividad de la TRP frente al BAPNA se monitoreó de manera continua en el tiempo, llevando a cabo la reacción directamente en la cubeta del espectrofotómetro. Los pasos de detención de la reacción con ácido acético y de clarificación para reducir la turbidez fueron eliminados (no son necesarios). Si bien las concentraciones finales (en cubeta) de todos los reactivos –enzima, sustrato y tampón- fueron las mismas que en el método estándar, las concentraciones y volúmenes de las soluciones de trabajo fueron modificadas para mejorar el procedimiento y hacerlo más simple. Particularmente, se destaca la reducción del volumen final de reacción desde 10 a 2,5 mL. Todos los detalles del método modificado se describen a continuación:

3.2.9.1. *Reactivos*

Las soluciones madre y de trabajo de TRP y BAPNA se prepararon de acuerdo a las siguientes indicaciones.

La solución madre de TRP se preparó disolviendo 10 mg de TRP en 1 mL de HCl 1 mM. Se conservó a -18 °C hasta su utilización, homogeneizándose adecuadamente luego de ser descongelada. La solución de trabajo de TRP se preparó al momento de utilizarse, mediante una dilución 1:100 de la solución madre con tampón Tris 50 mM pH 8,20. Esta solución se mantuvo en baño de agua con hielo durante el ensayo.

La solución madre de BAPNA se preparó disolviendo 100 mg de BAPNA sólido en 2,3 mL de dimetilsulfóxido (DMSO). Ésta se mantuvo a -18 °C hasta el momento de uso. La solución de trabajo de BAPNA se preparó al momento del ensayo, diluyendo 1:100 la solución madre, previamente descongelada y adecuadamente homogeneizada, con tampón Tris 50 mM pH 8,20.

3.2.9.2. Mediciones

Cada determinación de *TIA* requirió de dos condiciones a ensayar: *control* (actividad de TRP en ausencia de IT) y *muestra* (actividad trípica en presencia de IT). Los volúmenes (mL) de reactivos/muestras y su secuencia de adición se indican en la Tabla 3.2.

Inmediatamente después de mezclar, la absorbancia a 410 nm se registró durante 10 min, obteniéndose lecturas a intervalos iguales o inferiores a 10 s. La velocidad de la reacción (unidades de *Abs*/min) se obtuvo a partir de la pendiente (*m*) de las curvas de *Abs* vs. tiempo en ambas condiciones (m_{control} y m_{muestra}). Los ensayos se realizaron a temperatura constante de 37 °C.

Tabla 3.2. Procedimiento para determinar *TIA* por el método continuo.

Reactivos	Control [†]	Muestra [†]
Tampón Tris 0,050 M, pH 8,20	1,00	0,72
Solución de trabajo TRP	0,20	0,20
Sobrenadante convenientemente diluido	---	0,28
Mezclar por inversión y equilibrar a 37 °C por 2 min, luego adicionar		
Solución de trabajo BAPNA (preincubada a 37 °C)	1,30	1,30

[†] Valores correspondientes a volúmenes en mL.

Debe notarse que en el método estándar se establece que, para minimizar el error, el cambio en la *Abs* de la muestra debe ser entre 0,4-0,6 veces del valor correspondiente al control. Para equiparar esta condición en el método continuo, el sobrenadante (extracto de harina soja) fue convenientemente diluido, introduciendo luego el correspondiente factor de dilución (F_D) en la expresión de cálculo de *TIA*.

Las mediciones de la absorbancia se llevaron a cabo en un espectrofotómetro JASCO V-550 con una celda termostatazada de 1 cm de paso óptico.

3.2.9.3. Cálculos

Los resultados (*TIA*) fueron expresados en unidades de inhibición de tripsina por g de harina de soja (*TIU/g*), comparables con los arrojados por el método estándar (discontinuo). Los cálculos fueron hechos mediante la siguiente expresión:

$$TIU/g = \frac{100 \cdot 2,5 (m_{control} - m_{muestra})}{0,280} F_D V_E \quad (3.15)$$

donde 100 es el factor de conversión de 0,01 unidades de *Abs* en *TIU*; $m_{control} - m_{muestra}$, la diferencia entre las pendientes de las curvas de reacción en ausencia y presencia de *IT* respectivamente; F_D , el factor de dilución, calculado como el volumen final de la dilución preparada dividido por el volumen de alícuota del extracto; V_E es el volumen de extracción de 0,01 M NaOH, utilizado para 1 g de harina de soja, es decir 50 mL/g; 0,280, la alícuota (mL) utilizada en el ensayo continuo y 2,5, el volumen final de reacción (mL) en la cubeta.

3.2.9.4. Modificaciones adicionales

El método continuo fue también evaluado acortando el tiempo de adquisición de datos de 10 a 4 y 2 min, pero manteniendo intactas las restantes condiciones. Una vez validada la metodología, también fue adaptado a volúmenes reducidos de celda en microplaca de 96 pocillos, como se muestra a continuación en la Tabla 3.3:

Tabla 3.3. Adaptación a microplaca del método continuo para determinar *TIA*.

Reactivos	Control [†]	Muestra [†]
Tampón Tris 0,050 M, pH 8,20	140	101
Solución de trabajo TRP	70	70
Sobrenadante convenientemente diluido	---	39
Equilibrar a 37 °C por 2 min dentro del lector de microplacas, luego adicionar		
Solución de trabajo BAPNA (preincubada a 37 °C)	140	140

[†] Valores correspondientes a volúmenes en μ L.

La cinética se evaluó durante 2 min. Tanto la incubación como las lecturas se realizaron en el espectrofotómetro Multiskan GO (Thermo Fisher Scientific Corporation) operado mediante el software SkanIt 3.2 (Thermo Fisher Scientific Corporation). El cálculo de *TIA* también fue readaptado como sigue:

$$\text{TIU/g} = \frac{100 \cdot 0,350 (m_{\text{control}} - m_{\text{muestra}})}{0,039} F_D V_E \quad (3.16)$$

3.2.10. Preparación de aislados de proteína de soja

Se prepararon aislados de proteína de soja (SPI), como material de partida para la determinación de bioactividad, a partir de harina de soja desgrasada blanca por extracción acuosa bajo dos condiciones controladas de tiempo y temperatura (70 °C durante 1 h y 90 °C durante 30 min). Se utilizaron estas dos condiciones para evaluar el impacto del tratamiento térmico sobre la hidrólisis por Corolase PP, ya que el nivel de desnaturalización de proteínas puede facilitar, en función de la enzima utilizada, el acceso al sitio activo de la hidrólisis. Así, se prepararon dispersiones de harina de soja en una relación harina/agua de 1:10, con un valor inicial de pH de 8,5 [276] y se calentaron de acuerdo con las condiciones descriptas. Después del tratamiento térmico, el extracto se clarificó por centrifugación a 5000 rpm durante 45 min, y a continuación, se precipitó la proteína por acidificación a pH 4,5 con HCl 2 N. La fracción insoluble (aislado) fue separada por centrifugación a 5000 rpm durante 30 min y posteriormente, liofilizada. La preparación de aislados de proteína de soja (SPI) se llevó a cabo por duplicado para cada condición. El contenido total de proteína del SPI en base seca se determinó por el método Dumas (P_{td}), usando un analizador de nitrógeno Leco (Modelo FP-528, Leco Corporation, St. Joseph, EE.UU.), utilizando un factor de conversión de nitrógeno a proteína de 6,25.

3.2.11. Hidrólisis enzimática con Corolase PP

Se prepararon suspensiones (100 mL) al 1 % m/V de los liofilizados de SPI, obtenidos a 70 °C y 90 °C, y se precalentaron a la temperatura de hidrólisis (50 °C) durante 20 min para maximizar la solubilización. Luego, la proteólisis se llevó a cabo adicionando Corolase PP en una relación de enzima:sustrato (10 mg de enzima/g SPI, es decir 1 % m/m). La hidrólisis enzimática se llevó a cabo durante 24 h bajo las condiciones óptimas de Corolase PP establecidas por el fabricante, es decir 50 °C pH 8,0. El seguimiento del proceso se realizó tomando alícuotas (2 mL) del medio de reacción a diferentes tiempos: 30 min, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10 y 24 h. Luego, la enzima se inactivó mediante tratamiento térmico a 80 °C 20 min, y el sobrenadante se separó del precipitado mediante centrifugación a 5000 durante 45 min. Finalmente, el sobrenadante que contiene los hidrolizados de proteínas (SPHs) se almacenó a -80 °C para su posterior análisis. La hidrólisis se realizó por duplicado para cada muestra, es decir 4 experimentos para cada tratamiento térmico inicial. Corolase PP contiene quimotripsina, elastasa, dipeptidasa, actividades trípica y de aminopeptidasa, junto con carboxipeptidasa A1 y A2.

3.2.12. Determinación del grado de hidrólisis (GH)

El grado de hidrólisis (GH) de cada SPH se determinó usando el método OPA descrito por Nielsen et al. (2001) [277], pero reduciendo los volúmenes. Se agregó 1,5 mL del reactivo OPA (reactivo a base de o-ftaldialdehído) sobre 200 μ L de estándar (Serina), blanco (agua destilada) y muestra, dejándose luego reaccionar durante 2 min. Se midió la absorbancia del producto de reacción a una longitud de onda de 340 nm.

El GH (%) se calculó siguiendo las ecuaciones reportadas por Adler-Nissen (1984) [278]:

$$Serina\ NH_2 = \frac{Abs_{muestra} - Abs_{blanco}}{Abs_{estándar} - Abs_{blanco}} 0,9516 \cdot 0,01 \cdot \frac{100}{X \cdot Pt_D} \quad (3.17)$$

$$h = \frac{Serina\ NH_2 - \beta}{\alpha} \quad (3.18)$$

$$GH = \frac{h}{h_{tot}} 100 \quad (3.19)$$

Dónde:

$Serina\ NH_2$ = miliequivalentes de grupos amino de serina por g de proteína

h = número de enlaces peptídicos hidrolizados

h_{tot} = número total de enlaces peptídicos por equivalente proteico (7,8 específico para proteína de soja)

β = 0,342 (específico para proteína de soja)

α = 0,970 (específico para proteína de soja)

$Abs_{muestra}$ = absorbancia de la muestra a 340 nm

Abs_{blanco} = absorbancia del agua a 340 nm

$Abs_{estándar}$ = absorbancia de L-serina a 340 nm

X = cantidad de muestra (g)

Pt_D = contenido proteico de la muestra (%), ver Sección 3.2.10.

3.2.13. Análisis por cromatografía de filtración por geles

La distribución de pesos moleculares de los SPHs, obtenidos según la Sección 3.2.11, se analizó por cromatografía de filtración por geles. La columna se hizo funcionar a una velocidad de flujo de 0,4 mL/min con tampón fosfato 0,025 M (pH 7), conteniendo NaCl 0,15 M y 0,2 g/L NaN_3 . La absorbancia del eluyente se leyó a 280 nm. Proteínas estándar con

pesos moleculares conocidos (IgG, 150 kDa; BSA, 66 kDa; β -lactoglobulina, 36 kDa; α -lactoalbúmina, 14,178 kDa) se utilizaron para establecer una curva estándar de pesos moleculares. Se utilizó el sistema FPLC de Pharmacia (Uppsala, Suecia) en una configuración que consta de dos bombas P-500 de desplazamiento positivo, una válvula motorizada eléctrica MV-7, una columna de filtración por gel preempacada con Superosa 12 HR 10/30, un lector espectrofotométrico de simple canal UV1, una grabadora de doble canal REC-102 y un controlador LCC-500.

Para los posteriores análisis con cromatografía de filtración por geles, las corridas cromatográficas se realizaron a un flujo de 0,5 mL/min con tampón fosfato 25 mM (pH 7), conteniendo NaCl 150 mM y 0,2 g/L NaN_3 . Proteínas estándar con pesos moleculares conocidos (Tiroglobulina, 669 kDa; Ferritina, 440 kDa; Aldolasa, 158 kDa; Conalbúmina, 75 kDa; Ovoalbúmina, 43 kDa; Anhidrasa carbónica, 29 kDa; Ribonucleasa A, 13,7 kDa; Aprotina, 6,5 kDa) se utilizaron para calibrar el sistema. Se utilizó el sistema AKTA pure 25 L (GE Healthcare Life Sciences, Freiburg, Germany) en una configuración que consta en dos sistemas de bombas de pistón de alto rendimiento, un sistema de monitoreo de presión para protección de la columna, una cámara de mezcla, una válvula de inyección V9-IA, una columna Superdex® 200 10/300 GL conectada en serie a una columna Superdex Peptide 10/300 GL (GE Healthcare Life Sciences, Freiburg, Germany), y un detector UV U9-L de longitud de onda fija a 280 nm. El sistema se controló mediante el software UNICORN.

3.2.14. Electroforesis (SDS-PAGE)

La composición proteica de los SPHs también fue analizada por electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE). Inicialmente, las muestras se mezclaron con un volumen igual de solución tampón (6,00 g de glicerol; 1,60 g de dodecil sulfato de sodio; 0,62 g de DTT disueltos en Tris 3 M pH 8,45) y se calentaron a 80 °C durante 5 min. La SDS-PAGE se realizó en un sistema Mini-Protean II de Bio-Rad (Hercules, CA, EE.UU.), utilizando un gel de apilamiento al 4% y otro de corrida al 16,5%, según lo descrito por Schägger and von Jagow (1987) [279]. Las bandas proteicas se tiñeron con solución de azul brillante Coomassie 0,25 % y después se decoloraron con una solución 2,5: 1 (V/V) de ácido acético y metanol, hasta que las bandas de proteínas quedaron claramente visibles en una matriz de gel incoloro. Las muestras se corrieron junto a un patrón de masas moleculares entre 11 y 75 kDa.

3.2.15. Determinación de proteínas totales en solución (*Pt*)

El contenido proteico total en solución (*Pt*) se determinó mediante el método del ácido bicinconínico [280], adaptado a volúmenes reducidos de celda en microplaca de 96

pocillos. Para ello se preparó una solución madre de ácido bicinconíico (BCA, por sus siglas en inglés) al 1,00% (m/V), tartrato sódico 0,16% (m/V), Na_2CO_3 2,00% (m/V), NaOH 0,4% (m/V) y NaHCO_3 0,95% (m/V), llevándose a pH 11,2 con NaOH. También se preparó una solución madre de CuSO_4 al 4,00% (m/V). La solución BCA de trabajo se preparó diluyendo 1:10 una alícuota de la solución madre de BCA y agregando luego una alícuota de CuSO_4 al 4% para una proporción 50:1 respectivamente. El protocolo se llevó a cabo colocando en cada pocillo 25 μL de muestra y luego agregando simultáneamente (en todos los pocillos) 200 μL de reactivo BCA de trabajo a cada uno, incubando 30 min a 37 °C. Las lecturas de absorbancia se realizaron a 562 nm. La incubación y las lecturas se realizaron en el espectrofotómetro Multiskan GO (Thermo Fisher Scientific Corporation) operado mediante el software SkanIt 3.2 (Thermo Fisher Scientific Corporation).

3.2.16. Determinación de la capacidad antioxidante

Se determinó la capacidad de captación de radicales de oxígeno (*ORAC*) por el método propuesto por Contreras *y col.* (2011) [281]. En este se determina la disminución, ocasionada por el antioxidante, en la degradación oxidativa de la fluoresceína en presencia del generador de radicales peroxilo, el 2,2'-azobis (2-methylpropionamide)-dihydrochloride (AAPH). La degradación oxidativa de la fluoresceína se midió como el área bajo la curva de extinción de la fluorescencia (ABC) [282]. Las mediciones de fluorescencia fueron normalizadas por la curva producida por el blanco (sin antioxidante), como fue propuesto anteriormente [283]. A partir de las curvas normalizadas, el ABC fue calculado:

$$ABC = 1 + \sum_{i=1}^{i=97} f_i/f_0 \quad (3.20)$$

donde f_0 es la fluorescencia inicial leída a 0 min y f_i es la fluorescencia leída a i min. La ABC total correspondiente a cada muestra fue calculada como:

$$ABC_{\text{total}} = ABC_{\text{antioxidante}} - ABC_{\text{blanco}} \quad (3.21)$$

Se calculó la ecuación de regresión entre la ABC_{total} y concentración de antioxidante. La pendiente de la ecuación fue utilizada para calcular el valor de *ORAC*, usando una curva de calibración de Trolox con diferentes concentraciones ($9,98 \cdot 10^{-4}$ - $7,99 \cdot 10^{-3}$ mol/mL), obtenida para cada ensayo. Los valores se presentaron como equivalentes de Trolox (TE), expresados como $\mu\text{mol TE/mg}$ material de partida en base seca.

La reacción se llevó a cabo a 40 °C en tampón de fosfato 75 mM (pH 7,4), conteniendo la mezcla final del ensayo (200 μL): fluoresceína (70 nM), AAPH (14 mM) y muestra (a diferentes diluciones). El AAPH y las soluciones de Trolox se prepararon en el día y la

fluoresceína se diluyó diariamente a partir de una solución madre (1,17 mM) en tampón fosfato 75 mM (pH 7,4). Todas las mezclas de reacción se prepararon por duplicado y se realizaron al menos tres corridas independientes para cada muestra. La fluorescencia se registró durante 97 minutos, utilizando el lector de placas FLUOstar OPTIMA (BMG Labtech, Offenburg, Alemania) con filtros de excitación a 485 nm y de emisión a 520 nm. El equipo fue controlado por el software FLUOstar Galaxy v. 1.32 R2 para medición de fluorescencia. Se utilizaron Microplacas de poliestireno negro de 96 pocillos (Nunc, Dinamarca) para el ensayo.

3.2.17. Determinación de la capacidad inhibitoria sobre ECA

Se midió la capacidad que presentaban las muestras de inhibir la actividad de la enzima convertora de angiotensina-I (ECA) utilizando el ensayo fluorimétrico de Sentandreu y Toldrá (2006) [284], modificado por Quirós y col. (2009) [285]. El método se basa en la capacidad de ECA de hidrolizar un sustrato específico (o-aminobenzoilglicil-p-nitro-L-phenilalanil-L-prolina o ABz-Gly-Phe(NO₂)-Pro) generando o-aminobenzoil-glicina fluorescente (λ_{exc} 360 nm, λ_{em} 430 nm).

Se diluyó una enzima convertora de angiotensina-I comercial (EC 3.4.15.1, 5,1 U/mg) en 5 mL de una solución de glicerol en agua ultra pura al 50%. Esta solución fue mantenida a -20 °C hasta su uso. La solución de stock fue luego diluida 1:24 con una solución tampón Tris 150 mM, pH 8,3, conteniendo 1 μ M de ZnCl₂, alcanzándose una concentración en la solución final de reacción de 42 mU/mL. 40 μ L de la solución de trabajo de ECA fueron agregados a cada pozo de la microplaca de reacción, y luego ajustados a 80 μ L por agregado tanto de agua ultra pura para los controles, como de las muestras a analizar. La reacción enzimática fue iniciada por adición de 160 μ L de una solución 0,45 mM de ABz-Gly-Phe(NO₂)-Pro, disuelto en tampón Tris 150 mM (pH 8,3), conteniendo 1,125 M de NaCl, mezclándose inmediatamente e incubando a 37 °C. La microplaca fue agitada automáticamente antes de la primera lectura, y la fluorescencia generada fue medida durante 30 min.

La actividad inhibitoria sobre ECA (*iECA*) fue expresada como valores de concentración capaz de inhibir el 50% de la actividad enzimática (IC₅₀), como fue descripto por Quirós y col. (2007) [286]. Un modelado no lineal de los datos obtenidos se utilizó para calcular los valores de IC₅₀, los cuales fueron expresados como media \pm SD.

Las medidas se realizaron con el lector de placas FLUOstar OPTIMA (BMG Labtech, Offenburg, Alemania) con filtros de excitación a 350 nm y de emisión a 420 nm. El equipo fue controlado por el software FLUOstar Galaxy v.1.32 R2 para medición de fluorescencia.

Se utilizaron Microplacas de poliestireno negro de 96 pocillos (Nunc, Dinamarca) para el ensayo.

3.2.18. Análisis unifactorial de las condiciones de extracción de IT

3.2.18.1. Extracción a diferentes pH

El efecto del pH sobre la extracción de IT fue evaluado por un análisis unifactorial. Las extracciones se realizaron a temperatura ambiente, con agitación magnética durante 30 minutos sobre suspensiones preparadas con 1 g de harina de soja desgrasada sin desactivar y medios (50 mL) de diferentes pHs. Los pHs analizados fueron: 4,0; 4,5; 5,0; 6,5 y 10,0. Los primeros tres (4,0; 4,5 y 5,0) se consiguieron mediante tampón citrato de sodio 200 mM, el pH 6,5 mediante H₂O destilada y el pH 10,0 mediante NaOH 10 mM. Luego de la extracción, se decantó el sobrenadante (extractos), almacenándose a -18 °C para su posterior análisis. Las pruebas se realizaron por triplicado en días sucesivos.

3.2.18.2. Cinética de extracción a pH 4,5

El progreso del proceso extractivo se analizó mediante extracciones con agitación magnética a temperatura ambiente por un período total de 4 h (240 min), tomando alícuotas de 2 mL a diferentes tiempos (Tabla 3.4). El procedimiento se aplicó sobre suspensiones de 1 g de harina de soja desgrasada blanca (sin desactivar), en 50 mL de solución tampón de citrato de sodio 200 mM pH 4,5. Los ensayos se realizaron por cuadruplicado en días sucesivos.

Tabla 3.4. Puntos de muestreo en el tiempo de proceso.

Alícuota	Tiempo (min)
1	5
2	15
3	30
4	60
5	90
6	120
7	150
8	180
9	210
10	240

3.2.18.3. Evaluación de los extractos

Los extractos provenientes de los procesos de extracción realizados bajo diferentes condiciones fueron analizados mediante la determinación de su *TIA* y *Pt* según las metodologías en microplaca descritas precedentemente (Secciones 3.2.9 y 3.2.15). Los resultados se expresaron como porcentaje relativo a los valores de *TIA* y *Pt* determinada del extracto de harina de soja bajo las condiciones descritas en la Sección 3.2.7.

3.2.19. Extracción de isoflavonas con diferentes solventes

La eficiencia extractiva de varios solventes se determinó usando tabletas comerciales de isoflavonas (suplementos dietarios) como matriz, con el fin de minimizar las interferencias. Las píldoras se colocaron en un mortero de vidrio y se trituraron con el pilón hasta obtener partículas finas y homogéneas. Este polvo se dividió en fracciones de 0,14 g que se introdujeron en el fondo de tubos de vidrio y a los cuales se agregaron 2 mL de cada uno de los siguientes solventes: agua, etanol (99 y 60% m/V), metanol, GX (1, 5 y 10% m/m), Tg7 (1, 5 y 10%) m/m, Tg9 (1, 5 y 10% m/m), TX114 (5% m/m), SDS (5% m/m), PEG8000 (5% m/m), PEG600 (5% m/m) y NaOH 10 mM. Los sistemas heterogéneos de matriz/disolvente se mezclaron vigorosamente durante 30 min a temperatura constante (25,0 °C ± 0,1 °C), y luego se centrifugaron en microtubos a 12000 rpm durante 10 min. Los sobrenadantes (extractos) se separaron para su posterior análisis (Sección 3.2.20) mediante la determinación del contenido polifenólico total (*CPT*) y/o la identificación de las IFs por cromatografía en capa delgada o de alta eficiencia.

3.2.20. Contenido polifenólico total (*CPT*)

El contenido de polifenoles (*CPT*) se determinó mediante el método colorimétrico Folin-Ciocalteu [287] modificado, adaptando el procedimiento a celdas de microplaca de 96 pocillos. El procedimiento consistió en mezclar 30 µL de cada sobrenadante (o su dilución si fuera necesario) con 200 µL del reactivo Folin-Ciocalteu (diluido 1:10) y 100 µL de solución de carbonato de sodio anhidro (7,4% m/V). Después de agitar bien e incubar durante 30 min a 25 °C, se midió la absorbancia de las mezclas azules resultantes a 765 nm. Se preparó una curva de calibración de ácido gálico (0,025-0,200 mg/mL) para expresar los resultados como mg de equivalentes de ácido gálico por mililitro de muestra (mg EAG/mL). La incubación y las medidas de absorbancia se realizaron en el lector de microplacas Multiskan GO (Thermo Fisher Scientific Corporation) operado con el software SkanIt 3.2 (Thermo Fisher Scientific Corporation).

3.2.21. Identificación de IFs por cromatografía en capa delgada

Los extractos con mayor *CPT* también se analizaron mediante cromatografía en capa delgada (TLC, por sus siglas en inglés) mediante la técnica ascendente de una vía, usando placas pre-recubiertas con gel de sílice (Merck & Co.). Las placas se desarrollaron en un sistema disolvente de acetato de etilo/metanol/agua (100:13,5:10), luego se secaron y se visualizaron en UV (254 nm). El factor de retención (*R_f*) de cada banda se calculó y se comparó con los correspondientes a los estándares de daidzeína, daidzina, genisteína y genistina. El cromatograma densitométrico se obtuvo fotografiando en UV la placa, con el gabinete UVP-Chromato-Vue C-75 y analizando el patrón de intensidad puntual con la ayuda del software Fiji/ImageJ [288].

3.2.22. Análisis multifactorial de cribado

Se realizó un diseño experimental para la determinación de los factores más influyentes en la recuperación de IFs a partir de tabletas comerciales molidas (Sección 3.2.19) con sistemas de GX. Los efectos e interacciones de los factores más significativos se determinaron con la ayuda de un diseño factorial completo de 2^4 (4 = número de factores experimentales). Para ello, se consideraron como factores a analizar a la concentración de surfactante (X_A), el tiempo de extracción (X_B), el pH (X_C) y la temperatura (X_D), siendo el *CPT* en el sobrenadante la variable seleccionada como respuesta (*Y*). Se analizaron dos niveles para cada factor: 5 y 15% m/m (concentración de surfactante); 25 y 55 °C (temperatura); pH 4,5 y 8,0; 10 y 110 min (tiempo de incubación). El diseño consistió en 16 experimentos aleatorios, secuencia que se ejecutó por duplicado. Los niveles de los factores, codificados como -1 (bajo) y +1 (alto), se muestran en la Tabla 3.5.

Tabla 3.5. Niveles para los 4 factores experimentales.

Factores	Niveles	
	-1	+1
X_A^1	5	15
X_B^2	25	55
X_C^3	4,5	8
X_D^4	10	110

¹ Concentración de surfactante en % m/m, ² temperatura en °C, ³ pH y ⁴ tiempo en min.

Los experimentos se realizaron empleando una razón de masas tableta/SMA de 7% m/m, mezclando las suspensiones en un agitador tipo carrusel y manteniendo la temperatura de la extracción en una estufa de precisión SAN JOR Serie SLDB. Una vez aplicados los tratamientos, los sistemas se centrifugaron a 5000 rpm 5 min para separar el residuo remanente del sobrenadante. Los residuos se descartaron mientras que los extractos fueron almacenados a -20 °C para su posterior análisis.

Los valores de respuesta (Y) de los experimentos del diseño factorial se ajustaron al siguiente modelo lineal:

$$Y = \beta_0 + \beta_A X_A + \beta_B X_B + \beta_C X_C + \beta_D X_D + \beta_{A,B} X_A X_B + \beta_{A,C} X_A X_C + \beta_{A,D} X_A X_D + \beta_{B,C} X_B X_C + \beta_{B,D} X_B X_D + \beta_{C,D} X_C X_D + \varepsilon \quad (3.22)$$

donde X_A, X_B, X_C y X_D son los niveles codificados de las variables independientes mencionadas anteriormente; β_0, β_i y β_{ij} son los coeficientes de regresión para el término independiente y los efectos lineales y de interacción binaria respectivamente; y ε , el error residual [289].

3.2.23. Optimización por superficies de respuesta

3.2.23.1. Diseño compuesto central

Una vez determinados los factores más influyentes en el lixiviado de IFs de tabletas comerciales, descrito en la Sección 3.2.22, se optimizó el proceso a través de un diseño compuesto central de 2^2 , consistente en cuatro puntos axiales y dos puntos centrales, para un total de 10 tratamientos aleatorios. El diseño se ejecutó por triplicado (un total de 30 experimentos) en días sucesivos. La concentración de surfactante (X_A) y la temperatura (X_B) se seleccionaron como factores experimentales mientras que el pH y el tiempo de extracción se mantuvieron constantes a 4,5 (NaCit 200 mM) y 60 min respectivamente. La Tabla 3.6 muestra los niveles de los factores codificados como -1 (bajo), 0 (punto central), +1 (alto) y $\pm\alpha$ (axiales), y sus valores reales.

Tabla 3.6. Niveles para los 2 factores experimentales.

Factores	Niveles				
	$-\alpha$	-1	0	+1	$+\alpha$
X_A^1	3	5	10	15	17
X_B^2	26	30	40	50	54

¹ Concentración de surfactante en % m/m y ² temperatura en °C

Los experimentos se llevaron a cabo utilizando una razón de masas tableta/SMA de 7% m/m, mezclando con un agitador tipo carrusel dentro de una estufa de precisión SAN JOR Serie SLDB. Una vez aplicados los tratamientos, los sistemas se centrifugaron a 5000 rpm 5 min para separar el residuo remanente del sobrenadante. Los residuos se descartaron mientras que los extractos fueron almacenados a -20 °C para su posterior análisis.

Los valores de respuesta (Y), es decir, el CPT en los sobrenadantes de cada tratamiento, se ajustaron al siguiente modelo cuadrático polinómico:

$$Y = \beta_0 + \beta_A X_A + \beta_B X_B + \beta_{A,A} X_A^2 + \beta_{A,B} X_A X_B + \beta_{B,B} X_B^2 + \varepsilon \quad (3.23)$$

donde X_A y X_B son los niveles codificados de las variables independientes mencionadas anteriormente; β_0 , β_i , β_{ii} y β_{ij} son los coeficientes de regresión para el término independiente, los efectos lineales, cuadrático e interacción binaria respectivamente; y ε , el error residual [289]. Los gráficos de superficie y contorno de las respuestas se generaron a partir este modelo.

El tratamiento del diseño correspondiente a las condiciones más próximas a las óptimas se comparó con una extracción realizada con metanol en iguales condiciones de tiempo y temperatura.

Adicionalmente, se aplicó la condición óptima resultante sobre harina de soja en una razón harina/SMA del 2% m/m. A modo de control, la misma condición de tiempo y temperatura se utilizaron en una extracción con metanol sobre la mencionada matriz (harina de soja). La cantidad de IFs recuperada en los extractos de ambos procedimientos se determinaron, a fines comparativos, mediante HPLC según lo descrito en la Sección 3.2.24.

3.2.23.2. Diseño Box-Behnken

Las mejores condiciones de extracción de los principales antinutrientes de la harina de soja mediante SMAs de GX, Tg7 y Tg9, se determinaron con un análisis en base estadística. Se implementó una estrategia experimental que permitiera reducir el número de experimentos necesarios para la optimización del proceso, así como establecer los factores más influyentes. Para este fin se seleccionó un diseño Box-Behnken, el cual es un tipo de diseño de superficie de respuesta a 3 niveles que incluye un subconjunto de corridas de un factorial completo a tres niveles. Los factores evaluados fueron concentración de surfactante (X_A), temperatura (X_B) y tiempo de extracción (X_C) y las variables respuestas (Y) seleccionadas fueron la actividad inhibitoria de tripsina (TIA), contenido proteico (Pt) y

contenido polifenólico total (*CPT*) de los extractos. Tanto *TIA* como las *Pt* se expresaron como % considerando como 100% los valores obtenidos según lo explicado en la Sección 3.2.7. Por su parte, *CPT* se expresó en mg EAG/g de harina. El diseño resultó en un arreglo de 15 tratamientos, el cual se ejecutó por triplicado (un total de 45 experimentos) en días sucesivos. Los niveles de los factores, codificados como -1 (bajo), 0 (punto central) y +1 (alto), se muestran en la Tabla 3.7.

Los experimentos se realizaron con una razón de masas harina/SMA de 10% m/m en un medio tamponado con NaCit 50 mM a pH 4,5, mezclando las suspensiones con un agitador tipo carrusel dentro de una estufa de precisión SAN JOR Serie SLDB. Una vez aplicados los tratamientos, los sistemas se centrifugaron a 5000 rpm 5 min para separar el residuo remanente del sobrenadante. Los residuos se descartaron mientras que los extractos fueron almacenados a -20 °C para su posterior análisis.

Tabla 3.7. Niveles para 3 factores experimentales.

Factores	Niveles		
	-1	0	+1
X_A^1	1	5	9
X_B^2	30	50	70
X_C^3	10	45	80

¹ Concentración de surfactante en % m/m, ² temperatura en °C y ³ tiempo en min.

La ecuación 3.24 representa en forma simbólica el modelo de respuesta considerando todos los términos lineales, cuadráticos y los términos de interacción lineal-lineal:

$$Y = \beta_0 + \beta_A X_A + \beta_B X_B + \beta_C X_C + \beta_{A,A} X_A^2 + \beta_{A,B} X_A X_B + \beta_{A,C} X_A X_C + \beta_{B,B} X_B^2 + \beta_{B,C} X_B X_C + \beta_{C,C} X_C^2 + \varepsilon \quad (3.24)$$

donde X_A y X_B son los niveles codificados de las variables independientes mencionadas anteriormente; β_0 , β_i , β_{ii} y β_{ij} son los coeficientes de regresión para el término independiente, los efectos lineales, cuadrático e interacción binaria respectivamente; y ε , el error residual [289]. Los gráficos de superficie y contorno de las respuestas se generaron a partir este modelo.

La optimización simultánea de las variables respuesta se basó en la función de deseabilidad global [290]. Para definir esta función debieron establecerse dos parámetros importantes: el peso y el impacto. El peso define la forma de la función, cuando es 1, la deseabilidad se comporta linealmente desde 0 en el valor bajo hasta 1 en el valor alto. Para valores mayores a 1, se incrementa lentamente al principio y después se acelera. Si fuese muy importante aproximarse al nivel máximo puede fijarse un peso grande. Por otro lado, cuando algunas respuestas son consideradas más importantes que otras, se define el coeficiente de impacto asignándole valores entre 1 y 5. El valor más alto determina la respuesta más importante. Particularmente, se consideró que *TIA* debía ser preponderante frente a las otras respuestas, poniendo foco en la extracción del máximo contenido posible de IT y por ende en el proceso de detoxificación. Para ello, se establecieron los siguientes parámetros: -un peso de valor 2 para *TIA* y de valor 1 tanto para *Pt* como para *CPT*; -un impacto de valor 5 para *TIA* y de valor 2 para las otras dos respuestas.

3.2.24. Determinación de IFs por HPLC

La identificación y cuantificación de las isoflavonas extraídas se llevó a cabo mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC). Inicialmente, cada muestra analizada fue convenientemente diluida (1:3 con MetOH puro) y filtrada en filtro de 0,45 µm. La cromatografía se llevó a cabo en una columna de fase reversa (COSMOSIL 5C18-AR-II Packed Column – 4.6 mm D.I. x 250 mm) con dos fases móviles. La fase móvil A consistió en agua ultra pura acidificada con ácido acético glacial (0,1% V/V), mientras que la fase B estuvo constituida por acetonitrilo acidificado con ácido acético glacial (0,1% V/V). La operación consistió en la inyección de 20 µL de muestra y su elución con un gradiente lineal desde 80 a 0% de fase A a lo largo de 25 min, con un flujo constante de 0,8 mL/min y a una temperatura de columna de 25 °C. La identificación de cada IF se realizó teniendo en cuenta el espectro de absorbancia y tiempo de retención del respectivo patrón. La cuantificación de cada IF se realizó integrando las áreas de los picos, interpolando las mismas en curvas de calibrado realizadas con cada patrón. Los resultados fueron expresados en µg de IF/g de tableta o harina de soja en base seca, según corresponda. Se utilizó el sistema modular de separación Waters e2695, con un detector de arreglo de fotodiodo UV/Vis (PDA 190-600 nm). La adquisición de los datos y el análisis se efectuó utilizando el software Empower 3.

3.2.25. Producción de concentrados proteicos de soja

3.2.25.1. Por acidificación

Se prepararon concentrados proteicos de soja (SPCa) siguiendo el método clásico de concentrado acidificado (Ma) [291]. Para ello, una dispersión de harina de soja al 20% m/V en tampón citrato 25 mM pH 4,5 (3 g de harina en 60 ml de tampón), se llevó a un baño a 40

°C, agitándose 150 rpm durante 45 min. Luego de los 40 min, la dispersión se centrifugó 15 min a 4000 rpm y 15 °C, obteniéndose dos fracciones: sobrenadante (SWPa) y fracción insoluble (SPCa). SPCa fue neutralizado a pH 6,5 por agregado de 20 mL de solución tampón fosfato 25 mM pH 7,0 y 0,5 mL de solución NaOH 1 M. Del SWPa se guardó una alícuota de 2 mL a -30 °C y el restante volumen, junto al SPCa fueron liofilizados.

Tanto para el SPCa liofilizado como para la harina inicial, se analizó el contenido proteico total por el método de referencia Kjeldahl (P_{TK}).

3.2.25.2. *Por utilización de SMAs*

El proceso se realizó empleando tres sistemas micelares acuosos (SMAs) formados por tensoactivos no-iónicos y citrato de sodio (NaCit) 50 mM a pH 4,5. Los surfactantes empleados fueron: Genapol X-080 (GX), Tergitol 15-S-7 (Tg7) y Tergitol 15-S-9 (Tg9), a una concentración en el sistema de 5% m/m. La concentración de detergente fue seleccionada en base a los ensayos de optimización, descartando condiciones de alta viscosidad que pudieran representar una desventaja técnica al momento de un posible escalado.

La preparación del SMA de cada surfactante se efectuó como se explica a continuación. Para 3 g de surfactante se adicionó solución tampón NaCit 50 mM (pH 4,5) hasta completarse 60 g, luego se llevó a baño termostatzado durante 20 min para alcanzar la temperatura de extracción (45 °C). Similarmente, se pesaron en un erlenmeyer 3 g de harina desgrasada blanca de soja y se llevaron al mismo baño termostatzado para alcanzar el equilibrio térmico con la solución de surfactante. Una vez transcurrido el tiempo de incubación (20 min), ambos componentes se mezclaron, agitando durante 45 min y manteniendo el sistema dentro del baño termostatzado. A seguir, se retiró el sistema del baño y se centrifugó durante 10 min a 4000 rpm a temperatura ambiente, obteniéndose un pellet (SPC) y un sobrenadante, los cuales fueron separados por decantación. El sobrenadante se llevó nuevamente a baño termostatzado (a una temperatura superior al punto de turbidez de cada sistema) y se dejó reposar hasta separación total de fases (aproximadamente 15 min). Por simple decantación se obtuvo un extracto de proteínas de suero de soja (SWP) en la fase de baja concentración de micelas o fase inferior (FI), y una fase rica en micelas o fase superior (FS). Las temperaturas de separación de fases se seleccionaron en particular para cada surfactante, por encima de su PT en orden de obtener similares volúmenes de la fase rica en micelas o fase superior (FS), siendo 45 °C para GX y Tg7, y 60 °C para Tg9. Se realizaron tres experimentos individuales para cada surfactante, realizando el mismo procedimiento para cada uno. De los SWP se guardó una alícuota de 2 mL a -30 °C y el restante volumen fue posteriormente liofilizado. Los SPCs fueron

neutralizados a pH 6,5 por agregado de 20 mL de solución tampón fosfato 25 mM a pH 7,0 y 0,5 mL de solución NaOH 1 M, y posteriormente liofilizados. La metodología empleada aquí se denominó Mp.

Finalmente, se analizó el contenido proteico total de cada SPC liofilizado por el método de referencia Kjeldahl (Pt_K).

3.2.26. Determinación de oligosacáridos por HPLC

Al igual que para IF, se analizó mediante HPLC el contenido de oligosacáridos de la familia de la rafinosa (RFOs) para los extractos provenientes de cada metodología aplicada. Se analizaron alícuotas (30 μ L) de las muestras líquidas, sin diluir, por cromatografía líquida de alta eficiencia. La fase móvil fue una solución de H₂SO₄ 13 mM, con un flujo de 0,8 mL/min, a elución isocrática. Se utilizaron patrones de calidad HPLC de rafinosa, estaquirosa, glucosa y sacarosa como referencias para identificar dichos compuestos en las muestras teniendo en cuenta el tiempo de retención. Los resultados se expresaron cuantificando conjuntamente las áreas correspondientes a rafinosa y estaquirosa, designándose como RFO, debido a la superposición ambos picos. Los valores se expresaron en unidades relativas (UR), dadas por el producto entre el área integrada y la cantidad total (en masa) de cada fracción obtenida en el proceso, referidas a un gramo de harina de soja (UR/g). Se utilizó un sistema de HPLC preparado para identificación y cuantificación de azúcares, compuesto por un módulo Knauer WellChrom Pump K-1001 (Knauer GmbH, Germany) y un detector diferencial de índice de refracción (IR) K-2301 (Knauer GmbH, Germany). La separación se llevó a cabo en una columna Aminex HPX-87H 300 x 7.8 mm (Bio-Rad, Hercules, USA) acoplada a una precolumna Micro-Guard Cation H⁺ (Bio-Rad, Hercules, USA), mantenidas a una temperatura de 42 °C mediante un horno de columna Eldex CH-150 (Eldex Laboratories, Napa, CA). Los datos fueron adquiridos y analizados mediante el software Clarity v. 5.0.5.98 (DataApex Ltd, Prague, Czech Republic).

3.2.27. Parámetros de eficiencia de extracción de IFs y RFOs

Para cada SMA aplicado en la Sección 3.2.25.2, se determinaron los coeficientes de reparto (Kr) y el rendimiento en la recuperación (Rr), tanto para IFs como RFOs. El Kr se estima como:

$$Kr = \frac{C_{FS}}{C_{FI}} \quad (3.25)$$

donde C_{FS} y C_{FI} son las concentraciones del analito (IF o RFO) en las fases superior (rica en micelas) e inferior (acuosa), respectivamente. Por otro lado, el Rr se determina:

$$Rr(\%) = \frac{C_{FS/II}V_{FS/II}}{(C_{FS}V_{FS}+C_{FI}V_{FI})} 100\% \quad (3.26)$$

donde $C_{FS/II}$ es la concentración del analito en la FS o FI, según corresponda, siguiendo el criterio que sea la fase de mayor recuperación; así mismo, $V_{FS/II}$ es el volumen de la fase correspondiente.

3.2.28. Simulación de sistema gastrointestinal in-vitro (SGI)

El SGI se realizó para los SPCs y para la propia harina blanca de soja sin tratar. Dado que el foco estaba en percibir la digestión de proteínas y compuestos fenólicos, principalmente, no se realizó la simulación del paso digestivo que transcurre en la boca y esófago, donde se ven afectados principalmente los hidratos de carbono. Para el SGI se preparó un conjunto con los productos provenientes de cada metodología aplicada, utilizando 300 mg de cada réplica y homogeneizando adecuadamente. Se realizaron tres experimentos independientes de SGI para cada conjunto, retirando 280 mg para cada experiencia. Se adicionaron 6 mL de agua acidificada (pH 2,0) en cada caso, se ajustó el pH a 2,0 con HCl 1 N, luego se completó hasta volumen final de 7 mL con la misma agua acidificada y se llevó a 37 °C agitando a 130 rpm durante 20 min, para atemperar previamente al proceso digestivo. Antes de comenzar con el SGI, se retiró de cada experimento 1 mL de sobrenadante que representó la muestra a tiempo 0 (T1).

La etapa inicial del SGI comenzó en el paso de digestión en estómago, simulando el jugo gástrico con pepsina a 25 mg/mL, preparada en HCl 0,1 N [292]. A cada experimento se agregó 0,3 mL de jugo gástrico y se dejó a 37 °C agitándose a 130 rpm. Transcurridos 60 min, se finalizó el paso gástrico incrementando el pH a 6,5 con solución de NaHCO₃ 100 mM. Se retiró entonces una alícuota de 1 mL de cada experimento, representando el final de dicha etapa (T2).

Para la etapa intestinal, se simularon los jugos pancreáticos con una solución de pancreatina 2 mg/mL y sales biliares 12 mg/mL diluidas en una solución de NaHCO₃ 100 mM [293]. A cada experimento se adicionó una alícuota de 1,5 mL de esta solución pancreática y se llevó nuevamente a 37 °C, pero agitado a baja intensidad (45 rpm). Esta etapa (T3) se extendió durante 90 min, y fue finalizada mediante congelamiento a -30 °C. Finalmente, todas las muestras del proceso de SGI fueron nanofiltradas en membranas con poro de 3 kDa (Amicon® Ultra-4, Millipore), para el posterior análisis de los permeados (péptidos bioactivos y compuestos fenólicos).

Todas las soluciones enzimáticas fueron preparadas frescas y esterilizadas por filtración con filtros de membrana de 0,22 μm (Millipore, Billerica, MA, USA) para su utilización. Luego de esterilizadas, todas las soluciones se mantuvieron en un baño de hielo para evitar la autodegradación enzimática. Se utilizó un baño de agua termoestabilizado a 37 °C para simular la temperatura fisiológica del cuerpo humano. Se implementó agitación mecánica (movimientos peristálticos paralelos), con intensidades emulando aquellas alcanzadas en cada compartimiento digestivo.

3.2.29. Análisis estadístico

Todos los experimentos se efectuaron por triplicado, excepto casos particulares donde se indique algo diferente, y los resultados se expresaron como valor medio con su desvío estándar (SD) y, en algunos casos su coeficiente de variación (CV) en porcentaje. Previamente a cualquier análisis estadístico comparativo, para todos los conjuntos de datos se ejecutó un análisis exploratorio para determinar el cumplimiento de los supuestos de normalidad y homocedasticidad. Luego las medias fueron analizadas estadísticamente mediante análisis de varianza (ANOVA) seguido de pruebas de múltiples rangos por el test de Tukey [294]. La separación de medias se realizó mediante el uso de la diferencia menos significativa en el nivel de 5% de probabilidad.

En el caso de la comparación entre las metodologías indicadas en las Secciones 3.2.8 y 3.2.9, se aplicó una regresión de la distribución de los valores de TIU/g obtenidos mediante ambos ensayos. Considerando que tanto y (valores obtenidos por el método propuesto) como x (valores obtenidos por el método estándar) son afectados por errores aleatorios y de magnitud comparable, se utilizó para hallar la pendiente y la ordenada al origen la regresión por mínimos cuadrados bivariada (BLS, por sus siglas en inglés). Una vez obtenidos estos parámetros, se compararon con los ideales (0 y 1 respectivamente), calculando su región elíptica de confianza conjunta (EJCR, por sus siglas en inglés) mediante los cálculos reportados por Franco y col. (2002) [295].

Los resultados de los diseños experimentales (Secciones 3.2.22 y 3.2.23) fueron analizados considerando: el diagrama de probabilidad normal de residuos, análisis de varianza (ANOVA), análisis de falta de ajuste, diagrama de Pareto, coeficiente de determinación (R^2), coeficiente de determinación ajustado (R^2_{ajd}) y diagramas de superficie de respuesta. Para el diseño factorial completo (Sección 3.2.22), se realizó una regresión lineal para ajustar el polinomio e identificar los términos relevantes del modelo. En el caso de los diseños de optimización (Sección 3.2.23), un método de regresión no-lineal fue

empleado para ajustar el segundo orden polinomial para los datos experimentales y para identificar los términos relevantes del modelo.

La elaboración y análisis de los diseños experimentales, así como la mayoría de los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el soporte del software Statgraphics Centurion XVI.I. Los análisis BLS y EJCRC se realizaron con el soporte del software Matlab R2015 (MathWorks).

PARTE III

Resultados y Discusión



*“En los campos de la observación la
suerte sólo favorece a las mentes preparadas.”*

Louis Pasteur

CAPÍTULO 4 - Caracterización fisicoquímica de sistemas micelares acuosos

∞ IDEAS PREVIAS. INTERROGANTES

Una de las características distintivas de los surfactantes, además de la propiedad de ser adsorbidos en las interfaces, es su capacidad de formar micelas, esto es autoensamblarse u organizarse formando *clusters* de tamaño coloidal en solución. La formación de micelas, o micelización, es un fenómeno importante, siendo que varios fenómenos interfaciales importantes, como la detergencia y la solubilización, dependen de la existencia de micelas en solución. Los sistemas micelares se han convertido en un tema de gran interés no sólo para la química, sino también para la bioquímica y biotecnología, constituyéndose como herramientas importantes en el desarrollo de tecnologías de análisis y procesamiento.

En este marco, como punto de partida del presente trabajo resulta necesaria la caracterización fisicoquímica de los sistemas micelares propuestos, determinando parámetros y patrones de comportamiento vinculados a su organización supramolecular como la concentración micelar crítica (*CMC*), el tamaño y morfología micelar y las curvas de coexistencia de fases, ya que estos están vinculados al poder tensoactivo, al

comportamiento hidrodinámico y a la capacidad de solubilizar de los mencionados sistemas. Se plantearon, entonces, los siguientes interrogantes: *¿Cuál será la concentración mínima de trabajo para la cual los sistemas estudiados resulten micelares? A la hora de diseñar una estrategia separativa basada en equilibrios de reparto, ¿cuál será la temperatura por encima de la cual se deberá trabajar para generar una separación de fases? ¿Cuál será el tamaño y cómo será la forma de las micelas presentes en los SMAs? ¿Cómo se verán afectadas las propiedades del sistema en un medio tamponado con citrato de sodio que regule el pH de trabajo en un valor deseado? Considerando a estos sistemas como potenciales extractantes de isoflavonas: ¿interaccionarán éstas con las micelas? ¿en ese caso, en qué región de la micela se ubicarán al ser solubilizadas? ¿tendrá algún efecto modificar las condiciones de trabajo?*

Para el abordaje de estas cuestiones se llevaron a cabo diferentes técnicas cuyos resultados, interpretación y discusión parcial se presentarán a continuación en sucesivos apartados. Al final del capítulo, y a modo de integración, se ensayarán respuestas a los interrogantes planteados. Finalmente, se debe puntualizar que para Genapol X-080, algunas determinaciones fueron realizadas por miembros del grupo de investigación, en el marco de otros trabajos en curso. En esos casos se referirán los valores hallados a los fines de discusión y comparación con los tergitoles.

4.1. ESPECTRO IR DE LOS SURFACTANTES

La espectroscopía vibracional en la banda del infrarrojo medio es una técnica analítica potente a la hora de estudiar moléculas orgánicas, con grupos fácilmente identificables como es el caso de los alcoholes polietoxilados (POE) no-iónicos. La Fig. 4.1 muestra los espectros obtenidos de los tres surfactantes utilizados. Los principales picos observados se ubican en las regiones de estiramientos del enlace simple C-H en una configuración sp^3 (2955/2910/2868 cm^{-1} para GX; 2957/2924/2858 cm^{-1} para Tg7 y 2956/2924/2858 cm^{-1} para Tg9), de flexión de dicho enlace (1460/1378 cm^{-1} para GX; 460/1376 cm^{-1} para Tg7 y Tg9) y de vibración de enlaces simples C-C y C-O (1103 cm^{-1} para GX y a 1099 cm^{-1} para ambos tergitoles). Adicionalmente, se observó un pico, de baja intensidad, en la región de estiramientos de enlaces O-H (3472 cm^{-1} para GX; 3471 cm^{-1} para Tg7; 3481 cm^{-1} para Tg9). Sólo para los tergitoles, se encontró un pico correspondiente a la vibración de cadenas largas alifáticas $-(\text{CH}_2)_n-$ de $n \geq 4$ (723 cm^{-1}). Estos resultados son consistentes con la estructura de compuestos alifáticos alcoxilados o éteres alifáticos alcohólicos, correspondiente a los surfactantes utilizados en este trabajo.

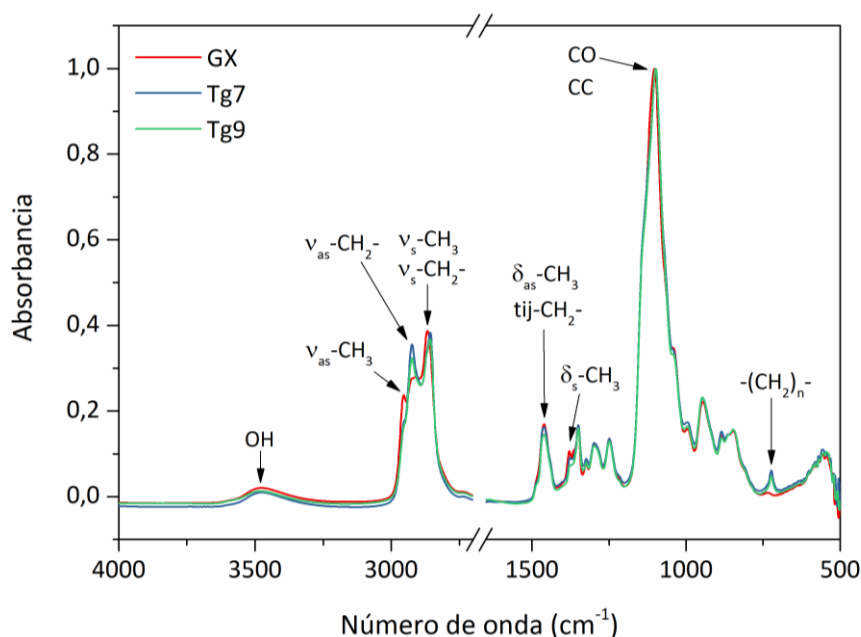


Figura 4.1. Espectros estandarizados de absorbanza de FTIR de GX, Tg7 y Tg9 comerciales.

4.2. CONCENTRACIÓN MICELAR CRÍTICA

La concentración micelar crítica (CMC) es indicativa de la capacidad de formar micelas que tiene un dado detergente. La Fig. 4.2 muestra, para los tergitoles, el efecto que

sobre dicho parámetro tienen concentraciones crecientes de NaCit pH 4,5 (50, 100 y 200 mM). El agregado de la sal fue adoptado como una estrategia que nos permitiera modificar la CMC, disminuyendo sus valores [239], a la vez que tamponar el medio.

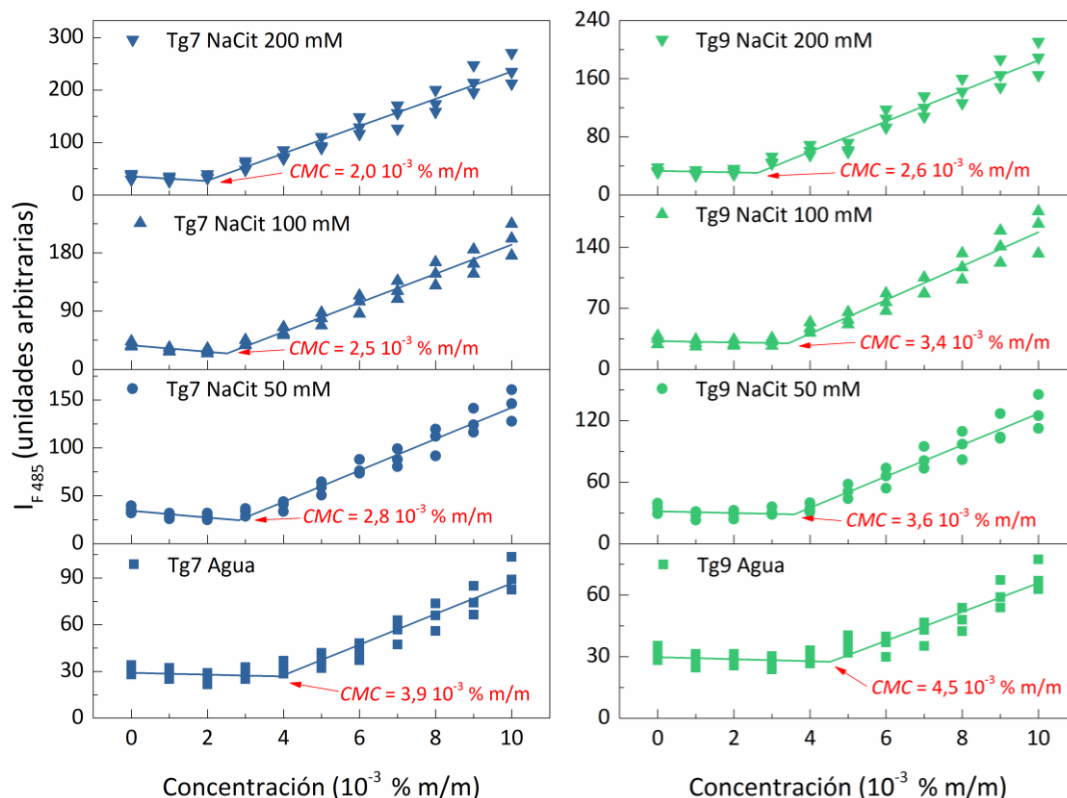


Figura 4.2. Dependencia de la intensidad de fluorescencia (I_F) del ANS con respecto a la concentración de surfactante (Tg7 y Tg9) en agua y en presencia de citrato de sodio pH 4,5, a diferentes concentraciones (50, 100 y 200 mM). $\lambda_{\text{excitación}} = 350$ nm, $\lambda_{\text{emisión}} = 485$ nm, temperatura 25 °C. Los datos se representan como dispersiones de tres experimentos independientes. Cada flecha marca la correspondiente concentración micelar crítica (CMC) en % m/m.

Puede apreciarse que los valores de fluorescencia se mantienen constantes por debajo de $2,0 \cdot 10^{-3}$ % m/m para todos los sistemas analizados. Sin embargo, a partir de esa concentración se produce un aumento abrupto de la señal emisiva, dependiente de la concentración de surfactante en forma lineal. Éste es un comportamiento extensamente reportado en la literatura [239,266,296,297], relacionado con la capacidad de incorporar compuestos hidrofóbicos (como es el ANS) al interior de las micelas, que permite estimar la concentración mínima a la que éstas se forman (CMC) [296]. Cabe aclarar que las CMCs halladas se expresaron en % m/m y por ser valores tan pequeños, del orden de 10^{-3} , también se presentaron en partes por millón (ppm) para simplificar la escritura. A los fines comparativos, se debe tener presente que 10 ppm equivalen a 10^{-3} % m/m.

Como se observa en la Fig. 4.2, los valores obtenidos de *CMC* de Tg7 y Tg9 en agua fueron 39 ppm y 45 ppm, respectivamente. Uno de los fabricantes (Dow Chemical Company) reportó *CMCs* de 38 ppm para Tg7 y 52 ppm para Tg9. Estos valores pueden ser considerados consistentes con los observados en nuestro trabajo, ya que las diferencias encontradas son muy comunes entre diferentes lotes de fabricación de mezclas comerciales, tal como es el caso de estos surfactantes no-iónicos. Asimismo, debe notarse que Tg9 presentó valores más altos de *CMC* que el Tg7, lo cual se atribuye al hecho de que Tg9 contiene 2 grupos etoxi (OE) adicionales en la molécula, haciendo que su forma monomérica sea más hidrofílica y consecuentemente presente una mayor estabilidad en medio acuoso.

Para el caso de GX, un alcohol etoxilado primario, Cordisco y col. (2015) [239] reportaron un valor de *CMC* en agua de 46 ppm, comparable en magnitud a los hallados para los tergitoles. Esto es reflejo de la naturaleza estructural semejante que presentan los tres surfactantes, con colas hidrofóbicas alifáticas. En contraste, otros tensoactivos no-iónicos con grupos alquilfenilo ramificado en su porción hidrófoba, como Triton X-100 y Triton X-114, presentan *CMCs* en agua sensiblemente mayores, entre 125 y 107 ppm respectivamente [224,239].

Respecto al efecto de NaCit, puede apreciarse en la Fig. 4.2, que el aumento de la concentración de esta sal disminuyó la *CMC*. Un comportamiento similar se ha observado para otros surfactantes no-iónicos [239,242], siendo esto atribuible al cambio en el grado de estructuración del agua, según lo descrito en la introducción de esta tesis (ver Fig. 1.11). Recordando que el proceso de formación micelar es un proceso entrópicamente conducido, diferentes iones pueden, según su ubicación en la serie de Hofmeister, aumentar o disminuir la *CMC*, efectos conocidos como *salting-in* y *salting-out*, respectivamente. Estos efectos se entienden a partir de la interacción entre el surfactante y el cosoluto, siendo más pronunciados para aniones. Aniones caotrópicos, como SCN^- y I^- , irrumpen el ordenamiento de las moléculas de agua, favoreciendo la formación de puentes de hidrógeno agua-surfactante. Por el contrario, otros aniones como PO_4^{3-} y SO_4^{2-} , conocidos como cosmotrópicos, tienden a hidratarse fuertemente y acumularse en el seno de la solución, próximos a los OEs del detergente. Particularmente, el citrato es un anión que, por su alta densidad de carga negativa, presenta características cosmotrópicas, compitiendo fuertemente por las moléculas de agua estructurada en torno a las colas hidrofóbicas, las que para estabilizarse tenderán a asociarse facilitando la formación micelar. Este proceso se refleja en una reducción de la correspondiente *CMC*.

A los fines predictivos, se relacionaron los valores de *CMC* con la concentración del electrolito. Como puede apreciarse en la Fig. 4.3, se encontró una relación polinomial de segundo orden entre ambas variables, a diferencia de lo observado por Molina-Bolívar, Aguiar y Ruiz (2001) [242], quienes reportaron una tendencia de primer orden para soluciones de Triton X-100 en presencia de otra sal cosmotrópica como es el KCl.

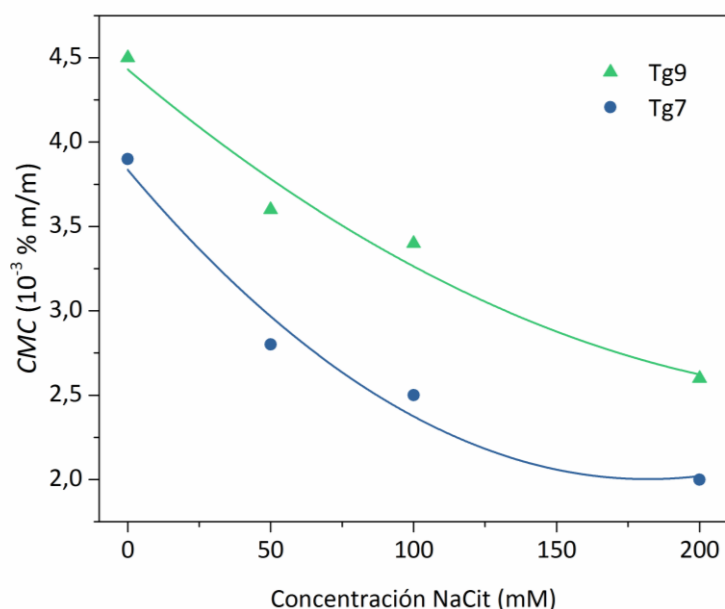


Figura 4.3. Dependencia de la *CMC* medida con ANS con la concentración de NaCit pH 4,5 para Tg7 y Tg9 a 25 °C.

4.3. PUNTO DE TURBIDEZ

El fenómeno de separación de fases con la temperatura (T) es una característica importante de los surfactantes no-iónicos y está relacionado con el balance de las interacciones presentes en el sistema [244]. En la Fig. 4.4 se visualizan las curvas de coexistencia para Tg7 y Tg9, en agua y en presencia de NaCit, que representan el efecto de la concentración de surfactante (C) sobre la temperatura de separación de fases o punto de turbidez (PT). Como se esquematizó previamente en la Fig. 3.2, los puntos (C, T), debajo de la curva, corresponden a sistemas de sólo una pseudo-fase líquida (fase micelar), mientras que los que se ubican por encima dan lugar a la formación de dos pseudo-fases líquidas coexistentes, una fase micelar, rica en agregados del surfactante (micelas) y una acuosa, pobre en el detergente. El patrón observado es típico de los surfactantes no-iónicos polietoxilados (POE) [223,239,243,257,298–300]. Partiendo de soluciones muy diluidas de Tg7/Tg9, el aumento de concentración de éstos va acompañado de una brusca disminución del PT (tramo inicial de la curva), hasta alcanzar un punto mínimo [301], para luego

aumentar gradualmente ante incrementos adicionales en la concentración (tramo final de la curva).

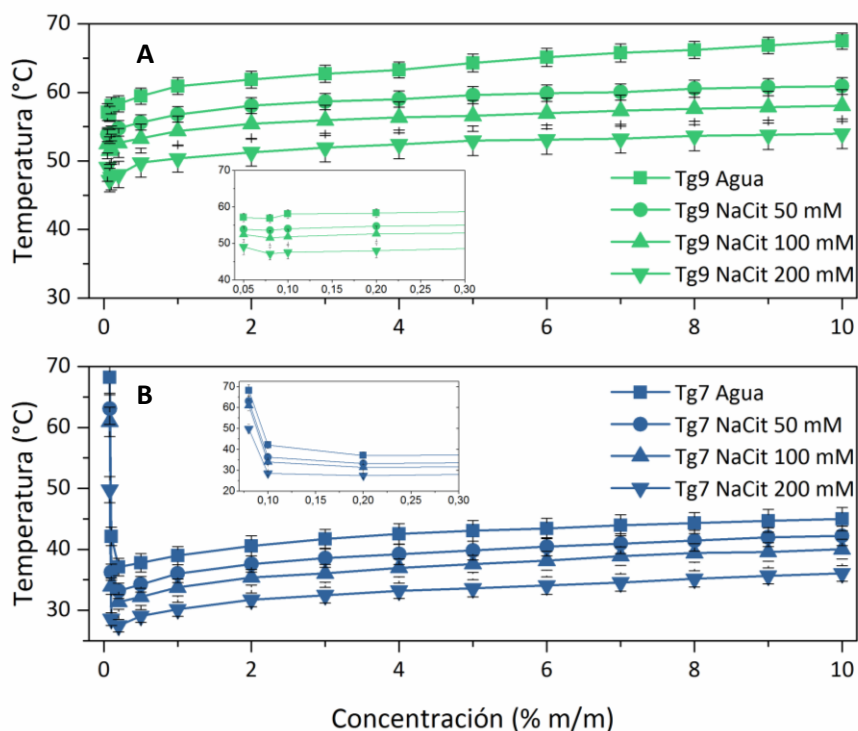


Figura 4.4. Curvas de coexistencia de Tg9 (A) y Tg7 (B) en agua y en presencia de citrato de sodio pH 4,5 a diferentes concentraciones (50, 100 y 200 mM). Cada punto representa la media de tres medidas independientes y las barras de error indican el respectivo \pm SD. En los gráficos internos se representan los puntos de menores concentraciones empleando otra escala.

Tabla 4.1. Valores de *PT* para GX, Tg7 y Tg9.

Medio	<i>PT</i> (°C) [†]		
	GX	Tg7	Tg9
Agua	46 \pm 2	39 \pm 2	61 \pm 1
NaCit 50 mM	41 \pm 2	36 \pm 2	57 \pm 1
NaCit 100 mM	37 \pm 1 ^a	34 \pm 1 ^a	54 \pm 2
NaCit 200 mM	30 \pm 1 ^a	30 \pm 1 ^a	50 \pm 2

Los sistemas analizados, 1% m/m en surfactante, fueron preparados en agua y en presencia de citrato de sodio pH 4,5 a diferentes concentraciones (50, 100 y 200 mM).

[†] Valores expresados como media \pm SD de tres experimentos independientes.

^a Valores de una misma fila que no presentan diferencias significativas entre sí, según el análisis de sus varianzas (ANOVA) con la prueba de rangos múltiples de Tukey para un nivel de significancia de 0,05.

Como muestra la Tabla 4.1, soluciones al 1% m/m de Tg7 y Tg9 en agua presentaron *PT* similares a los reportados para los mismos detergentes por Moussa Alibrahim [210]

(Tg7: 39,7 °C y Tg 9: 60,0 °C) y Swe [232] (Tg7: 38,0 °C y Tg 9: 63,0 °C). Tg9 se diferenció con valores más altos de *PT*, en todas las condiciones, lo cual se vincula con su naturaleza estructural, dado que presenta aproximadamente dos OEs adicionales respecto de Tg7, que le confieren mayor carácter hidrofílico. En relación a esto, se sabe que los valores de *PT* dependen fuertemente del tamaño de la cabeza polar, siendo menos influyente en esta propiedad las dimensiones de la cola hidrofóbica [224,239]. A los fines comparativos, en la Tabla 4.1 se muestran los valores de *PT* obtenidos para GX en idénticas condiciones que las ensayadas para los tergitoles. Puede verse que los *PT* del mencionado surfactante se aproximan más a los del Tg7.

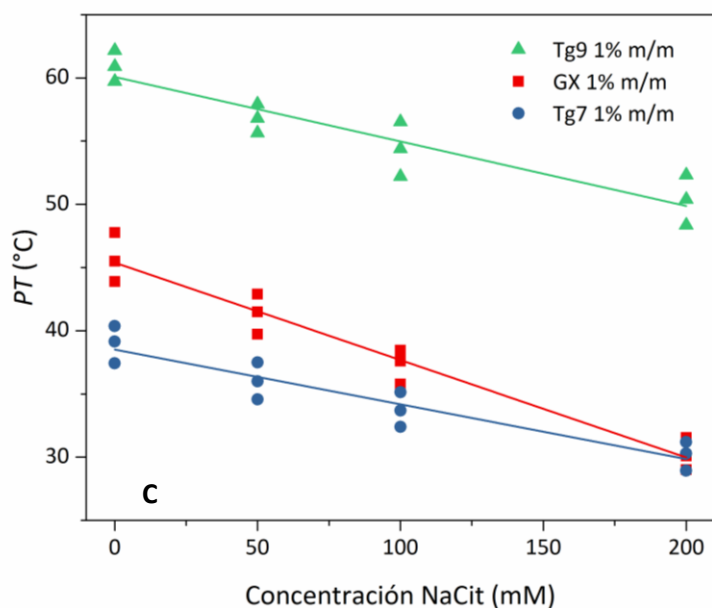


Figura 4.5. Dependencia del *PT* con la concentración de NaCit pH 4,5 para sistemas de GX, Tg7 y Tg9 al 1% m/m. Datos representados como dispersiones de tres experimentos independientes.

Con respecto al efecto del NaCit en el fenómeno de turbidez y separación de fases, se apreció una importante disminución del *PT* (Figs. 4.4 y 4.5) para ambos tergitoles, comportamiento también observado para GX (Tabla 4.1) [239]. Al igual que con la *CMC*, diferentes iones pueden afectar el *PT*, a partir de los efectos de *salting-in* y *salting-out* que estos cosolutos generan. El efecto de *salting-out* de los aniones cosmotrópicos comprende una reducción de la capa de solvatación micelar que induce una interacción más próxima entre las micelas y favorece consecuentemente la separación de fases [233,244,249]. Tal como fue reportado, el citrato es un anión cosmotrópico que decrece el *PT* de soluciones de surfactantes no-iónicos [234,239,302]. La Fig. 4.5 muestra que los cambios del *PT* con respecto a la concentración del electrolito, para soluciones al 1% m/m de los detergentes, se comportaron de manera lineal ($R^2 = 0,950$ para GX; $R^2 = 0,880$ para Tg7; $R^2 = 0,858$ para Tg9), coincidiendo con lo reportado por Alibrahim [210] para ambos tergitoles con otras

sales, tanto cosmotrópicas como caotrópicas. Las pendientes de las rectas correspondientes a ambos tergitoles, no difieren ($P = 0,171$), indicando un comportamiento de *salting-out* equivalente. Por otro lado, Tg7 y Tg9 presentan un comportamiento diferente con respecto a GX ($P < 0,001$), lo que se explica considerando sus estructuras. Los tres detergentes estudiados difieren en extensión sólo en sus cabezas polares (número de OEs), mientras que la longitud total de la cadena hidrófoba es en promedio similar (12 C). Sin embargo, el GX posee una cadena hidrofóbica lineal simple y no bifurcada como la de los tergitoles. Esto da cuentas de la influencia que podría tener la configuración de la cola hidrofóbica en el fenómeno de separación de fases.

4.4. COMPORTAMIENTO HIDRODINÁMICO DE LAS MICELAS

El tamaño y forma de las micelas determinan varias de las propiedades del sistema tales como su viscosidad, punto de turbidez y capacidad de solubilizar [223], por lo que resultó importante estimar dichos parámetros y conocer cómo se ven afectados por la presencia de NaCit. Una primera aproximación para lograr este objetivo fue analizar las propiedades hidrodinámicas de las micelas en los sistemas estudiados.

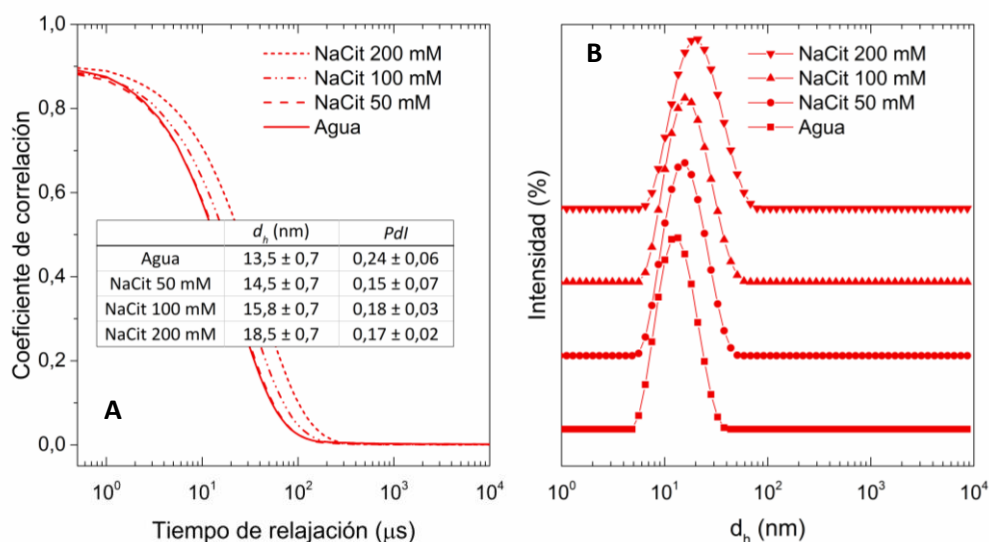


Figura 4.6. DLS. Correlograma (A) y gráfico de distribución de diámetros hidrodinámicos aparentes según % de intensidad de dispersión (B). Resultados obtenidos a 25°C y correspondientes a GX al 1% m/m en agua y en presencia de citrato de sodio pH 4,5 a diferentes concentraciones (50 mM, 100 mM y 200 mM). La tabla inserta en el correlograma muestra los diámetros hidrodinámicos aparentes (d_h) y el índice de polidispersión (Pdl) calculados a partir del análisis de acumulados. Estos parámetros están expresados como la media \pm SD de tres experimentos independientes.

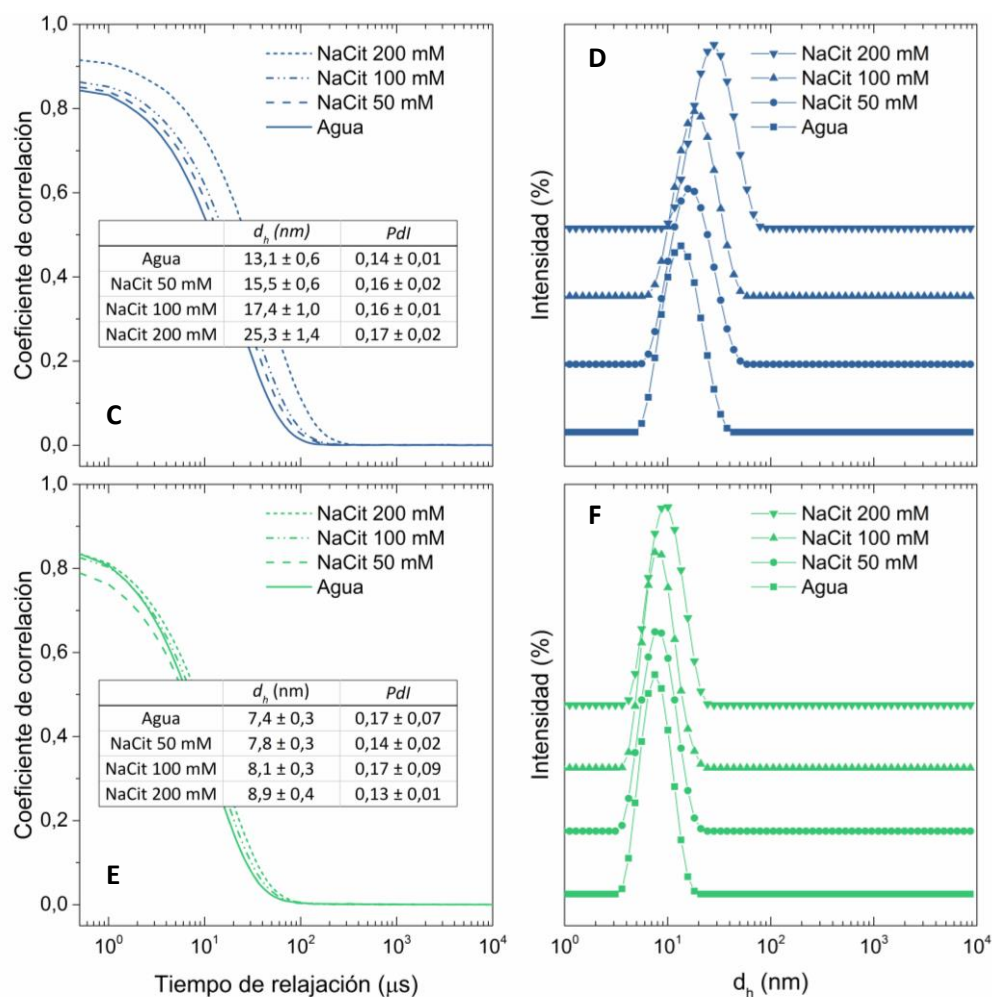


Figura 4.6. Continuación. DLS. Correlogramas (**C** y **E**) y gráficos de distribución de diámetros hidrodinámicos aparentes según % de intensidad de dispersión (**D** y **F**). Resultados obtenidos a 25°C y correspondientes a Tg7 (**C** y **D**) y Tg9 (**E** y **F**) al 1% m/m en agua y en presencia de citrato de sodio pH 4,5 a diferentes concentraciones (50 mM, 100 mM y 200 mM). La tabla inserta en cada correlograma muestra los diámetros hidrodinámicos aparentes (d_h) y el índice de polidispersión (Pdl) calculados a partir del análisis de acumulados. Estos parámetros están expresados como la media \pm SD de tres experimentos independientes.

En la Fig. 4.6 se representan para cada detergente los gráficos de distribución de tamaños en intensidad y sus respectivas funciones de correlación. En todos los casos se observaron índices de polidispersidad (Pdl) inferiores a 0,25, compatibles con un comportamiento monomodal, lo cual permitió el *análisis de acumulados*. Los diámetros hidrodinámicos aparentes (d_h) en agua obtenidos para GX y Tg7 no presentaron diferencias estadísticas entre sí, mientras que sí lo hicieron con respecto a Tg9. Estos valores no pudieron contrastarse con datos reportados por otros autores, dado que al momento los trabajos efectuados se han realizado con configuraciones instrumentales no comparables con la tecnología NIBS (ver Sección 3.2.4.1) utilizada en este estudio [232,239,241].

El tamaño micelar es muy sensible a la presencia de cosolutos, sufriendo modificaciones que dependen de la naturaleza y concentración de los mencionados componentes. En ese sentido, las Figs. 4.6A, C y E muestran el efecto de NaCit sobre las funciones de correlación para GX, Tg7 y Tg9. Pueden observarse distribuciones unimodales y patrones de relajación similares, dados por el *Pdl*, para concentraciones crecientes de la sal (50, 100 y 200 mM). Asimismo, se detectó un aumento del tiempo de relajación, desfasándose la curva, comportamiento que se corresponde con un aumento en el tamaño de las partículas, tal como puede visualizarse en las Figs. 4.6B, D y F. Al analizar la dependencia del d_h con la concentración de sal (Fig. 4.7), se observaron crecimientos lineales para los tres surfactantes. En presencia de citrato de sodio, cuyo anión tiene características cosmotrópicas, resulta previsible un proceso de deshidratación de los grupos hidrofílicos del surfactante, lo que produciría una disminución del área expuesta por los grupos polares del surfactante (a_0) favoreciendo la formación de micelas de mayor tamaño. La magnitud del crecimiento de d_h con la concentración de NaCit, dada por la pendiente de las mencionadas rectas, sigue la secuencia Tg7 > GX > Tg9 y coincide con la proximidad entre la temperatura de trabajo (25 °C) y el *PT* del surfactante y guarda relación inversa con el número de grupos OE presentes en la molécula. Se evidencia así un crecimiento micelar más sensible a la concentración de sal en las cercanías del punto de turbidez, siendo éste un comportamiento frecuente para surfactantes no-iónicos [223].

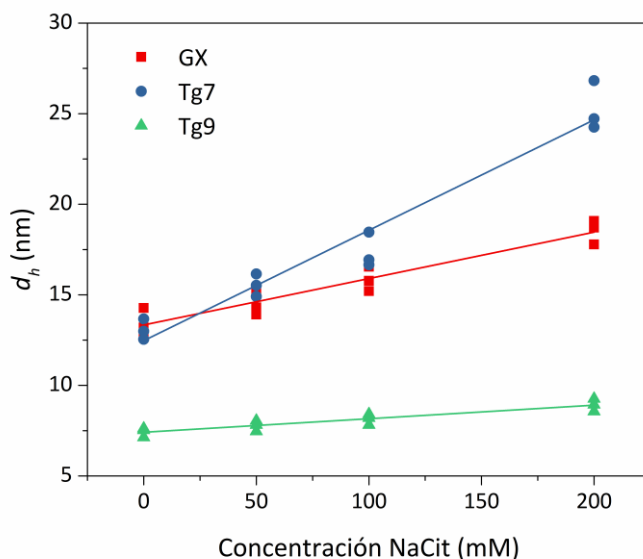


Figura 4.7. Dependencia del d_h con la concentración de NaCit pH 4,5 para sistemas de GX, Tg7 y Tg9 al 1% m/m a 25 °C. Datos representados como dispersiones de tres experimentos independientes.

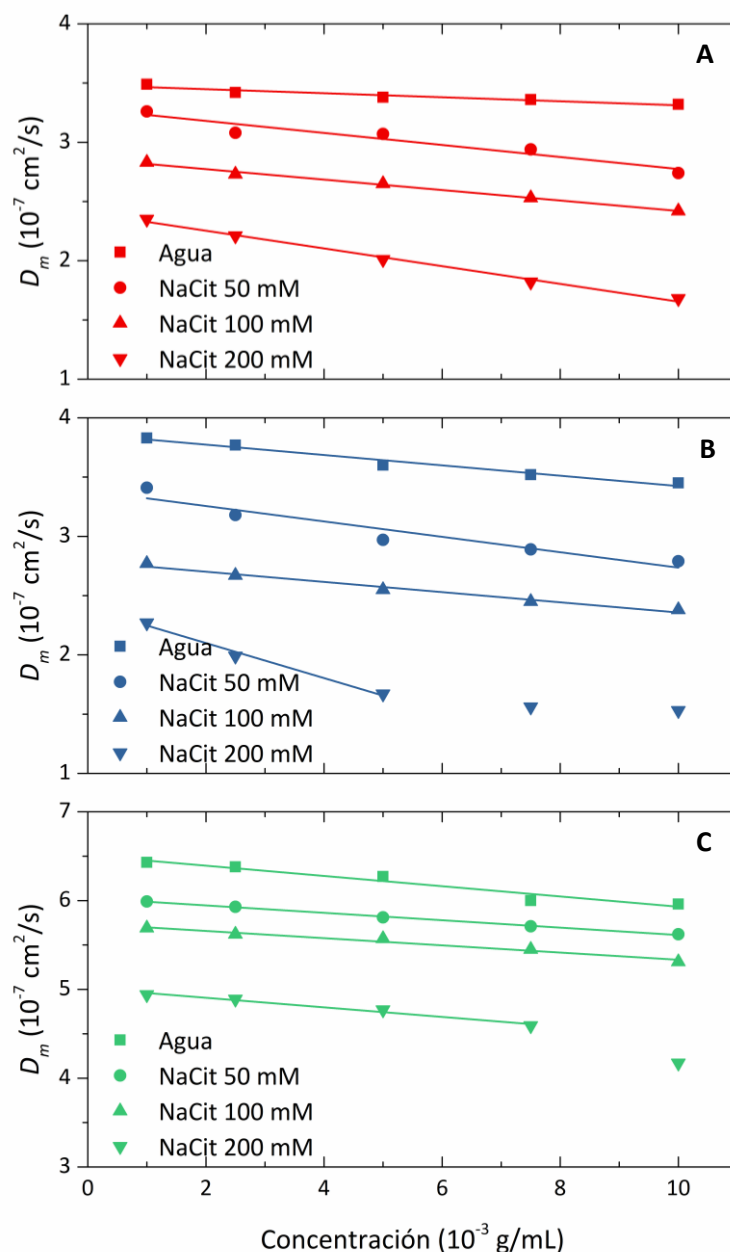


Figura 4.8. Gráficos dinámicos de Debye, que expresan la dependencia del coeficiente de difusión medido por DLS (D_m) con la concentración de surfactante, para GX (A), Tg7 (B) y Tg9 (C) en agua y en presencia de citrato de sodio pH 4,5 a diferentes concentraciones (50, 100 y 200 mM).

En la Fig. 4.8 se representan los gráficos dinámicos de Debye para los tres surfactantes. En la mayor parte de los casos se observó linealidad en todo el rango de concentraciones evaluado. Sin embargo, para los tergitoles en presencia de NaCit 200 mM sólo se apreció un comportamiento lineal a bajas concentraciones del surfactante. El cambio de perfil de la curva a mayores concentraciones respondería no sólo a un efecto debido a interacciones entre micelas, sino a modificaciones de la morfología micelar [238]. En la Tabla 4.2 se resumen los parámetros D^0 y k_D para cada sistema, calculados según lo descrito precedentemente (Sección 3.2.4.1). Dado que valores de k_D negativos y positivos

indican respectivamente interacciones interpartículas atractivas y repulsivas, en todos los casos aquí estudiados los datos sugieren la predominancia de las primeras. Sin embargo, la leve dependencia de D_m con la concentración de surfactante, dada por la magnitud de k_D , indica la presencia de interacciones intermicelares débiles, tal como era de esperar para surfactantes no-iónicos [238]. Esto explica la proximidad entre D^0 y los D_m medidos a diferentes concentraciones de un dado surfactante.

Tabla 4.2. Valores de coeficiente de difusión a dilución infinita (D^0), parámetro de interacción de difusión (k_D) y diámetro hidrodinámico verdadero (d_h^0).

		D^0 (10^{-7} cm^2/s)	k_D (mL/g)	d_h^0 (nm)
GX	Agua	3,482	-4,871	14,25
	NaCit 50 mM	3,282	-15,480	14,94
	NaCit 100 mM	2,862	-15,418	16,39
	NaCit 200 mM	2,403	-31,145	18,02
Tg7	Agua	3,861	-11,317	12,74
	NaCit 50 mM	3,394	-19,143	14,31
	NaCit 100 mM	2,788	-15,437	16,79
	NaCit 200 mM	2,395	-61,693	18,07
Tg9	Agua	6,508	-8,874	7,56
	NaCit 50 mM	6,029	-6,915	8,06
	NaCit 100 mM	5,739	-7,071	8,16
	NaCit 200 mM	5,013	-10,748	8,63

Valores calculados a partir del gráfico de DLS de Debye para GX, Tg7 y Tg9 en agua y en presencia de citrato de sodio pH 4,5 a diferentes concentraciones (50 mM, 100 mM y 200 mM).

La Tabla 4.2 muestra además el d_h^0 de las micelas, calculado con la ecuación de Stokes-Einstein (ecuación 3.2) a partir de los valores de D^0 . Estos valores crecen con la concentración de sal, siguiendo la misma secuencia observada para d_h en todo el rango de concentración. Esto indica que, a los fines comparativos, pueden utilizarse los valores de d_h como estimadores del tamaño o volumen micelar sin necesidad de recurrir a la extrapolación a dilución infinita, metodología que resulta más laboriosa y costosa.

4.5. ENSAMBLADO Y CONFIGURACIÓN MICELAR

El aumento observado en el tamaño hidrodinámico (d_h^0) con el agregado de citrato, puede deberse a un aumento del número de agregación micelar y/o de la asimetría de las

micelas. Con el fin de evaluar esta cuestión, se realizaron estudios de dispersión estática de luz (SLS).

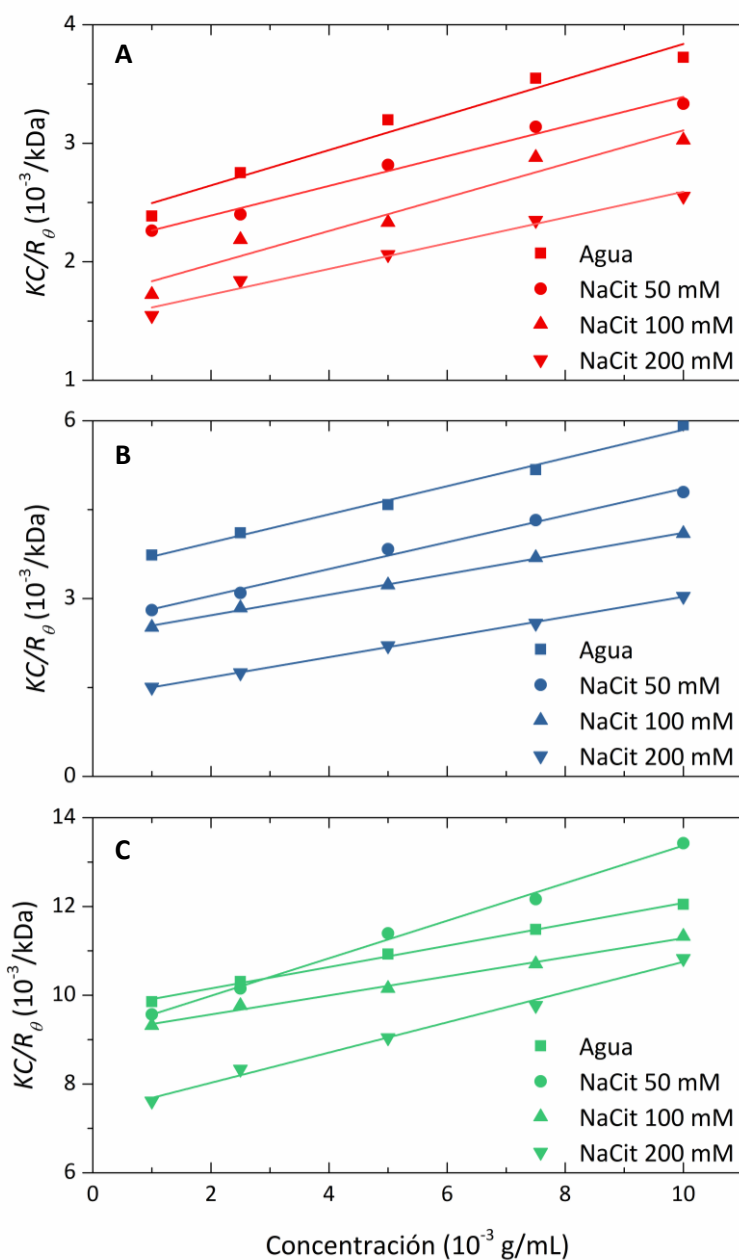


Figura 4.9. Gráficos de Debye, que expresan la dependencia de la intensidad dispersión estática de luz (KC/R_θ) con la concentración de surfactante, para GX (A), Tg7 (B) y Tg9 (C) en agua y en presencia de citrato de sodio pH 4,5 a diferentes concentraciones (50 mM, 100 mM y 200 mM).

La Fig. 4.9 muestra los diagramas estáticos de Debye (ver Sección 3.2.4.2) en las diferentes condiciones ensayadas. A partir de los mismos se obtuvieron por regresión lineal las masas moleculares promedio (en masa) de las micelas (M_m), así como el segundo coeficiente del virial (A_2). Se observó una adecuada respuesta a la variabilidad de los datos mediante un ajuste al modelo lineal ($R^2 > 0,950$ para todos los casos) demostrando que la

dependencia angular de la dispersión de luz resulta insignificante para las condiciones de trabajo ($P(\theta) = 1$).

Tabla 4.3. Valores de masa molecular promedio (M_m), segundo coeficiente del virial (A_2), número de agregación (N_{ag}) y área superficial por molécula de surfactante (a_0).

SMA		M_m (kDa) ^{†,‡}	A_2 (10^{-4} mL mol/ g ²) ^{†,‡}	N_{ag} [†]	a_0 (Å ²)
GX	Agua	399 ± 10	0,64 ± 0,05	707	50,36
	NaCit 50 mM	467 ± 12	0,43 ± 0,04	828	47,79
	NaCit 100 mM	590 ± 38	0,71 ± 0,10	1045	44,22
	NaCit 200 mM	664 ± 22	0,54 ± 0,04	1176	42,51
Tg7	Agua	288 ± 6	1,19 ± 0,06	560	53,27
	NaCit 50 mM	386 ± 10	1,13 ± 0,06	749	48,35
	NaCit 100 mM	422 ± 4	0,87 ± 0,02	819	46,92
	NaCit 200 mM	751 ± 9	0,85 ± 0,01	1457	38,72
Tg9	Agua	103 ± 1	1,20 ± 0,04	177	84,31
	NaCit 50 mM	109 ± 1	2,12 ± 0,08	187	82,74
	NaCit 100 mM	109 ± 1	1,07 ± 0,05	187	82,74
	NaCit 200 mM	136 ± 2	1,70 ± 0,09	233	76,93

[†]Valores de M_m y A_2 calculados a partir del gráfico de SLS de Debye para GX, Tg7 y Tg9. N_{ag} calculado a partir del M_m y la masa molar monomérica.

[‡]Valores expresados como media ± SD.

Por su parte, A_2 es una medida de interacciones atractivas micela-solvente o repulsivas micela-micela [303]. En todos los casos se hallaron valores positivos que sugieren interacciones micela-solvente favorables, aunque de baja magnitud (Tabla 4.3), indicando que las medidas realizadas no se ven afectadas sensiblemente por estas interacciones. Un comportamiento similar respecto a la magnitud fue observado para los valores de k_D (ver Sección 4.4). Sin embargo, en relación al sentido de la interacción, estos dos parámetros sugirieron interacciones micela-micela favorables ($k_D < 0$) e interacciones micela-solvente favorables ($A_2 > 0$), comportamientos aparentemente antagónicos. Un caso similar fue reportado por Shi y col. (2013) [304] para un fragmento de anticuerpo monoclonal, discrepancia que explicaron en base a la relación que vincula A_2 con k_D :

$$A_2 = \frac{k_D + k_S + \bar{v}}{2 M_w} \quad (4.1)$$

donde k_S es el parámetro de interacción de sedimentación y \bar{v} el volumen específico parcial del anticuerpo. De aquí se aprecia que A_2 es un parámetro más global y representativo para

el sistema, ya que contempla no sólo las interacciones interpartícula (k_D y k_S) sino también la componente repulsiva dada por el volumen que excluyen las partículas en solución (\bar{v}). Este último efecto, puede en casos como el de los sistemas micelares aquí estudiados, donde k_D es negativo y de pequeña magnitud, compensar y revertir el efecto atractivo intermicelas resultando en A_2 positivos, indicativos de buena interacción partícula-solvente.

A partir de los valores de M_m se calcularon los números de agregación micelar (N_{ag}) de los tensoactivos en agua, datos que se muestran en la Tabla 4.3. Debe señalarse que los valores de M_m y N_{ag} en agua para el Tg7 son próximos a los reportados por Li y Chen [241], no así para Tg9 que en nuestro caso arrojó M_m s que duplican a las informadas por Swe [232]. Para el caso de GX, no se han reportado previamente valores de M_m y N_{ag} .

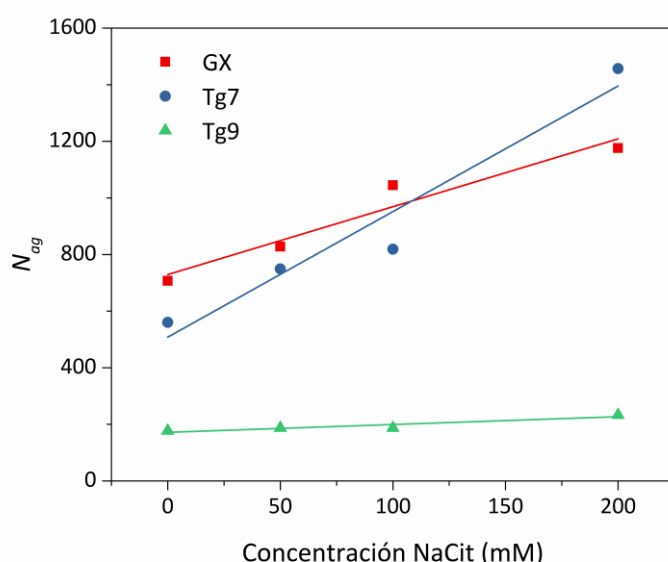


Figura 4.10. Dependencia del N_{ag} con la concentración de NaCit para sistemas de GX, Tg7 y Tg9 al 1% m/m a pH 4,5.

Respecto del efecto que produce el agregado de NaCit, al igual que para el d_h , incrementos de la concentración de electrolito entre 50 y 200 mM aumentaron los números de agregación de las micelas de todos los detergentes (Tabla 4.3). En la Fig. 4.10 se representa el efecto de la concentración de citrato sobre el N_{ag} , observándose una tendencia creciente lineal para todos los surfactantes ($R^2 = 0,942, 0,946$ y $0,884$ respectivamente para GX, Tg7 y Tg9). El patrón observado fue similar al de la dependencia de d_h con la concentración de la sal. Estos resultados, que reflejan la formación de ensamblados más grandes son consecuencia de la deshidratación de los grupos polares en presencia de la sal y la consecuente disminución del área superficial de los grupos hidrofílicos, a_o , según lo que

puede apreciarse en la Tabla 4.3. Asimismo, la disminución de a_0 podría no sólo conducir al crecimiento micelar, sino también a la adopción forzada de estructuras menos simétricas.

Tabla 4.4. Valores de parámetro de empaquetado (PE), factor de Perrin (FP) y las relaciones axiales a partir de FP .

SMA		PE †	FP	Relación axial (prolato)	Relación axial (oblato)
GX	Agua	0,40	1,27	5,32	5,87
	NaCit 50 mM	0,43	1,26	5,16	5,68
	NaCit 100 mM	0,50	1,29	5,63	6,26
	NaCit 200 mM	0,50	1,37	6,91	7,92
Tg7	Agua	0,40	1,25	4,90	5,43
	NaCit 50 mM	0,43	1,29	5,44	6,08
	NaCit 100 mM	0,44	1,47	8,78	10,40
	NaCit 200 mM	0,50	1,31	5,87	6,61
Tg9	Agua	0,25	1,03	1,62	1,78
	NaCit 50 mM	0,25	1,08	2,33	2,53
	NaCit 100 mM	0,25	1,10	2,53	2,74
	NaCit 200 mM	0,29	1,07	2,20	2,38

Valores calculados para GX, Tg7 y Tg9 en agua y en presencia de citrato de sodio pH 4,5 a diferentes concentraciones (50, 100 y 200 mM).

† Estructuras implícitas en los intervalos de valores de PE : 0 – 0,3 esférica en medio acuoso; 0,3 – 0,5 cilíndrica en medio acuoso; 0,5 – 1 lamelar en medio acuoso.

Para analizar esta última cuestión, de tipo configuracional, se estimaron algunos parámetros morfológicos. La Tabla 4.4 muestra los valores calculados del parámetro de empaquetado (PE), factor de Perrin (FP) y las correspondientes relaciones axiales de prolato y oblato, obtenidas a partir de FP , para cada uno de los sistemas evaluados. Analizando los valores de PE y teniendo en cuenta las implicaciones de éstos (ver Sección 3.2.5.3), puede verse que para GX y Tg7 en agua se sugiere una morfología cilíndrica, mientras que para Tg9 una estructura de tipo esférica. Con el agregado de NaCit, PE sufrió un incremento para los tres detergentes, evidenciando un aumento en la asimetría, a excepción de los sistemas de Tg9 que continuaron dentro de los parámetros de la esfericidad. Por otro lado, se hicieron estimaciones sobre la morfología micelar a partir del factor de Perrin y las eventuales proporciones axiales que se corresponden con dicho factor. Como muestra la Tabla 4.4, los menores valores de FP se observaron para Tg9, seguidos por GX y Tg7. En ese sentido también estuvieron las relaciones axiales de prolato y oblato, donde

Tg7 como GX mostraron valores elevados para todo el rango de concentraciones de sal, indicando posibles estructuras cilíndricas tipo barra o discales. Para Tg9, estos parámetros sugirieron estructuras más compactas tipo ovoide, para todo el rango. En general pudo observarse un aumento de la asimetría de las micelas con la concentración de electrolito para todos los surfactantes estudiados.

Para integrar los resultados precedentes debe tenerse presente que los cambios en la temperatura, la concentración de surfactante y los aditivos en la fase líquida pueden causar cambios en el tamaño, la forma y el número de agregación de la micela, variando la estructura de esférica a cilíndrica o discal [226]. Los SMAs aquí estudiados no superaron la concentración de 80 mM, inferior a la mencionada por Rosen [223], por debajo de la cual el N_{ag} de POEs no-iónicos aumenta considerablemente con la concentración de surfactante, incluso en agua pura, alcanzando números de agregación de varios cientos o más e indicando, generalmente, que las micelas no son de forma esférica. Este elevado N_{ag} , como fue discutido previamente, se observó para los sistemas micelares del Tg7 y GX, sugiriendo por tanto, una posible morfología de elipsoide de revolución. Por otro lado, es bien sabido que las micelas de surfactantes no-iónicos pueden incorporar agua en su estructura a través de dos mecanismos diferentes, a saber, el agua unida por puentes de hidrógeno y el entrampamiento mecánico de agua en la capa exterior [305]. En presencia de un agente cosmotrópico, disminuye la cantidad de agua unida a través de puentes de hidrógeno, produciendo una estructura más densamente enmarañada para las cadenas POE. Esto conduciría a una mayor efectividad en la captura mecánica de moléculas de agua, siendo otro dato que contribuye a la consideración que, probablemente, el aumento del tamaño micelar vaya acompañado de una transición a una morfología menos simétrica. Una estructura asimétrica, tipo oblata o alargada (cilíndroide), da como resultado una superficie micelar aumentada, favoreciendo el flujo osmótico de moléculas de agua a través de la cobertura y, como consecuencia, aumentando el contenido de agua atrapada en esta región.

Teniendo en cuenta el parámetro de empaquetado y el factor de Perrin, puede decirse que los sistemas micelares del Tg7 y GX al 1% m/m y 25 °C, presentan micelas elipsoidales flexibles, mientras que en el Tg9 son más próximas a conformación esférica. Finalmente, la asimetría estructural evaluada pareciera ser mayor para los surfactantes con menor PT (Tg7 y GX), lo que orienta a relacionar la morfología micelar con la cercanía del sistema al PT . Esta última propiedad (PT), en los sistemas analizados, sigue la secuencia Tg7 < GX < Tg9, coincidente con la del número de OEs presentes en cada molécula.

4.6. INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA

4.6.1. Diámetro hidrodinámico

Como se mencionó anteriormente, es sabido que la temperatura afecta algunas propiedades estructurales de los SMAs, por lo que resultó interesante estudiar su influencia sobre el tamaño micelar.

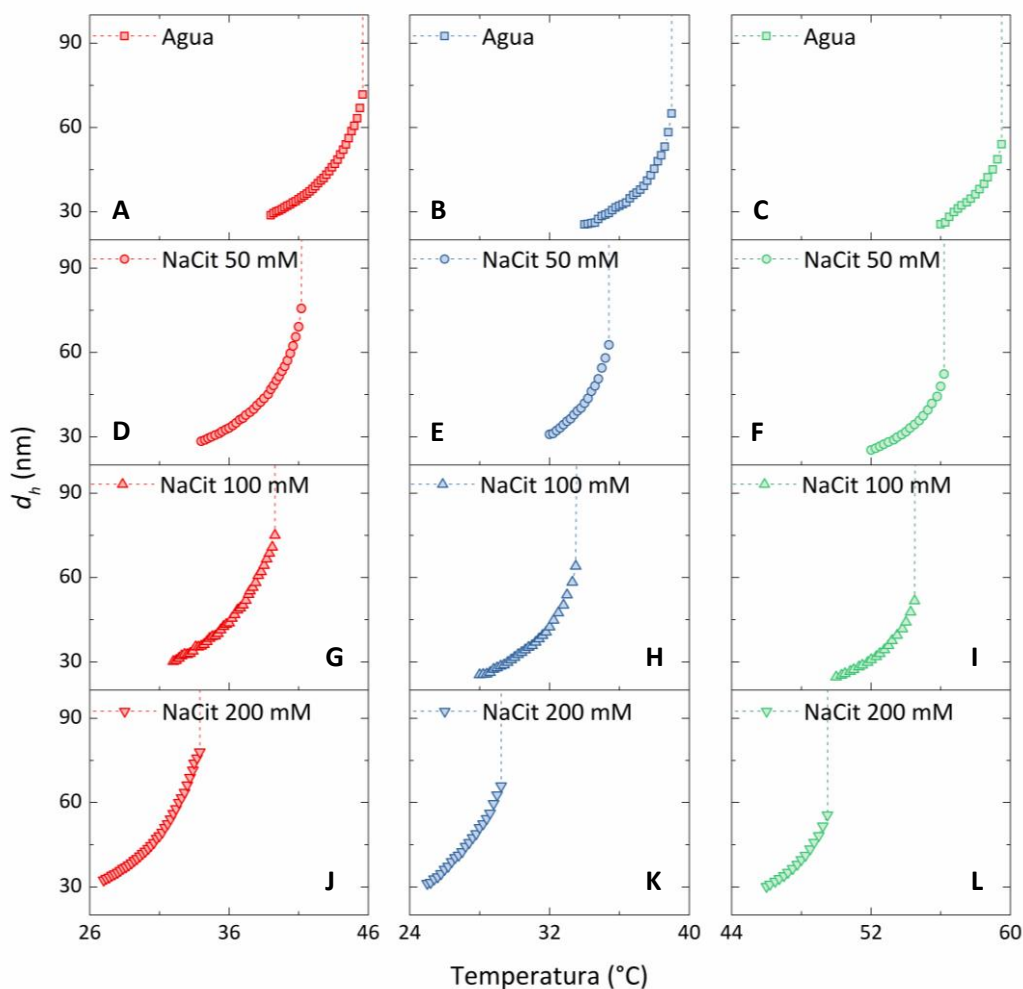


Figura 4.11. DLS. Dependencia del diámetro hidrodinámico aparente (d_h) con la temperatura. Resultados correspondientes a GX (A, D, G y J), Tg7 (B, E, H y K) y Tg9 (C, F, I y L) al 1% m/m en agua y en presencia de citrato de sodio pH 4,5 a diferentes concentraciones (50, 100 y 200 mM).

El efecto sobre el diámetro hidrodinámico aparente de GX, Tg7 y Tg9 al 1% m/m en agua se representa en la Fig. 4.11. Inicialmente, los surfactantes incrementaron sus d_h gradualmente con la temperatura, seguido por un cambio abrupto. Las soluciones se tornaron turbias al alcanzar las temperaturas indicadas en la Tabla 4.5, con un consiguiente aumento brusco de tamaño por encima del límite de detección del equipamiento. Se reveló así la existencia de un fenómeno de separación de fases y existencia de un punto de turbidez (PT). Pudo observarse entonces, para estos POEs no-iónicos y congruentemente a lo ya

reportado [223], que hay un lento aumento de N_{ag} hasta que la temperatura alcanza unos 3-5 °C por debajo del PT y luego comienza rápidamente a aumentar. Generalmente, los anfífilos aumentan su hidrofobicidad con la temperatura, produciendo la agregación intermicelar y así incrementando su N_{ag} [306]. Como ya vimos, este creciente carácter hidrófobo viene acompañado de la deshidratación de las cadenas POE causando una disminución en σ_0 . Esto genera un fuerte aumento en la asimetría de la micela [223]. Este cambio en la forma traería aparejado un incremento en la resistencia hidrodinámica y, por tanto, una disminución del coeficiente de difusión, tal cual vimos a partir del análisis de dispersión de luz.

Tabla 4.5. Temperatura, diámetro hidrodinámico aparente (d_h) e índice de polidispersión (Pdl) en el punto de turbidez (PT).

		PT (°C)	d_h (nm) [†]	Pdl [†]
GX	Agua	45,6	71,65	0,227
	NaCit 50 mM	41,2	75,61	0,243
	NaCit 100 mM	39,3	74,99	0,252
	NaCit 200 mM	33,9	78,01	0,261
Tg7	Agua	39,0	65,8	0,236
	NaCit 50 mM	35,4	62,7	0,220
	NaCit 100 mM	33,5	64,2	0,217
	NaCit 200 mM	29,2	65,9	0,229
Tg9	Agua	59,5	54,0	0,141
	NaCit 50 mM	56,2	52,3	0,156
	NaCit 100 mM	54,5	51,7	0,141
	NaCit 200 mM	49,5	55,6	0,169

[†] Valores calculados a partir del análisis de acumulados para los datos de DLS.

En la Tabla 4.5, también podemos observar los d_h y sus valores de Pdl medidos para cada sistema antes de la separación de fases (previo al PT). Los PT s hallados mediante DLS se corresponden muy bien con los encontrados a partir de los diagramas de coexistencia de la Sección 4.3. Consistentemente con lo expuesto anteriormente en este capítulo, pudo observarse mediante este análisis que el aumento en la concentración de citrato disminuye el PT . Como se ha mencionado previamente en el texto, el efecto de NaCit sobre los parámetros estructurales de las micelas de los tres detergentes se atribuye a la ruptura estructural del agua alrededor de las micelas, conduciendo así a la eliminación de moléculas de agua de los grupos hidrófilicos en la interfase micelar. Una vez más, esta situación corresponde formalmente a la ruptura de enlaces intermoleculares con los hidrógenos. Esta reducción en la cantidad de agua ligada a las micelas a través de puentes de hidrógeno

probablemente reduzca el tamaño efectivo la cabeza hidrófila (α_0), igual que lo hace la temperatura, dando lugar así al crecimiento micelar a un menor nivel de energía térmica.

4.6.2. Interacción IF-micela

Para estudiar la interacción entre las isoflavonas y las micelas se incorporaron IFs comerciales en iguales cantidades a cada sistema, analizando las propiedades hidrodinámicas, antes y después de la incorporación, mediante DLS.

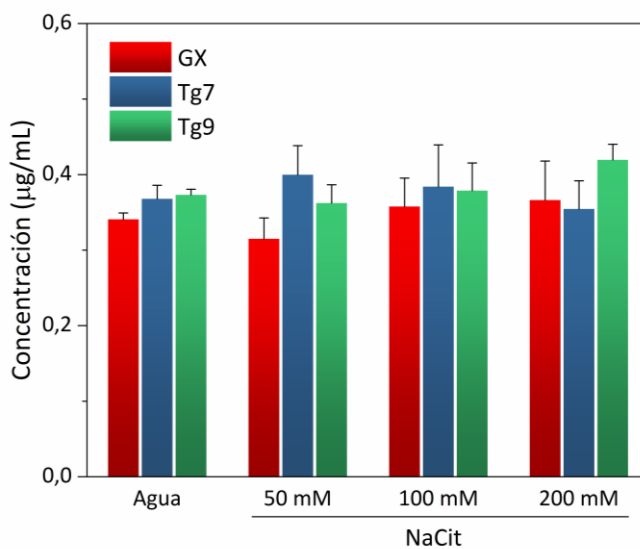


Figura 4.12. Concentración de isoflavonas totales en sistemas de GX, Tg7 y Tg9 al 1% m/m en agua y en presencia de citrato de sodio pH 4,5 a diferentes concentraciones (50, 100 y 200 mM). Cada punto representa la media de tres medidas independientes y las barras de error indican el respectivo \pm SD. Valores estimados a partir de la sumatoria de las concentraciones individuales de daidzina, genistina, daidzeína y genisteína, calculadas mediante curva de calibrado estándar en HPLC. Temperatura 25 °C.

En la Fig. 4.12 se representan las concentraciones de las IFs solubilizadas (daidzina, genistina, daidzeína y genisteína), determinadas por HPLC, en los sistemas micelares estudiados. Para todos los casos no se observaron diferencias significativas en la cantidad de IFs en solución ($P > 0,1$), lo que permitió las comparaciones subsiguientes.

Con respecto a las propiedades hidrodinámicas, se observaron diferencias en las distribuciones de tamaños (Fig. 4.13), tanto relacionada al tipo de surfactante como a la concentración de electrolito, lo cual podría estar relacionado con la ubicación puntual de cada isoflavona en la estructura micelar.

Es sabido que las isoflavonas gliconadas tienen un carácter mucho más polar que sus agliconas. Entre éstas últimas, la daidzeína, con sólo dos sustituyentes hidroxilo, tiene una mayor afinidad por un entorno polar que la genisteína con tres sustituyentes hidroxilo. El grupo 5-hidroxilo de la genisteína forma un enlace de hidrógeno intramolecular con el

grupo 4-carbonilo, lo que disminuye la afinidad molecular para una matriz polar. En un estudio de la interacción entre isoflavonas con micelas, utilizando un surfactante aniónico como es el SDS, Whaley y col. (2006) [307] establecieron que la genisteína es bastante móvil, pero se encuentra principalmente inserta dentro del núcleo hidrófobo. Por su parte, la daidzeína y la genistina también son móviles, pero exhiben posiciones medias cerca de la interfase micela/matriz acuosa, con grupos polares orientados hacia el compartimento acuoso.

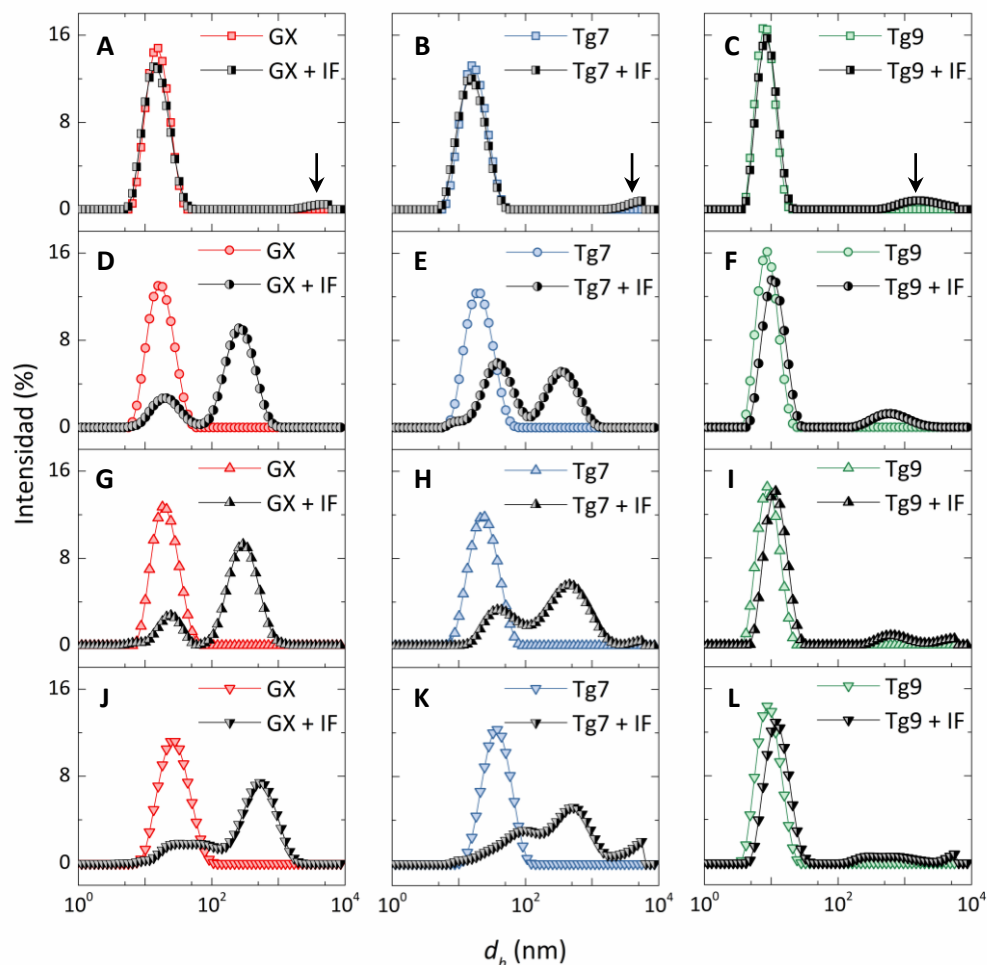


Figura 4.13. DLS. Gráficos de distribuciones de diámetros hidrodinámicos aparentes (d_h) según % de intensidad de dispersión, para sistemas micelares con y sin incorporación de isoflavonas (IF). Resultados correspondientes a GX (A, D, G y J), Tg7 (B, E, H y K) y Tg9 (C, F, I y L) al 1% m/m a 25 °C: A, B y C) SMAs en agua; D, E y F) SMAs en NaCit 50 mM pH 4,5; G, H e I) SMAs en NaCit 100 mM pH 4,5; J, K y L) SMAs en NaCit 200 mM pH 4,5,

La Fig. 4.13 representa las distribuciones de tamaño de los SMAs estudiados con y sin agregado de IF. Al observar las Figs. 4.13A, B y C, correspondientes a los SMAs en agua, encontramos distribuciones casi iguales entre los sistemas con y sin IF. Sin embargo, podemos observar una sutil diferencia en la aparición de un grupo de partículas de gran tamaño (marcado con flecha) con una intensidad de dispersión muy baja. Considerando lo

reportado por Whaley (2006) [307], podría pensarse, entonces, que una porción de las IFs presentes en la solución fueron incorporadas en el interior de un pequeño grupo de micelas, lo que a su vez las llevó a asociarse y modificar su morfología y/o aumentar su tamaño, reduciendo su difusión, equivalente a un d_h 10 veces mayor. Es probable que este grupo de solutos insertos en el núcleo micelar esté compuesto principalmente por genisteína.

Al incorporar el citrato al sistema, el segundo grupo de partículas comienza a incrementarse aumentando su relevancia en relación al primer grupo (en el caso de GX y Tg7) en forma sostenida a medida que aumenta la concentración de sal. Para el Tg9, si bien la adición de IF genera un grupo de micelas con mayor d_h , se aprecia un predominio del grupo de partículas con menor tamaño en todas las condiciones ensayadas. En este caso, sí pudo apreciarse un aumento en la dispersión del grupo de partículas de mayor tamaño. Estas observaciones permiten deducir que la presencia del citrato conduce a una mayor interacción de las IFs con las micelas ya sea incorporándose éstas en el interior de la micela o modificando su configuración, aumentando el N_{ag} o haciéndola más asimétrica. Este efecto es más notorio para GX y Tg7, sugiriendo que sus estructuras micelares de mayor tamaño, formadas por varios cientos de monómeros, y su morfología cilíndrica son más apropiadas para la mencionada interacción. En relación a esto, Rosen (2012) [223] ha reportado que la adición de electrolitos neutros a soluciones de surfactantes POE no-iónicos incrementa la solubilización de compuestos hidrocarbonados a una dada temperatura, en aquellos casos en los que el electrolito genere un aumento en el número de agregación micelar. En este caso, tanto GX como los tergitos experimentaron este aumento de N_{ag} con la concentración de NaCit, sin embargo, dado que las concentraciones de IF utilizadas en las experiencias no fueron a nivel saturante, no podemos precisar si realmente aumenta la capacidad solubilizante de los SMAs con la concentración de sal.

En principio, la diferencia entre el comportamiento de GX y Tg7 con respecto a Tg9 se atribuyó a la mayor lejanía de este último con respecto a su PT , con partículas considerablemente más pequeñas y simétricas que los otros surfactantes. Esta hipótesis se evaluó analizando las distribuciones de tamaño micelar a temperaturas cercanas, aunque aún inferiores al PT de cada sistema (Fig. 4.14). En estas nuevas mediciones se observaron comportamientos disímiles a los observados a 25 °C. En general, en puntos previos al PT , se evidencian poblaciones de micelas de mayor d_h resultantes de la interacción con las IFs, siendo esto independiente de la presencia de citrato y de su concentración. Lo observado demuestra que, si bien aumentos en la concentración de NaCit incrementan la internalización de IFs para una misma temperatura, existe un límite de solubilización que a iguales condiciones de cercanía con los respectivos PT no puede ser superado,

independientemente de la concentración del electrolito. Además, esto también dependería de la naturaleza del surfactante ya que Tg9, a diferencia de los otros dos surfactantes, demostró ser más ordenado y uniforme en la internalización de las IFs, con partículas más pequeñas que no sufrieron un drástico fenómeno de agregación.

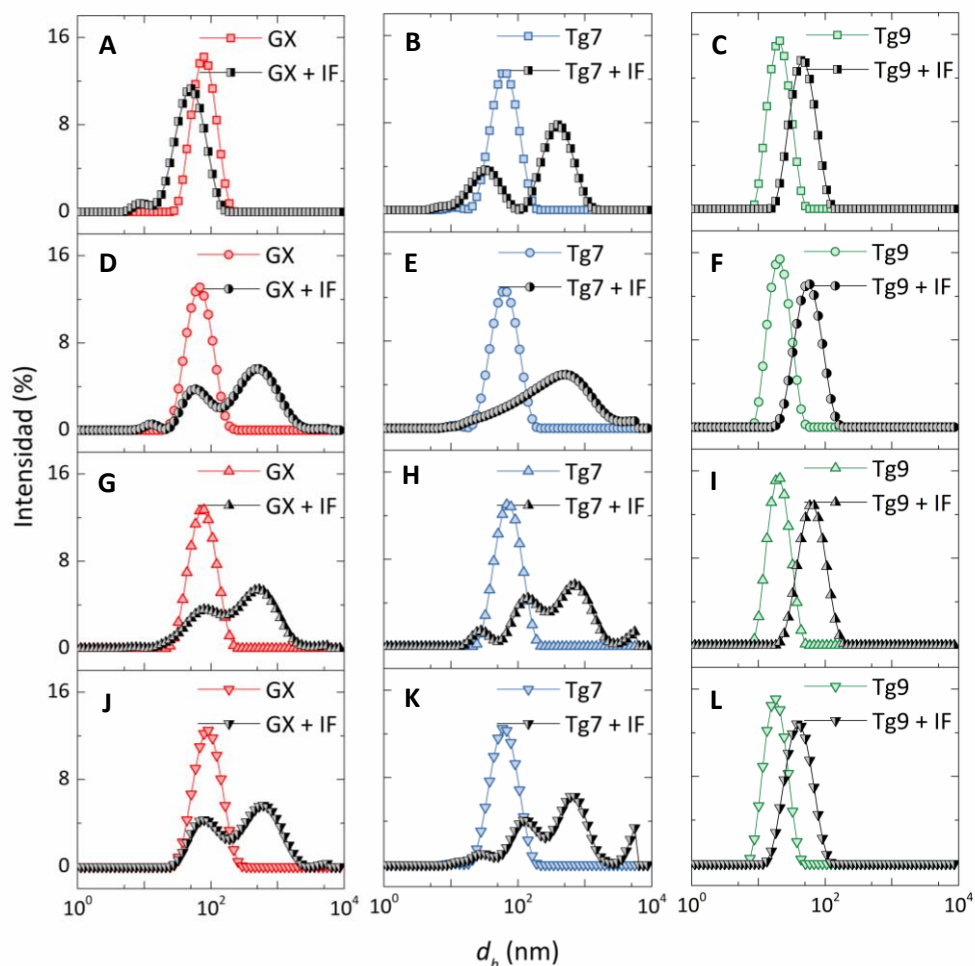


Figura 4.14. DLS. Gráficos de distribuciones de diámetros hidrodinámicos aparentes (d_h) según % de intensidad de dispersión, para sistemas micelares con y sin incorporación de isoflavonas (IF). Resultados correspondientes a SMAs al 1% m/m y a temperaturas cercanas al PT . GX: **A)** 45,5 °C en agua, **D)** 41,2 °C en NaCit 50 mM pH 4,5, **G)** 39,3 °C en NaCit 100 mM y **J)** 33,9 °C en NaCit 200 mM; Tg7: **B)** 37,0 °C en agua, **E)** 34,0 °C en NaCit 50 mM, **H)** 32,0 °C en NaCit 100 mM y **K)** 27,0 °C en NaCit 200 mM; Tg9: **C)** 59,0 °C en agua, **F)** 54,0 °C en NaCit 50 mM, **I)** 52,0 °C en NaCit 100 mM y **L)** 48,0 °C en NaCit 200 mM. Sistemas en NaCit a pH 4,5.

Estos resultados demuestran que las IFs interactúan con la estructura micelar provocando mayor dispersión y agregación en los surfactantes menos hidrófilos (GX y Tg7). Este proceso varía con la concentración de NaCit y la temperatura, siendo que esta última propiedad toma mayor relevancia en las cercanías del PT , volviendo insignificante al efecto de la sal.

4.7. CONCLUSIONES PARCIALES

Un análisis integrador de los resultados obtenidos permite sacar las siguientes conclusiones y dar respuesta a los diferentes interrogantes planteados al inicio de este capítulo.

La caracterización fisicoquímica de los sistemas micelares acuosos (SMAs) formados por los alcoholes alifáticos etoxilados Genapol X-080, Tergitol 15-S-7 y Tergitol 15-S-9, permitió obtener información muy útil a la hora de diseñar las estrategias extractivas propuestas en el presente trabajo doctoral.

El Tg9 presenta valores más altos de *CMC* y *PT*, compatibles con la presencia de un grupo etoxi adicional en su molécula en relación a GX y dos en relación a Tg7, lo cual le confiere mayor hidrofiliidad tanto al monómero como al ensamblado.

El agregado de NaCit reduce drásticamente tanto la *CMC* como el *PT* de los tres surfactantes. En el caso de este último parámetro, lo acerca a la temperatura ambiente, condición favorable en la recuperación de biomoléculas termolábiles. Al aumentar la concentración de electrolito (NaCit) de 50 mM a 200 mM, el diámetro hidrodinámico de las micelas y sus números de agregación aumentan de manera lineal para los tres surfactantes empleados.

GX y Tg7 presentan micelas con un diámetro hidrodinámico mayor que Tg9, condición que permanece presente incluso al alcanzar el *PT*. Esta diferencia no se observa sólo en dicha propiedad hidrodinámica, sino también se evidencia en la masa molecular del agregado y, por ende, en su número de agregación. Teniendo en cuenta las estimaciones teóricas sobre la morfología, puede decirse que los sistemas micelares de GX y Tg7 al 1% m/m y 25 °C, presentan micelas elipsoidales de mayor tamaño y más asimétricas (cilíndricas) que las correspondientes al Tg9 (esféricas y ovoides). Para cada surfactante, la asimetría se incrementa también con el aumento de la concentración de NaCit en el medio.

Los tres surfactantes son capaces de interaccionar con las IF evidenciándose un incremento en el diámetro hidrodinámico que podría ser consecuencia de la incorporación de la IF en el núcleo de la micela, o alternativamente de un aumento en el número de monómeros agregados o asimetría de la micela. Si bien a 25 °C este proceso está favorecido por el agregado de citrato sódico, al incrementarse la temperatura y aproximarse al *PT*, el efecto de la sal deja de ser relevante, alcanzándose un límite de solubilización independiente de la concentración de electrolito.

CAPÍTULO 5- Indicadores de seguimiento y valoración del proceso de detoxificación

☞ IDEAS PREVIAS. INTERROGANTES

Control del contenido de inhibidores de tripsina

Entre los factores antinutricionales, los inhibidores de tripsina (IT) son los componentes con mayor relevancia en el retardo del crecimiento y enfermedades digestivas y metabólicas [136,308,309]. Es por esto que la determinación de la actividad antitriptica (*TIA*, por sus siglas en inglés), es de gran importancia al evaluar la calidad nutricional de los productos de soja luego de los estadios de procesamiento, con el fin de asegurar la alta calidad del producto final. El método estándar para determinar *TIA*, recomendado por la AOCS (American Oil Chemists' Society), se basa en la capacidad de inhibición de tripsina que presentan extractos de harina de soja frente al sustrato cromogénico α -*N*-benzoilo-DL-arginina-*p*-nitroanilida [274]. La cantidad formada del producto de reacción *p*-nitroanilida, formado durante 10 min de reacción, es determinada midiendo la absorbancia en presencia y ausencia del extracto de harina, obteniéndose una diferencia relacionada con la *TIA* de esa harina. Este es un método discontinuo o de punto final, en el que la enzima (tripsina) es

inactivada después de transcurrido el tiempo de reacción (10 min) por disminución del pH con adición de ácido acético. El ensayo en su totalidad presenta cierta complejidad y no es lo suficientemente práctico como método de control de calidad en un proceso industrial. Éste presenta diversas desventajas [310,311] como se menciona a continuación. El reactivo para detener la reacción (ácido acético) causa desnaturalización no solo de la tripsina, sino también de las proteínas extraídas, produciendo turbidez, la cual debe ser reducida por un paso subsiguiente de clarificación (filtración/centrifugación). Se requiere un blanco adicional en el que el sustrato es adicionado luego del ácido para sustraer la turbidez remanente. Sumado a esto, cada determinación comprende la preparación de varias diluciones de prueba procurando alcanzar una concentración que presente una inhibición entre 40-60% del total de actividad de la tripsina, con el objetivo de minimizar el error en la determinación. Finalmente, este ensayo presenta una de las desventajas propias de todo método discontinuo, y es que al no hacerse un seguimiento del progreso de la reacción con el tiempo, no es posible detectar eventuales irregularidades como la pérdida de linealidad, presencia de un tiempo de latencia, etc. [312].

Propiedades bioactivas potenciales

Gibbs y col. (2004) [33] identificaron varios péptidos bioactivos en alimentos de soja hidrolizados. Las actividades variaron desde la inhibición de la enzima convertora de angiotensina-I (ECA) hasta la presencia de propiedades antioxidantes. Las condiciones operativas empleadas en el procesamiento de las proteínas aisladas, el tipo de hidrólisis y el grado de hidrólisis afectan las actividades biológicas [32]. Para exhibir sus efectos beneficiosos sobre la salud, los péptidos bioactivos deben ser liberados de la estructura primaria de las proteínas de los alimentos, donde permanecen unidos a otros aminoácidos. Además, la hidrólisis de proteínas también puede conducir a hidrolizados con propiedades tecno-funcionales mejoradas (por ejemplo, solubilidad, emulsificación, formación de espuma, detergencia y gelificación) [313]. La liberación de péptidos bioactivos se logra mediante la degradación de las proteínas originales con compuestos químicos (por ejemplo, ácidos y álcalis) o enzimas. La proteólisis causada por enzimas es preferible a la hidrólisis química ya que: i) la reacción se lleva a cabo en condiciones suaves de pH (4-8) y temperatura (40-60 °C), ii) se evitan reacciones secundarias debido a la alta especificidad de las enzimas, y iii) los péptidos obtenidos mantienen su valor nutritivo [314]. Emplear una enzima apropiada y tener un buen control de las condiciones de procesamiento (por ejemplo, pH, temperatura, relación enzima/proteína y tiempo) son aspectos críticos para la producción de hidrolizados de proteína con las propiedades requeridas [314]. De hecho, estas variables de proceso determinan el grado de la reacción de hidrólisis para un sistema

enzima-proteína. Esto normalmente se indica por el grado de hidrólisis (*GH*), que se define como el porcentaje de enlaces peptídicos escindidos.

En el proceso de hidrólisis enzimática, la especificidad de la enzima utilizada es particularmente importante. Esto se debe a que afecta el tamaño, la cantidad, la composición de aminoácidos y la secuencia de aminoácidos de los péptidos producidos, lo que a su vez influye en las propiedades bioactivas y funcionales de los hidrolizados [315]. Las proteasas industriales derivadas de diferentes fuentes, como los microorganismos (Alcalase, Neutrase, Protease P "Amano" 6, Flavourzyme, Protamex) [316,317], animales (PTN, pepsina, tripsina, quimotripsina-a, pancreatina) [318,319] y plantas (cardosina, papaína, bromelina) [320–322] han sido ampliamente utilizadas para la producción de hidrolizados de proteínas que exhiben propiedades bioactivas y/o funcionales. Estas proteasas comerciales pueden contener principalmente endopeptidasas (por ejemplo, tripsina, subtilisina, papaína), o una combinación de endopeptidasas y exopeptidasas (por ejemplo, carboxipeptidasas, aminopeptidasas). Según varios estudios, Corolase PP (complejo proteolítico de calidad alimentaria, producido a partir de páncreas porcino) es uno de los complejos enzimáticos comerciales más apropiadas para producir hidrolizados derivados de proteínas lácteas con actividad antioxidante [323] y actividad antihipertensiva [324]. Aunque existen algunos estudios sobre hidrolizados de soja que utilizan diferentes enzimas, hasta el momento de realizado este trabajo no se había reportado ningún estudio aplicando Corolase PP.

En este marco, consideramos relevante incluir a las propiedades bioactivas o de producción de hidrolizados bioactivos (proteasas comerciales, así como las propias del sistema gastrointestinal) como parámetros de calidad de los productos finales de los diferentes procesos de detoxificación y sumarlos a los demás indicadores (contenido proteico y de antinutrientes). Sumado a esto, vimos una oportunidad clara de mejora de la metodología de dosaje de *TIA*, generando una ventaja analítica para el trabajo a realizar en esta tesis y como herramienta para la industria en general.

Como mapa de ruta del presente capítulo, se plantearon los siguientes interrogantes: *¿Podrá medirse TIA de manera continua? ¿Cómo se expresarán los resultados? ¿Cuál será la ventaja de esto en relación al método estándar? ¿Cómo serán las capacidades antioxidantes y antihipertensivas de la proteína nativa de soja? ¿Podrán estas bioactividades mejorarse con la hidrólisis? ¿Podrán estas propiedades aplicarse como parámetros de calidad proteica?*

5.1. MÉTODO CONTINUO PARA DETERMINAR ACTIVIDAD INHIBIDORA DE TRIPSINA EN HARINA DE SOJA

5.1.1. Método propuesto vs método estándar

Muestras de harina de soja con diferente actividad de IT fueron analizadas simultáneamente por ambos métodos, el estándar (discontinuo) y el propuesto (continuo), descritos en las Secciones 3.2.8 y 3.2.9, y sus resultados fueron comparados. Tanto la harina comercial como la industrial se sometieron a diferentes procesos de inactivación térmica para reducir moderadamente su actividad de IT y lograr así muestras con un rango más amplio de actividades. Los resultados obtenidos pueden observarse en la Tabla 5.1.

Tabla 5.1. Comparación de valores de TIA obtenidos por los métodos estándar (discontinuo) y propuesto (continuo)

Muestra	Tratamiento ^a	Ensayo					
		Estándar ^b			Propuesto ^c		
		TIA	SD	CV	TIA	SD	CV
1- Mol	S/T	43420	1091	2,5	41193	2363	5,7
2- Mol	80 °C, 1h	39874	642	1,6	41122	1822	4,4
3- Mol	100 °C, 1,5 h	30310*	508	1,7	23960*	966	4,0
4- Mol*	S/T	1352	92	6,8	2673	212	7,9
5- Com	S/T	31463	773	2,5	33067	991	3,0
6- Com	100 °C, 2,5 h	25340	341	1,3	26862	1002	3,7

Mol, harina de soja desgrasada blanca (no desactivada) suministrada por Molinos Rio de la Plata SA; Mol*, harina de soja desgrasada tostada (desactivada) suministrada por Molinos Rio de la Plata SA; Com, harina de soja adquirida en un comercio local.

^aEspecificaciones (temperatura y tiempo de incubación) de los procesos de desactivación realizados en laboratorio. S/T, sin tratamiento

^bEnsayo estándar: condiciones de reacción descritas en Sección 3.2.9.

^cEnsayo propuesto: condiciones de reacción descritas en Sección 3.2.10, tiempo de reacción 10 min.

*Valores significativamente diferentes en la misma fila, para un nivel de significancia de 0,05.

TIA, SD y CV: media (TIU/g), desvío estándar (TIU/g) y coeficiente de variación (%) de triplicados.

Los valores obtenidos mediante el método estándar para las harinas sin tratamiento o con tratamiento térmico en las condiciones más suaves, mostraron las mayores TIAs. Los valores obtenidos, alrededor de 40000 TIU/g, estuvieron en concordancia con los valores reportados previamente por otros autores [325–328]. Cabe mencionar que, en la literatura puede encontrarse un amplio rango de resultados de actividad antitriptica dependiendo de la especie de leguminosa, su estado de maduración y las condiciones ambientales durante la temporada de cultivo. A pesar de que las muestras desactivadas en nuestro laboratorio fueron sometidas a calentamiento en seco, durante prolongados períodos de tiempo y

temperaturas moderadas (80 °C) y altas (100 °C) obteniéndose *TIA*s significativamente inferiores a las de las muestras no tratadas, la harina desactivada por la empresa Molinos Río de la Plata SA (Mol*) mostró los valores más bajos de *TIA*.

Las muestras 1, 2, 3, 5 y 6 tuvieron que ser diluidas convenientemente (1:20), mientras que la muestra 4 no requirió de dilución, para cumplir con la condición de que sus absorbancias fuesen 0,4 - 0,6 veces del valor del control. Este requerimiento lo establece el método estándar para minimizar el error en la medición [275], siendo necesario para ello llevar a cabo ensayos adicionales (prueba y error) con el consiguiente gasto de tiempo y reactivos.

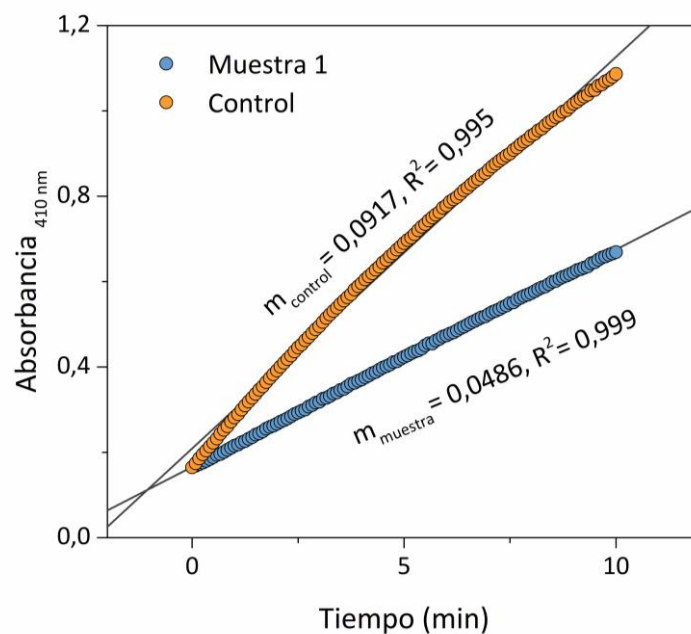


Figura 5.1. Curva típica del progreso de reacción con el método propuesto (continuo) para una dada muestra (muestra de harina n° 1) y control.

Las curvas de reacción obtenidas en el método continuo siguen un patrón similar al de la Fig. 5.1. Como era esperable, la pendiente de la curva ajustada para la muestra (m_{muestra}) fue menor a la del control (m_{control}) para todas las harinas ensayadas debido a la inhibición de la actividad de la tripsina causada por los ITs presentes en las harinas de soja. Los valores de pendiente reemplazados en la ecuación 3.15 permitieron obtener la magnitud de *TIA* en TIU/g, de manera similar al método estándar. Al comparar los resultados obtenidos por ambos métodos para las mismas muestras, utilizando para ello el análisis de sus varianzas (ANOVA), no se encontraron diferencias significativas en la mayoría de las muestras. Para la muestra 4, fue llamativo que la diferencia no fuera significativa a partir del test de Tukey, teniendo en cuenta los valores de ambas medias

(entre el método continuo y el discontinuo) y sus pequeños desvíos. Para aclarar este punto, es importante notar que este test ajusta los intervalos de confianza para permitir comparaciones entre todos los pares de medias. Se utiliza la t de Tukey en lugar de la t de Student en los cálculos, siendo la primera $(1/\sqrt{2})$ veces el rango de distribución estudentizado. El procedimiento de Tukey es más conservador que, por ejemplo, el de Fisher LSD, dado que hace más difícil declarar a un par particular de medias como significativamente diferentes [329], disminuyendo así la posibilidad de incurrir en un error de tipo I en la estimación de la significancia.

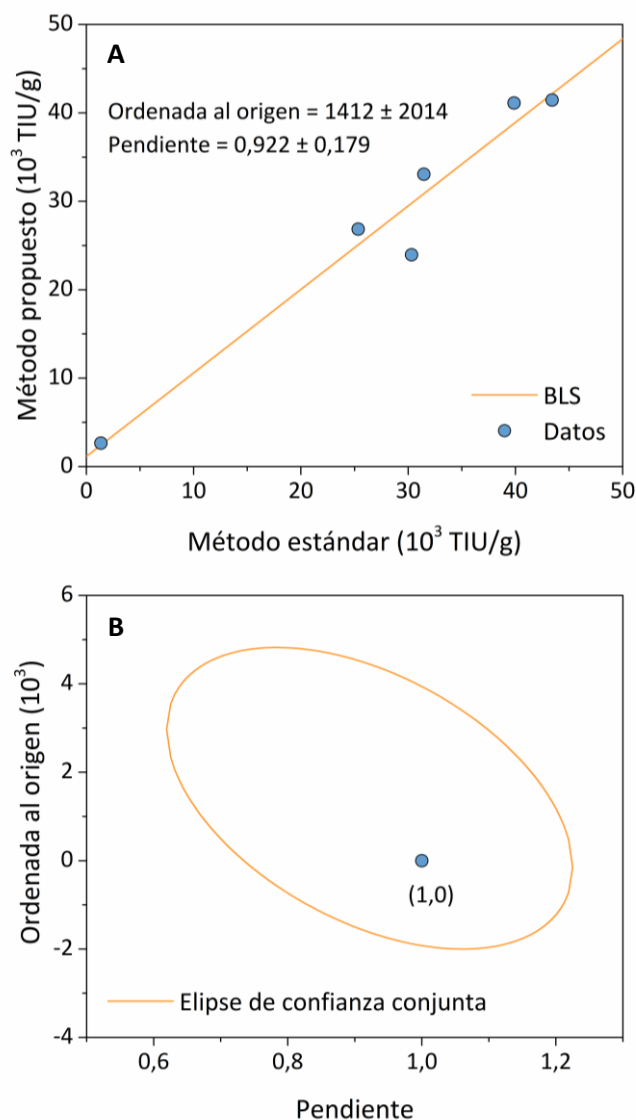


Figura 5.2. A) TIA para las muestras de harina mediante ambos métodos, estándar y propuesto (puntos) y curva de regresión de BLS (línea sólida) junto con sus parámetros (pendiente e intersección) y sus correspondientes intervalos de confianza (0,05 de nivel de significancia). **B)** Región de confianza conjunta a partir del método BLS y representación del punto determinado por los valores teóricos de pendiente e intersección (1, 0).

Adicionalmente a las comparaciones individuales de las muestras, se realizó un análisis comparativo de ambos métodos (ver Sección 3.2.29). La Fig. 5.2 A muestra la curva de regresión obtenida por el método de los *mínimos cuadrados bivariado* (BLS), donde la abscisa representa los valores de *TIA* obtenidos por el método discontinuo y la ordenada representa los valores obtenidos por el método continuo. El intervalo de confianza tanto para la pendiente como para la ordenada al origen (ver recuadro Fig. 5.2 A) contiene al valor teórico correspondiente (1 y 0 respectivamente), lo que sugiere que el método estándar y el propuesto son comparables. Sin embargo, esto podría ser una conclusión errónea al ignorarse una eventual correlación entre la pendiente y la ordenada al origen [295]. Por ello, Franco y col. (2002) [295] sugirieron calcular la *región elíptica de confianza conjunta* (EJRC, por sus siglas en inglés) de estos parámetros, la cual se representa en la Fig. 5.2 B. A partir de esta gráfica puede inferirse que no hay un sesgo constante y proporcional, dado que el punto (1, 0) está contenido en la mencionada región. Esto indica que la pendiente y la ordenada al origen no difirieron estadísticamente de 1 y 0 respectivamente, permitiéndonos confirmar la equivalencia entre ambos métodos. Sumado a esto, Van de Velde y col. (2012) [330] demostraron que cuando el punto óptimo (1, 0) está incluido en la EJRC, se ha logrado una buena exactitud con el método propuesto.

En la Tabla 5.1 pueden observarse también los coeficientes de variación (CV) correspondientes a las diferentes medidas de *TIA*. Se ve claramente que los CV (%) correspondientes a las medidas del método propuesto son mayores a los del método estándar. Este hecho podría atribuirse a las diferentes condiciones operacionales correspondientes a cada método. Comúnmente, los métodos continuos se llevan a cabo secuencialmente, es decir que se realiza el procesamiento de una muestra por vez, mientras que en los discontinuos pueden procesarse varias muestras en simultáneo. En consecuencia, estos últimos permiten mantener condiciones operacionales prácticamente idénticas para cada muestra en un dado lote o corrida (15 determinaciones/lote en nuestro caso), lo que minimiza la variabilidad derivada de reactivos poco estables y factores ambientales que pueden modificarse durante el tiempo de trabajo. Teniendo en cuenta lo antes expuesto, el CV (%) del método continuo podría reducirse utilizando un espectrofotómetro con celdas múltiples o un lector de microplacas, capaz de leer hasta 96 muestras en simultáneo.

A pesar que una reducción del CV (%) sería deseable, cabe mencionar que los CV (%) observados con el método propuesto no superaron el 8% para ningún nivel de actividad. El CV (%) representa una medida de la precisión y su valor no debe exceder el

15% en la validación de un método bioanalítico [331], condición alcanzada por cada valor observado en el presente estudio (Tablas 5.1 y 5.2).

5.1.2. Análisis de la curva de reacción y linealidad del ensayo

Al analizar la forma de la curva del progreso de la reacción (Fig. 5.1), fue notorio que la gráfica de *Abs* vs. tiempo resultó lineal en presencia de IT (muestra), sin embargo, fue ligeramente curvada en ausencia de IT (control). Mediante el análisis estadístico de las seis réplicas se observó una falta de ajuste significativa de los datos al modelo lineal. Esto sugirió considerar un modelo polinomial de mayor grado, encontrando un ajuste adecuado en un modelo polinomial cuadrático ($R^2 = 0,998$):

$$Abs = 0,0278521 + 0,0020113 t - 7,41739 \cdot 10^{-7} t^2 \quad (5.1)$$

donde *Abs* es la absorbancia y *t* el tiempo en segundos.

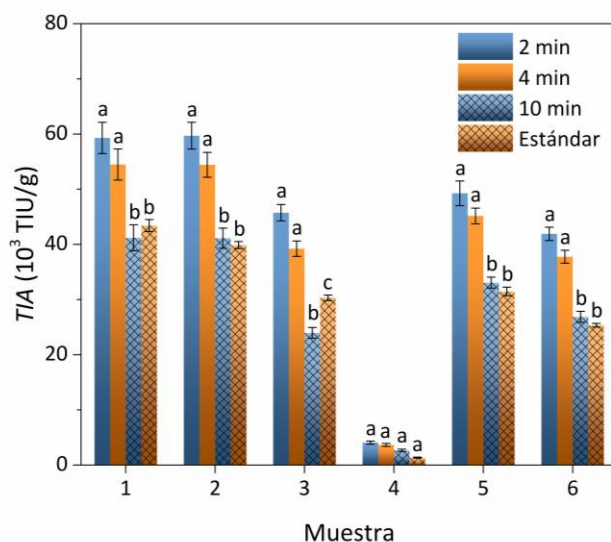


Figura 5.3. Efecto de la reducción del tiempo de reacción sobre los valores de *T/A* obtenidos por el método continuo (2, 4 y 10 min) y en comparación a los valores del método discontinuo. Los números de muestra se corresponden con la Tabla 5.1. Para cada muestra, las columnas que comparten la misma letra (a, b, c) no difirieron significativamente en sus medias, dado el análisis de sus varianzas (ANOVA) con la prueba de rangos múltiples de Tukey para un nivel de significancia de 0,05.

La no-linealidad de la curva control, sugiere que la degradación del BAPNA por la tripsina no tiene lugar bajo condiciones de saturación más allá de los 10 minutos de incubación. En presencia de IT, sin embargo, para la curva de la muestra no se observó falta de ajuste al modelo lineal. Bajo estas condiciones operacionales, los ITs se unen a la tripsina y, por lo tanto, la cantidad de enzima libre que es capaz de reaccionar con BAPNA es lo suficientemente baja como para hacer saturante la concentración de trabajo del sustrato. La no-linealidad de la curva de reacción (en ausencia de IT), así como sus posibles causas han

sido reportadas por otros autores [311]. Independientemente de dichas causas, la mencionada curvatura conduce a resultados subvalorados y, en consecuencia, a un rango de linealidad del método más acotado. Para corregir esto, sería necesario realizar un análisis más profundo y recalcular volúmenes y concentraciones de reactivos, y precisar sus características de pureza.

Con el objetivo de alcanzar la condición de linealidad cambiando mínimamente las condiciones experimentales, evaluamos tiempos de seguimiento de la reacción más cortos y su efecto en los resultados de *TIA*. Para ese propósito, reprocesamos todos los datos obtenidos previamente para el ensayo continuo a 10 min, acotándolos a sólo 2 y 4 min de reacción (Fig. 5.3). En el análisis de la curva control, se observó que, para una reacción de 4 min, a pesar de no presentar carencia de ajuste al modelo lineal, continúa teniendo mejor ajuste con un modelo cuadrático. Sin embargo, al considerar 2 min de reacción, la estadística (ANOVA) demostró que la relación lineal de los datos es el modelo de regresión más apropiado.

Como era de esperar, los valores de *TIA* aumentan significativamente al reducir el tiempo de reacción, a excepción de la muestra 4 (Fig. 5.3). A partir de nuestros cálculos se observó que, el incremento en *TIA* resulta principalmente del incremento en la pendiente de la curva control (m_{control}) dado que las curvas de las muestras no alteran pendientes (m_{muestra}) a pesar de la reducción de tiempo de reacción.

Tabla 5.2. Comparación de rangos lineales para los métodos propuesto (continuo), a diferentes tiempos de medición, y estándar (discontinuo).

F_D^\dagger	Ensayo											
	Propuesto									Estándar		
	2 min			4 min			10 min					
	<i>TIA</i>	SD	CV	<i>TIA</i>	SD	CV	<i>TIA</i>	SD	CV	<i>TIA</i>	SD	CV
0,6	53068 ^a	2073	3,9	49799 ^a	2936	5,9	36463 ^a	2294	6,3	45067 ^a	1554	3,4
1,0	52390 ^a	1527	2,9	48764 ^a	916	1,9	39664 ^b	429	1,1	41687 ^a	858	2,0
1,4	54705 ^a	3292	6,0	52089 ^a	2845	5,5	45139 ^{a,b}	455	1,0	48264 ^{a,b}	477	1,0
1,8	52988 ^a	1034	2,0	50299 ^a	1088	2,2	41706 ^{a,b}	1349	3,2	43980 ^b	446	1,0

[†]Diluciones de muestra 1, calculadas como la relación entre el volumen de sobrenadante ensayado y el correspondiente al protocolo de cada método.

^{a,b} Valores de la misma columna que comparten superíndice no presentan diferencias estadísticas entre sí, dado el análisis de sus varianzas (ANOVA) con la prueba de rangos múltiples de Tukey para un nivel de significancia de 0,05.

TIA, SD y CV: media (TIU/g), desvío estándar (TIU/g) y coeficiente de variación (%) de triplicados.

En este punto, se evaluó si la reducción de los tiempos de incubación implicaría cambios en el rango de linealidad del método. Se realizaron los ensayos estándar (10 min de incubación) y propuesto a diferentes tiempos de incubación (2, 4 y 10 min) para un amplio rango de diluciones (0,6; 1,0; 1,4 y 1,8) de una misma muestra (muestra 1). Los resultados (Tabla 5.2) indicaron que sólo el ensayo continuo a 2 y 4 min conduce a valores que no difieren estadísticamente para todas las diluciones. Por otro lado, la incubación a 10 min conduce a valores significativamente diferentes tanto para el método continuo como el discontinuo. De acuerdo con estos hallazgos, la reducción en el tiempo de reacción puede considerarse una buena alternativa, no solo por hacer más rápido el ensayo sino también por ampliar el rango lineal. Esto ocurre por un incremento en la sensibilidad del método al cambio de respuesta por unidad de actividad, es decir a la mayor pendiente de la recta de regresión.

5.2. BIOACTIVIDAD DE LA PROTEÍNA DE SOJA

Como indicadores de calidad, además del contenido de antinutrientes, se consideraron dos tipos de bioactividades muy estudiadas en la actualidad, las capacidades antioxidante y antihipertensiva. En un enfoque inicial, se tomó como modelo de estudio a la proteína aislada de soja (SPI, Fig. 5.4), simplificando así la matriz en estudio. Sobre el SPI se efectuó una hidrólisis, procedimiento que generalmente conduce a un aumento de dichas bioactividades [332], a modo de definir y adaptar las técnicas a aplicar en la evaluación de la calidad nutricional de las harinas y concentrados proteicos de soja.



Figura 5.4. Aislado proteico de soja (SPI) producido en este trabajo.

Diferentes reportes han demostrado que el calentamiento de las proteínas de soja por encima de 70 °C provoca la disociación de sus estructuras cuaternarias, desnaturaliza

sus subunidades, y promueve la formación de agregados proteicos a través de mecanismos electrostáticos, hidrofóbicos y de intercambio de disulfuros [333]. La glicinina tiene un punto de transición térmica (desnaturalización) de 92 °C, superior al del otro componente mayoritario del aislado de proteína de soja (SPI), la β -conglucina, cuyo valor es 72°C. Basado en esto, fueron elegidas dos condiciones para producir el aislado, controlando temperatura y tiempo (70 °C, 1 h; 90 °C, 30 min), ambas cercanas a las temperaturas de desnaturalización de las 2 globulinas mencionadas. Así se obtuvieron los SPIs correspondientes, designándose como SPI70 y SPI90 según la temperatura de extracción. Adicionalmente, se produjo un aislado a temperatura ambiente para usar como control en la cromatografía de exclusión molecular que se reporta en párrafos subsiguientes.

Luego del tratamiento con Corolase PP, según lo descrito en la Sección 3.2.12, los hidrolizados finales de SPI fueron nombrados SPH70 y SPH90, respectivamente, según la condición de extracción aplicada.

5.2.1. Hidrólisis

Como se muestra en la Fig. 5.5, el progreso de este proceso se evaluó mediante la determinación del grado de hidrólisis (*GH*) a diferentes tiempos de muestreo (30 min, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10 y 24 h).

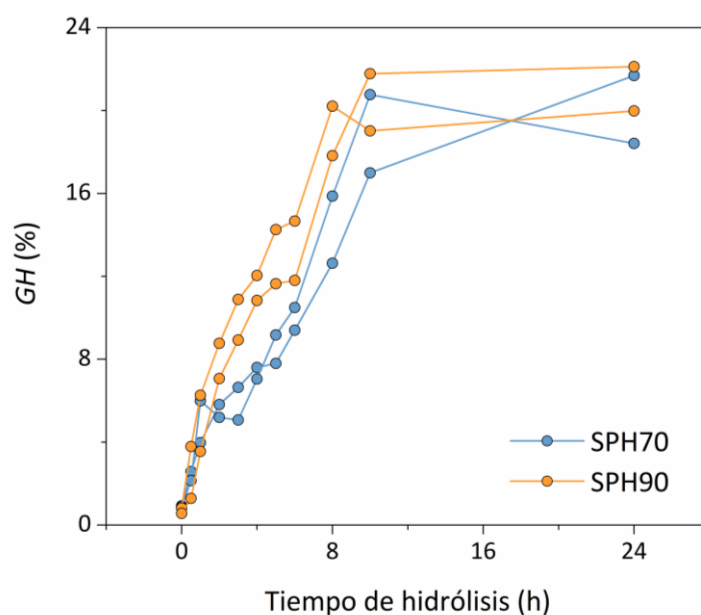


Figura 5.5. Grado de hidrólisis (*GH*) de los hidrolizados de SPI con Corolase PP (SPH70 y SPH90) en función del tiempo de hidrólisis. Los datos unidos por líneas corresponden a las observaciones longitudinales para una misma ejecución.

Dado que en los datos recolectados la variable respuesta se registra más de una vez para cada tiempo seleccionado, se consideran del tipo de “medidas repetidas”, analizándose mediante el procedimiento de “Modelos Lineales Generalizados”. Los modelos demostraron una correlación significativa entre las observaciones ($P < 0,001$), aunque sólo explicaron el 71% de la variabilidad de los datos ($R^2 = 0,711$). Mientras que entre las réplicas no se observaron diferencias, sí la hubo entre ambos SPHs, aunque ésta fue mínima ($P \sim 0,050$). Sin embargo, a pesar de SPH90 conseguir mayores valores de *GH* (principalmente entre las 2 y 8 h), el comportamiento para tiempos más largos no difirió entre los SPHs ($P > 0,900$). Como se observa en la Fig. 5.5, el *GH* alcanza $10,0 \% \pm 0,6$ y $13,2 \% \pm 1,4$ para SPH70 y SPH90 respectivamente, a las 6 h. Estos valores son similares a los obtenidos por Chiang y col. (2006) [334] para pepsina y tripsina (10,5 y 10 %, respectivamente) pero menores que los producidos por las proteasas comerciales Alcalase y Flavourzyme (18 y 23 %, respectivamente) al mismo tiempo de hidrólisis de una dispersión al 3 % (m/V) de SPI (de harina de soja desactivada) y con una proporción de proteasa/SPI de 1 % m/m (hidrólisis realizada bajo condiciones óptimas de temperatura y pH, sugeridas por los proveedores). Aunque las dispersiones utilizadas en nuestro trabajo fueron un tercio del contenido de SPI (1% m/V), la Corolase PP fue capaz de romper un número de enlaces peptídicos similar al que rompieron la pepsina y tripsina (enzimas con alta actividad proteolítica), evidenciando así una mayor eficiencia que dichas enzimas en cuanto a la cantidad de proteína hidrolizada. Sin embargo, a pesar de este buen desempeño, no consiguió alcanzar el alto poder proteolítico de la Alcalase ni Flavourzyme.

La Fig. 5.5 muestra además que *GH* aumenta en forma sostenida hasta alcanzar un valor máximo de $18,9 \% \pm 1,9$ para SPH70 y $20,4 \% \pm 1,4$ para SPH90 a las 10 h, sin mostrar diferencias significativas después de las 24 h en ambos casos. De acuerdo con Lee (2011) [335], la hidrólisis de SPI por encima de un cierto límite (más de 8 %) resulta en la liberación de péptidos que provocan amargor. Por lo tanto, el uso de SPH en aplicaciones de alimentos es limitado debido a los efectos adversos del sabor amargo causado por hidrólisis sobre la calidad sensorial. En consecuencia, es importante mantener una hidrólisis controlada y limitada para conseguir las propiedades funcionales y bioactividad deseadas, con una producción reducida de amargor.

5.2.2. Caracterización de los hidrolizados peptídicos

5.2.2.1. Cromatografía de filtración por geles

La Fig. 5.6 muestra la distribución de tamaños moleculares de los SPIs extraídos a 70 y 90 °C (SPI70 y SPI90, Figs. 5.6A y B) y sus SPHs (SPH70 y SPH90, Figs. 5.6C, D, E y F).

Como se ve en las Figs. 5.6A y B, SPI70 y SPI90 se compararon con el SPI extraído a temperatura ambiente (SPI25). Se observan las principales globulinas, glicinina (pico 1, con un volumen de retención de unos 7,2 mL, correspondiente a una estructura hexamérica de masa molecular media de 360 kDa) y β -conglucina (pico 2, volumen de retención alrededor de los 9,6 mL, correspondiente a una estructura trimérica de masa molecular de 180 kDa). Para SPI70, que fue sometido a un calentamiento próximo al punto de transición de la β -conglucina, se observa una disminución del contenido de la estructura cuaternaria de esta globulina (pico 2) y la aparición de sus subunidades globulares disociadas (pico 3). En el SPI90, la influencia de la temperatura por encima del punto de transición de β -conglucina resultó en la ausencia total del pico 2, lo que demuestra la disociación de las estructuras cuaternarias casi por completo.

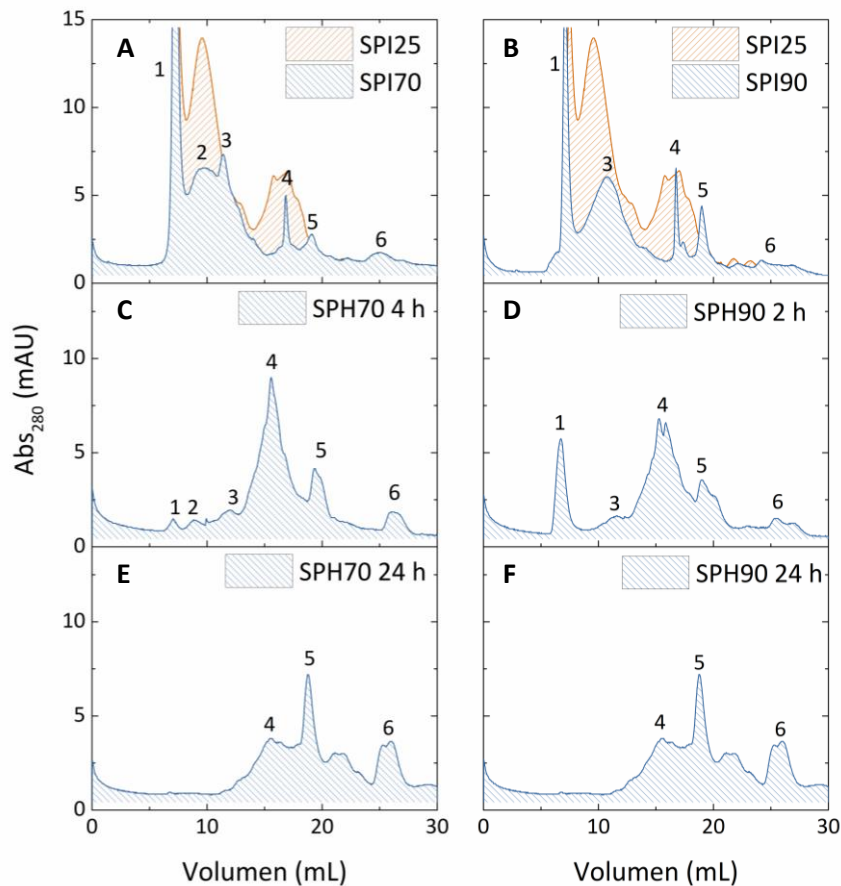


Figura 5.6. Cromatogramas de exclusión molecular típicos de **A)** SPI25 y SPI70, **B)** SPI25 y SPI90, **C)** SPH70 a las 4 h, **D)** SPH90 a las 2 h, **E)** SPH70 a las 24 h y **F)** SPH90 a las 24 h, a 280 nm. 1: estructura cuaternaria de glicinina; 2: estructura cuaternaria de β -conglucina; 3: subunidades globulares (glicinina y β -conglucina); 4-6: fracciones peptídicas.

Como se muestra en las Figs. 5.6C, D, E y F, el perfil cromatográfico de los SPHs muestra una desaparición de la estructura cuaternaria compacta y de las subunidades de las globulinas (reducción de los picos 1, 2 y 3), y la generación de péptidos de bajo peso

molecular (aparición/crecimiento de los picos 4, 5 y 6) a medida que el tiempo fue transcurriendo. Las globulinas tienden a desaparecer casi por completo después de 4 h para SPH70 y de 2 h para SPH90. A las 24 h, se observa que el pico 4 también desapareció incrementándose los picos 5 y 6. Esto sugiere la hidrólisis de los péptidos del pico 4 y la generación de otros con masas moleculares inferiores a 3 kDa (picos 5 y 6). En concordancia con lo observado en nuestro trabajo, la hidrólisis de una dispersión de SPI al 3 % con una mezcla de Flavourzyme:Alcalase (2,5 % 3:2/sustrato - m/m) produjo hidrolizados principalmente compuestos de aminoácidos y pequeños péptidos con masas moleculares menores a 4 kDa [66].

5.2.2.2. SDS-PAGE

Como método alternativo o complementario para caracterizar el perfil de tamaños moleculares de las muestras, se llevó a cabo una SDS-PAGE, cuyos resultados se muestran en la Fig. 5.7. Puede apreciarse que las bandas de las subunidades de β -conglucina y glicina están presentes en ambas muestras no hidrolizadas (Fig. 5.7, calles 10 y 11 para SPI70 y SPI90 respectivamente), en concordancia con las bandas observadas en otros trabajos [336,337]. Las subunidades de glicina se observan prácticamente intactas en el SPH70 a los 30 min, 2 y 4 h, mientras que las bandas de β -conglucina fueron hidrolizadas a partir de los 30 min hasta casi desaparecer a las 4 h (Fig. 5.7 calles 2, 4 y 6). Para SPH90, las subunidades de glicina se mantuvieron intactas a los 30 min, pero casi desaparecieron a las 4 h de hidrólisis (Fig. 5.7 calles 3, 5 y 7). Las bandas de β -conglucina de SPH90 comenzaron a disminuir a los 30 min, desapareciendo completamente después de 2 h (Fig. 5.7 calles 3, 5 y 7). De acuerdo con reportes previos [337], las subunidades básicas de la glicina en SPH90 parecen ser más susceptibles a la hidrólisis que las subunidades ácidas. Estas subunidades residen en el interior del complejo de la glicina sin desnaturalizar, quedando así menos expuestas al ataque enzimático, sin embargo, este comportamiento protector sólo ocurre hasta alcanzarse su punto de desnaturalización. SPH70 y SPH90 mostraron nuevas bandas a los 25 kDa y por debajo de 20 kDa, evidenciándose también péptidos pequeños en la parte inferior del gel (Fig. 5.7 calles 2-9). Para los SPHs a las 24 h, los péptidos más pequeños no pudieron ser resueltos por el gel (Fig. 5.7 calles 8 y 9). Puede observarse además una mayor susceptibilidad del SPH90 a ser hidrolizado en comparación con SPH70, lo que concuerda con lo observado previamente para hidrólisis enzimáticas de SPI desnaturalizado [336,338].

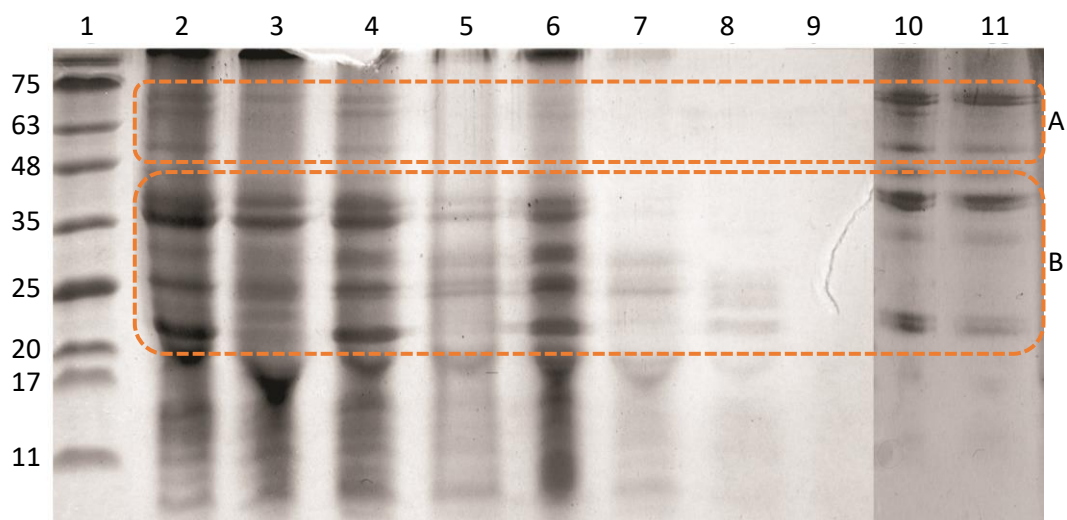


Figura 5.7. SDS-PAGE. Patrones de los SPIs y sus hidrolizados a diferentes tiempos (30 min, 2, 4 y 24 h). Calles: 1: marcador de pesos moleculares (kDa); 2: SPH70 a 30 min; 3: SPH90 a 30 min; 4: SPH70 a 2 h; 5: SPH90 a 2 h; 6: SPH70 a 4 h; 7: SPH90 a 4 h; 8: SPH70 a 24 h; 9: SPH90 a 24 h; 10: SPI70; 11: SPI90. A: subunidades de β -conglucina; B: subunidades de glicina.

5.2.3. Capacidad antioxidante de los hidrolizados

Según Neuzil y col. (1993) [339] la capacidad de las proteínas para actuar como compuestos antioxidantes puede atribuirse a su capacidad de capturar radicales libres. Se sabe que la hidrólisis enzimática mejora las propiedades nutricionales y funcionales de las proteínas. La especificidad de la proteasa determina la secuencia de aminoácidos de los hidrolizados, lo que influye en su actividad antioxidante. En el presente estudio, se evaluó el efecto protector de los SPHs contra peroxilos. La actividad antioxidante se midió mediante la metodología *ORAC*, descrita en la Sección 3.2.16. Los resultados se expresaron en relación al contenido de proteína de la suspensión inicial de SPI (Sección 3.2.15) y a la masa de harina de soja.

La actividad antioxidante de los hidrolizados fue mayor a la del control correspondiente. Ambos SPIs presentaron valores de *ORAC* (1,42 $\mu\text{mol TE/mg}$ proteína para SPI70 y 1,87 $\mu\text{mol TE/mg}$ proteína para SPI90) significativamente superiores a aquellos presentados por Tavares y col. (2011) [320] para un concentrado de proteína de suero de leche, α -lactalbúmina y caseinomacropéptido (0,195, 0,499 y 0,105 $\mu\text{mol TE/mg}$ proteína, respectivamente), e incluso mayores que los obtenidos para hidrolizados de α -lactoalbúmina con Cardosina (1,061 $\mu\text{mol TE/mg}$ proteína). En otro trabajo, Ranamukhaarachchi y col. (2013) [340] presentaron un estudio de SPI calentado (95 °C durante 5 min) y no calentado, con una hidrólisis secuencial de 90 min con pepsina y pancreatina, mostrando valores de 1,71 y 1,79 $\mu\text{mol TE/mg}$ respectivamente, y valores de 2,37 y 3,07 $\mu\text{mol TE/mg}$ para los respectivos permeados de ultrafiltración (fracciones

menores a 10 kDa). En comparación con ese trabajo, los SPHs totales (sin fraccionamiento por tamaño) con Corolase PP a las 2 h (120 min) alcanzaron valores comparables (2,47 $\mu\text{mol TE/mg}$ proteína para SPH70 y 3,23 $\mu\text{mol TE/mg}$ proteína para SPH90) a los permeados mencionados. Además, nuestros hidrolizados a las 4, 5 y 24 h para SPH70 y a las 2, 3, 4, 5, 8, 10 y 24 h para SPH90 presentaron los valores 3,26, 3,12 y 3,83 $\mu\text{mol TE/mg}$ y 3,29, 3,97, 3,19, 3,13, 3,39, 3,16 y 4,45 $\mu\text{mol TE/mg}$ respectivamente, superiores todos ellos a los del hidrolizado de α -lactoalbúmina obtenido con Corolase PP durante 24 horas a 37 °C en otro trabajo [283], cuyo valor de *ORAC* resultó ser 2,95 $\mu\text{mol TE/mg}$.

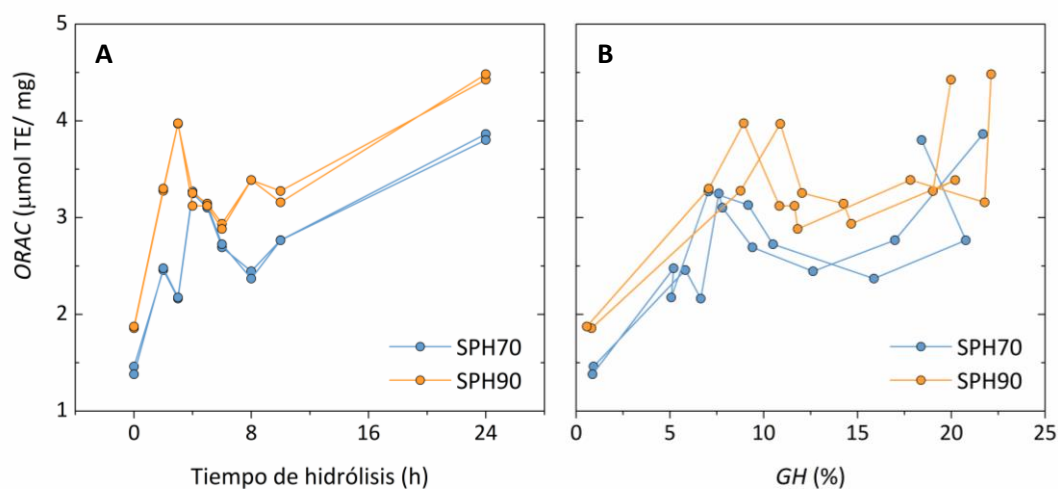


Figura 5.8. Actividad antioxidante *ORAC* de SPH70 y SPH90 en función del tiempo de hidrólisis (A) y del *GH* (B). Los datos unidos por líneas corresponden a las observaciones longitudinales para una misma ejecución.

Con el mismo criterio adoptado en la Sección 5.2.1, se aplicó un análisis del tipo de “Modelos Lineales Generalizados”. Los modelos demostraron una correlación significativa entre las observaciones ($P < 0,001$), aunque sólo se consiguió explicar el 59% de la variabilidad de los datos ($R^2 = 0,588$). Esta correlación indica que la capacidad antioxidante de los SPIs aumenta al ser hidrolizados. La Fig. 5.8A muestra la capacidad antioxidante en relación al tiempo. Si bien el patrón de captura de radicales peroxilo a lo largo del tiempo no fue diferente entre los SPHs ($P > 0,900$), SPH90 presentó valores mayores ($P < 0,005$). De acuerdo con Amigo-Benavent y col. (2008) [341], este tipo de actividad puede verse afectada en función de la intensidad del tratamiento térmico.

Al relacionar los valores observados de *ORAC* con el *GH* correspondiente a cada observación, como era de esperar, obtuvimos una correlación significativa ($P < 0,001$). Como se muestra en la Fig. 5.8B, los valores de *ORAC* aumentan con el *GH*, aunque los datos presentan una alta variabilidad que el modelo no consigue explicar en gran medida ($R^2 = 0,523$). Sin embargo, a partir de este análisis estadístico encontramos que no existen

diferencias entre los SPHs ($P > 0,200$). Esto quiere decir que la capacidad antioxidante no varía directamente según el tratamiento de extracción, sino que sólo depende del *GH* alcanzado, el cual sí se relaciona con el tratamiento.

5.2.4. Capacidad inhibitoria sobre la actividad de ECA

Muchos estudios han demostrado que el consumo de proteína de soja tiene varios efectos positivos sobre la salud, siendo una de estas características la actividad antihipertensiva [35]. La actividad antihipertensiva se basa fundamentalmente en la inhibición de la actividad de un regulador crucial de la presión arterial, la enzima convertora de angiotensina-I (ECA), la que puede elevar demasiado la presión arterial cuando es anormalmente activa, causando hipertensión [342]. En otros trabajos con hidrolizados de proteínas de soja se han identificado péptidos antihipertensivos [334,343].

Para la caracterización de la inhibición sobre la ECA (*iECA*) por SPIs y SPHs, se determinó el IC_{50} . Debe tenerse presente que un mayor valor de IC_{50} indica una menor *iECA*, ya que se requiere más proteína para lograr el 50% de inhibición de la enzima. Como muestra la Tabla 5.3, los SPIs no mostraron una inhibición significativa ($IC_{50} > 1000$ μ g proteína/mL), mientras que se observó una disminución significativa en la actividad de la ECA cuando ambos SPHs fueron analizados, indicando un interesante potencial inhibitorio.

Tabla 5.3. Resultados de grado de hidrólisis (*GH*) y actividad inhibitoria sobre la enzima convertora de angiotensina-I (ECA) de los hidrolizados totales, obtenidos de SPH70 y SPH90 a tres tiempos de hidrólisis diferentes.

Tiempo de hidrólisis (h)	Sustrato SPH70		Sustrato SPH90	
	<i>GH</i> (%)	<i>iECA</i> (IC_{50} , μ g/ mL)	<i>GH</i> (%)	<i>iECA</i> (IC_{50} , μ g/ mL)
0	0,90 \pm 0,03	>1000	0,69 \pm 0,13	>1000
2	5,51 \pm 0,31	274 \pm 3*	7,92 \pm 0,85	403 \pm 49*
4	7,33 \pm 0,28	221 \pm 22*	11,44 \pm 0,60	254 \pm 21*
10	18,88 \pm 1,89	237 \pm 14*	20,40 \pm 1,38	178 \pm 28*

Análisis de varianza fue usado para estimar el efecto la actividad inhibitoria de la ACE de cada sustrato: Test de Tukey: * $p < 0,001$, usando SPIs (SPI70 and SPI90) como hipótesis nula, Valores expresados como media \pm error estándar (SEM) ($n = 2$ tanto para grado de hidrólisis como actividad inhibitoria de la enzima convertora de angiotensina).

El incremento del *GH* no mostró ningún efecto significativo sobre esta bioactividad para SPH70, al contrario de lo observado para SPH90 entre las 2 y 4 h de hidrólisis. Los IC_{50} de SPH70 y SPH90 fueron 274-237 μ g proteína/mL y 403-178 μ g proteína/mL, respectivamente entre las 2-10 h de hidrólisis (Tabla 5.3). En trabajos anteriores se informó

la potencial actividad antihipertensiva de diferentes péptidos, presentes en hidrolizados proteicos de la leche y derivados de soja, con valores (33-930 µg proteína/mL) que se corresponden con los observados en este estudio [320,334,343]. De hecho, Cha and Park (2005) [343] reportaron una *iECA* de 120 µg proteína/mL para una hidrólisis de SPI de 18,54% de *GH* con la proteasa de *Bacillus sp.* SS103, actividad que se incrementó mediante ultrafiltración con una membrana de 10 kDa, hasta un valor de 48 µg proteína/mL. Por su parte, Chiang y col. (2006) [334] también informaron de un aumento de la actividad inhibidora sobre la ECA de 668 a 78 µg proteína/mL en un hidrolizado de SPI con Alcalase durante 6 h por medio de ultrafiltración con membrana de 10 kDa. Además, Hideaki y col. (1990) [344] reportaron el efecto antihipertensivo de un hidrolizado de caseína con un valor IC_{50} de 166 µg proteína/mL en ratas hipertensas. Estos resultados indican la potencial actividad antihipertensiva de nuestros hidrolizados y hacen previsible un posible incremento de dicha actividad vía un proceso de ultrafiltración, que concentre los péptidos de tamaños moleculares inferiores.

5.3. CONCLUSIONES PARCIALES

Se considerará como indicador principal del grado de detoxificación, en el procesamiento de la harina de soja, a la actividad de inhibición trípica, siguiendo los criterios normalmente aplicados en la industria. En base a los resultados obtenidos, consideramos que el método continuo propuesto en nuestro trabajo, cumple con los requisitos para el control de calidad, constituyendo una buena alternativa para reemplazar el método actualmente utilizado (discontinuo). Un tratamiento apropiado de los datos permite informar los resultados TIU/g de manera similar al método estándar, siendo esto importante a la hora de comparar resultados interlaboratorios. El método propuesto no requiere la adición de ácido acético para detener la reacción, por lo que no es necesario un paso de clarificación para reducir la turbidez, ni la elaboración de blancos de reactivos. Esto es de una gran importancia práctica, dado que permite reducir costos y tiempo empleado en la determinación. Adicionalmente, se propone la reducción del tiempo de reacción (2 min), al haberse demostrado que tal reducción amplía el rango lineal del método. En resumen, el método propuesto es más económico, rápido y simple que el método estándar.

Como segundo parámetro de calidad en el proceso de la harina, se considerará la bioactividad potencial en relación a las capacidades antioxidante y antihipertensiva de los productos. Los resultados obtenidos en el presente capítulo sugieren que las temperaturas de extracción ensayadas afectan el grado de desnaturalización de las proteínas, sin embargo, no se observa ningún impacto en el patrón final de las fracciones de péptidos

generados. La hidrólisis de SPI con Corolase PP aumenta considerablemente la capacidad antioxidante, alcanzando valores comparables o superiores a los reportados en otros trabajos con diferentes enzimas y sustratos. Este efecto positivo se observa también para la actividad *iECA*, mostrando valores de inhibición que sugieren una alta capacidad de inhibir a la enzima hipertensiva. Estos resultados sugieren que fue posible obtener por primera vez, con Corolase PP, hidrolizados de proteína de soja con potencial antioxidante e inhibidor de la ECA.

CAPÍTULO 6- Condiciones de proceso: análisis exploratorio

☞ IDEAS PREVIAS. INTERROGANTES

Los concentrados de proteína de soja (SPC) se preparan, a partir de soja descascarillada y desgrasada, eliminando principalmente, la mayoría de los constituyentes no proteicos solubles en agua, así como los que conforman las proteínas de suero de soja [345]. Los SPCs se producen por tres procesos básicos, es decir, lixiviación ácida (a pH ~ 4,5), extracción con etanol acuoso (60-90%) y desnaturalización de la proteína con calor húmedo antes de la extracción con agua [14,345]. Los concentrados neutralizados preparados por lixiviación ácida tienen un mayor contenido de proteína soluble en agua que los preparados por lixiviación con alcohol o por técnicas de desnaturalización térmica [345]. Si bien el proceso de lixiviado ha sido bastante estudiado, es necesario analizar empíricamente las variables más influyentes, tales como pH y tiempo, y definir sus rangos de aplicación en el presente trabajo [14,346].

Por otro lado, como ya se ha explicado, resulta importante poder extraer la mayor cantidad posible de isoflavonas (IFs) de la harina de soja. En ese sentido, la extracción con solventes ha sido ampliamente utilizada para la recuperación de IFs debido a su alta eficiencia, simplicidad y facilidad de escalado [347,348]. Las soluciones acuosas de metanol, etanol y acetona son disolventes típicos utilizados para este fin [349]. Recientemente, se ha evaluado una amplia gama de nuevos disolventes no tóxicos, no inflamables y biodegradables para desarrollar métodos de extracción sustentables y amigables con el ambiente [350]. Entre ellos, ciertos surfactantes reúnen las propiedades mencionadas, lo que representa una alternativa económica a solventes orgánicos caros y peligrosos. Las micelas presentes en los SMAs de estos surfactantes pueden interactuar con moléculas hidrófilas o lipófilas a través de interacciones hidrofóbicas, dipolares y enlaces de hidrógeno, siendo éstas características útiles para propósitos separativos [351]. Varios surfactantes tales como SDS, Triton X-100, PEG 2000 y Brij 35 han sido utilizados para extraer polifenoles de jugos de frutas [351,352]. En un trabajo previo, llevado a cabo en nuestro laboratorio [209], se demostró que los sistemas acuosos micelares bifásicos de Triton X-114 eran capaces, en condiciones adecuadas (tiempo, concentración y temperatura), de recuperar el 93% de las IFs de harina de soja con un factor de purificación casi de 10. Por otro lado, SMAs de GX se han aplicado con éxito para recuperar y cuantificar las vitaminas A y E de suero humano [261] y SMAs formados por Tg7 y Tg9 se han utilizado para extraer hidrocarburos aromáticos policíclicos de soluciones acuosas [210]. Con respecto a la recuperación de IFs, se informaron resultados disímiles. Los SMAs de GX mostraron un muy buen desempeño para extraer daidzeína de *Puerariae radix* [262] pero exhibieron un rendimiento pobre en la recuperación de IFs totales de soja [263]. Estas divergencias podrían deberse a la ausencia de un estudio completo de estos sistemas micelares como extractantes de isoflavonas soportado por herramientas estadísticas potentes.

En este contexto, el objetivo de este capítulo es la evaluación empírica de los factores más relevantes en el proceso de lixiviado de antinutrientes (particularmente IT) para la producción de SPCs, al mismo tiempo que comparar rigurosamente la eficiencia de la extracción de IFs con diferentes disolventes, centrando la atención en GX, Tg7 y Tg9 como potenciales extractantes micelares para fines industriales. Además, es necesario poder determinar los factores que afectan significativamente el rendimiento de extracción de IFs para poder trabajar en una estrategia que optimice el proceso.

Como mapa de ruta del presente capítulo, se plantearon los siguientes interrogantes: *¿Cómo afectarán el pH y el tiempo al lixiviado de IT y qué cantidad de proteína*

se perderá en el proceso? ¿Los SMAs de GX, Tg7 y Tg9 serán adecuados extractantes de IFs comparados con los solventes/soluciones típicas? ¿Cuáles serán las variables que más afectarán al proceso extractivo de IFs con SMAs?

6.1. EXTRACCIÓN ACUOSA DE IT: INFLUENCIA DE pH Y TIEMPO

6.1.1. Influencia del pH

Se realizaron extracciones con soluciones acuosas a pH creciente sobre harina de soja blanca. La Fig. 6.1A muestra los perfiles obtenidos de *Pt* y *TIA* en dicho proceso.

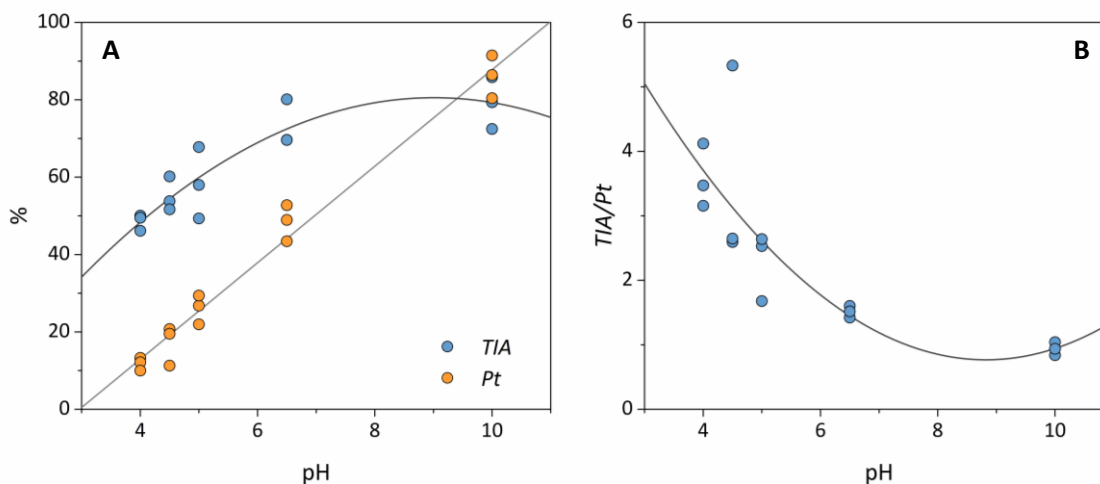


Figura 6.1. A) Dispersión de datos de *TIA* (%) y *Pt* (%) a pH creciente. **B)** Dispersión de datos de la relación *TIA/Pt* en función del pH. Las líneas sólidas representan los modelos polinomiales ajustados a cada respuesta.

Los resultados fueron analizados estadísticamente ajustando a diferentes modelos polinomiales, encontrando así un adecuado ajuste a un modelo polinomial de primer orden para *Pt*, mientras que para *TIA* fue de segundo orden. A partir de las observaciones efectuadas se deduce un comportamiento incremental de ambas respuestas con el pH, siendo que *Pt* aumenta de manera constante junto al pH, dentro del rango ensayado (entre 4 y 10), siguiendo una tendencia lineal, mientras que *TIA* aumenta casi linealmente entre pH 4-6 alcanzando luego un comportamiento de saturación entre pH 6-8 que se mantiene hasta pH 10. Como se observa en la Fig. 6.1B, la relación (cociente) entre estos parámetros (*TIA/Pt*) nos demostró que, si bien a altos pH es mayor la extracción absoluta de IT, a menor pH mayor es la eficiencia de extracción de IT en relación a la pérdida de contenido proteico de la harina. A modo de ejemplo, una lixiviación de 30 min a pH 4-4,5 y temperatura ambiente permite extraer cerca del 50% del inhibidor de tripsina con sólo una pérdida de alrededor del 10 % de las proteínas totales (solubles en NaOH 10 mM según Sección 3.2.18), mientras que a pH 10,0 se extrae el 80-90% de ambos componentes (Fig. 6.1). Las observaciones coinciden con lo ya bien establecido en materia de procesamiento de soja, particularmente en la producción de concentrados proteicos con soluciones ácidas a pH 4,5 [14].

6.1.2. Cinética de extracción a pH 4,5

Teniendo en cuenta lo observado precedentemente y siendo nuestro objetivo disminuir las pérdidas de contenido proteico en la harina de soja sometida a lixiviación, se analizó la cinética de extracción al pH en el que la solubilidad de las proteínas de soja es mínima, pH 4,5 [14,353].

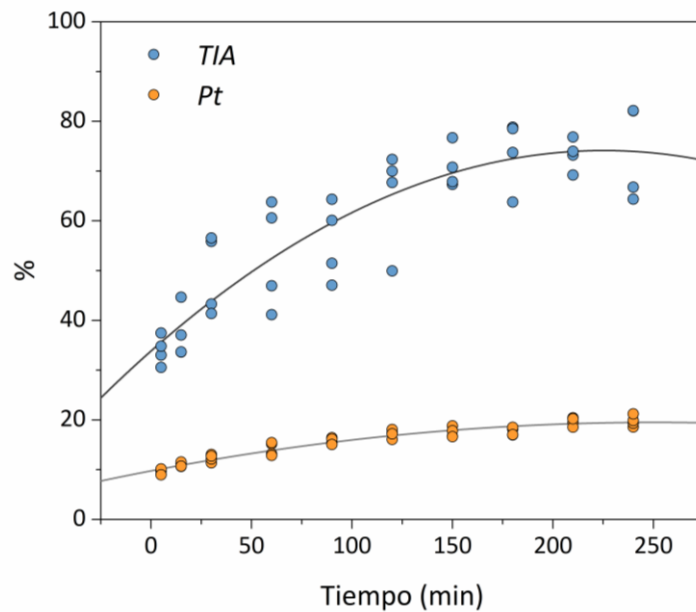


Figura 6.2. Cinéticas de extracción para *TIA* (%) y *Pt* (%). Los puntos representan las observaciones y las líneas sólidas los modelos de regresión ajustados.

La Fig. 6.2 muestra el progreso del proceso extractivo seguido a través de *Pt* y *TIA* en el tiempo. Las respuestas presentaron cinéticas que ajustan adecuadamente a modelos polinomiales de segundo orden. Estas observaciones indican que, a pH 4,5, el proceso de solubilización de las proteínas de la harina, y en particular IT, demostró un crecimiento cuadrático a lo largo del tiempo de ensayo, es decir un crecimiento más pronunciado en los primeros minutos (0-60 min), tendiendo a un valor de saturación (plateau) en los minutos finales. Sin embargo, en valores absolutos, fue mayor el incremento para *TIA* que el observado para *Pt*, mostrando de esta manera que a medida que el tiempo transcurre, aumenta *TIA/Pt* en las condiciones ensayadas. Este crecimiento de *TIA/Pt* también alcanza su valor máximo luego de los 60 min.

6.2. EXTRACCIÓN DE IF: ANÁLISIS EXPLORATORIO

6.2.1. Eficiencia extractiva de diferentes solventes

Se probó un conjunto de diferentes sistemas de solventes como extractantes de isoflavonas de soja. Se incluyeron solventes orgánicos tradicionales como metanol y etanol [263], y soluciones acuosas de diferentes surfactantes etoxilados. El contenido polifenólico total (*CPT*) de los diferentes extractos obtenidos, considerado una medida de la eficiencia de extracción de IFs, se representa en la Fig. 6.3A.

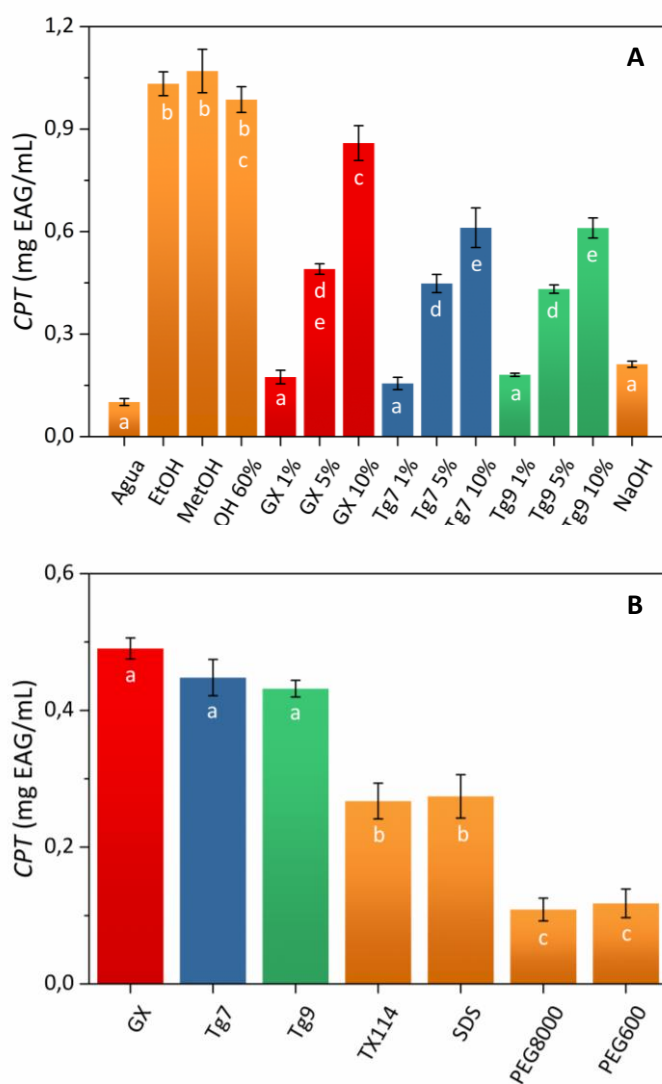


Figura 6.3. Comparación del contenido polifenólico total (*CPT*) en los extractos de: **A)** diferentes solventes y sistemas micelares acuosos; **B)** diferentes sistemas de surfactantes y soluciones de polímeros anfifílicos, todos a una concentración de 5% m/m. Las barras representan las medias de dos experimentos independientes. Las barras de error representan el desvío estándar de la muestra (SD). Los sistemas que comparten la misma letra (a, b, c, d y e) no presentan una diferencia significativa entre sus medias ($P > 0,05$) según los datos adquiridos.

Como se esperaba, según lo reportado en la literatura, el metanol y el etanol demostraron poseer una alta capacidad de extracción. Sin embargo, los sistemas formados por los alcoholes alifáticos etoxilados GX, Tg7 y Tg9 (10% m/m) también mostraron ser sistemas de extracción efectivos con *CPT* de $0,86 \pm 0,05$; $0,61 \pm 0,06$ y $0,61 \pm 0,03$ mg EAG/mL respectivamente, destacándose significativamente GX. Estos valores son varias veces superiores a los obtenidos con agua pura y la solución acuosa de NaOH. Este comportamiento parece estar estrechamente relacionado con el carácter anfifílico de los surfactantes y su capacidad de formar micelas, lo que permite la interacción con los grupos hidrófilos o lipófilos de la molécula de IF. Cabe destacar que las "soluciones" GX, Tg7 y Tg9 son en realidad sistemas heterogéneos "micelares", ya que las concentraciones de trabajo (1-10% m/m) son mucho más altas que sus respectivas *CMCs* ($4,6 \cdot 10^{-3}$; $3,9 \cdot 10^{-3}$ y $4,5 \cdot 10^{-3}$ m/m) como se especificó en la Sección 4.2.

Cuando se compara con otros sistemas micelares (Fig. 6.3B), la eficiencia extractiva de los POEs mencionados es aproximadamente dos veces mayor que la del TX114 y SDS, y el triple respecto a los polímeros anfifílicos PEG600 y PEG8000.

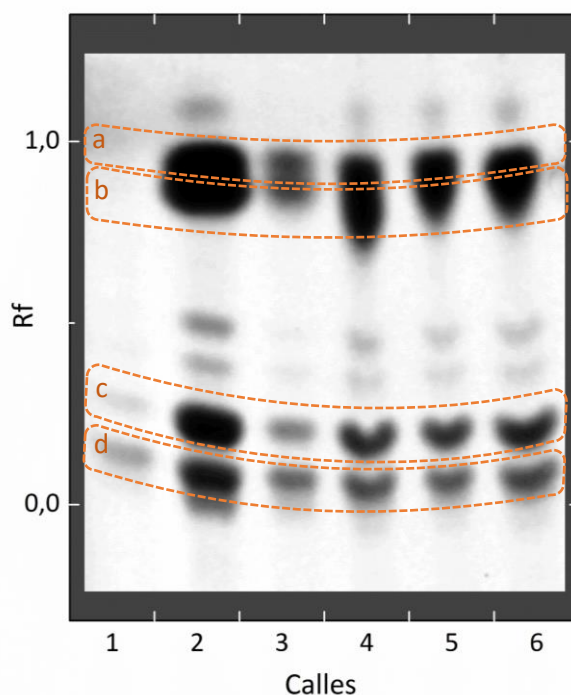


Figura 6.4. Cromatografía de capa delgada (TLC) de extractos, revelada en UV. Calles: 1- agua; 2- Metanol; 3- NaOH 10 mM; 4- GX080 10% m/m; 5- Tg7 10% m/m; 6- Tg9 10% m/m. Bandas principales: genisteína (a); daidzeína (b); genistina (c); daidzina (d).

Con el fin de corroborar estas conclusiones derivadas de las medidas del *CPT*, se analizaron varios extractos mediante cromatografía en capa delgada (TLC, Fig. 6.4). A partir

de un análisis densitométrico, se detectaron al menos cuatro bandas intensas, cuyos *R_f*s indicaron la presencia de daidzeína, daidzina, genisteína y genistina. Este estudio confirmó lo observado previamente, a partir del *CPT*, con respecto a la mayor capacidad extractiva del MetOH y los POEs.

Considerando que el GX exhibió, *a priori*, el mejor desempeño entre los surfactantes fue seleccionado para un estudio posterior.

6.2.2. Factores influyentes

Según la literatura, muchas variables afectan el proceso de extracción de una sustancia dada a partir de una matriz sólida [354]: temperatura, tiempo de extracción, pH, tamaño de partícula del sólido, velocidad de agitación y concentración de extractante. Sin dudas, éstos son muchos factores a considerar a la hora de planificar un arreglo experimental para determinar las mejores condiciones de trabajo. Considerando algunas de estas variables como más influyentes (concentración de surfactante, temperatura, pH y tiempo), se realizó un diseño factorial completo para dilucidar los factores e interacciones más significativos que en nuestro caso determinan el rendimiento de la extracción. La Tabla 6.1 muestra la matriz de diseño y los resultados obtenidos para los 16 tratamientos aleatorios.

La selección apropiada de valores máximos y mínimos para los factores evaluados se hizo de acuerdo con nuestro conocimiento previo de los sistemas. La pérdida de estabilidad de los flavonoides a altas temperaturas y prolongados tiempos de procesamiento, el aumento drástico en la viscosidad media con la concentración de surfactante fueron consideraciones prácticas que definieron el dominio experimental de cada variable. Se realizó un análisis de varianza para determinar qué factores afectaron significativamente la respuesta considerada (*CPT*) en los sobrenadantes. La representación gráfica a través del diagrama de Pareto (Fig. 6.5) permitió la interpretación de los datos. Los efectos debidos a las variables elegidas y sus interacciones en la respuesta están representados por barras cuya longitud es proporcional a la magnitud del efecto estandarizado. La línea vertical en dicho gráfico determina la significancia del efecto a un nivel del 5%, y el sentido de los efectos, positivos (+) o negativos (-), en las variables de respuesta se indican por diferentes colores de barras. Para simplificar el análisis, los efectos se clasificaron en orden decreciente respecto del valor absoluto.

Tabla 6.1. Diseño factorial de cribado a dos niveles para cuatro factores (2^4).

Exp.	Factores				<i>CPT</i> [†]
	X_A^1	X_B^2	X_C^3	X_D^4	
1	5	25	4,5	10	0,58 ± 0,06
2	15	25	8	10	0,89 ± 0,14
3	15	25	4,5	10	1,04 ± 0,05
4	5	25	8	10	0,50 ± 0,05
5	15	55	4,5	10	1,23 ± 0,09
6	15	55	8	10	1,01 ± 0,05
7	15	55	4,5	110	1,11 ± 0,10
8	5	25	8	110	0,58 ± 0,06
9	15	55	8	110	1,19 ± 0,10
10	5	55	8	110	0,70 ± 0,06
11	15	25	8	110	0,98 ± 0,06
12	15	25	4,5	110	1,26 ± 0,08
13	5	55	8	10	0,69 ± 0,02
14	5	55	4,5	110	0,70 ± 0,07
15	5	25	4,5	110	0,48 ± 0,08
16	5	55	4,5	10	0,74 ± 0,05

[†] Valores expresados como media ± SD para duplicados, en mg EAG/mL.

¹ Concentración de surfactante en % m/m, ² temperatura en °C, ³pH y ⁴ tiempo en min.

La Fig. 6.5A muestra que la concentración de GX, temperatura y pH fueron los efectos más significativos sobre el *CPT*. Tanto la temperatura como la concentración de GX aumentaron el *CPT* mientras que el pH causó el comportamiento opuesto. El efecto positivo de la concentración de GX se explica considerando que, al aumentar las concentraciones de tensoactivo, por encima de la *CMC*, también aumenta la formación de micelas, mejorando así la capacidad del sistema para solubilizar flavonoides. En cuanto al efecto de la temperatura, como se esperaba, favoreció el proceso de extracción. Es ampliamente conocido que [203,354,355], un aumento de la temperatura disminuye la tensión superficial y la viscosidad de medios acuosos [223]. El primer cambio ayuda al solvente a penetrar más en la muestra, aumentando la difusión y el segundo favorece la transferencia de masa de una molécula dada desde la matriz sólida por disminución de la resistencia viscosa. Además, el aumento de la temperatura podría contribuir a romper las interacciones entre el analito y la matriz, liberándolo al medio acuoso. En este trabajo, el pH mostró un ligero efecto negativo sobre la respuesta de manera similar a su efecto de interacción con la concentración de GX. Este hallazgo concuerda con lo reportado para las IFs en cuanto a un aumento en el carácter polar de la molécula en condiciones más alcalinas [356], lo cual disminuiría su solubilidad en sistemas micelares. La duración de la extracción no resultó ser

un factor significativo que afectara el rendimiento de extracción dentro del intervalo seleccionado (10-110 min), siendo este hecho ventajoso, ya que extracciones más prolongadas podrían conducir a la degradación de los compuestos de interés [354]. Por lo tanto, sólo tres de los cuatro factores estudiados demostraron ser relevantes al modelar el comportamiento de respuesta.

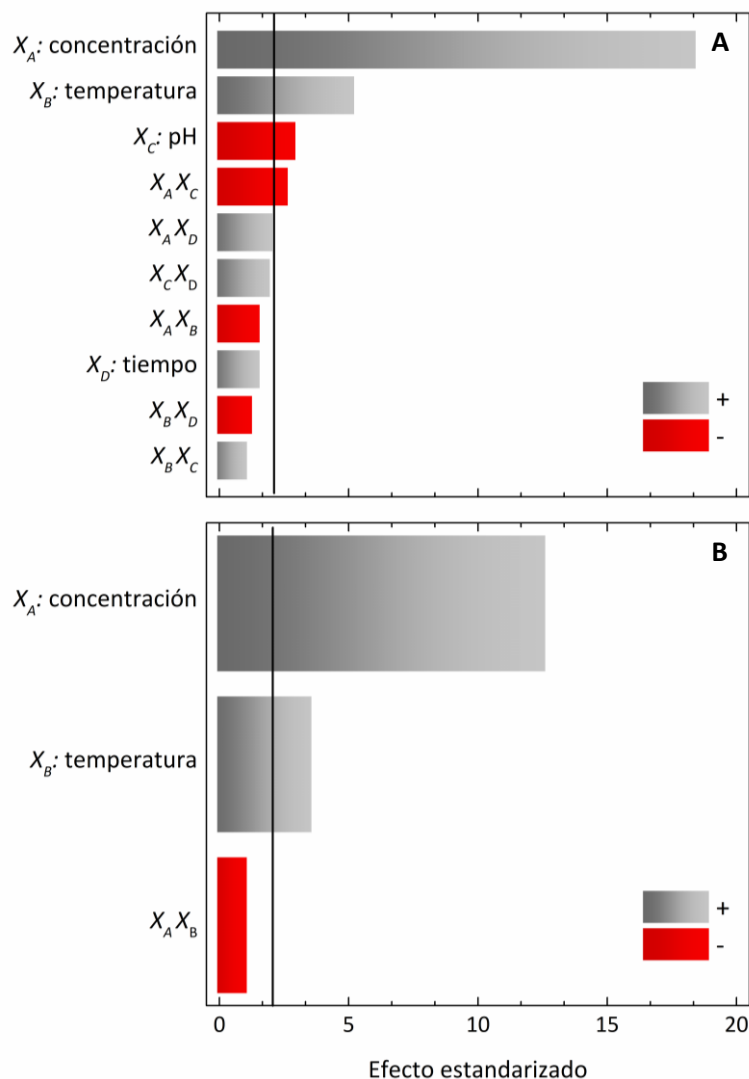


Figura 6.5. Análisis de los efectos del diseño experimental factorial completo a 2 niveles. **A)** Gráfico de Pareto del modelo inicial, con los efectos de cuatro factores experimentales, en orden decreciente de importancia. **B)** Diagrama de Pareto con efectos del modelo recalculado para dos factores, en orden decreciente de importancia. Las líneas negras verticales representan el umbral de significancia ($P = 0,05$).

Para describir la dependencia de la respuesta con las variables seleccionadas, los coeficientes de la relación lineal propuesta (ecuación 3.22) se estimaron mediante la regresión de mínimos cuadrados, obteniéndose un modelo con una relación significativa entre las variables elegidas y el *CPT* ($P < 0,05$), así como buenos valores de R^2 (0,929) y R^2

ajustado (0,895), lo que indica una buena explicación a la variabilidad de los datos. Sin embargo, con vistas a realizar un proceso de optimización posterior, sería deseable un modelo más simple. De esta forma, teniendo en cuenta los factores relevantes antes mencionados, se desestimó el efecto del tiempo y sus interacciones, factor que no resultó significativo (términos de X_D de la ecuación 3.22). Asimismo, aunque el pH mostró ser una variable significativa, su efecto e interacciones tampoco se tuvieron en cuenta (términos de X_C de la ecuación 3.22), ya que la magnitud de los mismos fue bastante menor a la observada para la temperatura y la concentración de GX. Además, recordando lo observado precedentemente para IT (Sección 6.1.1), sería deseable trabajar a un pH 4,5 para disminuir la pérdida de proteínas durante el lixiviado. Teniendo en cuenta las consideraciones mencionadas, se propuso un modelo lineal más simple sólo dependiente de la concentración de GX (X_A), la temperatura (X_B) y su interacción ($X_A X_B$). Los valores de los coeficientes del modelo calculado pueden observarse en la Tabla 6.2, incluyéndose estadísticos de regresión obtenidos: R^2 , R^2 ajustado (R^2_{ajd}) y desvío estándar de los residuos (RSD).

Tabla 6.2. Mejores estimaciones de los coeficientes (β_0 , β_i y β_{ij}) de cada término en el modelo y sus estadísticos correspondientes, para SMA de GX.

Término	Estimado [†]
Constante	0,104167
X_A : concentración	0,057417 **
X_B : temperatura	0,007083 *
$X_A X_B$	-0,000267
Estadísticos	
R^2 ¹	0,861
R^2_{ajd} ²	0,846
RSD ³	0,105

[†] Efectos significativamente diferentes de cero: * $P < 0,010$, ** $P < 0,001$.

¹ R^2 = coeficiente de determinación

² R^2_{ajd} = coeficiente de determinación ajustado.

³ RSD = desvío estándar de los residuos.

Si bien los coeficientes de determinación obtenidos para el modelo recalculado son más bajos que los observados anteriormente, siguen siendo satisfactorios para respaldar la validez estadística con una buena explicación a la variación en las observaciones. Al sopesar los pros y los contras de este modelo recalculado, consideramos que la pérdida en su representatividad se vio compensada por su mayor simplicidad. Los resultados indicaron que tanto la concentración de surfactante (X_A) como la temperatura (X_B) tuvieron efectos

significativos ($P < 0,05$) que favorecieron la extracción de IFs mientras que su interacción ($X_A X_B$) no fue significativa. La representación de estos resultados se muestra en el diagrama de Pareto de la Fig. 6.5B.

6.3. CONCLUSIONES PARCIALES

A partir del conocimiento ya establecido sobre la dinámica del proceso extractivo de los compuestos proteicos presentes en la soja, se efectuó un análisis exploratorio de dos de los factores experimentales más influyentes. Pudo corroborarse que a menor pH se obtuvieron mejores rendimientos en la extracción de IT en relación a la pérdida de contenido proteico de la harina, mientras que la cinética indicó que esta propiedad también fue favorecida al aumentar el tiempo de extracción dentro de un rango razonable desde el punto de vista industrial.

Por otro lado, los sistemas micelares formados por surfactantes etoxilados en general y el sistema de GX en particular, demostraron poseer una capacidad significativa de extraer isoflavonas. Comprimidos comerciales de IF se utilizaron como una matriz simple de partida, para determinar las variables que afectan el procedimiento de extracción mediante herramientas estadísticas rigurosas. La capacidad de los surfactantes para penetrar en los intersticios de la matriz, afectar la interacción soluto-matriz y aumentar el área de contacto fluido-sólido serían las principales causas de su eficacia extractiva. Habiendo determinado las variables mínimas para obtener un adecuado modelado que explica el proceso de extracción de isoflavonas, es posible realizar un subsiguiente trabajo de optimización de las condiciones que maximicen esta respuesta.

En resumen, en el presente capítulo se avanzó en el análisis de cuánto y cómo influyen las principales variables a tener en cuenta en el lixiviado de ITs e IFs que formará parte del proceso a diseñar para la detoxificación de harina de soja.

CAPÍTULO 7- Optimización de procesos

∞ IDEAS PREVIAS. INTERROGANTES

En base a los resultados precedentes, el próximo objetivo es realizar una optimización con los factores más relevantes en el proceso de extracción de IFs con GX, siguiendo el trabajo realizado en el capítulo anterior. Adicionalmente, se plantea optimizar el proceso de lixiviado sobre harina de soja, ya no solo considerando las isoflavonas, sino principalmente los inhibidores de tripsina, dado que representan los antinutrientes más relevantes.

Como mapa de ruta del presente capítulo, se plantearon los siguientes interrogantes: *¿Cuáles serán las condiciones óptimas que maximicen la extracción de isoflavonas utilizando, preliminarmente, tabletas comerciales como matriz más sencilla? ¿Cuáles son las variables que más afectarán al proceso extractivo de inhibidores de tripsina e isoflavonas de harina de soja blanca, con SMAs de GX, Tg7 y Tg9? ¿Cuáles serán las condiciones óptimas que maximicen la extracción de ITs e IFs de la harina de soja, minimizando la extracción de contenido proteico?*

7.1. OPTIMIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN DE IFs CON GX

Continuando el estudio reportado en el capítulo anterior, en la Sección 6.2.2, se planteó una estrategia que permitiera maximizar la respuesta *CPT*, a partir del proceso extractivo sobre la matriz de las tabletas comerciales. Las variables significativas que afectan la extracción de isoflavonas, es decir, la concentración de surfactante y la temperatura, se optimizaron aplicando la metodología de superficie de respuesta. Se seleccionó un diseño factorial central compuesto como se describió en la Sección 3.2.23.1. En este análisis el pH se mantuvo constante en el valor mínimo ensayado, 4,5, ya que se observó que los pHs más altos disminuían la eficiencia de extracción de IFs. Además, cuando se considera aplicar este procedimiento en harina de soja, el pH seleccionado (4,5) es una condición de trabajo deseable, visto que las proteínas de soja presentan su menor solubilidad (Sección 6.1.1), minimizando la pérdida de proteína durante la extracción. El tiempo de extracción se fijó en 60 min, un valor intermedio de su intervalo de dominio, ya que este factor no mostró que afectara significativamente la respuesta. Las observaciones de *CPT* para cada tratamiento pueden apreciarse en la Tabla 7.1.

Tabla 7.1. Diseño factorial de central compuesto a dos niveles para dos factores.

Exp.	Factores		<i>CPT</i> [†]
	X_A ¹	X_B ²	
1	3	40	0,61 ± 0,05
2	10	54	1,26 ± 0,14
3	17	40	1,11 ± 0,12
4	10	40	1,12 ± 0,10
5	15	30	1,16 ± 0,12
6	10	40	1,11 ± 0,08
7	10	26	0,96 ± 0,06
8	5	50	0,99 ± 0,04
9	5	30	0,68 ± 0,07
10	15	50	1,13 ± 0,12

[†] Valores expresados como media ± SD de tres réplicas, en mg EAG/mL.

¹ Concentración de surfactante en % m/m,

² temperatura en °C.

Los valores de los coeficientes del modelo calculado pueden observarse en la Tabla 7.2, incluyéndose los estadísticos de regresión obtenidos: prueba de falta de ajuste, R^2 , R^2_{ajd} y RSD. Este modelo (ecuación 3.23) consiste en dos efectos positivos principales, la concentración de surfactante (X_A) y la temperatura (X_B); un efecto negativo de interacción de dos factores ($X_A X_B$) y un efecto de curvatura negativo (X_A^2). El otro efecto de curvatura o

cuadrático (X_B^2) se excluyó de esta estimación ya que no resultó significativo ($P > 0,950$). A partir de la prueba de falta de ajuste y de los coeficientes de determinación, se encontró una buena calidad de ajuste, así como una adecuada explicación a la variabilidad de los datos. La representación gráfica del modelo, es decir la superficie de respuesta, se muestra en la Fig. 7.1. Como se esperaba, el aumento en la concentración de surfactante y la temperatura, en los rangos evaluados, conlleva al aumento del *CPT* en los extractos. La disminución en la respuesta, observada hacia valores más altos de estos factores, resultó de los términos $X_A X_B$ y X_A^2 negativos. Este comportamiento puede estar relacionado con cambios en la estructura micelar (es decir, el número y la forma de agregación) que ocurren a mayor concentración de surfactante y temperatura, lo que afecta la capacidad de extracción [357].

Tabla 7.2. Mejores estimaciones de los coeficientes (β_0 , β_i , β_{ii} y β_{ij}) de cada término en el modelo y sus estadísticos correspondientes, para SMA de GX.

Término	Estimado [†]
Constante	-0,764020
X_A : concentración	0,203615 **
X_B : temperatura	0,025838 **
X_A^2	-0,005114 **
$X_A X_B$	-0,001700 *
Estadísticos	
Falta de ajuste ¹	0,851
R^2 ²	0,858
R^2_{ajd} ³	0,836
RSD ⁴	0,094

[†] Efectos significativamente diferentes de cero: * $P < 0,010$, ** $P < 0,001$.

¹ Prueba de falta de ajusta expresada en su valor de prueba (P).

² R^2 = coeficiente de determinación.

³ R^2_{ajd} = coeficiente de determinación ajustado.

⁴ RSD = desvío estándar de los residuos.

Según este estudio, se obtendrá un *CPT* máximo de $1,24 \pm 0,21$ mg EAG/mL¹ con un SMA de GX al 11% m/m y pH 4,5, extrayendo a 54 °C durante 60 min. Estas condiciones son aproximadamente las del experimento número 2 del diseño (pH 4,5, 54 °C, 60 min, Tabla 7.1), excepto por la concentración GX que es 10% m/m en lugar del óptimo predicho (11% m/m). Seleccionamos, entonces, los extractos de dicho tratamiento (experimento 2) para un análisis adicional del contenido de IFs por HPLC, dado que el *CPT* es una medida indirecta

¹ Valor de *CPT* expresado como media \pm IC.

y más económica del contenido de dichos compuestos. Cabe señalar que el extracto de GX no requirió ningún tratamiento previo a la cromatografía, ya que este surfactante es compatible con el sistema de elución. Además, no absorbe en el rango de 240-280 nm, lo que facilita la detección de IFs por mediciones de absorbancia. Por otro lado, se efectuó una extracción con metanol en las mismas condiciones (a 54 °C durante 60 min) para poder comparar con nuestro sistema. El contenido total de isoflavonas determinado en extractos de metanol y de GX fue de $83,3 \pm 6,5$ y $83,0 \pm 12,3$ mg por g de matriz sólida (tableta comercial), respectivamente. Estos resultados conducen a dos conclusiones importantes: a) el contenido de IFs en ambos extractos concuerda con el informado por el fabricante (79 mg IF/g), lo que indica que se logró una extracción completa de isoflavonas; b) la eficiencia de GX como sistema extractivo, en condiciones cercanas a la óptima, ha mejorado en relación a la exhibida preliminarmente (Sección 6.2.1), llegando a ser comparable a la del metanol.

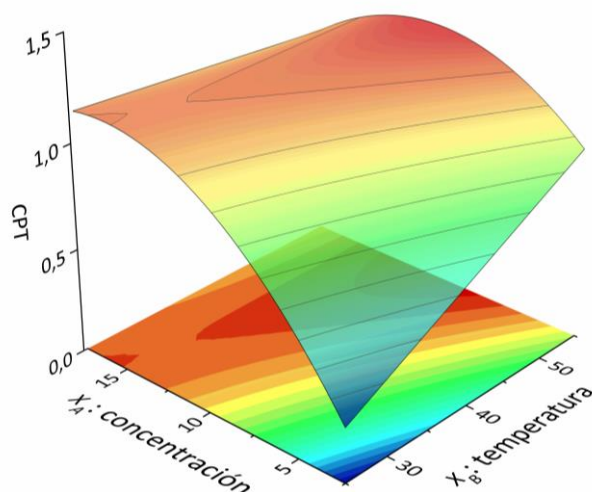


Figura 7.1. Representación gráfica del modelo ajustado a las observaciones del diseño factorial compuesto central. Superficie de respuesta y contorno del modelo calculado, que expresa *CPT* (mg EAG/g) en función de la concentración de surfactante (X_A , % m/m) y la temperatura (X_B , °C).

Sobre la base de estos hallazgos y considerando las ventajas de los sistemas micelares de GX, se consideró una evaluación adicional sobre una matriz más compleja, la harina de soja, que es objeto de nuestro estudio. Se determinó entonces, el rendimiento extractivo del metanol y del SMA (11% m/m, pH 4,5) en harina de soja (2% razón harina/extractante) bajo las condiciones óptimas determinadas previamente sobre las tabletas (54 °C, 60 min).

Las observaciones evidenciaron que la eficiencia extractiva del SMA era considerablemente mayor a la del metanol. El *CPT* del extracto de GX ($4,8 \pm 0,8$ mg de EAG/g de harina) resultó aproximadamente cuatro veces superior al correspondiente al extracto

metílico ($1,3 \pm 0,3$ mg de EAG/g de harina). Este comportamiento, observado previamente para la extracción de IFs de *Puerariae radix* [262], tiene tres explicaciones razonables: a) las propiedades de difusión mejoradas del SMA en las partículas de harina de soja debido a su baja tensión superficial; b) la capacidad de solubilización de las micelas, dada por su carácter anfífilico; c) la capacidad del metanol para desnaturalizar proteínas, cuyos agregados interactúan fuertemente con las isoflavonas y reducen su disponibilidad [358].

Este hallazgo fue corroborado por el análisis de IFs en cada extracto por HPLC (Tabla 7.3), observándose un mayor rendimiento GX ($3,237 \pm 0,173$ mg de IF/g de harina). En ambos casos el contenido de agliconas fue menor que el de las formas β -glucósidos, característica que se corresponde con la composición en IFs informada para varios derivados de soja [359]. Adicionalmente, el SMA de GX exhibió cierta selectividad para recuperar daidzeína, ya que su extracto contenía seis veces la cantidad que esta aglicona presentaba en el extracto metílico. Este es un hecho destacable si se considera la bioactividad potenciada de las agliconas con respecto a otras formas conjugadas. Es pertinente mencionar que este excelente rendimiento se observó mediante la mera extrapolación de condiciones optimizadas, para una matriz simple (es decir, polvo de comprimidos comerciales de isoflavonas), sobre una matriz más compleja, tal como es la harina de soja. Sin embargo, esto no quita la necesidad de optimizar sobre la matriz real a la que se aplique luego el proceso propuesto.

Tabla 7.3. Contenido de IF extractos de harina de soja.

IF	Extractos (mg/g) [†]	
	MetOH	GX
Daidzina	$0,527 \pm 0,062$	$1,596 \pm 0,067$
Genistina	$0,531 \pm 0,073$	$1,297 \pm 0,187$
Daidzeína	$0,031 \pm 0,011$	$0,184 \pm 0,011$
Genisteína	$0,049 \pm 0,009$	$0,159 \pm 0,026$
Total	$1,138 \pm 0,151$	$3,237 \pm 0,173$

[†] Valores expresados como media \pm SD de tres experimentos independientes. Para las IFs individuales y totales, existen diferencias significativas entre los extractos con ambas metodologías, determinados por la prueba T con un nivel de significancia de 0,05.

7.2. OPTIMIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN DE ANTINUTRIENTES CON SMAs

Previamente, en el Capítulo 6, se han realizado estudios con el fin de dilucidar los factores e interacciones más significativos que determinan el rendimiento de extracción de proteínas, particularmente IT, y de isoflavonas. Considerando esto, se elaboró un diseño experimental del tipo Box-Behnken, para optimizar el proceso extractivo con sistemas micelares acuosos, mediante un modelo de superficie de respuesta en el que se evaluaron tres respuestas: actividad inhibitoria de tripsina (*TIA*), contenido proteico (*Pt*) y polifenoles totales (*CPT*) extraídos. Los factores experimentales considerados fueron tres: concentración de surfactante (X_A), temperatura (X_B) y tiempo de extracción (X_C). La selección adecuada de los valores máximos y mínimos para los factores evaluados se realizó de acuerdo con nuestro conocimiento de los sistemas.

La Tabla 7.4 muestra la matriz de diseño y los resultados de regresión múltiple obtenidos para los 15 tratamientos aleatorios. El mismo criterio que se mencionó en la Sección 6.2.2 para las IFs, se aplicó para las proteínas. Así, el *PT* de cada surfactante, la pérdida de estabilidad de los componentes proteicos y flavonoides a alta temperatura y tiempo de análisis, y el drástico aumento de la viscosidad media con la concentración de surfactante fueron consideraciones prácticas que definieron el dominio experimental de cada factor. Se establecieron como parámetros constantes al pH y el cociente porcentual de masas o razón harina/SMA. El pH (4,5) fue seleccionado considerando los resultados de las experiencias exploratorias (Capítulo 6) siendo éste próximo al punto isoeléctrico general de las proteínas presentes en la harina de soja, donde su solubilidad es mínima. Por su parte, la razón harina/SMA (10 %) se estableció a partir de trabajos previos del grupo, pensando principalmente en la factibilidad de escalado del proceso. La representación gráfica a través de gráficos de Pareto (Fig. 7.2) permitió la interpretación de los datos obtenidos.

La Fig. 7.2 muestra que los efectos no fueron igualmente significativos entre los surfactantes para ninguna de las respuestas. Considerando *TIA* (Figs. 7.2A, B y C), prácticamente los tres factores fueron significativos, aunque no así sus interacciones. Los SMAs de GX se mostraron más sensibles a la temperatura y la concentración, en tanto que los tergitoles lo fueron más al tiempo. En general, considerando los valores extremos de las variables, a mayor concentración y temperatura disminuye *TIA*, mientras que esta respuesta aumenta con el tiempo. A valores intermedios en los rangos de los factores, sin embargo, *TIA* aumenta hasta encontrar un máximo, para luego volver a disminuir. En particular, ni el tiempo presenta un efecto lineal significativo para GX ni la concentración

para Tg7, lo que quiere decir que entre los valores extremos de estos factores no encontramos una diferencia en la respuesta. Por tanto, puede decirse que se alcanzan valores máximos de *TIA* a valores intermedios de los rangos ensayados para cada variable. Los coeficientes de determinación ajustados (R^2_{ajd}) para los tres modelos iniciales indicaron que éstos conseguían explicar más del 80% de la variabilidad de los datos obtenidos para *TIA* ($R^2_{ajd} = 0,822$ para GX, 0,809 para Tg7 y 0,807 para Tg9), lo cual da cuentas de la buena consistencia predictiva de cada modelo.

Para *Pt* (Figs. 7.2D, E y F), los efectos de los factores son similares que para *TIA*, donde las tres variables son significativas para los modelos y sus interacciones no son notorias. En general, para los tres surfactantes los efectos de los factores accionan de manera cuadrática, creciendo hasta alcanzar un máximo, como fue descrito en el párrafo anterior. La excepción en este sentido se presentó para Tg9, dado que el tiempo en lugar de hacer crecer a la respuesta hasta un máximo al interior del rango evaluado, la hace decrecer hasta un mínimo y sin mostrar diferencias entre los valores extremos del intervalo. Puede decirse entonces que, al igual que para *TIA*, dentro de los rangos ensayados de cada variable se alcanzan valores máximos de *Pt*. Esto es consistente con el hecho de que IT es parte del contenido proteico de la matriz. Los coeficientes de determinación ajustados (R^2_{ajd}) para los tres modelos iniciales indicaron que éstos conseguían explicar más del 72% de la variabilidad de los datos obtenidos para las proteínas ($R^2_{ajd} = 0,727$ para GX, 0,769 para Tg7 y 0,853 para Tg9), lo cual para el tipo de matriz compleja en la que se trabaja, aún permite considerar como adecuado al modelo ajustado.

En el caso del *CPT* (Figs. 7.2G, H e I) una vez más se observa una clara significancia de los tres factores experimentales. La diferencia que podemos encontrar con los modelos para las otras dos respuestas, es que la concentración para los tergitoles genera una mayor respuesta en su extremo máximo que en su valor más bajo, dando cuentas de un sentido positivo de su efecto lineal. Sin embargo, continúa encontrándose un máximo hacia valores intermedios del intervalo analizado. Particularmente para GX, la concentración no presenta valores de *CPT* diferentes entre sus extremos (1 y 9% m/m), contrario a lo observado en la sección anterior para las tabletas comerciales, donde encontrábamos un máximo hacia 11% m/m. Decimos para *CPT* también que sus valores encuentran un máximo a un valor intermedio del rango analizado para cada respuesta. Una vez más el modelo demostró una correcta representatividad de los datos, como pudo inferirse por los coeficientes de determinación ajustados (R^2_{ajd}) que indicaron una explicación mayor al 70% de la variabilidad ($R^2_{ajd} = 0,705$ para GX, 0,734 para Tg7 y 0,749 para Tg9).

Tabla 7.4. Diseño factorial Box-Behnken para 3 factores y tres respuestas obtenidas para SMAs de GX, Tg7 y Tg9.

Exp.	Factores			Respuestas ⁺								
	X _A ¹	X _B ²	X _C ³	GX		Tg7		Tg9				
				TIA ⁴	Pt ⁵	CPT ⁶	TIA ⁴	Pt ⁵	CPT ⁶	TIA ⁴	Pt ⁵	CPT ⁶
1	1	30	45	83 ± 4	36 ± 3	1,51 ± 0,12	85 ± 6	34 ± 2	1,30 ± 0,08	75 ± 4	39 ± 3	1,31 ± 0,07
2	9	30	45	73 ± 5	33 ± 3	1,72 ± 0,09	81 ± 5	34 ± 2	1,59 ± 0,10	65 ± 5	29 ± 2	1,52 ± 0,07
3	5	30	80	99 ± 6	44 ± 3	1,79 ± 0,12	93 ± 6	38 ± 2	1,59 ± 0,10	83 ± 7	38 ± 1	1,52 ± 0,06
4	5	50	45	94 ± 5	38 ± 2	1,85 ± 0,08	93 ± 5	39 ± 2	1,63 ± 0,08	89 ± 9	37 ± 2	1,58 ± 0,04
5	9	50	10	83 ± 6	29 ± 2	1,48 ± 0,09	65 ± 5	30 ± 2	1,53 ± 0,09	61 ± 4	38 ± 2	1,34 ± 0,09
6	5	50	45	101 ± 4	40 ± 1	1,84 ± 0,15	100 ± 2	39 ± 2	1,62 ± 0,10	88 ± 6	40 ± 3	1,59 ± 0,03
7	1	50	10	97 ± 7	31 ± 2	1,43 ± 0,09	68 ± 4	31 ± 2	1,26 ± 0,08	65 ± 4	40 ± 2	1,28 ± 0,08
8	9	50	80	91 ± 6	36 ± 2	1,78 ± 0,14	87 ± 5	37 ± 2	1,54 ± 0,08	77 ± 8	31 ± 2	1,54 ± 0,06
9	5	70	10	89 ± 6	33 ± 2	1,35 ± 0,08	68 ± 4	29 ± 2	1,37 ± 0,09	57 ± 4	32 ± 2	1,31 ± 0,04
10	5	70	80	74 ± 5	35 ± 3	1,50 ± 0,13	81 ± 4	35 ± 2	1,32 ± 0,07	73 ± 4	30 ± 2	1,39 ± 0,06
11	9	70	45	63 ± 5	28 ± 3	1,46 ± 0,08	78 ± 5	31 ± 2	1,55 ± 0,06	59 ± 4	26 ± 2	1,29 ± 0,07
12	1	50	80	94 ± 6	36 ± 3	1,66 ± 0,10	92 ± 7	35 ± 2	1,35 ± 0,08	83 ± 5	49 ± 4	1,32 ± 0,09
13	5	30	10	89 ± 8	33 ± 3	1,49 ± 0,12	69 ± 6	31 ± 2	1,41 ± 0,10	66 ± 4	38 ± 3	1,33 ± 0,08
14	5	50	45	94 ± 3	37 ± 2	1,80 ± 0,10	93 ± 2	39 ± 1	1,61 ± 0,04	88 ± 4	38 ± 3	1,60 ± 0,04
15	1	70	45	61 ± 4	30 ± 3	1,50 ± 0,12	81 ± 6	31 ± 2	1,25 ± 0,06	70 ± 5	31 ± 2	1,44 ± 0,08

⁺ Valores expresados como media ± SD de tres replicas.

¹ Concentración de surfactante en % m/m, ² temperatura en °C y ³ tiempo en min.

⁴ TIA en %, ⁵ Pt en % y ⁶ CPT en mg EAG/g.

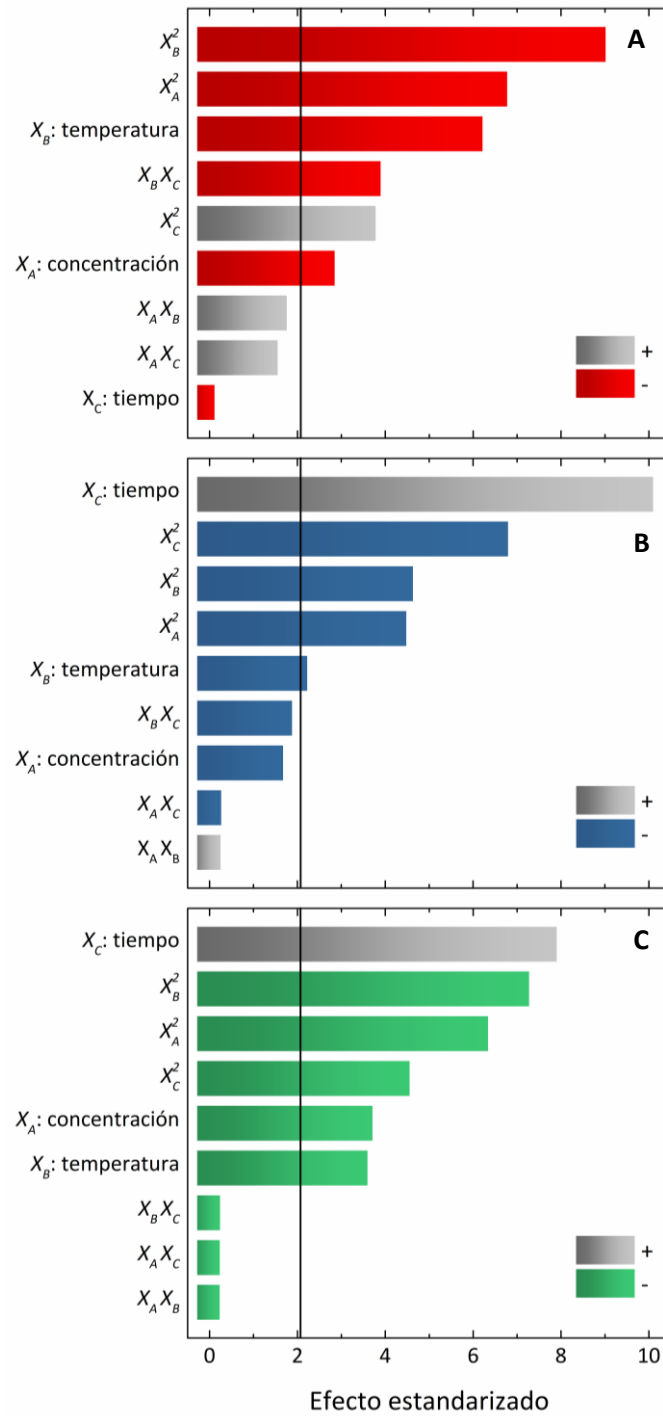


Figura 7.2. Análisis de los efectos del diseño factorial Box-Behnken. Diagramas de Pareto con efectos de tres factores experimentales, en orden decreciente de importancia. Respuesta: *T/A* para **A)** GX, **B)** Tg7 y **C)** Tg9. Las líneas verticales negras representan el umbral de significación ($P = 0,05$).

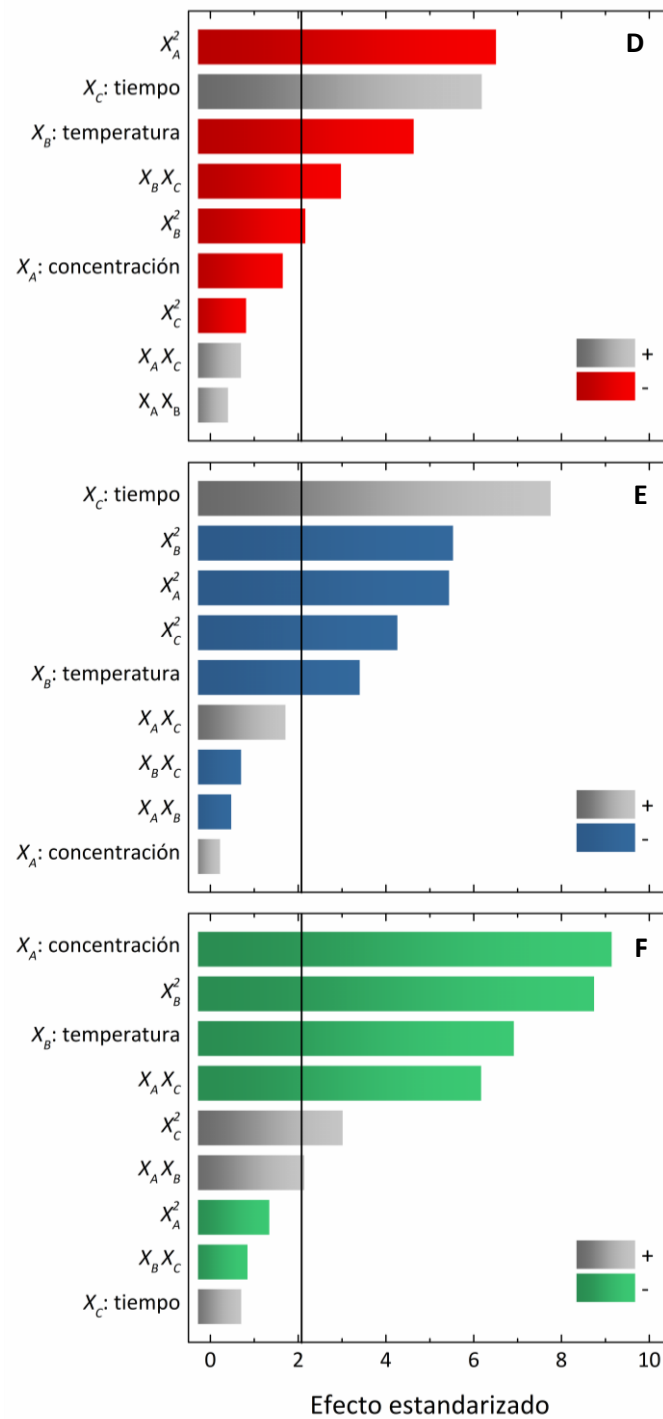


Figura 7.2. Continuación. Análisis de los efectos del diseño factorial Box-Behnken. Diagramas de Pareto con efectos de tres factores experimentales, en orden decreciente de importancia. Respuesta: *Pt* para **D**) GX, **E**) Tg7 y **F**) Tg9. Las líneas verticales negras representan el umbral de significación ($P = 0,05$).

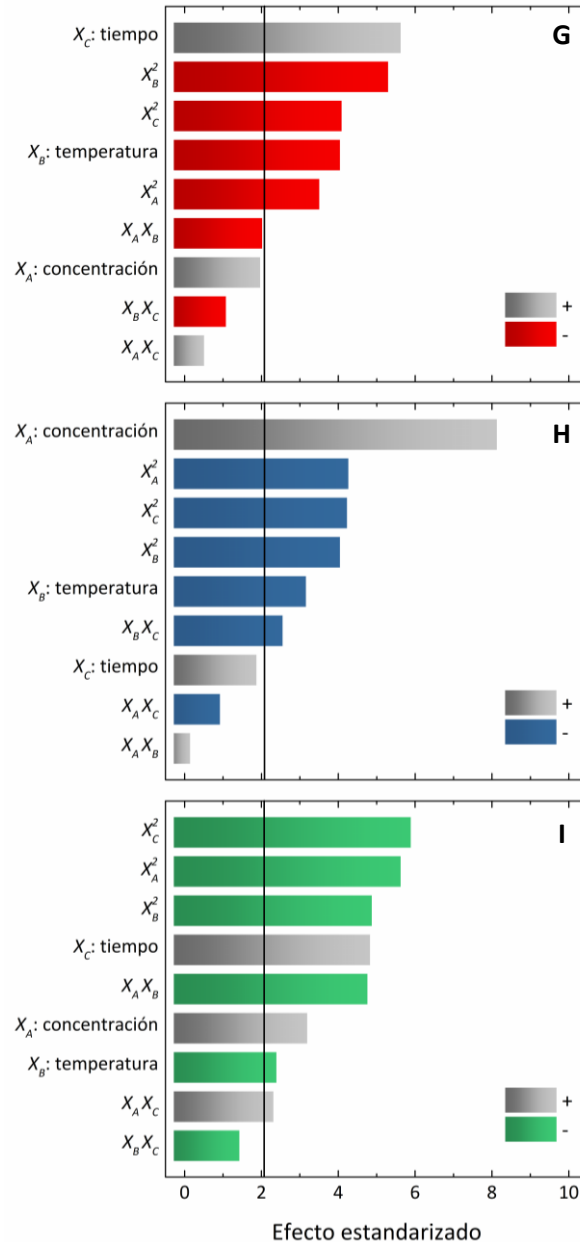


Figura 7.2. Continuation. Analysis of the effects of the Box-Behnken factorial design. Pareto diagrams with effects of three experimental factors, in order of decreasing importance. Response: *CPT* for **G**) GX, **H**) Tg7 and **I**) Tg9. The vertical black lines represent the significance threshold ($P = 0,05$).

Los modelos se recalcularon luego, eliminando algunos de los efectos no significativos con el criterio de maximizar los R^2_{ajd} , ajustando nuevamente a partir de la regresión múltiple de los datos. Los resultados de los modelos finales pueden observarse en la Tabla 7.5, incluyéndose los estadísticos de regresión obtenidos para los modelos: prueba de falta de ajuste, R^2 , R^2_{ajd} y RSD.

Tabla 7.5. Mejores estimaciones de los coeficientes (β_0 , β_1 y β_{ij}) de cada término en el modelo y los estadísticos correspondientes, pertenecientes a las tres respuestas evaluadas para SMAs de los surfactantes GX, Tg7 y Tg9.

Término	Estimados [†]			Tg7			Tg9		
	GX	Tg7	Tg9	T/A	Pt	CPT	T/A	Pt	CPT
Constante	9,30560	16,24110	0,09511	8,41632	11,28560	0,43244	-5,77216	13,95160	0,31026
X _A : concentración	3,69727**	2,84165	0,11909	3,85689	1,63516	0,09598***	5,18135***	-0,06327***	0,11864**
X _B : temperatura	3,64436***	0,41960***	0,04375***	1,83816*	0,72182**	0,02520**	2,63739**	1,25989***	0,02892*
X _C : tiempo	-0,10684	0,24622***	0,01540***	1,26420***	0,23067***	0,01240	0,75900***	-0,00691	0,01042***
X _A ²	-0,70874***	-0,30551***	-0,00698**	-0,42942***	-0,19376***	-0,00632***	-0,61620***	-0,05843	-0,00672***
X _A X _B	0,03547		-0,00077					0,01784*	-0,00109***
X _A X _C	0,01790				0,00672			-0,02929***	0,00030*
X _B ²	-0,03772***	-0,00399*	-0,00042***	-0,01776***	-0,00788***	-0,00024***	-0,02828***	-0,01512***	-0,00023***
X _B X _C	-0,00896***	-0,00310**	-0,00005	-0,00397	-0,00008*	-0,00008*			-0,00004
X _C ²	0,00517***		-0,00011***	-0,00851***	-0,00198***	-0,00008***	-0,00578***	0,00170**	-0,00009***
Estadísticos									
Falta de ajuste ¹	0,587	0,922	0,864	0,818	0,895	0,482	0,847	0,285	0,207
R ² ₂	0,858	0,774	0,763	0,848	0,812	0,783	0,845	0,879	0,801
R ² _{ajd} ³	0,827	0,739	0,711	0,819	0,782	0,742	0,821	0,856	0,749
RSD ⁴	5,565	2,521	0,106	5,097	1,844	0,079	5,168	2,257	0,064

[†] Efectos significativamente diferentes de cero: * $P < 0,050$, ** $P < 0,010$, *** $P < 0,001$.

¹ Prueba de falta de ajuste expresada en su valor de prueba (P).

² R² = coeficiente de determinación.

³ R²_{ajd} = coeficiente de determinación ajustado.

⁴ RSD = desvío estándar de los residuos.

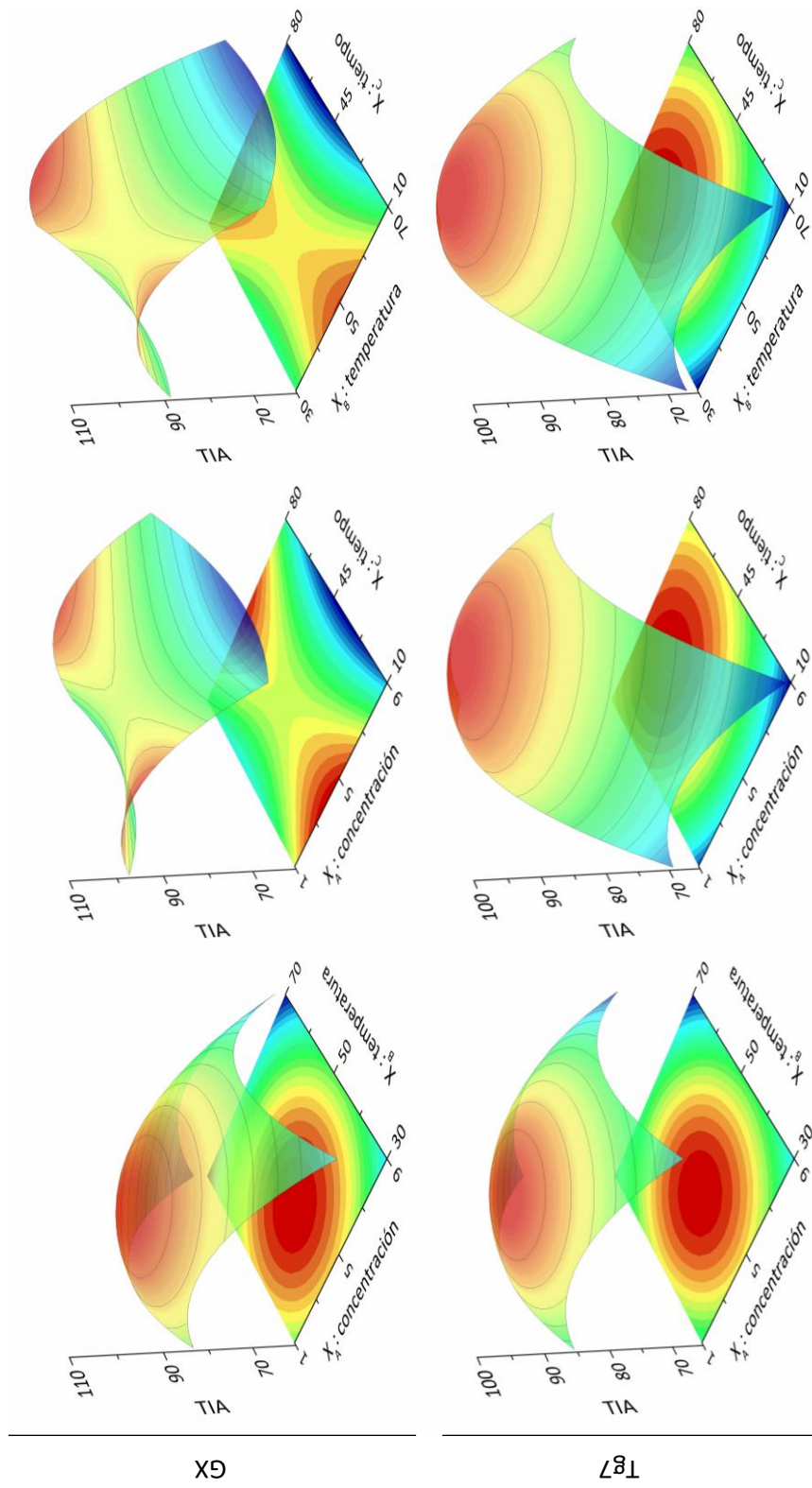


Figura 7.3. Diagramas de superficie para las diferentes respuestas estimadas en función de dos factores experimentales manteniendo el tercer factor en su valor central. Gráficos de TIA (%) para GX (arriba) y Tg7 (abajo).

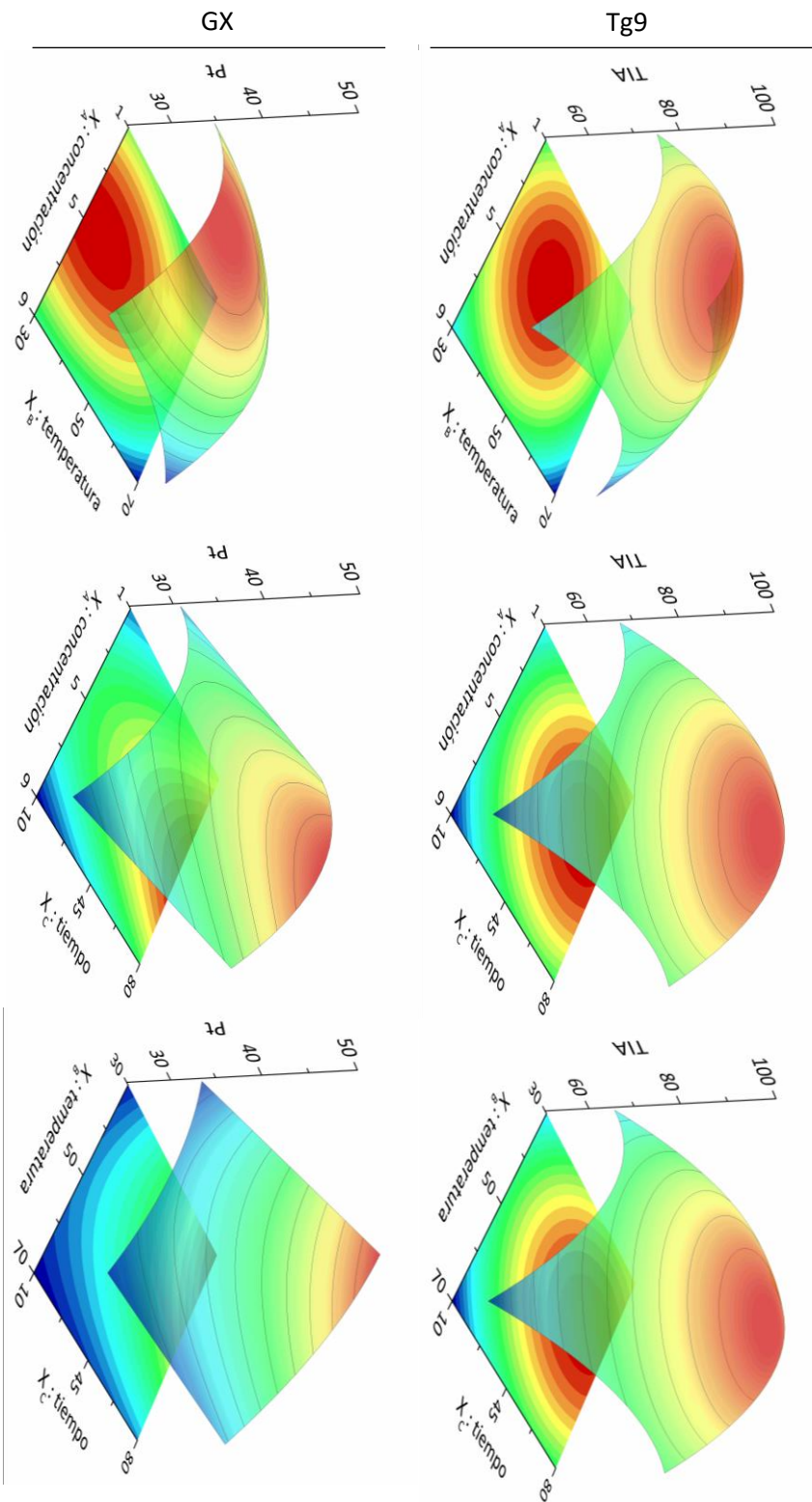


Figura 7.3. Continuación. Diagramas de superficie para las diferentes respuestas estimadas en función de dos factores experimentales manteniendo el tercer factor en su valor central. Gráficos de T/A (%) para Tg9 (arriba) y Pt (%) para GX (abajo).

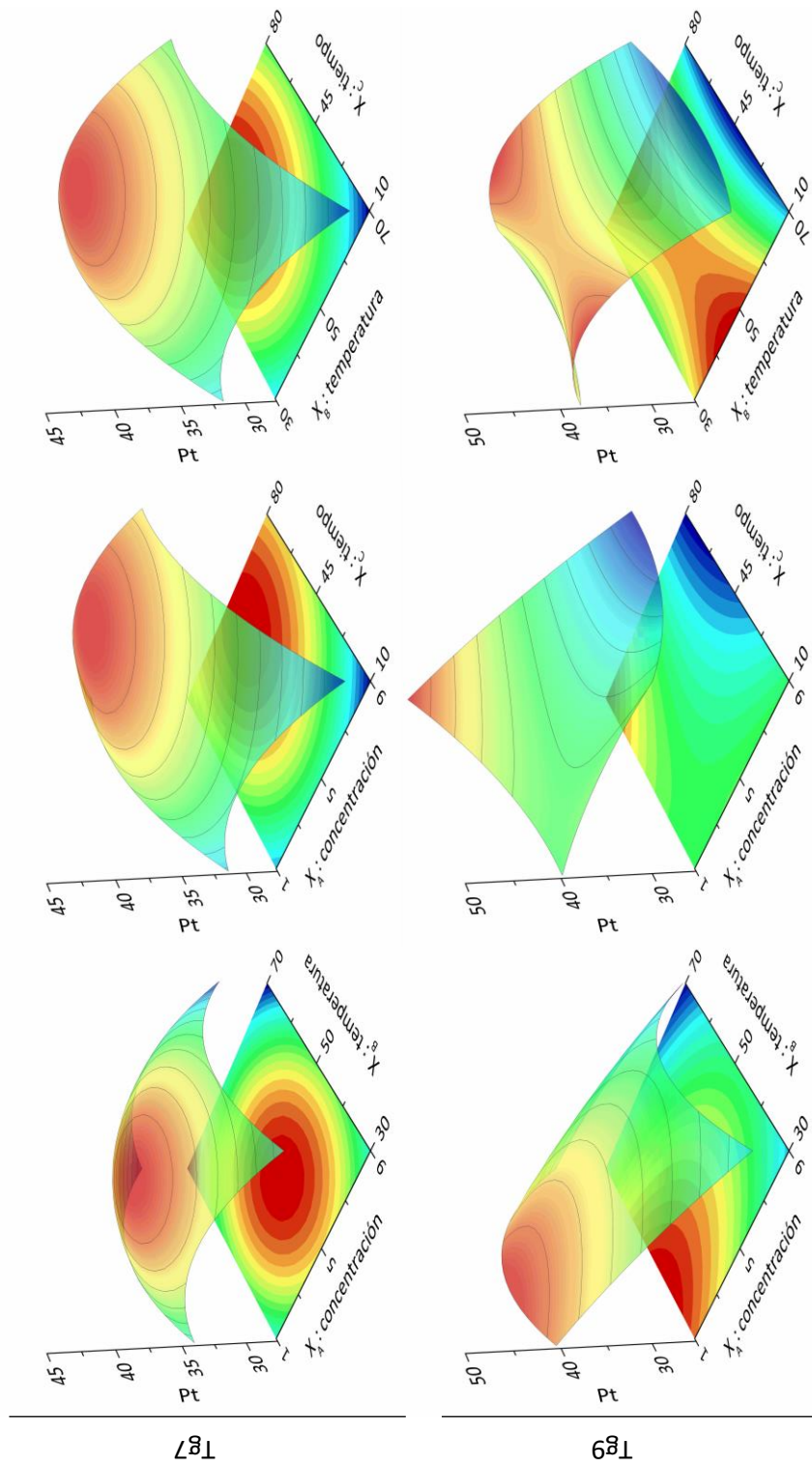


Figura 7.3. Continuación. Diagramas de superficie para las diferentes respuestas estimadas en función de dos factores experimentales manteniendo el tercer factor en su valor central. Gráficos de Pt (%) para Tg7 (arriba) y Tg9 (abajo).

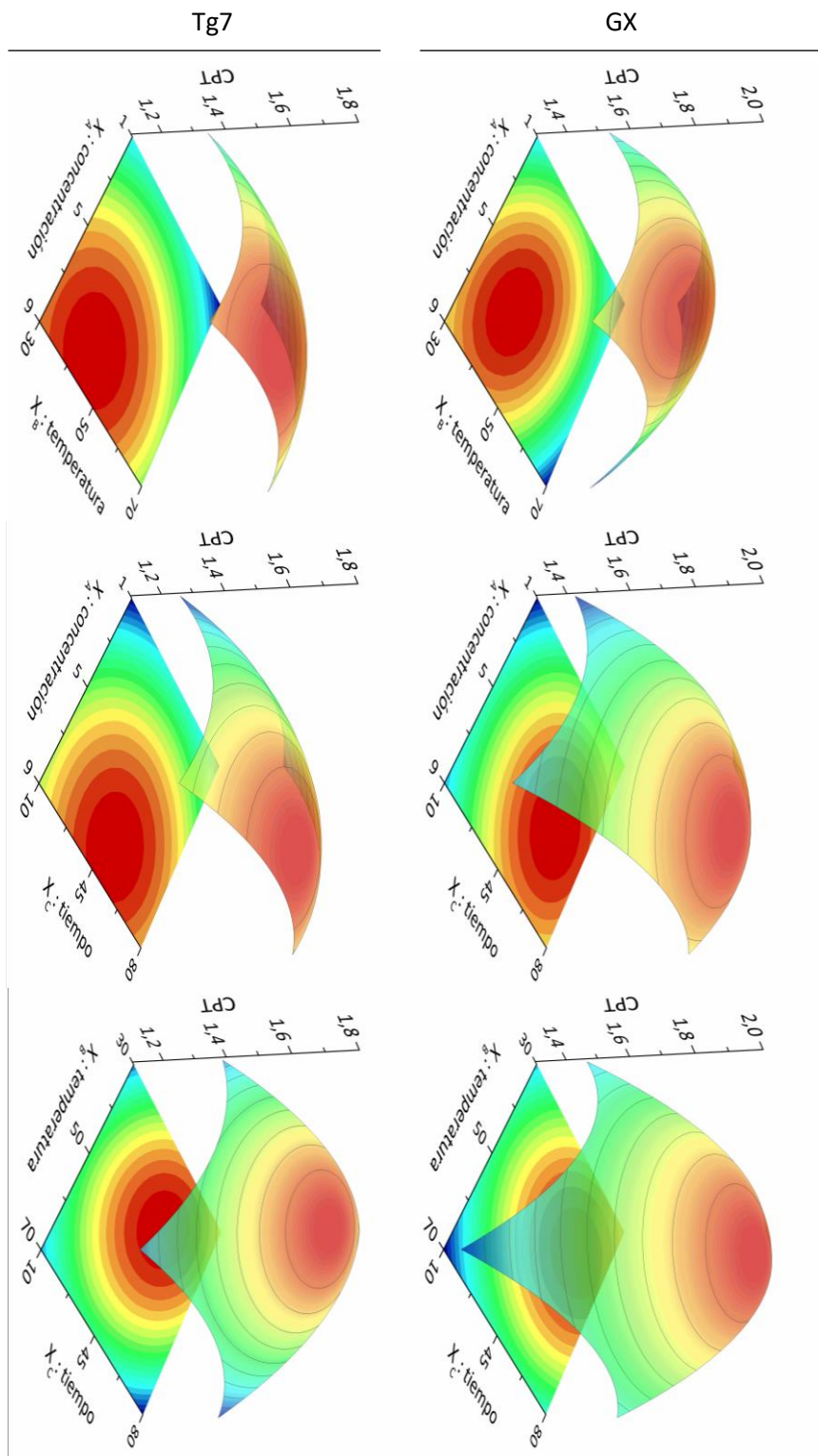


Figura 7.3. Continuación. Diagramas de superficie para las diferentes respuestas estimadas en función de dos factores experimentales manteniendo el tercer factor en su valor central. Gráficos de CPT (mg EAG/g) para GX (arriba) y Tg7 (abajo).

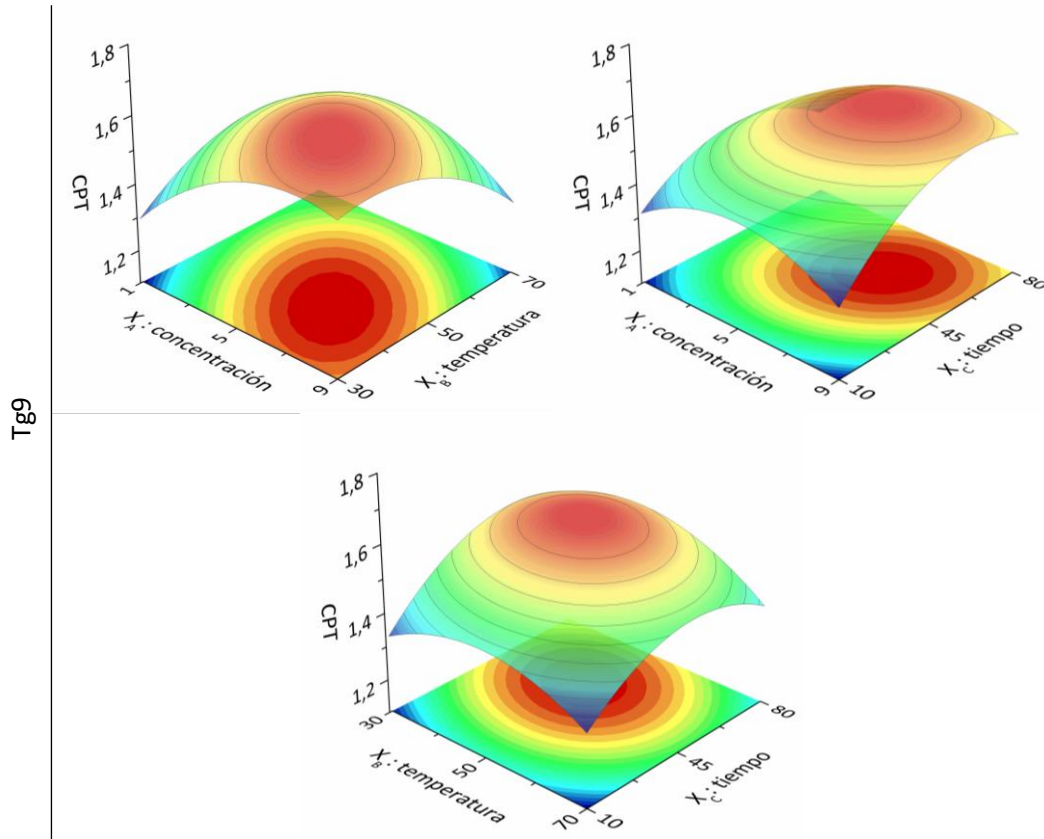


Figura 7.3. Continuación. Diagramas de superficie para las diferentes respuestas estimadas en función de dos factores experimentales manteniendo el tercer factor en su valor central. Gráficos de *CPT* (mg EAG/g) para Tg9.

Los nuevos modelos continuaron explicando de manera adecuada la variación en cada respuesta, con una maximización de los correspondientes R^2_{ajd} . La Fig. 7.3 muestra las superficies de respuesta de los modelos finales, expresando las respuestas en función de los factores considerados para cada surfactante.

Observando las superficies para *TIA*, puede verse que tal como se mencionó en el análisis del sentido de los efectos en el modelo inicial, valores medios de la concentración de surfactante, así como de la temperatura conducen a máximos de la respuesta para los tres detergentes. Sin embargo, el tiempo demostró un efecto diferente en GX y los tergitoles. Para GX, el efecto lineal X_C fue despreciado en el modelo recalculado y X_C^2 conduce a respuestas mínimas hacia valores centrales, aunque con una curvatura poco pronunciada, indicando una reducida influencia del tiempo. En el caso de los tergitoles, se obtiene el máximo de *TIA* a valores próximos al extremo mayor del intervalo de tiempo estudiado.

A partir de los modelos ajustados, para *TIA* se predicen valores máximos² de $106 \pm 12\%$, $99 \pm 11\%$ y $92 \pm 11\%$, respectivamente para GX, Tg7 y Tg9. Las condiciones óptimas en la aplicación de los SMAs serían 4,6% m/m a 41 °C durante 80 min (GX), 4,5% m/m a 45 °C durante 64 min (Tg7) y 4,2 % m/m a 47 °C durante 66 min (Tg9).

El *Pt* es la repuesta para la cual encontramos las mayores diferencias de comportamiento entre los surfactantes. Los gráficos de la Fig. 7.3 reafirman lo antes mencionado, que para GX y Tg7 los efectos de la concentración de surfactante llevan a alcanzar un máximo de la respuesta a valores medios del factor. X_A es despreciable para GX e incluso fue despreciado del modelo para Tg7, por lo que la mayor influencia está dada por el efecto cuadrático del factor. Tg9, por otro lado, presenta un máximo de proteínas a la mínima concentración, con una reducción casi lineal de la respuesta con el aumento en el factor. Los efectos de la temperatura provocan comportamientos similares para GX, Tg7 y Tg9, pero con predominancias diferentes en el modelo, con lo cual el efecto general resulta particular para cada surfactante. En el caso del primero, X_B predomina generando una reducción casi lineal en la respuesta a partir de incrementos del factor, presentando apenas una leve curvatura. En cambio, para ambos tergitoles X_B influye principalmente por sus efectos cuadráticos, maximizando la respuesta entre valores intermedios a reducidos de temperatura y alcanzando un mínimo hacia el extremo mayor del factor. Por otro lado, mientras que para GX y Tg7 el tiempo genera una respuesta directamente proporcional, con un crecimiento lineal para el primero (X_C^2 despreciado del modelo) y levemente curvado para el segundo, para Tg9, como se distinguió en el modelo inicial, el factor minimiza la respuesta hacia los valores centrales. Además, en el caso de GX, a valores bajos de tiempo los efectos de la temperatura son mínimos, mientras que a valores altos aumentan, reflejando la importancia de la interacción $X_B X_C$. Algo similar sucede con Tg9, pero para el caso de la interacción $X_A X_C$, donde a mayor tiempo mayor es el efecto de la concentración.

A partir de los modelos ajustados, para el contenido proteico se predicen valores mínimos³ de $27 \pm 6\%$, $25 \pm 4\%$ y $23 \pm 5\%$, respectivamente con GX, Tg7 y Tg9. Las condiciones óptimas en la aplicación de los SMAs serían 9,0% m/m a 70 °C durante 10 min (GX), 9,0% m/m a 70 °C durante 10 min (Tg7) y 9,0 % m/m a 70 °C durante 80 min (Tg9).

Los efectos relacionados con la temperatura observados tanto para el *Pt* como para *TIA* indican que los mínimos valores de las respuestas se encuentran siempre hacia el

² Valores de *TIA* expresados como media \pm IC.

³ Valores de *Pt* expresados como media \pm IC.

máximo de dicho factor, lo que se atribuye a la desnaturalización proteica que se produce a tan elevada temperatura (70°C).

Con respecto al *CPT*, el comportamiento observado para los tres sistemas estudiados (Fig. 7.3) fue bastante parecido. En general, la concentración maximiza la respuesta a valores entre el central y el extremo mayor del rango analizado, mientras que la temperatura hace lo propio entre el valor central y el inferior. Para Tg7, el decaimiento de la respuesta a temperaturas altas es menos drástico que lo observado para los otros dos surfactantes, con lo que el efecto lineal X_B es menos importante. El efecto de interacción entre la concentración y la temperatura es considerable, sobre todo para GX y Tg9, indicando que a altas temperaturas se invierte el efecto lineal del primer factor, presentando mínimos *CPTs* a altas concentraciones de surfactante. El tiempo es el factor con más influencia general, con un efecto lineal preponderante para GX y Tg9. Al aumentar el tiempo del proceso aumenta la respuesta, siendo mayor este cambio a valores bajos del factor.

A partir de los modelos ajustados para *CPT* se predicen valores máximos⁴ de $1,88 \pm 0,22$ mg EAG/g, $1,67 \pm 0,17$ mg EAG/g y $1,62 \pm 0,14$ mg EAG/g, respectivamente para GX, Tg7 y Tg9. Las condiciones óptimas en la aplicación de los SMAs serían 6,2% m/m a 43 °C durante 63 min (GX), 7,6% m/m a 43 °C durante 54 min (Tg7) y 6,8 % m/m a 41 °C durante 60 min (Tg9). Si comparamos el modelo resultante para GX con el calculado en la sección anterior, podemos ver que las condiciones óptimas son diferentes, a una concentración más baja de surfactante (~ 40% menor) y menor temperatura (~ 10 °C menos). Esto da cuentas de la importancia de la matriz y de la necesidad de optimizar particularmente para cada matriz a trabajar, como se mencionó anteriormente en este capítulo. Además, debe aclararse que existe una notable diferencia entre el *CPT* óptimo aquí predicho y el obtenido en la sección anterior. Esto se explica considerando la diferente relación harina/SMA utilizada (10% m/m en la presente sección y 2% m/m en la anterior), siendo que a menor porcentaje mayor es el *CPT* obtenido por unidad de masa de harina.

Luego se estimaron las funciones de deseabilidad. La función “deseabilidad de Derringer” (deseabilidad general) [11] ayuda a determinar la combinación de los factores experimentales que simultáneamente optimiza varias respuestas. La deseabilidad general se alcanzó considerando como respuesta más importante *TIA*, la cual junto a *CPT* fueron

⁴ Valore de *CPT* expresados como media \pm IC.

maximizadas, mientras que se minimizó *Pt*. Como se muestra en la Fig. 7.4, a partir de la función se estimaron superficies de predicción en función de los tres factores estudiados.

Inicialmente, la deseabilidad óptima se calculó por separado para cada surfactante, obteniéndose así condiciones ideales para cada sistema. La mayor deseabilidad predicha se obtuvo para GX (0,810), siendo considerablemente menor para Tg7 (0,656) y Tg9 (0,530). Las condiciones correspondientes a esos valores óptimos fueron de 4,7% m/m a 48 °C durante 20 min para GX, 5,3% m/m a 43 °C durante 61 min para Tg7 y 5,6% m/m a 47 °C durante 61 min para Tg9. Así se obtendrían valores respectivos para GX, Tg7 y Tg9: *-TIA* de 100%, 98% y 90%, *-Pt* de 36%, 40% y 38%, *-CPT* de 1,68 mg EAG/g, 1,64 mg EAG/g y 1,61 mg EAG/g.

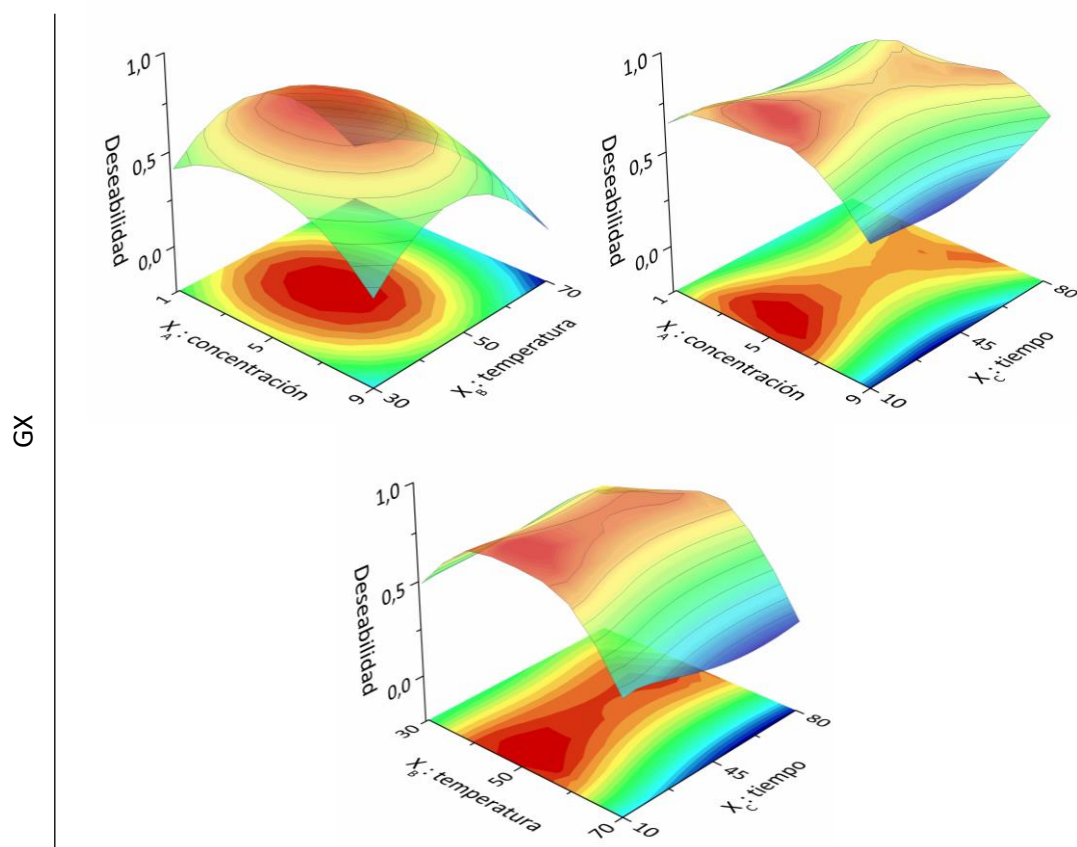


Figura 7.4. Diagramas de superficie para la deseabilidad estimada en función de dos factores experimentales manteniendo el tercer factor en su valor central. Gráficos de deseabilidad para GX

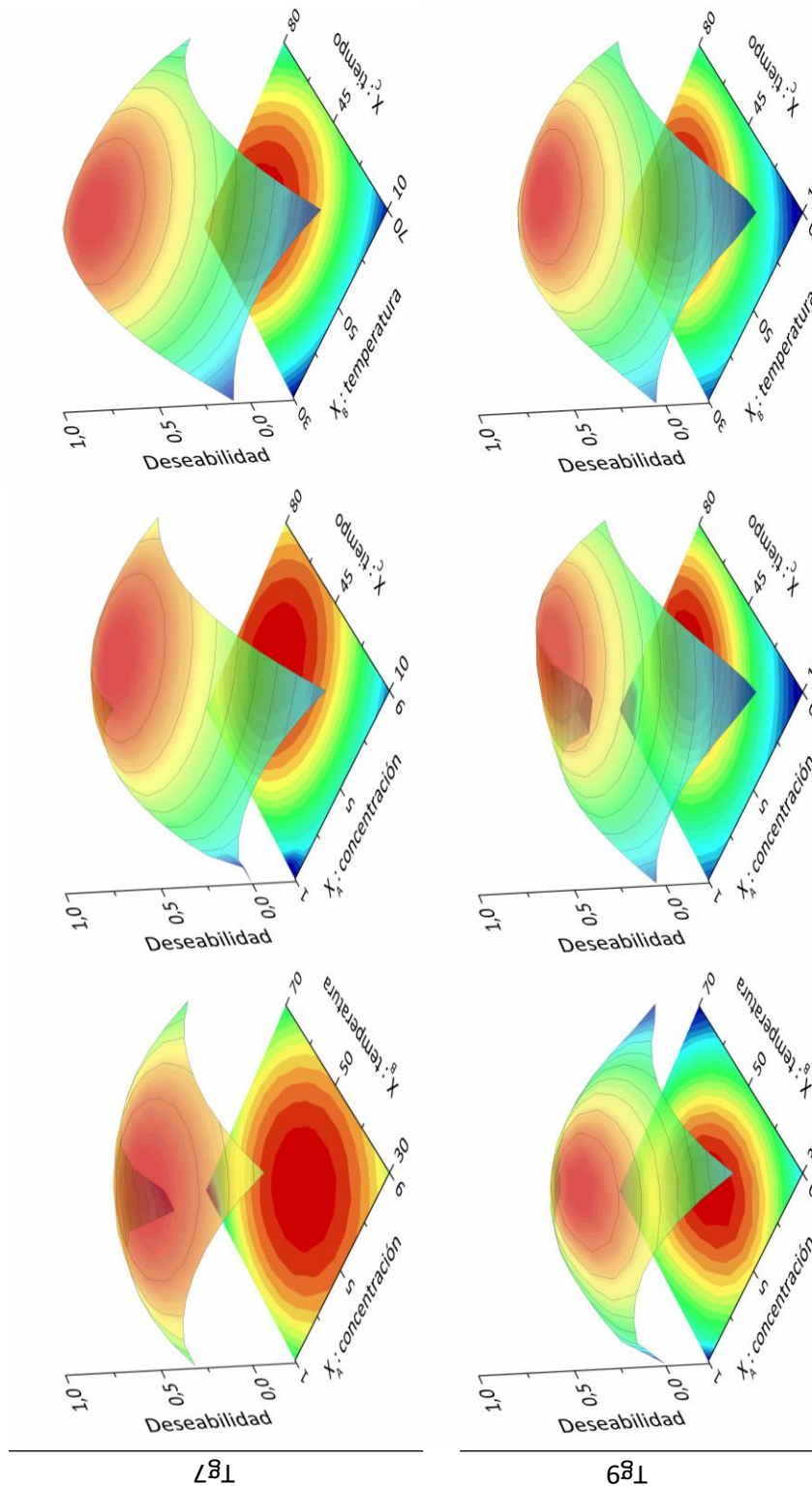


Figura 7.4. Continuación. Diagramas de superficie para la deseabilidad estimada en función de dos factores experimentales manteniendo el tercer factor en su valor central. Gráficos de deseabilidad para Tg7 (arriba) y Tg9 (abajo).

Luego, vislumbrando la posibilidad de diseñar un proceso unificado, independientemente del surfactante empleado (entre los estudiados), se sondearon otras posibilidades. Se consideró entonces, la condición intermedia de 5% m/m de surfactante a

45 °C durante 45 min. Fueron predicho así valores⁵ de deseabilidad = 0,751, *TIA* = 97 ± 12%, *Pt* = 39 ± 5% y *CPT* = 1,84 ± 0,23 mg EAG/g para GX; deseabilidad = 0,620, *TIA* = 95 ± 11%, *Pt* = 38 ± 4% y *CPT* = 1,63 ± 0,17 mg EAG/g para Tg7; deseabilidad = 0,482, *TIA* = 89 ± 11%, *Pt* = 39 ± 5% y *CPT* = 1,59 ± 0,14 mg EAG/g para Tg9. Estas predicciones indican que, la condición unificada permitiría obtener resultados deseables que no se alejan de los óptimos previstos individualmente para cada surfactante, lo cual brinda un escenario deseado de tecnología flexible, aplicable de manera más general y no restricta a un surfactante particular.

7.3. CONCLUSIONES PARCIALES

A partir de las consideraciones previas, establecidas en el capítulo anterior, pudo procederse a la optimización de las condiciones extractivas de isoflavonas a partir de una matriz más simple que la natural, comprimidos comerciales. Las condiciones optimizadas determinadas en este capítulo (GX080 11% m / m pH 4,5, extracción a 54 ° C durante 60 min) se aplicaron también a la matriz real, es decir harina de soja, lo que condujo a una eficiencia extractiva del sistema micelar mucho más alta que la del metanol, un solvente tradicional. La capacidad de los surfactantes para penetrar en los poros de la matriz, afectar la interacción soluto-matriz y aumentar el área de contacto fluido-sólido serían las principales causas de su eficiencia aumentada.

Por otro lado, también se optimizaron SMAs de GX, Tg7 y Tg9 en la extracción de IT e IFs, con una reducida extracción de proteínas de la harina de soja. Realizando una optimización múltiple se encontraron condiciones deseables (5% m/m de surfactante, pH 4,5 a 45 °C durante 45 min), aplicables a los tres surfactantes con resultados similares predichos. En este punto, es importante mencionar lo apropiado de la utilización de herramientas estadísticas sólidas en el proceso de optimización. Se trata de sistemas complejos afectados fuertemente por diferentes variables y sus interacciones, siendo prácticamente inviable lograr predecir comportamientos certeros en base al método clásico unifactorial (de una variable a la vez). Asimismo, nótese lo dificultoso que es encontrar una explicación física contundente para el efecto causado por cada variable en la respuesta analizada. Para tomar dimensión de la mencionada complejidad, basta con considerar una de esas variables, a modo de ejemplo, tal como la temperatura, y sus potenciales acciones en la extracción de un dado analito. Esta puede afectar la estabilidad de la molécula de

⁵ Valores de *TIA*, *Pt* y *CPT* expresados como media ± IC.

interés, el proceso de liberación por ruptura de interacciones de esa sustancia de la matriz que la contiene, determina la velocidad del proceso difusivo hacia el extracto, y en el caso de los sistemas surfactantes influye también en la formación micelar y en el proceso de separación de fases. Esto se relaciona con el hecho que los modelos propuestos no consiguen explicar entre 15 y 25% de la variabilidad de los datos

Finalmente, haber logrado una condición óptima, común a los tres surfactantes, posiciona a los sistemas micelares como potencialmente aplicables en una amplia gama de extracciones líquido-sólido. Además, la posibilidad de sustituir solventes orgánicos por estos agentes biodegradables, no-inflamables y no-tóxicos, y la posible aplicación en procedimientos de extracción a gran escala, hacen que estos sistemas sean adecuados para fines industriales.

CAPÍTULO 8 - Producción de concentrados proteicos de soja

☞ IDEAS PREVIAS. INTERROGANTES

Tradicionalmente los concentrados proteicos de soja (SPC) se obtienen a partir de harina de soja desgrasada, eliminando el azúcar soluble y constituyentes menores, mediante alcohol acuoso (ó mezcla alcohol-agua) o una solución de ácido diluido en el rango de pH de 4,0-4,8 [14]. Los rendimientos de SPC para estos procesos convencionales se ha informado que varían entre 60 y 70% respecto del contenido proteico de la harina [14]. Así, aproximadamente dos tercios del contenido proteico en los copos/harina resulta en residuos insolubles después de la extracción y otro tercio son proteínas de suero de soja que se pierden y entre los cuales encontramos a la mayoría de los antinutrientes proteicos [360].

Los péptidos bioactivos derivados de los alimentos generalmente están encriptados en las secuencias de aminoácidos de las proteínas alimentarias y comúnmente contienen 2-

20 aminoácidos, incluso también se han informado péptidos bioactivos de más de 20 residuos de aminoácidos [361]. Estos péptidos a menudo son funcionalmente inactivos dentro de las proteínas nativas y deben liberarse mediante proteólisis para cumplir sus funciones bioactivas específicas. Los péptidos bioactivos se producen a partir de proteínas provenientes de la dieta mediante los siguientes mecanismos: i) fermentación (enzimas proteolíticas excretadas por los microorganismos); ii) fabricación de hidrolizados proteicos con enzimas comerciales; iii) digestión in-vivo de proteínas de la dieta; o iv) digestión in-vitro, usando diversas enzimas proteolíticas como pepsina, tripsina, Corolase PP y pancreatina [362].

En este contexto, se proponen metodologías que permitan la detoxificación de harina de soja dando concentrados proteicos que mantengan o mejoren su calidad con respecto de los obtenidos por métodos clásicos. Para ello se considera la aplicación de sistemas micelares acuosos que puedan establecerse como alternativas sustentables para la industria. Como un parámetro clave de calidad se considerarán dos potenciales capacidades bioactivas muy extendidas e importantes, actividades antioxidante y antihipertensiva, relacionadas con la calidad proteica del producto y que pueden mejorarse durante el consumo.

Como mapa de ruta del presente capítulo, se plantearon los siguientes interrogantes: *¿Las metodologías propuestas tendrán mayor o menor capacidad extractiva de proteínas solubles, antinutrientes e isoflavonas que la metodología clásica? ¿Será posible separar y recuperar estos componentes de los extractos como subproductos del proceso? ¿Cómo será la calidad proteica de los concentrados producidos por las metodologías propuestas con respecto a la clásica? ¿Y su calidad nutritiva y bioactiva?*

8.1. CARACTERIZANDO EL PROCESO

En base a los resultados previos se diseñó un proceso de producción de concentrados proteicos de soja (SPCs) y detoxificación de harina de soja aplicando sistemas micelares acuosos (SMAs), cuyos detalles técnicos fueron explicitados en la Sección 3.2.25. A modo de guía para facilitar la lectura del presente capítulo y favorecer a la comprensión de los resultados, a continuación, se expone un diagrama del proceso realizado (Fig. 8.1).

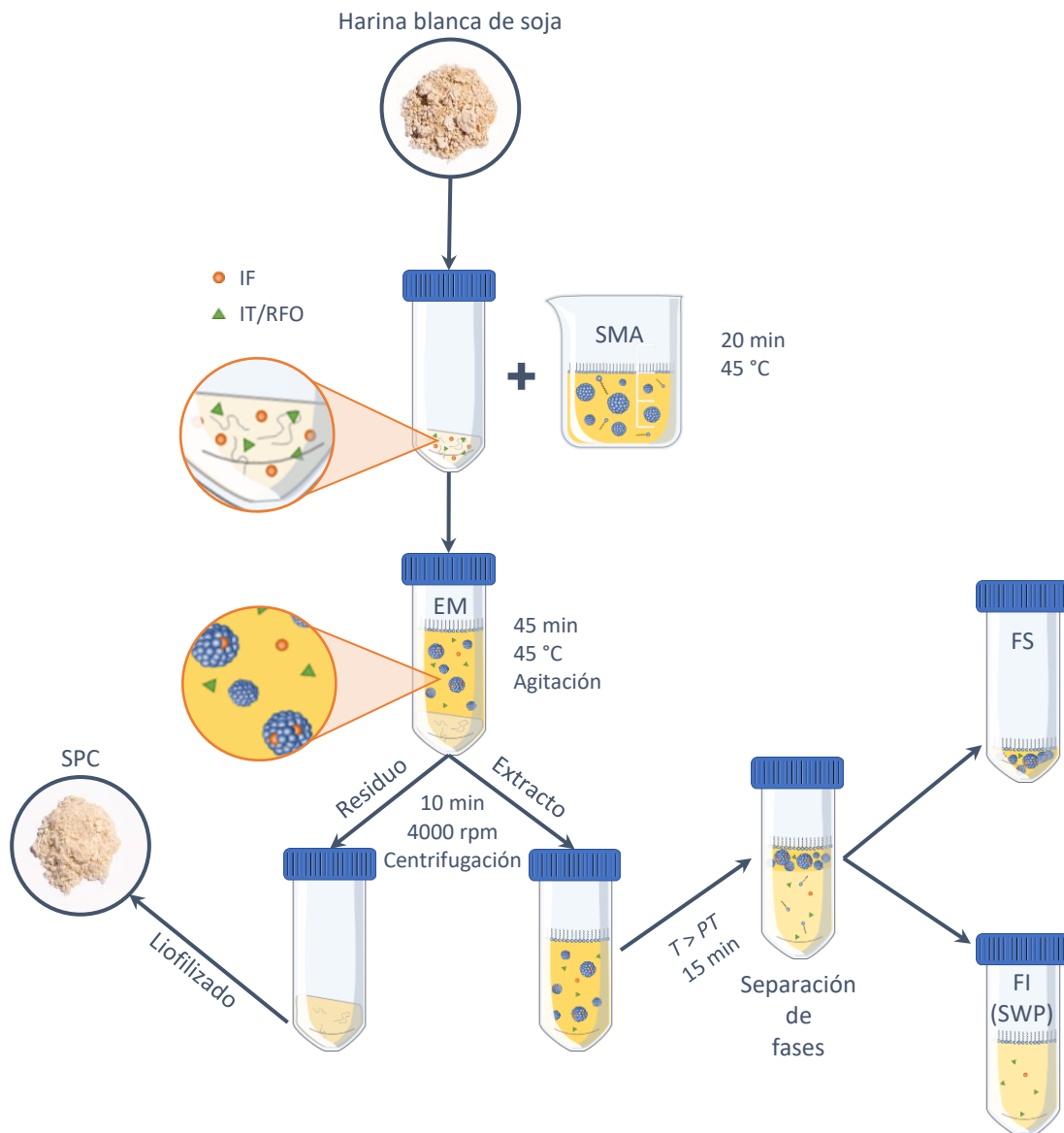


Figura 8.1. Diagrama de la metodología propuesta para la producción de SPCs con SMAs. EM: extracción micelar; FS: fase superior; FI: fase inferior.

En la Fig. 8.1 se destaca la aplicación de una extracción micelar (EM) inicial seguida de la separación de fases, micelar (FS) y acuosa (FI) por calentamiento del extracto a una temperatura superior al punto de turbidez (*PT*). Es importante aclarar que la EM para GX y

Tg7 es equivalente a una EDFA (extracción en dos fases acuosas), dado que se trabajó por encima del *PT* de ambos SMAs, no así para Tg9.

8.1.1. Caracterización peptídica de los SWPs

Luego de aplicar la metodología clásica (acidificación) y los SMAs para preparar concentrados proteicos, los extractos obtenidos (SWPs), presumiblemente ricos en factores antinutricionales, se caracterizaron según el tamaño de sus componentes peptídicos mediante cromatografía de exclusión molecular o filtración por geles, como se detalla en la Sección 3.2.13.

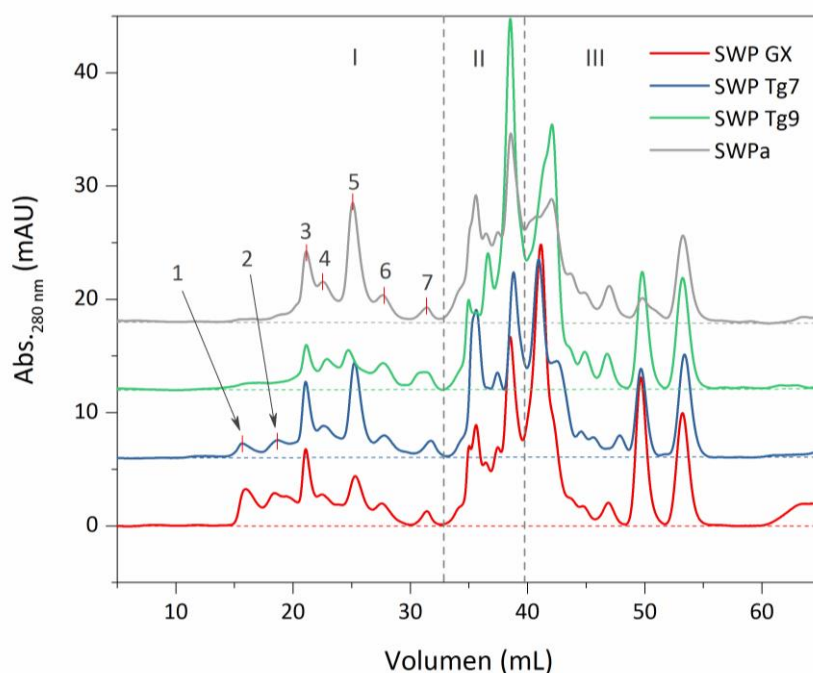


Figura 8.2. Cromatografía de exclusión molecular. Cromatogramas (líneas sólidas) de distribución de tamaños moleculares de los SWP obtenidos por el método clásico (SWPa), y las metodologías propuestas con SMAs de GX, Tg7 y Tg9. Las líneas discontinuas horizontales representan la línea base de cada cromatograma y las verticales dividen regiones: I, II y III. Los números representan a los picos correspondientes a la región I.

En la Fig. 8.2 se representan los cromatogramas obtenidos, donde se identifican tres regiones principales. En la primera (I), nos encontramos con grandes proteínas y polipéptidos, en la segunda (II) con medianos a pequeños péptidos, en tanto que en la tercera (III) podemos apreciar aminoácidos libres y pequeñas moléculas capaces de absorber a 280 nm. La región de mayor interés a los fines del presente trabajo fue la I, donde podemos encontrar a los factores antinutricionales proteicos presentes en la harina de soja.

Al analizar individualmente cada uno de los picos a partir de sus masas moleculares medias aparentes (M_m), se infirió que los picos 1 y 2, con respectivos tamaños medios

aproximados de 690 kDa y 296 kDa, corresponderían a agregados proteicos y a la estructura cuaternaria nativa de la glicinina. Para el caso de los picos 3 (M_m de 120 kDa) y 4 (M_m de 72 kDa) se abarcan estructuras nativas de β -conglucina y desnaturalizadas tanto de ésta como de glicinina, por parte del primero (pico 3), y subunidades de la β -conglucina (α , α' y β) y glicinina (subunidades ácidas) en el segundo (pico 4). Por su parte, el quinto pico (5) con una M_m aproximada de 30 kDa, es esperable que comprenda a la subunidad básica de glicinina, lectina y al inhibidor de tripsina tipo Kunitz (ITK), siendo estos últimos dos de los principales antinutrientes de la soja, que junto al inhibidor de tripsina tipo Bowman-Birk (ITBB), presente en el pico 6 (tamaño medio de 13 kDa), son los factores objetivos de la extracción. Finalmente, un séptimo pico de tamaño medio de 4 kDa, posiblemente contenga a un péptido de alto valor comercial y creciente interés en la actualidad, Lunasin [363–365]. Tanto el pico 5 como el 6 se fraccionaron y enviaron a analizar por espectrometría de masas (Maldi-tof), comprobando la presencia de los correspondientes inhibidores de tripsina para ambas fracciones.

Tabla 8.1. Áreas de picos principales de la región I y áreas totales de las regiones II y III.

Región	Pico	Área (mL*mAU) [†]			
		SWP GX	SWP Tg7	SWP Tg9	SWPa
I	1	5,4 ± 0,3	1,6 ± 0,1	NA	NA
	2	7,7 ± 0,5	2,5 ± 0,2	NA	NA
	3	7,7 ± 0,5 ^a	7,3 ± 0,5 ^a	5,4 ± 0,5	7,3 ± 0,6 ^a
	4	5,5 ± 0,4 ^a	4,7 ± 0,3 ^{a, b}	4,5 ± 0,3 ^b	4,8 ± 0,4 ^{a, b}
	5	8,2 ± 0,6 ^a	11,2 ± 0,8 ^b	7,3 ± 0,5 ^a	14,4 ± 1,0 ^b
	6	4,8 ± 0,4 ^a	4,0 ± 0,2 ^a	5,8 ± 0,5	3,1 ± 0,2
	7	2,3 ± 0,3 ^a	2,4 ± 0,1 ^a	5,1 ± 0,3	1,1 ± 0,1
II		43,4 ± 2,9 ^a	49,6 ± 4,2 ^a	77,1 ± 3,9	49,2 ± 3,2 ^a
III		82,1 ± 4,7 ^a	66,3 ± 4,0	94,3 ± 7,1 ^a	51,3 ± 2,3

[†] Valores expresados como media ± SD.

^{a, b} Valores de la misma fila que comparten superíndice no presentan diferencias estadísticas entre sí, dado el análisis de sus varianzas (ANOVA) con la prueba de rangos múltiples de Tukey para un nivel de significancia de 0,05.

La Tabla 8.1 muestra los datos de las áreas calculadas para cada uno de los picos de la región I, así como las totales de las regiones II y III. El método propuesto (Mp) con Tg9 y el método clásico (Ma) no extrajeron agregados proteicos ni glicinina, como sí lo hicieron los sistemas de GX y Tg7, siendo notablemente mayor para GX. Para el caso del pico 3, el SWP de Tg9 se diferenció de los otros con un valor menor, mientras que para el 4, éste se diferencia sólo del SWP de GX. Teniendo en cuenta los 4 primeros picos, el método de mayor

poder de lixiviado es el que utiliza GX, seguido del de Tg7. Con respecto a los factores antinutricionales, el método clásico junto al de Tg7 resultaron ser mejores para extraer ITK y lectinas, sin embargo, no así para el ITBB, para el cuál Tg9 fue el mejor. Adicionalmente, cabe mencionar el marcado y promisorio poder extractivo que presentó Tg9 para el pico que podría contener al péptido Lunasin, dada la relevancia que éste está adquiriendo debido a sus comprobadas propiedades benéficas para la salud [366–369]. Finalmente, como se observa a partir de las regiones II y III, el SWP de Tg9 presentó un contenido mayor de pequeños péptidos, así como junto al SWP de GX, la mayor cantidad de aminoácidos libres y pequeñas moléculas que absorben a 280 nm.

8.1.2. Extracción de isoflavonas

Una de las propiedades que resulta de gran interés analizar para las metodologías aplicadas es la capacidad de extraer isoflavonas, teniendo en cuenta la posibilidad de recuperarlas por su alto valor comercial.

En la Tabla 8.2 se reportan los niveles de IFs extraídas por cada metodología. Las isoflavonas extraídas se identificaron cuantitativamente mediante cromatografía líquida de alto rendimiento. En general se encontró que los SMAs se diferenciaron notoriamente del proceso clásico (Ma), mostrando niveles de isoflavonas totales superiores. Un análisis más detallado evidenció que la metodología que aplica GX fue la que más se destacó en relación a cada IF en particular, superando a la extracción ácida típica. Por otro lado, Tg9 presentó niveles de agliconas iguales (para genisteína), o menores (para daidzeína) que Ma, lo que puede relacionarse con su carácter más hidrofílico. Como también se aprecia en la Tabla 8.2, las diferentes muestras presentaron diferentes composiciones de isoflavonas, sin embargo, en todos los casos, el contenido más alto correspondió a las formas gliconadas, daidzina y genistina. Estos resultados son consecuencia del alto contenido de β -glicósidos con respecto al de las agliconas en soja y derivados. Por ejemplo, es bien sabido que los agliconas de la harina de soja son aproximadamente el 2-3% de las isoflavonas totales, mientras que los β -glucósidos no conjugados representan el 34% del total de IFs [203].

En la Tabla 8.2 también se presentan los coeficientes de reparto (Kr) de las isoflavonas entre las fases de alta y baja concentración de micelas, así como sus rendimientos en la fase rica en micelas (Rr). Para el cálculo de estos parámetros de eficiencia se tuvieron en cuenta los volúmenes de las fases superior (FS) e inferior (FI) de cada SMA. Los volúmenes medios de la FS fueron 12,4, 10,3 y 9,1 mL correspondientes a GX, Tg7 y Tg9 respectivamente. Por su parte, los volúmenes medios de FI fueron 40,3, 44,7 y 40,9 mL correspondientes a GX, Tg7 y Tg9 respectivamente. Cabe mencionar que las diferencias en

los volúmenes totales recuperados se debieron a las pérdidas de líquido que retuvo el residuo sólido. Los *Krs* medidos mostraron una tendencia de las IFs a repartirse hacia la fase superior rica en micelas ($Kr \gg 1$). En relación al *Rr*, el alto porcentaje de recuperación en la FS dejó en claro la gran efectividad a la hora de recuperar las isoflavonas en la fase rica en micelas. Considerando tanto el poder extractivo como su recuperación de manera concentrada en la FS, Mp de GX se presentó como el mejor sistema para todas las IFs y en especial para las agliconas. También cabe destacar, que de esta manera se consiguió extraer más IFs que con el método clásico y en una concentración entre cuatro y cinco veces mayor, lo que tecnológicamente implica una gran reducción de volúmenes a manejar a la hora de recuperar estos compuestos para su aplicación industrial.

Tabla 8.2. Isoflavonas extraídas.

IF		Metodología				
		Mp			Ma	
		GX	Tg7	Tg9		
Agliconas [†]	Daidzeína	<i>C</i> [‡]	100,9 ± 0,4	62,0 ± 3,6 ^{a, b}	61,1 ± 1,4 ^a	70,0 ± 3,1 ^b
		<i>Kr</i>	9,0 ± 0,7 ^a	23,8 ± 2,5	6,1 ± 0,6 ^a	NA
		<i>Rr</i> [*]	73,3 ± 1,6	85,8 ± 3,1	57,6 ± 2,4	NA
	Genisteína	<i>C</i> [‡]	62,5 ± 4,3	40,2 ± 2,0 ^a	30,3 ± 1,8 ^a	35,0 ± 2,4 ^a
		<i>Kr</i>	9,3 ± 2,1 ^a	14,3 ± 2,7 ^a	14,2 ± 2,8 ^a	NA
		<i>Rr</i> [*]	73,8 ± 4,4 ^a	78,7 ± 6,5 ^a	78,2 ± 7,0 ^a	NA
Gliconadas [†]	Daidzina	<i>C</i> [‡]	603,9 ± 30,0 ^a	490,1 ± 20,3 ^b	513,9 ± 22,6 ^{a, b}	183,0 ± 15,8
		<i>Kr</i>	3,5 ± 0,2 ^a	4,2 ± 0,2 ^a	6,0 ± 0,3	NA
		<i>Rr</i> [*]	51,5 ± 1,5 ^a	49,3 ± 1,1 ^a	57,2 ± 1,3	NA
	Genistina	<i>C</i> [‡]	813,7 ± 16,6 ^a	770,4 ± 21,4 ^a	461,2 ± 4,3 ^b	418,7 ± 15,3 ^b
		<i>Kr</i>	8,5 ± 0,4 ^a	7,4 ± 0,4 ^a	11,2 ± 1,1	NA
		<i>Rr</i> [*]	72,3 ± 0,9 ^a	63,0 ± 1,3	71,4 ± 2,0 ^a	NA
Totales [†]	<i>C</i> [‡]	1581,0 ± 50,6	1362,8 ± 47,2	1066,5 ± 30,1	706,7 ± 36,7	
	<i>Kr</i>	5,9 ± 0,3 ^a	6,4 ± 0,4 ^a	8,0 ± 0,7	NA	
	<i>Rr</i> [*]	64,4 ± 1,2 ^a	59,5 ± 1,5 ^a	64,0 ± 1,9 ^a	NA	

[†] Valores expresados como media ± SD.

[‡] Cantidad de IF extraída expresada en µg/g de harina de soja.

^{*} Rendimiento de IF alcanzado en la fase rica en micelas expresado en %.

^{a, b} Valores de la misma fila que comparten superíndice no presentan diferencias estadísticas entre sí, dado el análisis de sus varianzas (ANOVA) con la prueba de rangos múltiples de Tukey para un nivel de significancia de 0,05.

Tabla 8.3. Isoflavonas de soja extraídas con diferentes metodologías.

Método extractivo	Fuente	Contenido de IF [†]			Referencia	
		Daidzeína	Genisteína	Daidzina		
SMA GX	Harina	100,90 ± 0,40	62,50 ± 4,30 ^a	604 ± 30 ^a	813,70 ± 16,60	**
SMA Tg7	Harina	62,00 ± 3,60 ^a	40,20 ± 2,00 ^b	490 ± 20 ^b	770,40 ± 21,40 ^a	**
SMA Tg9	Harina	61,10 ± 1,40 ^a	30,30 ± 1,80 ^{c,d}	514 ± 23 ^b	461,20 ± 4,30 ^b	**
SMA Triton X-114	Harina	142,60 ± 2,60	69,60 ± 0,20 ^a	350 ± 8 ^c	736,50 ± 3,30 ^a	Cordisco y col. (2016) [209]
Agua/acetona/etanol	Harina	Nd	38,00 ± 0,01 ^b	382 ± 12 ^c	467,00 ± 8,00 ^b	Andrade y col. (2016) [203]
Acetonitrilo 80%	Poroto	36,60 ± 2,00 ^b	36,30 ± 0,40 ^{b,c}	670 ± 18 ^d	644,70 ± 22,40	Lee y col. (2015) [377]
Metanol 80%	Poroto	22,10 ± 2,50 ^c	26,40 ± 1,30 ^d	631 ± 15 ^{a,d}	587,60 ± 2,20	Lee y col. (2015) [377]
Agua	Okara	22,00 ± 10,00 ^c	3,00 ± 4,00 ^e	108 ± 22	71,00 ± 16,00 ^c	Jankowiak y col. (2014) [370]
Etanol 70%	Okara	173,00 ± 8,00	194,00 ± 14,00 [*]	160 ± 7 ^e	171,00 ± 7,00	Jankowiak y col. (2014) [370]
SMA reverso Triton X-100	Harina	Nd	79,03 ± 4,31	168 ± 5 ^e	118,24 ± 4,98	Zhao y col. (2010) [258]
CO ₂ supercrítico	Harina	30,93 ± 0,04 ^{b,c}	1,71 ± 0,01 ^e	—	53,64 ± 0,06 ^c	Rostagno y col. (2002) [378]

[†] Valores expresados como media ± SD, en µg/g de harina de soja. Nd: no detectado.

^{a-e} Valores de la misma fila que comparten superíndice no presentan diferencias estadísticas entre sí, dado el análisis de sus varianzas (ANOVA) con la prueba de rangos múltiples de Tukey para un nivel de significancia de 0,05.

^{*} Valores no incluidos en el análisis debido por estar fuera de la homocedasticidad (prueba de Bartlett).

^{**} Valores correspondientes al presente trabajo.

Al comparar los datos obtenidos en este trabajo con los de otras metodologías (Tabla 8.3), se puede apreciar que la cantidad de agliconas recuperadas en este trabajo fue similar o incluso superior a la mayoría de ellas. La extracción con etanol al 70% fue la metodología que extrajo la mayor cantidad de genisteína y daidzeína, pero sobre otro derivado de soja como es el okara [370]. Al comparar el rendimiento extractivo del etanol y el agua pura, se puede observar que la extracción de agua no es capaz de extraer las IFs menos hidrofílicas [356]. Por otro lado, también es importante señalar que la cantidad de IFs (agliconas y β -glicósidos) obtenida en este trabajo y otro que realizamos previamente con Triton X-114 [209], fue superior a la de la extracción con micelas inversas (Zhao et al., 2010), lo que sugiere que el uso de micelas directas mejora el rendimiento extractivo.

Cuando los compuestos objetivo se recuperan en la fase rica en micelas de los sistemas micelares acuosos, la alta concentración de surfactante puede comprometer la aplicabilidad de este producto. Para subsanar este problema, en un trabajo previo, aplicamos un segundo paso extractivo que tiende a revertir el comportamiento de partición inicial [209]. Para ello, se añadió una solución acuosa básica a la fase micelar de un SMA de Triton X-114, lo que convierte a las IFs en formas aniónicas, con mayor solubilidad en la fase pobre en micelas [356]. De acuerdo con los resultados obtenidos, solo el 50% de las IFs se recuperó en la fase acuosa, lo cual no consideramos del todo satisfactorio [209]. Por el momento, el uso de la solución básica puede ser un punto de partida apropiado para lograr la separación entre las IFs y las micelas, sin embargo, aún debe llevarse a cabo una investigación más profunda sobre los medios para mejorar el rendimiento de la extracción reversa o alternativamente, complementar el proceso con alguna otra metodología.

8.1.3. Extracción de rafinosa/estaquirosa

Los carbohidratos de soja son en gran medida indeseables debido a su baja digestibilidad. Al respecto, los oligosacáridos de la familia de la rafinosa (RFOs) consiguieron extraerse en los procesos aquí evaluados.

Como se muestra en la Tabla 8.4, estos azúcares fueron extraídos en mayor cantidad mediante los SMAs que con la metodología clásica. Analizando los K_r se encontró que estos azúcares levemente prefirieron la fase inferior (FI), es decir en los SWPs, tendencia que tiene que ver con su carácter hidrofílico. A pesar de no encontrar repartos unidireccionados hacia una dada fase, teniendo en cuenta que el volumen de la fase inferior, pobre en micelas, resultó 3,3-4,5 veces superior a la de la fase superior, era de esperar que la mayoría de RFOs se recuperaran en la FI. Esto se corrobora al observar los R_r , evidenciando que la mayor parte de los oligosacáridos permaneció en los SWPs. A pesar que a grandes rasgos los tres

detergentes cumplieron satisfactoriamente en la extracción de estos compuestos antinutricionales, puede comentarse que la recuperación en las fases acuosa fue significativamente mayor para ambos tergitos (SWP ~ 85%) que para GX (SWP ~ 79%).

Tabla 8.4. RFOs extraídos, cuantificado mediante HPLC.

Metodología	RFO [†]			
	C (UR/g) [‡]	Kr	Rr (%)	
Mp	GX	16,3 ± 1,5 ^a	0,85 ± 0,02 ^a	79,3 ± 1,3
	Tg7	17,9 ± 1,0 ^a	0,76 ± 0,05 ^a	85,1 ± 1,3 ^a
	Tg9	18,5 ± 1,3 ^a	0,75 ± 0,02 ^a	85,7 ± 0,9 ^a
Ma		12,1 ± 0,8	NA	NA

[†] Valores expresados como media ± SD.

[‡] Valores expresados en relación a 1 g de harina de soja.

^a Valores de la misma columna que comparten superíndice no presentan diferencias estadísticas entre sí, dado el análisis de sus varianzas (ANOVA) con la prueba de rangos múltiples de Tukey para un nivel de significancia de 0,05.

Los galacto-oligosacáridos de soja representan una fuente de carbono alternativa y económica para la conversión microbiana a productos de valor agregado como el ácido succínico y el etanol [371]. En este sentido, la producción de concentrados proteicos de soja resulta una alternativa sustentable y comercialmente interesante, dado que permite recuperar los RFOs conservando el valor nutritivo y comercial del residuo proteico para alimentación humana y/o animal. En concreto, los SMAs aplicados presentan una mayor capacidad (26-35%) de extraer RFOs que la metodología clásica, lo que es una notable ventaja.

Teniendo en cuenta, además, que a partir de la separación de fases también se consigue separar la mayor parte de los RFOs de las IFs, la metodología propuesta sugiere ser una alternativa más que interesante.

8.2. CARACTERIZANDO EL PRODUCTO

8.2.1. Espectrometría IR

El análisis espectroscópico de moléculas poliméricas es complejo debido a las vibraciones moleculares que surgen de numerosos átomos. La espectroscopia FTIR es una técnica particularmente útil para el estudio de sistemas proteicos, dado que hay varias regiones fácilmente identificables en el espectro infrarrojo medio, habiendo nueve bandas

características denominadas amida A, B, I, II ... VII, siendo las más ampliamente utilizada en estudios estructurales de proteínas: amida I, amida II y amida III.

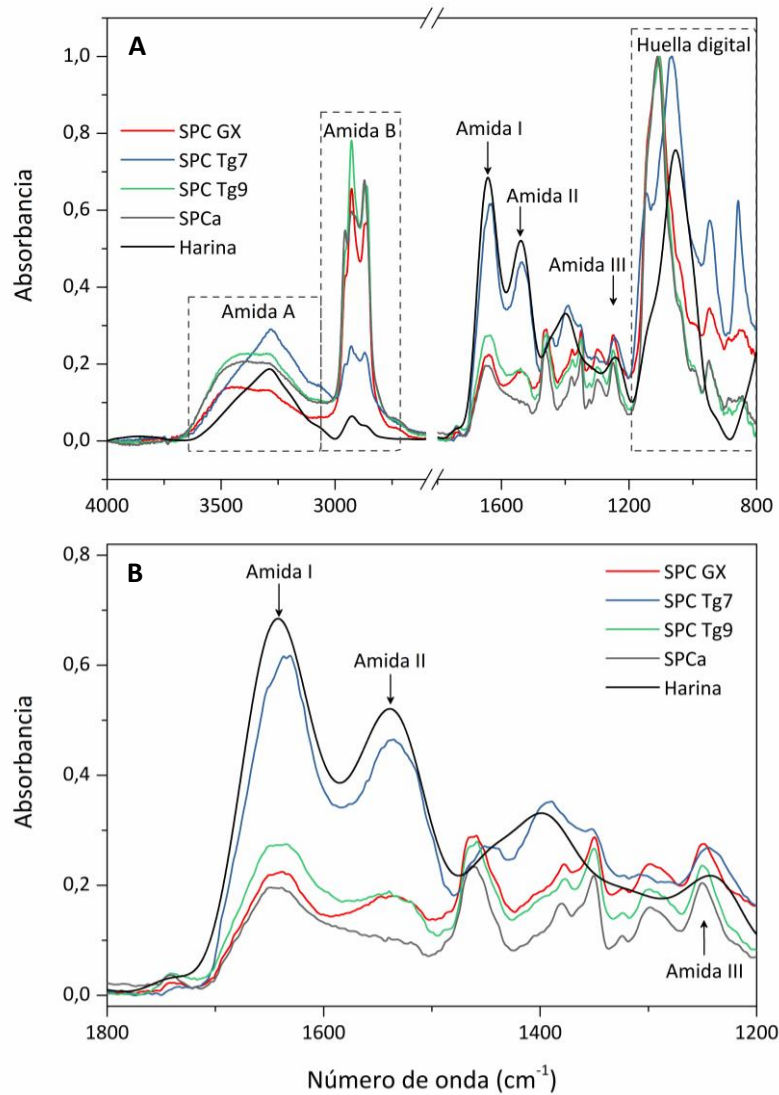


Figura 8.3. Espectros de absorbancia estandarizados ATR-FTIR de harina y concentrados proteicos (SPCs) de soja. **A)** Espectro completo de 4000 a 800 cm^{-1} . **B)** Regiones amida características más importantes (I, II y III).

La Fig. 8.3A muestra los espectros FTIR para la harina y los SPCs. Las bandas de amida A (3500-3200 cm^{-1}) y amida B (3100-2500 cm^{-1}) se originan a partir de una resonancia de Fermi entre el primer armónico de la amida II y la vibración de estiramiento N-H. Particularmente, la banda espectral de amida B mostró una fuerte alteración por el proceso, que indica un cambio conformacional de la estructura secundaria de la matriz de los SPCs [372]. Las intensidades en esta banda sufrieron drásticos incrementos para la mayoría SPCs con respecto a la de la harina, no siendo tan notorio para el correspondiente a Tg7. Las bandas amida I y amida II son dos regiones principales del espectro infrarrojo de

la proteína. La banda de amida I (entre 1700 y 1600 cm^{-1}) se asocia principalmente con la vibración de estiramiento C=O (70-85%) y está directamente relacionada con la conformación de la cadena peptídica principal [372]. La amida II (1600-1500 cm^{-1}) resulta de la vibración de flexión N-H (40-60%) y de la vibración de estiramiento C-N (18-40%). Estas dos bandas son conformacionalmente sensibles y, al presentar importantes disminuciones de sus intensidades indican alteraciones estructurales que podrían deberse a la desnaturalización y/o formación de agregados [373]. Como puede verse en la Fig. 8.3B, los SPCs obtenidos mediante los sistemas micelares muestran intensidades de amida I y II intermedias entre la harina y el concentrado clásico, siendo el de Tg7 más próximo a la primera mientras que los otros se asemejan más al SPCa. La amida III (entre 1300 y 1200 cm^{-1}) es una banda muy compleja que resulta de una mezcla de varios desplazamientos de coordenadas, no habiendo diferencias muy notorias entre los SPCs y la harina (Fig. 8.3B).

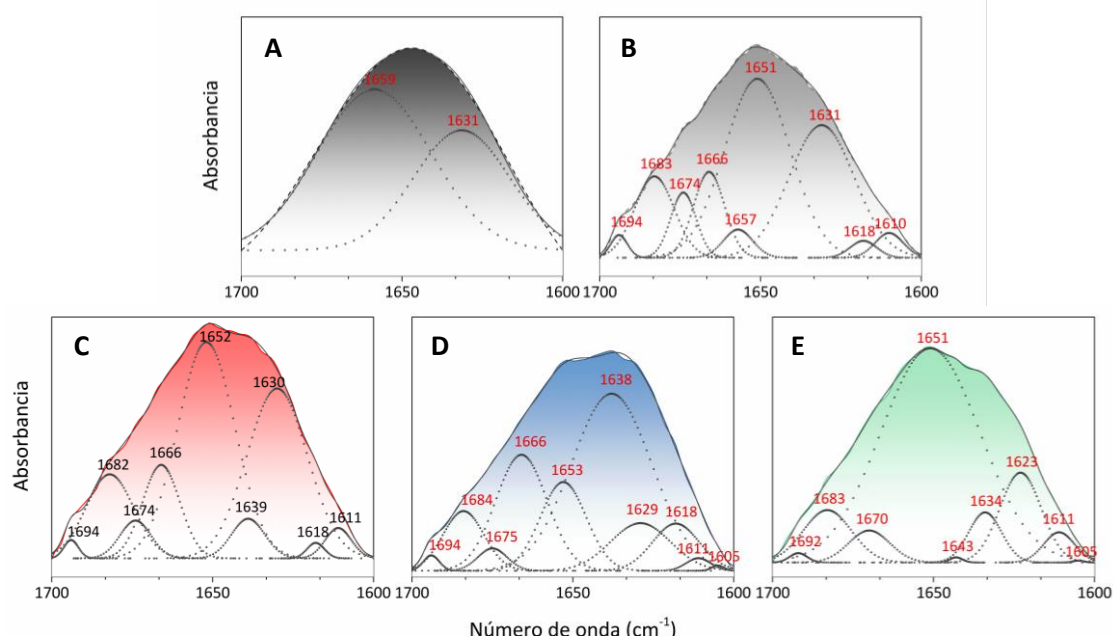


Figura 8.4. Comparación de la región amida I de los espectros de absorbancia ATR-FTIR deconvolucionados para: **A)** harina de partida, **B)** SPCa, **C)** SPC de GX, **D)** SPC de Tg7 y **E)** SPC de Tg9. El ajuste de la curva se realizó con líneas de Gauss. La posición de los picos de los componentes de la banda de amida se dedujo a partir de los espectros de la segunda derivada. La suma de las curvas ajustadas se muestra como una línea continua, superpuesta estrechamente al espectro original, mostrado como una línea discontinua (**A** y **B**) o coloreada continua (**C**, **D** y **E**).

Incluso si la estructura primaria de las proteínas es la misma, las estructuras secundarias y terciarias a veces no lo son. A partir de lo observado con la amida B, resultó importante poder analizar lo ocurrido con las estructuras secundarias de las proteínas presentes en los productos durante los procesos de concentrado.

Las regiones de la proteína amida I y II en los espectros FTIR se consideran las de mayor interés y se han observado cambios en estas regiones en otras proteínas [264,265]. Los espectros originales en combinación con un procedimiento deconvolutivo de la banda de amida I, se usaron para el análisis de las estructuras secundarias presentes en cada muestra (Fig. 8.4) [374]. La segunda derivada de las curvas permitió identificar los diferentes componentes espectrales, que se utilizaron para un procedimiento de deconvolución con ajuste de curvas gaussianas. La Tabla 8.5 presenta el porcentaje de contribuciones de los diferentes tipos de estructura secundaria, calculados como las relaciones entre las áreas de las curvas correspondientes a las distintas bandas componentes y el área total debajo del espectro.

Tabla 8.5. Contenido de la estructura secundaria proteica en la harina y concentrados proteicos de soja mediante análisis FTIR.

Producto	Estructura secundaria (%) [†]			
	Hélice- α	Lámina- β	Desordenada	Giros- β
Harina	62	38	0	0
SPCa	42	44	0	14
SPC GX	37	46	4	14
SPC Tg7	12	24	43	20
SPC Tg9	67	28	0	4

[†] Porcentaje de área de los componentes de la banda de amida I, obtenidos integrando el área bajo cada banda deconvoluta.

Los datos revelan que la banda de amida I para todos los SPCs consiste en nueve o diez componentes principales, a diferencia de lo hallado para la harina, compuesta por dos. Como se observa en la Fig. 8.4, la banda principal de los espectros FTIR de harina y del concentrado proteico clásico en la región amida I se encontró entre 1660-1650 cm^{-1} (62% y 42% del área total, respectivamente, Tabla 8.5), que corresponde a los movimientos vibracionales de los restos amida de la cadena principal en una conformación helicoidal. Por otro lado, el SPCa también presenta bandas menores a 1637-1600 cm^{-1} y 1700-1682 cm^{-1} , relacionadas a estructuras tipo lámina- β , que en su totalidad superan levemente al contenido de hélice- α (44%), y dos bandas correspondiente a estructuras tipo giros- β (1674 cm^{-1} y 1666 cm^{-1}), que en su conjunto indican una mayor unión de los protones amida por formación de puentes de hidrógeno [15].

En el espectro IR de los SPCs de las metodologías propuestas (Fig. 8.4) no se observó un patrón común para todos los casos. El SPC de GX evidenció una distribución de estructuras secundarias similar a la del SPCa, marcada por una banda mayoritaria a 1652-

1650 cm^{-1} (Fig. 8.4C) correspondiente al tipo helicoidal, representando el 36-37%, mientras que una sumatoria de bandas inferiores correspondieron a la estructura mayoritaria lámina- β (44-46%). Con pequeñas contribuciones, las estructuras de giros- β y desordenadas fueron minoritarias (Tabla 8.5). Por otro lado, el SPC de Tg7 (Fig. 8.4D) mostró un pico principal correspondiente a la región de las estructuras desordenadas (1639-1638 cm^{-1}), representando el mayor porcentaje estructural (43%), seguida por las láminas- β con una contribución del 24%. Finalmente, el SPC de Tg9 fue el producto con una distribución estructural más cercana a la de la harina (Fig. 8.4E).

Estos cambios estructurales que, en general, se encontraron en los concentrados con respecto a la harina, coinciden con el panorama general de los espectros completos de FTIR. Esto va de la mano a las condiciones bajo las cuales se llevaron a cabo los procesos, principalmente el pH del medio, al cual encontramos a la mayoría de las proteínas de la matriz en su punto isoeléctrico (pH 4,5), con su solubilidad al mínimo y donde la agregación es facilitada por fuerzas no-electrostáticas, produciéndose una disminución de solubilidad proteica del concentrado [290]. También debe considerarse que los procesos aplicados, si bien concentran proteínas, provocan una pérdida mayoritaria de hidratos de carbono solubles, acompañada de una considerable cantidad de proteínas solubles, enriqueciéndose el producto final en proteínas que ya eran insolubles en la harina de partida, ya sea por la extracción del aceite con hexano o por el paso de desolventización en el procesamiento de la soja.

8.2.2. Contenido proteico y actividad inhibitoria de tripsina

Como producto de las metodologías analizadas en el presente capítulo se obtuvieron concentrados proteicos de soja (SPC), los cuales se analizaron y contrastaron entre sí y con la harina de partida. Inicialmente se analizó el contenido proteico del sólido producido, y luego se le realizaron extracciones para evaluar su actividad de inhibición de tripsina (*TIA*) y cantidad de proteína soluble (*Ps*).

La Tabla 8.6 reporta los resultados obtenidos, en los cuales se ve que, en particular para las técnicas propuestas, el contenido proteico total (P_{tK}) varió según el detergente empleado. En relación a la harina de partida, se obtuvieron productos que satisfactoriamente cumplieron con el objetivo de concentrar proteínas (SPC de Tg9) o al menos mantener el mismo nivel (SPCs de GX y Tg7). Con respecto al SPCa, ningún producto pudo superarlo y sólo el SPC de Tg9 presentó valores equiparables. En ese sentido, GX y Tg7 mostraron un comportamiento muy próximo y resultaron ser menos eficientes que Tg9 a la hora de producir un concentrado proteico, dando indicios de un mayor poder extractivo de

proteínas. Esto mismo es coherente con lo hallado en la Sección 8.1.1 para los SWPs, donde la mayor extracción de globulinas correspondió a GX seguido de Tg7, indicando que al aumentar el poder extractivo de proteínas de reserva disminuye el contenido proteico final del concentrado producido.

Tabla 8.6. Análisis de proteínas totales y solubles, y *TIA* para los SPCs y la harina de partida.

Producto	<i>Ptk</i> (%) ^{†, ‡}	<i>TIA</i> (%) [†]	<i>Ps</i> (%) ^{†, *}
Harina	54,6 ± 2,1 ^{a, b}	100 ± 7	84 ± 4
SPCa	64,0 ± 1,5 ^c	11 ± 1 ^a	29 ± 4 ^{a, b}
SPC GX	51,1 ± 0,5 ^a	9 ± 2 ^a	43 ± 5 ^c
SPC Tg7	57,4 ± 0,7 ^{b, d}	10 ± 2 ^a	34 ± 7 ^{b, c}
SPC Tg9	60,7 ± 2,1 ^{c, d}	12 ± 3 ^a	19 ± 4 ^a

[†] Valores expresados como media ± SD en base seca.

[‡] Porcentaje expresado como *g proteínas/100 g producto*.

^{*} Porcentaje expresado como *g BSA/100 g proteínas totales*.

^{a-d} Valores de la misma columna que comparten superíndice no presentan diferencias estadísticas entre sí, dado el análisis de sus varianzas (ANOVA) con la prueba de rangos múltiples de Tukey para un nivel de significancia de 0,05.

La actividad inhibitoria de tripsina, como se muestra en la Tabla 8.6, se redujo de manera considerable, alrededor del 90%, alcanzando niveles muy satisfactorios y coincidentes con los predichos en la optimización del capítulo anterior (Sección 7.2). En relación a esta propiedad, ninguna de las metodologías se diferenció significativamente.

Sin embargo, esta interesante reducción de *TIA* estuvo acompañada de una importante reducción en la solubilidad proteica en NaOH 10 mM (valores de *Ps*). Esta es una conocida desventaja de los métodos de concentrado proteico, esto es, que el SPC tiene baja solubilidad proteica tras la rehidratación [360,375] y malas propiedades funcionales, dada por la exposición de las proteínas a condiciones extremas (extracción con alcohol o ácido, tratamiento térmico, precipitación o centrifugación). Además, debe considerarse, tal como fue mencionado precedentemente (Sección 8.2.1), la reducción de la solubilidad proteica debida al enriquecimiento del producto final en proteínas que ya eran insolubles antes del proceso de concentrado. Debe puntualizarse que en la actualidad, el impacto de esta desventaja puede atenuarse por medio de diferentes tratamientos que permiten recuperar gran parte de esa solubilidad [17]. Asimismo, cabe destacar que, particularmente en el caso de las metodologías con SMAs, si bien puede haber una moderada desnaturalización proteica dadas las condiciones ácidas, parece haber un cierto efecto protector por parte de los surfactantes menos hidrófilos.

8.2.3. Digestibilidad y bioactividad

Para analizar los efectos de la digestión simulada in-vitro sobre la harina y los diferentes concentrados proteicos, se analizó en cada etapa el contenido de compuestos de origen proteico (*Pt*) menores a 3 kDa (péptidos y aminoácidos), la actividad antioxidante medida como *ORAC* y la actividad inhibitoria sobre ECA (*iECA*). Dado que en los datos recolectados la variable respuesta se registra más de una vez sobre la misma unidad, se consideran del tipo de “medidas repetidas”, analizándose mediante el procedimiento de “Modelos Lineales Generalizados”.

En la Tabla 8.7 se reportan los resultados de ajustar los modelos estadísticos lineales generales que relacionan *Pt*, *ORAC* y *iECA* con 3 factores predictivos categóricos: I (unidades experimentales), M (harina de partida o concentrado proteico proveniente de una determinada metodología extractiva) y T (etapa de SGI). Dado que el valor de prueba (P) para cada modelo es menor que 0,05, existen relaciones estadísticamente significativas entre las respuestas observadas y las variables predictoras. El coeficiente de determinación (R^2) indica que los modelos, así ajustados, explican el 99,6 y 99,7% de la respectiva variabilidad.

Tabla 8.7. Análisis de varianza para los modelos lineales generales ajustados.

Respuesta	Fuente	SC*	GL**	CM***	F	P	R ²
<i>Pt</i>	Modelo	687	24	28,604	228	0,000	0,996
	Residuo	2,510	20	0,126			
	Total	689	44				
<i>ORAC</i>	Modelo	3557270	24	148219	276	0,000	0,997
	Residuo	10759	20	538			
	Total	3568030	44				
<i>iECA</i>	Modelo	7580240	24	315843	251	0,000	0,997
	Residuo	25209	20	1260			
	Total	7605440	44				

*SC, suma de cuadrados; **GL, grados de libertad; ***CM, cuadrado medio.
 P < 0,05 se considera significativo.

La Tabla 8.8 muestra las medias de mínimos cuadrados calculadas para cada nivel de la etapa del SGI (T). Considerando el proceso general de digestión, sin distinción de muestras, al aplicar un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias generales son significativamente diferentes de cuales otras, se encontró que, en las tres respuestas hubo diferencias significativas entre las diferentes etapas. Curiosamente, la etapa T2 mostró mayor *Pt* que la T3, lo cual se explica al considerar el fundamento de la

técnica analítica empleada, metodología del ácido bicinconírico (BCA). El ensayo BCA se usa para la cuantificación del contenido proteico total en una muestra, a partir de la capacidad de las proteínas de reducir Cu^{+2} a Cu^{+1} en una solución alcalina (reacción de biuret) que da como resultado un producto de color púrpura por el ácido bicinconírico. La reducción de cobre está causada principalmente por cuatro residuos de aminoácidos, incluidos cisteína, cistina, tirosina y triptófano que están presentes en las moléculas proteicas. Sin embargo, a diferencia de los métodos de unión al colorante Coomassie, el esqueleto peptídico también contribuye a la formación del color, ayudando a minimizar la variabilidad causada por las diferencias de composición de las proteínas. Entonces, teniendo en cuenta que durante la digestión estomacal hay una liberación significativa e inespecífica de compuestos peptídicos al medio, de los cuales muchos luego pueden ser degradados aún más en la etapa intestinal (a tripéptidos, dipéptidos y aminoácidos libres), es factible que esto cause una disminución de la señal por una menor contribución del esqueleto peptídico.

Tabla 8.8. Comparaciones múltiples para cada respuesta por T.

T	Medias de mínimos cuadrados [†]		
	<i>Pt</i> ¹	<i>ORAC</i> ²	<i>iECA</i> ³
T1	2,59 ± 0,09	51 ± 6	1015 ± 9
T2	9,63 ± 0,09	460 ± 6	283 ± 9
T3	8,37 ± 0,09	577 ± 6	57 ± 9

[†] Valores expresados en base seca, como media ± SEM calculados por mínimos cuadrados.

¹ *Pt* en mg/g de producto, ² *ORAC* en $\mu\text{mol TE/g}$ de producto, ³ *iECA* como IC_{50} , $\mu\text{g/mL}$.

Todos los valores de la misma columna presentan diferencias estadísticas entre sí, dado el análisis de sus varianzas (ANOVA) con la prueba de rangos múltiples de Tukey para un nivel de significancia de 0,05.

Por otro lado, *ORAC* no solo aumentó durante la etapa gástrica, sino que en general se mantuvo ese incremento durante la intestinal, en tanto que, sobre la *iECA*, el IC_{50} disminuyó de manera significativa en cada etapa del proceso, indicando un aumento sostenido de la actividad inhibitoria.

Ahora, considerando las muestras por separado, la Tabla 8.9 presenta las medias de mínimos cuadrados calculadas para cada nivel de producto. A partir de comparaciones múltiples se han identificado tres grupos homogéneos para *Pt* y *ORAC*, y dos para *iECA*. El contenido peptídico medio liberado durante el proceso digestivo del SPC de GX fue el superior, mientras que el de Tg7 presentó el menor *Pt*, no habiendo diferencias entre las restantes muestras. Asimismo, el SPC de Tg9 superó a los restantes en actividad antioxidante media, pero sin diferenciarse de la harina y, al igual que para *Pt*, el SPC de Tg7 tuvo el menor nivel de esta actividad. La *iECA* media del proceso, por su parte, evidenció un

máximo de actividad inhibitoria en el SPC de Tg7 y mínimos en SPCa y SPC de Tg9, mientras que el SPC de GX y la harina no se diferenciaron de ninguno de los dos grupos.

Tabla 8.9. Comparaciones múltiples para cada respuesta por producto.

Producto	Medias de mínimos cuadrados [†]		
	<i>Pt</i> ¹	<i>ORAC</i> ²	<i>iECA</i> ³
Harina inicial	6,3 ± 0,3 ^a	473 ± 13 ^a	452 ± 12 ^{a, b}
SPCa	7,5 ± 0,3 ^a	326 ± 13 ^b	428 ± 12 ^a
SPC GX	8,9 ± 0,3	303 ± 13 ^b	458 ± 12 ^{a, b}
SPC Tg7	4,8 ± 0,3	178 ± 13	489 ± 12 ^b
SPC Tg9	6,9 ± 0,3 ^a	534 ± 13 ^a	431 ± 12 ^a

[†] Valores expresados en base seca, como media ± error estándar calculados por mínimos cuadrados. ¹*Pt* en mg/g de producto, ²*ORAC* en μmol TE/g de producto, ³*iECA* como *IC*₅₀, μg/mL. ^{a, b} Valores de la misma columna que comparten superíndice no presentan diferencias estadísticas entre sí, dado el análisis de sus varianzas (ANOVA) con la prueba de rangos múltiples de Tukey para un nivel de significancia de 0,05.

Las Figs. 8.5A, C y E muestran respectivamente *Pt*, *ORAC* y *iECA* en función de cada etapa digestiva. Cada línea corresponde a cada I y según el color a cada nivel de M. Si no hubiera interacción entre M y T, las líneas serían aproximadamente paralelas, mientras que, de existir una interacción, cuanto más fuerte sea ésta, mayor diferencia se observará en las formas de dichas líneas.

Para *Pt* (Fig. 8.5A) se observa que el SPC de GX y SPCa presentaron un comportamiento similar durante el proceso digestivo, diferenciándose notoriamente del conjunto. Éstos sufrieron una marcada formación de péptidos durante la etapa gástrica, disminuyendo la señal durante la intestinal, por lo antes explicado sobre la técnica BCA. Esto podría indicar que para ambos casos hubo una mayor degradación peptídica. Por su parte, SPC de Tg9 experimentó un aumento del contenido peptídico durante la primera etapa, manteniéndolo constante hasta el final de la digestión. Para el caso de la harina y del SPC de Tg7, la formación peptídica fue casi constante durante todo el proceso digestivo.

Al evaluar los resultados para *ORAC* (Fig. 8.5C), se observa una disparidad de comportamiento, particularmente marcada para Tg7 y Tg9 con respecto a las restantes. El primero se destacó con una actividad antioxidante constante durante la etapa gástrica la cual se incrementa durante la digestión intestinal, mientras que el segundo mostró un incremento y reducción drásticos durante las etapas gástricas e intestinales respectivamente.

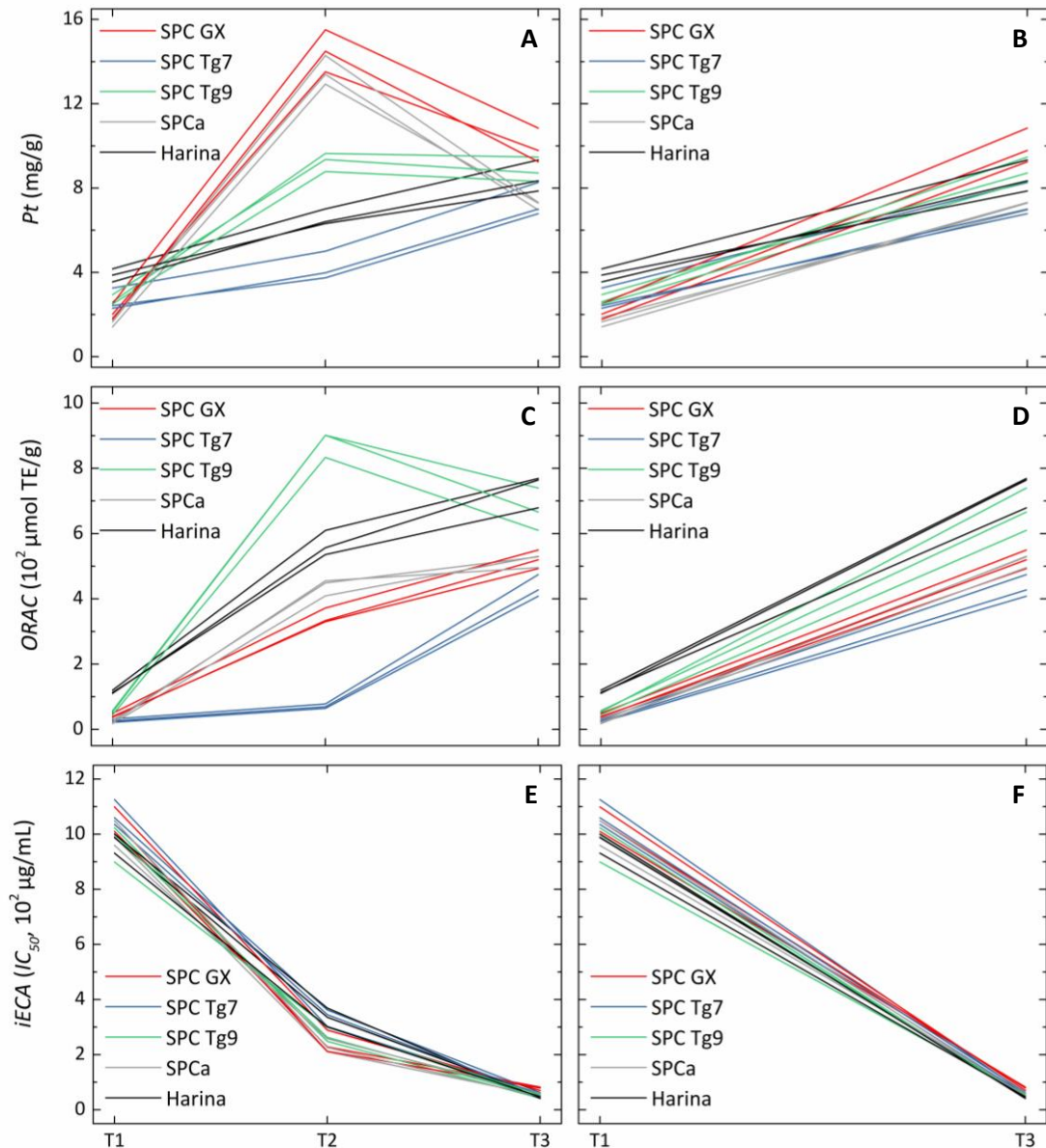


Figura 8.5. Observaciones de cada respuesta (Pt , $ORAC$ y $iECA$) en función de la etapa de proceso para todos los productos en la simulación de sistema gastrointestinal in-vitro (SGI). Las líneas despliegan las observaciones para cada unidad experimental **A) Pt** **C) $ORAC$** y **E) $iECA$** , considerando todas las etapas del SGI, **B) Pt** **D) $ORAC$** y **F) $iECA$** , considerando sólo el inicio y el final del proceso digestivo. Etapas del proceso: T1, inicio de la etapa gástrica; T2, final de la etapa gástrica; T3, final de la etapa intestinal.

A diferencia de las otras dos respuestas, el patrón de $iECA$ (Fig. 8.5E) fue similar para todas las muestras a lo largo del proceso digestivo con un mayor aumento de la actividad inhibitoria durante la etapa gástrica.

Considerando que la absorción de nutrientes, así como compuestos bioactivos ocurre principalmente en el intestino, se consideró evaluar el proceso digestivo de forma global, es decir al inicio y al final de dicho proceso. En las Figs. 8.6B, D y F pueden verse

nuevamente las respuestas obtenidas para los diferentes sistemas, pero reportando sólo los datos al inicio y al final del proceso digestivo simulado.

Sobre *Pt* (Fig. 8.5B), los productos no mostraron comportamientos muy diferentes, aumentando la cantidad de proteína en solución durante la digestión. El crecimiento más pronunciado fue para el SPC de GX, mientras que la harina y el SPC de Tg7 tuvieron el menor aumento global. En el caso de la actividad antioxidante (Fig. 8.5D), los comportamientos fueron más disímiles entre sí, observándose un mayor aumento de bioactividad para la harina y el SPC de Tg9, con el menor crecimiento correspondiente al SPC de Tg7. Por otro lado, todos los productos presentaron patrones similares de *iECA* para el proceso global (Fig. 8.5F).

En este caso, las comparaciones múltiples de las medias observadas para cada nivel de M al final del SGI, muestra dos grupos homogéneos para *Pt*, tres para *ORAC* y solo uno para *iECA*. Analizando *Pt*, SPCa presentó valores menores que los otros productos. En *ORAC*, la harina se destacó significativamente superando a los otros, seguida por el SPC de Tg9.

En la Tabla 8.10 puede verse que al final de la digestión, en general no hubo una marcada diferencia entre los distintos productos sobre la cantidad de compuestos peptídicos producidos, salvo por GX que mostró un *Pt* aproximadamente 27% mayor que SPCa y SPC de Tg7. Por otro lado, la actividad antioxidante fue alrededor de un 30% menor para los SPCa y SPCs de GX y Tg7 en relación a la harina y al SPC de Tg9. Con respecto a *iECA*, si bien la actividad alcanzada por todos los productos corresponde a valores considerados de elevada bioactividad, el SPC de GX presentó una actividad inhibitoria significativamente menor.

Si consideramos lo observado en la Sección 8.2.2, la harina de soja al presentar una mayor solubilidad proteica debería liberar mayor cantidad de compuestos peptídicos en su digestión y hasta quizás mayores capacidades antioxidante y antihipertensiva. Sin embargo, esto no se observa a partir de los resultados de este trabajo, lo cual es coherente con su contenido de inhibidores de proteasas (ITs). Hay que recordar que las muestras fueron filtradas para trabajar con fracciones menores a 3 kDa, por lo que todo péptido de más de 25 aminoácidos fue retenido. Estos inhibidores de proteasas provocan una reducción de la proteólisis que da como resultado péptidos de más de 20 aminoácidos [22], por lo que probablemente una gran proporción de los compuestos peptídicos generados en la digestión de la harina hayan quedado en el retenido de la nanofiltración. Si bien estos péptidos mayores aún cumplen un papel nutricional, dado que su tamaño aún es compatible

con la absorción a través del epitelio intestinal (3-51 aminoácidos) [376], sus propiedades bioactivas serían mínimas al superar los 20 residuos aminoacídicos.

Tabla 8.10. Comparaciones múltiples para cada respuesta por producto.

Producto	Medias observadas al final del SGI [†]		
	<i>Pt</i> ¹	<i>ORAC</i> ²	<i>iECA</i> ³
Harina	8,5 ± 0,8 ^{a,b}	737 ± 51 ^a	47 ± 6 ^a
SPCa	7,2 ± 0,2 ^b	518 ± 20 ^b	53 ± 6 ^a
SPC GX	10,0 ± 0,8 ^a	521 ± 29 ^b	77 ± 6
SPC Tg7	7,4 ± 0,8 ^b	437 ± 34 ^b	58 ± 4 ^a
SPC Tg9	8,8 ± 0,6 ^{a,b}	672 ± 65 ^a	49 ± 6 ^a

[†] Valores expresados media ± SD, en base seca. ¹ *Pt* en mg/g de producto, ² *ORAC* en μmol TE/g de producto, ³ *iECA* como *IC*₅₀, μg/mL.

^{a, b} Valores de la misma columna que comparten superíndice no presentan diferencias estadísticas entre sí, dado el análisis de sus varianzas (ANOVA) con la prueba de rangos múltiples de Tukey para un nivel de significancia de 0,05.

A grandes rasgos, analizando la digestibilidad y propiedades bioactivas generadas en el SGI, todos los productos presentaron interesantes características más allá de las nutritivas extensamente conocidas. Esto permite afirmar que los procesos con SMAs, además de las ventajas descritas en los apartados anteriores, más precisamente en la mayor eliminación de azúcares no-digeribles, así como la recuperación de mayor cantidad de IFs, permiten mantener la calidad de los concentrados proteicos producidos.

8.3. CONCLUSIONES PARCIALES

En este trabajo, se usaron sistemas micelares acuosos de GX, Tg7 y Tg9 y citrato de sodio 50 mM pH 4,5 para extraer, concentrar y purificar factores antinutricionales e isoflavonas de la harina de soja, y obtener como producto final un concentrado proteico con características nutritivas y biofuncionales adecuadas. Las condiciones experimentales fueron las propuestas en la Sección 7.2, esto es, extraer con 5% m/m de surfactante a 45 °C durante 45 min, y alcanzar luego la separación de fases manteniendo la temperatura en 45 °C para GX y Tg7 y elevándola a 60 °C para Tg9 durante 15 minutos.

El sistema que exhibe mayor poder de lixiviado de material proteico de la harina es el que utiliza GX, seguido del de Tg7. Con respecto a los factores antinutricionales, el método clásico junto al de Tg7 resultaron ser mejores para extraer ITK y lectinas, sin embargo, no así para el ITBB, para el cuál Tg9 es mejor.

Las condiciones experimentales seleccionadas permiten purificar en un pequeño volumen de fase micelar entre el 60 y 64% de las IFs lixiviadas. Con la aplicación de los SMAs estudiados, se consigue extraer más IF que con el método clásico y en una concentración entre cuatro y cinco veces mayor.

Los SMAs aplicados presentan una mayor capacidad (26-35%) de extraer RFOs que la metodología clásica, evidenciando una mayor eficiencia en la detoxificación del material tratado. Sumado a esto, a partir de la separación de fases se consigue separar la mayor parte de los RFOs de las IFs, lo que contribuye a la purificación de las IFs.

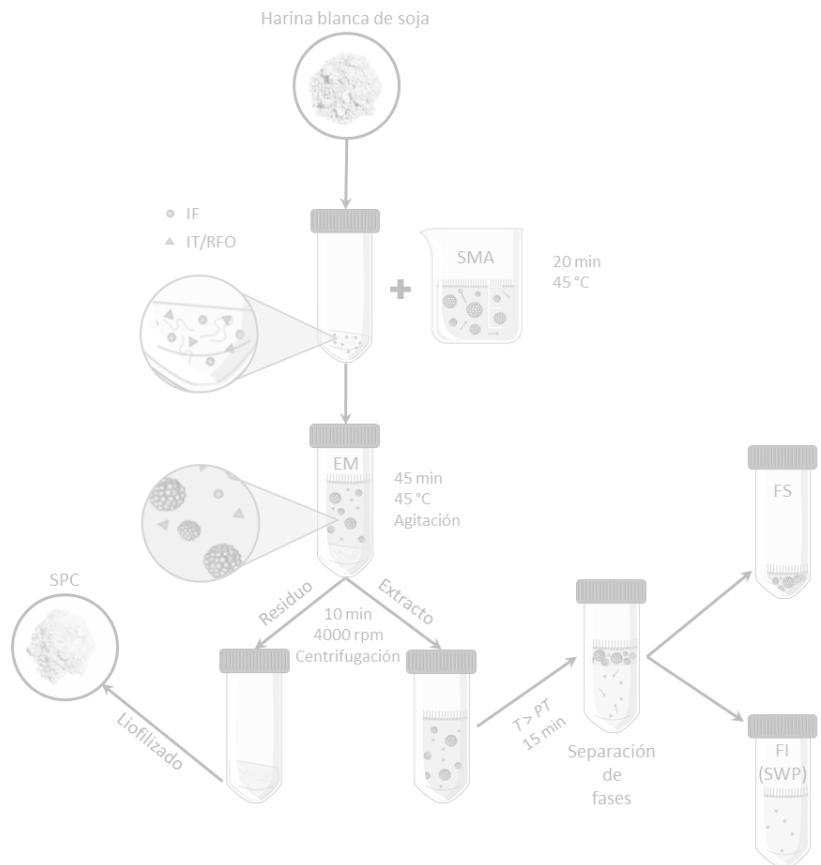
Con respecto a los concentrados proteicos (SPCs) obtenidos por la metodología propuesta, el análisis de las regiones típicas de proteínas en el espectro FTIR no muestra un único patrón. Sí puede decirse en forma general que, el producto final se concentra principalmente en agregados proteicos, debido tanto a las condiciones experimentales agresivas para las proteínas, así como a la pérdida de material soluble en los extractos.

Para los productos que se obtienen con las técnicas propuestas, el contenido proteico varía según el surfactante empleado. Con los SMAs se producen concentrados satisfactorios, con contenidos proteicos similares al del SPC clásico, en el caso de Tg9, o al menos con un contenido equivalente al de la harina de partida (GX y Tg7). Por otro lado, la actividad inhibitoria de tripsina remanente, es un 90% menor a la presente en la harina de soja, nivel coincidente con las predicciones del modelo del capítulo anterior (Sección 7.2), y comprueba nuevamente la eficiencia como proceso de detoxificación. Sin embargo, esta interesante reducción de *TIA* se acompaña de una importante reducción en la solubilidad proteica en NaOH 10 mM, desventaja que no es dramática al existir diversas técnicas que permiten revertirla.

Finalmente, considerando la digestibilidad y propiedades bioactivas que se generan en la digestión de los SPCs, todos los productos presentan interesantes características, discutidas precedentemente, más allá de las nutritivas extensamente conocidas. Esto permite afirmar que los procesos con SMAs, además de permitir una mayor eliminación no-destructiva de factores antinutricionales, así como la recuperación de mayor cantidad de IFs, permiten mantener la calidad de los concentrados proteicos producidos.

PARTE IV

Conclusiones



*“El descubrimiento consiste en ver
lo que todos ven, y pensar lo que nadie más ha
pensado.”*

Albert Szent-Györgi

CAPÍTULO 9- Conclusiones generales

La soja y sus subproductos son considerados como una de las fuentes alternativas de proteína de uso más difundido en el mundo para consumo animal y humano (35-40%). Esto sumado a ser la segunda mayor fuente de aceite vegetal en todo el mundo (después del aceite de palma), y a la utilización de su aceite como fuente de energía renovable (biodiesel), ha convertido al cultivo de esta leguminosa en la actividad económica de mayor importancia del sector agropecuario argentino, siendo la provincia de Santa Fe el principal polo exportador tanto del grano como de sus subproductos.

Los derivados proteicos, como son las harinas/sémolas, concentrados y aislados, son productos resultantes con distinto grado de procesamiento y presentan diferentes propiedades que los hace aptos para múltiples aplicaciones. Entre las consideraciones de calidad más importantes de estos productos encontramos la funcionalidad, la actividad inhibitoria de proteasas, la cantidad de oligosacáridos indigeribles (rafinosa y estaquiosa) presentes y la palatabilidad o sabor.

En este contexto, se planteó el desarrollo de un proceso de detoxificación de harinas de soja que permitiera extraer dos de sus principales antinutrientes, los inhibidores de

proteasas y los oligosacáridos no digeribles (rafinosa y estaquiosa), preservando la calidad nutricional y bioactividad del material tratado. Se evaluó la posibilidad de recuperar simultáneamente isoflavonas de soja como otro subproducto del proceso, junto a los mencionados antinutrientes. Se emplearon, como potenciales extractantes, sistemas micelares formados por los alcoholes alifáticos etoxilados Genapol X-080 (GX), Tergitol 15-S-7 (Tg7) y Tergitol 15-S-9 (Tg9), todos ellos surfactantes no-tóxicos y biodegradables.

Como punto de partida se realizó una caracterización fisicoquímica de los sistemas micelares propuestos, determinando parámetros y patrones de comportamiento vinculados a su organización supramolecular y a su interacción con las isoflavonas. A partir de los resultados obtenidos pudo establecerse un vínculo entre las características estructurales y la configuración adoptada por las micelas de los SMAs estudiados. En ese sentido, se ve que propiedades como *CMC*, *PT*, tamaño y forma de las micelas, son influenciadas principalmente por la estructura de la de cabeza polar, es decir el número de OEs en el caso de los POEs utilizados. En general, a menor número de OEs, menor carácter polar y por ende menores *CMC*, *PT* y D^0 , y mayores N_{ag} y asimetría. Así, teniendo en cuenta las estimaciones teóricas sobre la morfología, puede decirse que los sistemas micelares de GX y Tg7 al 1% m/m y 25 °C, presentan micelas elipsoidales de mayor tamaño y más asimétricas (cilíndricas) que las correspondientes al Tg9 (esféricas y ovoides). Además, el agregado de un electrolito cosmotrópico como el citrato de sodio, a concentraciones entre 50 y 200 mM, influye significativamente estas propiedades, reduciendo drásticamente la *CMC* y *PT* con su consecuente efecto sobre el fenómeno de agregación que determina sus propiedades hidrodinámicas y morfológicas. Por otro lado, los tres surfactantes son capaces de interactuar con las isoflavonas evidenciándose un incremento en el diámetro hidrodinámico que podría ser consecuencia de la incorporación de IFs en el núcleo apolar, o alternativamente de un aumento del número de agregación o asimetría micelares.

En relación a esto último, establecida la interacción entre los SMAs y las isoflavonas, se demostró que los tres surfactantes ensayados presentan mejores cualidades extractivas de estos fitoquímicos en comparación a otros tensoactivos e inclusive en relación a solventes orgánicos tradicionales, destacándose el desempeño del GX. Profundizando, se identificaron los factores que más afectan al proceso extractivo, permitiendo así optimizar las condiciones metodológicas y maximizar la extracción de isoflavonas a partir de una matriz simple (GX 11 % m/m, pH 4,5; temperatura 54°C y tiempo 60 min). Una extrapolación de dichas condiciones a la harina de soja, permite recuperar una cantidad de isoflavonas tres veces superior a la lograda por metanol, bajo idénticas condiciones.

Respecto a la extracción conjunta de antinutrientes e isoflavonas de la harina de soja, se estableció que la condición de 5% m/m de surfactante en citrato de sodio 50 mM pH 4,5, a 45 °C durante 45 min es óptima para maximizar la extracción de los inhibidores de tripsina y de isoflavonas, a la vez que minimizar la pérdida de material proteico nutricional. Esta condición óptima es común a los tres surfactantes empleados. Al aplicarla en la detoxificación de harina de soja blanca, seguido de una segunda etapa de separación de fases para dar lugar a sistemas bifásicos acuosos, permite extraer, concentrar y purificar factores antinutricionales e isoflavonas, y obtener como producto final un concentrado proteico con características nutritivas y biofuncionales adecuadas.

A partir del proceso propuesto se extraen diferentes cantidades de isoflavonas según el sistema micelar aplicado, pero siempre superiores (34 - 55%) a lo obtenido con la metodología clásica de preparación de concentrados proteicos, y en una concentración entre cuatro y cinco veces mayor. Si bien GX es más eficiente que los tergitoles en la cantidad total extraída de isoflavonas, los rendimientos que se alcanzan en la fase micelar, luego de la separación de fases, son similares para los tres surfactantes y próximos al 60% - 64%. Con respecto a los RFOs, ningún sistema micelar se diferencia de los otros, pero todos son mejores que la metodología clásica, extrayendo entre 26% - 35% más de estos azúcares. Luego de la separación de fases, el 79-85 % de estos oligosacáridos se recupera en la fase acuosa, separándose de las isoflavonas.

Finalmente, el proceso de concentrado con sistemas micelares comparativamente al aplicado actualmente, logra mantener la calidad de los concentrados proteicos producidos, con más de 50% de proteína y una actividad de inhibición de tripsina reducida en aproximadamente un 90%. Los concentrados, además presentan una digestibilidad y propiedades bioactivas interesantes. Todos los SPCs, incluyendo el clásico, al ser digeridos, presentan actividades antioxidante y antihipertensiva comparables. Esto permite afirmar que los procesos con SMAs son una interesante alternativa de detoxificación de derivados de soja, tales como las harinas/sémolas, y de producción de concentrados proteicos. La metodología propuesta, por un lado, es superadora de los procesos físicos de detoxificación destructivos, al permitir simultáneamente la recuperación de inhibidores de tripsina en su estado nativo, los cuales son valorados como alternativas terapéuticas en dolencias graves como las oncológicas, así como la reducción en el producto final de otros factores antinutricionales, los RFOs, que los enfoques clásicos como el tostado no consiguen eliminar. Por otro lado, esta propuesta aventaja al concentrado clásico con una mayor eliminación no-destructiva de factores antinutricionales, así como la recuperación de mayor cantidad de IFs y una purificación y concentración de las mismas.

PARTE V

Bibliografía

The image displays three overlapping pages from the journal *Food Chemistry*. The top page features the article "Integrated extraction and purification of soy isoflavones by using aqueous micellar systems" by Estefanía Condón, Carla N. Haide, and Bibiana B. Neri. The middle page shows "Continuous method to determine the trypsin in soybean flour" by Ezequiel R. Coscueta, Manuela E. Pintado, Luciana Pellegrini Malpiedi, and Bibiana B. Neri. The bottom page is titled "Bioactive properties of peptides obtained from Argentinian defatted soy flour protein by Corolase PP hydrolysis" by Ezequiel R. Coscueta, Maria M. Amorim, Glensse B. Voss, Bibiana B. Neri, and Guillermo A. Picó. Each page includes the Elsevier logo, the journal title, and a snippet of the abstract.

Food Chemistry
Journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodchem

Integrated extraction and purification of soy isoflavones by using aqueous micellar systems
Estefanía Condón, Carla N. Haide, Bibiana B. Neri, Luciana P. Malpiedi
Integrating extraction and purification by using aqueous micellar systems as a potential tool to purify soy isoflavones. Additionally, the presence of the micellar system of the prepared soy flour. The extraction yields were higher than those obtained by using conventional extraction methods. The results of this study indicate that the use of micellar systems is a promising alternative to the extraction of soy isoflavones. The obtained samples presented an efficient purification and concentration process, which could be used as a starting point for the development of new products and nutraceuticals. © 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Food Chemistry
Journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodchem

Continuous method to determine the trypsin in soybean flour
Ezequiel R. Coscueta^{a,b}, Manuela E. Pintado^a, Luciana Pellegrini Malpiedi^a, Bibiana B. Neri^{a,c}
^aINIA, Instituto de Desarrollo Rural y Agropecuario, 17000, Corrientes, Argentina; ^bINIA, Instituto de Desarrollo Rural y Agropecuario, 17000, Corrientes, Argentina; ^cINIA, Instituto de Desarrollo Rural y Agropecuario, 17000, Corrientes, Argentina

ABSTRACT
The determination of trypsin in soybean flour. An all-in-one method for trypsin and albumin determination in the soybean flour. The trypsin activity was determined by using a colorimetric assay. The results showed that the proposed method is a simple and accurate method for the determination of trypsin in soybean flour. © 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Food Chemistry
Journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodchem

Bioactive properties of peptides obtained from Argentinian defatted soy flour protein by Corolase PP hydrolysis
Ezequiel R. Coscueta^a, Maria M. Amorim^b, Glensse B. Voss^c, Bibiana B. Neri^d, Guillermo A. Picó^d
^aINIA, Instituto de Desarrollo Rural y Agropecuario, 17000, Corrientes, Argentina; ^bINIA, Instituto de Desarrollo Rural y Agropecuario, 17000, Corrientes, Argentina; ^cINIA, Instituto de Desarrollo Rural y Agropecuario, 17000, Corrientes, Argentina; ^dINIA, Instituto de Desarrollo Rural y Agropecuario, 17000, Corrientes, Argentina

ABSTRACT
Enzymatic hydrolysis of soybean meal protein isolate (SPI) obtained under two temperature conditions with Corolase PP was studied, assessing the impact of hydrolysis on potential antioxidant and antihypertensive activities. The protein was isolated from soybean meal under controlled conditions of time and temperature (70 °C, 1 h; 90 °C, 30 min). Degree of hydrolysis, antioxidant and antihypertensive activities were measured. As observed, the DH was increasing until reaching 20% at 10 h with significant decrease in antioxidant and antihypertensive activities. The results showed that the hydrolysis of SPI with Corolase PP was possible through their sequences the bioactive properties analyzed. Through this study was possible to obtain for the first time with Corolase PP soy hydrolysates with potential antioxidant and ACE inhibitory activities, which can be used to obtain new added value functional ingredients from soy meal. © 2016 Published by Elsevier Ltd.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 Vagadia BH, Vanga SK, Raghavan V. Inactivation methods of soybean trypsin inhibitor – A review. *Trends Food Sci Technol* 2017; **64**: 115-125.
- 2 Lee CC, Dudonné S, Dubé P, Desjardins Y, Kim JH, Kim JS *et al.* Comprehensive phenolic composition analysis and evaluation of Yak-Kong soybean (*Glycine max*) for the prevention of atherosclerosis. *Food Chem* 2017; **234**: 486-493.
- 3 Day L. Proteins from land plants - Potential resources for human nutrition and food security. *Trends Food Sci Technol* 2013; **32**: 25-42.
- 4 Ybran R, Lacelli G. Informe estadístico mercado de la soja. 2016.
- 5 Ridner E. *Soja, propiedades nutricionales y su impacto en la salud.* 2006.
- 6 Kulling SE, Honig DM, Metzler M. Oxidative metabolism of the soy isoflavones daidzein and genistein in humans in vitro and in vivo. *J Agric Food Chem* 2001; **49**: 3024-33.
- 7 Balisteiro DM, Rombaldi CV, Genovese MI. Protein, isoflavones, trypsin inhibitory and in vitro antioxidant capacities: Comparison among conventionally and organically grown soybeans. *Food Res Int* 2013; **51**: 8-14.
- 8 Xiao CW, Wood CM, Robertson P, Gilani GS. Protease inhibitor activities and isoflavone content in commercial soymilks and soy-based infant formulas sold in Ottawa, Canada. *J Food Compos Anal* 2012; **25**: 130-136.
- 9 Messina M. Soy foods, isoflavones, and the health of postmenopausal women. *Am J Clin Nutr* 2014; **100**. doi:10.3945/ajcn.113.071464.
- 10 de Mejia EG, Bradford T, Hasler C. The anticarcinogenic potential of soybean lectin and lunasin. *Nutr Rev* 2003; **61**: 239-246.
- 11 Lule VK, Garg S, Pophaly SD, Hitesh, Tomar SK. «Potential health benefits of lunasin: A multifaceted soy-derived bioactive peptide». *J Food Sci* 2015; **80**: C485-C494.
- 12 Xu ML, Liu J, Zhu C, Gao Y, Zhao S, Liu W *et al.* Interactions between soy isoflavones and other bioactive compounds: a review of their potentially beneficial health effects. *Phytochem Rev* 2015; **14**: 459-467.
- 13 Fukui K, Tachibana N, Wanezaki S, Tsuzaki S, Takamatsu K, Yamamoto T *et al.* Isoflavone-free soy protein prepared by column chromatography reduces plasma cholesterol in rats. *J Agric Food Chem* 2002; **50**: 5717-5721.
- 14 Erickson DR. *Practical handbook of soybean processing and utilization.* AOCS Press, 1995.
- 15 FAO, Berk Z. *Technology of production of edible flour and protein products from soybeans.* 1992.
- 16 Becker-Ritt AB, Mulinari F, Vasconcelos IM, Carlini CR. Antinutritional and/or toxic factors in soybean (*Glycine max* (L) Merrill) seeds: Comparison of different cultivars adapted to the southern region of Brazil. *J Sci Food Agric* 2004; **84**: 263-270.
- 17 Johnson LA. Process for producing improved soy protein concentrate from genetically-modified soybeans. US Pat. 5936069. 1999.
- 18 Qin G, Ter Elst ER, Bosch MW, Van Der Poel AFB. Thermal processing of whole soya beans: Studies on the inactivation of antinutritional factors and effects on ileal digestibility in piglets. *Anim Feed Sci Technol* 1996; **57**: 313-324.

- 19 Căpriță R, Căpriță A, Crețescu I. Protein Solubility as Quality Index for Processed Soybean. *Sci Pap Anim Sci Biotechnol* 2010; **43**: 375-378.
- 20 Tang W, Zhang H, Wang L, Qian H, Qi X. Targeted separation of antibacterial peptide from protein hydrolysate of anchovy cooking wastewater by equilibrium dialysis. *Food Chem* 2015; **168**: 115-123.
- 21 Mechkarska M, Attoub S, Sulaiman S, Pantic J, Lukic ML, Michael Conlon J. Anti-cancer, immunoregulatory, and antimicrobial activities of the frog skin host-defense peptides pseudhymenochirin-1Pb and pseudhymenochirin-2Pa. *Regul Pept* 2014; **194-195**: 69-76.
- 22 Capriotti AAL, Caruso G, Cavaliere C, Samperi R, Group P, Ventura S *et al.* Identification of potential bioactive generated by simulated gastrointestinal digestion of soybean seeds and soy milk proteins. *J Food Compos Anal* 2015; **44**: 205-213.
- 23 Babini E, Tagliazucchi D, Martini S, Dei Più L, Gianotti A. LC-ESI-QTOF-MS identification of novel antioxidant peptides obtained by enzymatic and microbial hydrolysis of vegetable proteins. *Food Chem* 2017; **228**: 186-196.
- 24 Hajfathalian M, Ghelichi S, García-Moreno PJ, Moltke Sørensen A-D, Jacobsen C. Peptides: Production, bioactivity, functionality, and applications. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2017; **0**: 1-33.
- 25 Hartmann R, Meisel H. Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. *Curr Opin Biotechnol* 2007; **18**: 163-169.
- 26 Wang W, Gonzalez De Mejia E. A new frontier in soy bioactive peptides that may prevent age-related chronic diseases. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 2005; **4**: 63-78.
- 27 Food and Drug Administration H. Food labeling: health claims; soy protein and coronary heart disease. Food and Drug Administration, HHS. Final rule. 1999.
- 28 Anderson JW, Johnstone BM, Cook-Newell ME. Meta-Analysis of the Effects of Soy Protein Intake on Serum Lipids. *N Engl J Med* 1995; **333**: 276-282.
- 29 Anthony MS, Clarkson TB, Hughes CL, Morgan TM, Burke GL. Soybean isoflavones improve cardiovascular risk factors without affecting the reproductive system of peripubertal rhesus monkeys. *J Nutr* 1996; **126**: 43-50.
- 30 Kito M, Moriyama T, Kimura Y, Kambara H. Changes in Plasma Lipid Levels in Young Healthy Volunteers by Adding an Extruder-cooked Soy Protein to Conventional Meals. *Biosci Biotechnol Biochem* 1993; **57**: 354-355.
- 31 Sirtori CR, Lovatij MR, Manzonij C, Mohetti M, Pazzucchoft F, Gatw AHDEYYO. Soy Intake and Cholesterol Reduction Soy and Cholesterol Reduction : Clinical Experience1. *J Nutr* 1995; **125**: 598-605.
- 32 Peña-Ramos EA, Xiong YL. Antioxidant Activity of Soy Protein Hydrolysates in a Liposomal System. *J Food Sci* 2002; **67**: 2952-2956.
- 33 Gibbs BF, Zougman A, Masse R, Mulligan C. Production and characterization of bioactive peptides from soy hydrolysate and soy-fermented food. *Food Res Int* 2004; **37**: 123-131.
- 34 Durazzo A, Gabrielli P, Manzi P. Qualitative Study of Functional Groups and Antioxidant Properties of Soy-Based Beverages Compared to Cow Milk. *Antioxidants* 2015; **4**: 523-532.
- 35 De Leo F, Panarese S, Gallerani R, Ceci L. Angiotensin Converting Enzyme (ACE) Inhibitory Peptides: Production and Implementation of Functional Food. *Curr Pharm Des* 2009; **15**: 3622-3643.

- 36 Chen JR, Yang SC, Suetsuna K, Chao JCJ. Soybean protein-derived hydrolysate affects blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *J Food Biochem* 2004; **28**: 61-73.
- 37 Lo WMY, Li-Chan ECY. Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides from in vitro pepsin-pancreatin digestion of soy protein. *J Agric Food Chem* 2005; **53**: 3369-3376.
- 38 Margatan W, Ruud K, Wang Q, Markowski T, Ismail B. Angiotensin Converting Enzyme Inhibitory Activity of Soy Protein Subjected to Selective Hydrolysis and Thermal Processing. *J Agric Food Chem* 2013; **61**: 3460-3467.
- 39 Pipe EA, Gobert CP, Capes SE, Darlington GA, Lampe JW, Duncan AM. Soy Protein Reduces Serum LDL Cholesterol and the LDL Cholesterol : HDL Cholesterol and Apolipoprotein B : Apolipoprotein A-I Ratios in Adults with Type 2 Diabetes 1 - 3. *Blood* 2009. doi:10.3945/jn.109.109595.from.
- 40 Nakurte I, Kirhnere I, Namniece J, Saleniece K, Krigere L, Mekss P *et al.* Detection of the lunasin peptide in oats (*Avena sativa* L). *J Cereal Sci* 2013; **57**: 319-324.
- 41 Aoyama T, Fukui K, Takamatsu K, Hashimoto Y, Yamamoto T. Soy protein isolate and its hydrolysate reduce body fat of dietary obese rats and genetically obese mice (yellow KK). *Nutrition* 2000; **16**: 349-354.
- 42 Bawa S. The significance of soy protein and soy bioactive compounds in the prophylaxis and treatment of osteoporosis. *J Osteoporos* 2010; **2010**: 891058.
- 43 Nagata C. Ecological study of the association between soy product intake and mortality from cancer and heart disease in Japan. *Int J Epidemiol* 2000; **29**: 832-6.
- 44 Yang G, Shu X, Li H, Chow W, Cai H, Zhang X *et al.* Prospective cohort study of soy food intake and colorectal cancer risk. *Am J Clin Nutr* 2009; : 577-583.
- 45 Lamartiniere CA. Protection against breast cancer with genistein: A component of soy. *Am J Clin Nutr* 2000; **71**: 1705-1707.
- 46 Messina MJ. Legumes and soybeans: Overview of their nutritional profiles and health effects. *Am J Clin Nutr* 1999; **70**.
- 47 Messina MJ, Loprinzi CL. Research Conference on Diet , Nutrition and Cancer Soy for Breast Cancer Survivors : A Critical Review of the Literature 1. *J Nutr* 2001; : 3074-3077.
- 48 Shahidi F. *Handbook of Antioxidants for Preservation*. 2015.
- 49 Schaich KM. Analysis of lipid and protein oxidation in fats, oils, and foods. En: Hu M, Jacobsen C (eds). *Oxidative Stability and Shelf Life of Foods Containing Oils and Fats*. AOCS Press: Cambridge, 2016, pp 1-131.
- 50 Shahidi F, Zhong Y. Measurement of antioxidant activity. *J Funct Foods* 2015; **18**: 757-781.
- 51 Jung WK, Mendis E, Je JY, Park PJ, Byeng WS, Hyoung CK *et al.* Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide from yellowfin sole (*Limanda aspera*) frame protein and its antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats. *Food Chem* 2006; **94**: 26-32.
- 52 Nii Y, Fukuta K, Yoshimoto R, Sakai K, Ogawa T. Determination of antihypertensive peptides from an izumi shrimp hydrolysate. *Biosci Biotechnol Biochem* 2008; **72**: 861-864.
- 53 Lee SH, Qian ZJ, Kim SK. A novel angiotensin I converting enzyme inhibitory peptide from tuna frame protein hydrolysate and its antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats. *Food Chem* 2010; **118**: 96-102.

- 54 Je JY, Park JY, Jung WK, Park PJ, Kim SK. Isolation of angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitor from fermented oyster sauce, *Crassostrea gigas*. *Food Chem* 2005; **90**: 809-814.
- 55 Je JY, Park P-J, Byun H-G, Jung W-K, Kim S-K. Angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory peptide derived from the sauce of fermented blue mussel, *Mytilus edulis*. *Bioresour Technol* 2005; **96**: 1624-1629.
- 56 Je JY, Park PJ, Kim SK. Antioxidant activity of a peptide isolated from Alaska pollack (*Theragra chalcogramma*) frame protein hydrolysate. *Food Res Int* 2005; **38**: 45-50.
- 57 Yamamoto N. Functional Food Products with Antihypertensive Effects. En: *Bioactive Proteins and Peptides as Functional Foods and Nutraceuticals*. Wiley-Blackwell: Oxford, UK, 2010, pp 169-177.
- 58 Adje EY, Balti R, Kouach M, Guillochon D, Nedjar-Arroume N. α 67-106 of bovine hemoglobin: A new family of antimicrobial and angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides. *Eur Food Res Technol* 2011; **232**: 637-646.
- 59 Norris R, FitzGerald RJ. Antihypertensive Peptides from Food Proteins. En: Hernandez-Ledesma B, Hsieh C-C (eds). *Bioactive Food Peptides in Health and Disease*. INTECH, 2013, pp 45-72.
- 60 Mohanty DP, Mohapatra S, Misra S, Sahu PS. Milk derived bioactive peptides and their impact on human health – A review. *Saudi J Biol Sci* 2016; **23**: 577-583.
- 61 Esteve C, Marina ML, García MC. Novel strategy for the revalorization of olive (*Olea europaea*) residues based on the extraction of bioactive peptides. *Food Chem* 2015; **167**: 272-280.
- 62 El Hatmi H, Jrad Z, Khorchani T, Jardin J, Poirson C, Perrin C *et al*. Identification of bioactive peptides derived from caseins, glycosylation-dependent cell adhesion molecule-1 (GlyCAM-1), and peptidoglycan recognition protein-1 (PGRP-1) in fermented camel milk. *Int Dairy J* 2016; **56**: 159-168.
- 63 Herman EM. Soybean seed proteome rebalancing. *Front Plant Sci* 2014; **5**: 437.
- 64 Gomes LS, Senna R, Sandim V, Silva-neto AC, Perales JEA, Fialho E. Four Conventional Soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] Seeds Exhibit Different Protein Profiles As Revealed by Proteomic Analysis. *J Agric Food Chem* 2014; **62**: 1283-1293.
- 65 Chen H, Muramoto K, Yamauchi F, Fujimoto K, Nokihara K. Antioxidative Properties of Histidine-Containing Peptides Designed from Peptide Fragments Found in the Digests of a Soybean Protein. *J Agric Food Chem* 1998; **46**: 49-53.
- 66 Chiang WD, Shih CJ, Chu YH. Functional properties of soy protein hydrolysate produced from a continuous membrane reactor system. *Food Chem* 1999; **65**: 189-194.
- 67 González-Montoya M, Ramón-Gallegos E, Robles-Ramírez M del C, Mora-Escobedo R. Evaluation of the Antioxidant and Antiproliferative Effects of Three Peptide Fractions of Germinated Soybeans on Breast and Cervical Cancer Cell Lines. *Plant Foods Hum Nutr* 2016; **71**: 368-374.
- 68 de Oliveira CF, Corrêa APF, Coletto D, Daroit DJ, Cladera-Olivera F, Brandelli A. Soy protein hydrolysis with microbial protease to improve antioxidant and functional properties. *J Food Sci Technol* 2014; **52**: 2668-2678.
- 69 Murphy PA, Song T, Buseman G, Barua K, Beecher GR, Trainer D *et al*. Isoflavones in retail and institutional soy foods. *J Agric Food Chem* 1999; **47**: 2697-2704.
- 70 Masilamani M, Wei J, Sampson HA. Regulation of the immune response by soybean

- isoflavones. *Immunol Res* 2012; **54**: 95-110.
- 71 Da Silva LH, Celeghini RMS, Chang YK. Effect of the fermentation of whole soybean flour on the conversion of isoflavones from glycosides to aglycones. *Food Chem* 2011; **128**: 640-644.
- 72 Chen L, Madl RL, Vadlani P V, Li L, Wang W. Value - Added Products from Soybean : Removal of Anti-Nutritional Factors via Bioprocessing. En: *Soybean - Bio-Active Compounds*. 2013, pp 161-179.
- 73 Tham DM, Gardner CD, Haskell WL. Potential Health Benefits of Dietary Phytoestrogens: A Review of the Clinical, Epidemiological, and Mechanistic Evidence. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; **83**: 2223-2235.
- 74 Patel RP, Boersma BJ, Crawford JH, Hogg N, Kirk M, Kalyanaraman B *et al*. Antioxidant mechanisms of isoflavones in lipid systems: Paradoxical effects of peroxy radical scavenging. *Free Radic Biol Med* 2001; **31**: 1570-1581.
- 75 Wangen KE, Duncan AM, Xu X, Kurzer MS. Soy isoflavones improve plasma lipids in normocholesterolemic and mildly hypercholesterolemic postmenopausal women. *Am J Clin Nutr* 2001; **73**: 225-231.
- 76 Zhang X, Gao Y-T, Yang G, Li H, Cai Q, Xiang Y-B *et al*. Urinary isoflavonoids and risk of coronary heart disease. *Int J Epidemiol* 2012; **41**: 1367-1375.
- 77 Taku K, Melby MK, Kronenberg F, Kurzer MS, Messina M. Extracted or synthesized soybean isoflavones reduce menopausal hot flash frequency and severity. *Menopause J North Am Menopause Soc* 2012; **19**: 776-790.
- 78 Ma D-F, Qin L-Q, Wang P-Y, Katoh R. Soy isoflavone intake inhibits bone resorption and stimulates bone formation in menopausal women: meta-analysis of randomized controlled trials. *Eur J Clin Nutr* 2008; **62**: 155-61.
- 79 Wei P, Liu M, Chen Y, Chen DC. Systematic review of soy isoflavone supplements on osteoporosis in women. *Asian Pac J Trop Med* 2012; **5**: 243-248.
- 80 Velasquez MT, Bhathena SJ. Role of dietary soy protein in obesity. *Int J Med Sci* 2007; **4**: 72-82.
- 81 Zimmermann C, Cederroth CR, Bourgoin L, Foti M, Nef S. Prevention of diabetes in db/db mice by dietary soy is independent of isoflavone levels. *Endocrinology* 2012; **153**: 5200-5211.
- 82 Henderson VW, Miller BL, Elble RJ, Reyes PF, Shoupe D, McCleary CA *et al*. Estrogen for Alzheimer ' s disease in women. *Neurology* 2000; **54**: 295-301.
- 83 Neese SL, Bandara SB, Doerge DR, Helferich WG, Korol DL, Schantz SL. Effects of multiple daily genistein treatments on delayed alternation and a differential reinforcement of low rates of responding task in middle-aged rats. *Neurotoxicol Teratol* 2012; **34**: 187-195.
- 84 Dong X, Xu W, Sikes RA, Wu C. Combination of low dose of genistein and daidzein has synergistic preventive effects on isogenic human prostate cancer cells when compared with individual soy isoflavone. *Food Chem* 2013; **141**: 1923-1933.
- 85 Filiberto AC, Mumford SL, Pollack AZ, Zhang C, Yeung EH, Perkins NJ *et al*. Habitual Dietary Isoflavone Intake Is Associated with Decreased C-Reactive Protein Concentrations among Healthy. 2013; : 900-906.
- 86 Park M-H, Ju J-W, Park M, Han J. Daidzein inhibits carbohydrate digestive enzymes in vitro and alleviates postprandial hyperglycemia in diabetic mice. *Eur J Pharmacol* 2013; **712**: 48-52.

- 87 Liu K. *Soybeans: chemistry, technology, and utilization*. Springer US, 1997.
- 88 Su S, Yeh T, Lei H. The Potential of Soybean Foods as a Chemoprevention Approach for Human Urinary Tract Cancer The Potential of Soybean Foods as a Chemoprevention Approach for Human Urinary Tract Cancer. *Clin Cancer Res* 2000; **6**: 230-236.
- 89 Constantinou AI, Lantvit D, Hawthorne M, Xu X, van Breemen RB, Pezzuto JM. Chemopreventive Effects of Soy Protein and Purified Soy Isoflavones on DMBA-Induced Mammary Tumors in Female Sprague-Dawley Rats. *Nutr Cancer* 2001; **41**: 75-81.
- 90 Kato K, Takahashi S, Cui L, Toda T, Suzuki S, Futakuchi M *et al*. Suppressive effects of dietary genistin and daidzin on rat prostate carcinogenesis. *Jpn J Cancer Res* 2000; **91**: 786-91.
- 91 Hedlund TE, Bokhoven A van, Johannes WU, Nordeen SK, Ogden LG. Prostatic fluid concentrations of isoflavonoids in soy consumers are sufficient to inhibit growth of benign and malignant prostatic epithelial cells in vitro. *Prostate* 2006; **66**: 557-566.
- 92 McCormick DL, Johnson WD, Bosland MC, Lubet R a, Steele VE. Chemoprevention of rat prostate carcinogenesis by soy isoflavones and by Bowman-Birk inhibitor. *Nutr Cancer* 2007; **57**: 184-93.
- 93 Pollard M, Wolter W, Sun L. Prevention of induced prostate-related cancer by soy protein isolate/isoflavone-supplemented diet in Lobund-Wistar rats. *In Vivo* 2000; **14**: 389-92.
- 94 Wang J, Eltoum IE, Lamartiniere CA. Dietary genistein suppresses chemically induced prostate cancer in Lobund-Wistar rats. *Cancer Lett* 2002; **186**: 11-18.
- 95 Hikosaka A, Asamoto M, Hokaiwado N, Kato K, Kuzutani K, Kohri K *et al*. Inhibitory effects of soy isoflavones on rat prostate carcinogenesis induced by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP). *Carcinogenesis* 2004; **25**: 381-387.
- 96 Loibl S, Lintermans A, Dieudonné AS, Neven P. Management of menopausal symptoms in breast cancer patients. *Maturitas* 2011; **68**: 148-154.
- 97 Patisaul HB, Jefferson W. The pros and cons of phytoestrogens. *Front Neuroendocrinol* 2010; **31**: 400-419.
- 98 Zuniga KE, Clinton SK, Erdman JW. The interactions of dietary tomato powder and soy germ on prostate carcinogenesis in the TRAMP model. *Cancer Prev Res* 2013; **6**: 548-557.
- 99 Wei H, Bowen R, Cai Q, Barnes S, Wang Y. Antioxidant and Antipromotional Effects of the Soybean Isoflavone Genistein. *Exp Biol Med* 1995; **208**: 124-130.
- 100 Djuric Z, Chen G, Doerge DR, Heilbrun LK, Kucuk O. Effect of soy isoflavone supplementation on markers of oxidative stress in men and women. *Cancer Lett* 2001; **172**: 1-6.
- 101 Santhakumar AB, Bulmer AC, Singh I. A review of the mechanisms and effectiveness of dietary polyphenols in reducing oxidative stress and thrombotic risk. *J Hum Nutr Diet* 2014; **27**: 1-21.
- 102 Pollard M, Luckert PH. Influence of isoflavones in soy protein isolates on development of induced prostate-related cancers in L-W rats. *Nutr Cancer* 1997; **28**: 41-45.
- 103 Onozawa M, Kawamori T, Baba M, Fukuda K, Toda T, Sato H *et al*. Effects of a soybean isoflavone mixture on carcinogenesis in prostate and seminal vesicles of F344 rats. *Japanese J Cancer Res* 1999; **90**: 393-98.
- 104 Barnes S. The chemopreventive properties of soy isoflavonoids in animal models of breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 1997; **46**: 169-179.

- 105 Wei H, Bowen R, Zhang X, Lebowitz M. Isoflavone genistein inhibits the initiation and promotion of two-stage skin carcinogenesis in mice. *Carcinogenesis* 1998; **19**: 1509-1514.
- 106 Sørensen IK, Kristiansen E, Mortensen A, Nicolaisen GM, Wijnands JAH, Van Kranen HJ *et al.* The effect of soy isoflavones on the development of intestinal neoplasia in Apc(Min) mouse. *Cancer Lett* 1998; **130**: 217-225.
- 107 Tatsuta M, Iishi H, Baba M, Yano H, Uehara H, Nakaizumi A. Attenuation by genistein of sodium-chloride-enhanced gastric carcinogenesis induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in Wistar rats. *Int J Cancer* 1999; **80**: 396-399.
- 108 Guo J-Y, Li X, Browning JD, Rottinghaus GE, Lubahn DB, Constantinou A *et al.* Dietary soy isoflavones and estrone protect ovariectomized ERalphaKO and wild-type mice from carcinogen-induced colon cancer. *J Nutr* 2004; **134**: 179-82.
- 109 Rao C V., Wang CX, Simi B, Lubet R, Kelloff G, Steele V *et al.* Enhancement of experimental colon cancer by genistein. *Cancer Res* 1997; **57**: 3717-3722.
- 110 Allred C, Allred KF, Ju YH, Clausen LM, Doerge DR, Schantz SL *et al.* Dietary genistein results in larger MNU-induced, estrogen-dependent mammary tumors following ovariectomy of Sprague-Dawley rats. *Carcinogenesis* 2004; **25**: 211-218.
- 111 Preedy VR. *Isoflavones : chemistry, analysis, function and effects*. Royal Society of Chemistry, 2013.
- 112 Pilšáková L, Riečanský I, Jagla F. The Physiological Actions of Isoflavone Phytoestrogens. *Physiol Res* 2010; **59**: 651-664.
- 113 Zaheer K, Humayoun Akhtar M. An updated review of dietary isoflavones: Nutrition, processing, bioavailability and impacts on human health. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2017; **57**: 1280-1293.
- 114 Zheng B, Yegge JA, Bailey DT, Sullivan JL. Process for the isolation and purification of isoflavones. 1997.
- 115 Waggle DH, Bryan BA. Recovery of isoflavones from soy molasses. 2000.
- 116 Bates GA, Bryan BA. Process for separating and recovering protein and isoflavones from a plant material. 2004.
- 117 Siepmann T, Roofeh J, Kiefer FW, Edelson DG. Hypogonadism and erectile dysfunction associated with soy product consumption. *Nutrition* 2011; **27**: 859-862.
- 118 Fernandez-Lopez A, Lamothe V, Delamplé M, Denayrolles M, Bennetau-Pelissero C. Removing isoflavones from modern soyfood: Why and how? *Food Chem* 2016; **210**: 286-294.
- 119 Omoruyi IM, Kabiersch G, Pohjanvirta R. Commercial processed food may have endocrine-disrupting potential: soy-based ingredients making the difference. *Food Addit Contam Part A* 2013; **30**: 1722-1727.
- 120 Cederroth CR, Zimmermann C, Nef S. Soy, phytoestrogens and their impact on reproductive health. *Mol Cell Endocrinol* 2012; **355**: 192-200.
- 121 Portman MA, Navarro SL, Bruce ME, Lampe JW. ScienceDirect Soy isoflavone intake is associated with risk of Kawasaki disease. *Nutr Res* 2016; **36**: 827-834.
- 122 Bennetau-Pelissero C. Response to the letter from Dr Messina and Dr Badger following the publication of the paper by Fernandez-Lopez A, Lamothe V, Delamplé M, Denayrolles M and Bennetau-Pelissero C. *Food Chem* 2017; **225**: 293-301.

- 123 Liu K. Chemistry and Nutritional Value of Soybean Components. En: *Soybeans*. Springer US: Boston, MA, 1997, pp 25-113.
- 124 Vijaya Raghavan GS, Harper JM, Kienholz EW. Nutritive Value of Salt-bed Roasted Soybeans for Broiler Chicks. *Poult Sci* 1974; **53**: 547-553.
- 125 Francis G, Makkar HPSS, Becker K. *Antinutritional factors present in plant-derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish*. 2001 doi:10.1016/S0044-8486(01)00526-9.
- 126 Iassonova DR, Johnson LA, Hammond EG, Beattie SE. Evidence of an enzymatic source of off flavors in «lipoxygenase- null» soybeans. *JAOCS, J Am Oil Chem Soc* 2009; **86**: 59-64.
- 127 Prachayawarakorn S, Prachayawasin P, Soponronnarit S. Heating process of soybean using hot-air and superheated-steam fluidized-bed dryers. *LWT - Food Sci Technol* 2006; **39**: 770-778.
- 128 Newkirk R. SoyBean, Feed Industry Guide. En: *Feed Industry Guide 1st Editin, 2010*. 2010, pp 1-48.
- 129 Orf JH, Hymowitz T. Inheritance of the Absence of the Kunitz Trypsin Inhibitor in Seed Protein of Soybeans. *Crop Sci* 1979; **19**: 107-9.
- 130 Dang L, Van Damme EJM. Toxic proteins in plants. *Phytochemistry* 2015; **117**: 51-64.
- 131 Gomes MTR, Oliva ML, Lopes MTP, Salas CE. Plant proteinases and inhibitors: an overview of biological function and pharmacological activity. *Curr Protein Pept Sci* 2011; **12**: 417-436.
- 132 L'Hocine L, Boye JI. Allergenicity of soybean: New developments in identification of allergenic proteins, cross-reactivities and hypoallergenization technologies. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2007; **47**: 127-143.
- 133 Walsh KA, Kauffman DL, Kumar KS, Neurath H. On the structure and function of bovine trypsinogen and trypsin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1964; **51**: 301-308.
- 134 Cabrera-Orozco A, Jimenez-Martinez C, Davila-Ortiz G. Soybean: Non-Nutritional Factors and Their Biological Functionality. En: *Soybean - Bio-Active Compounds*. InTech, 2013 doi:10.5772/52598.
- 135 Rackis JJ, Gumbmann MR. Protease Inhibitors: Physiological Properties and nutritional significance. *Antinutr Nat toxicants foods* 1982; **34**: 203-237.
- 136 Boisen S, Eggum BO. Critical evaluation of in vitro methods for estimating digestibility in simple-stomach animals. *Nutr Res Rev* 1991; **4**: 141-162.
- 137 Su G, Chang KC. Trypsin Inhibitor Activity In Vitro Digestibility and Sensory Quality of Meat-Like Yuba Products as Affected by Processing. *J Food Sci* 2002; **67**: 1260-1266.
- 138 Shin DJ, Kim W, Kim Y. Physicochemical and sensory properties of soy bread made with germinated, steamed, and roasted soy flour. *Food Chem* 2013; **141**: 517-523.
- 139 Kakade ML, Hoffa DE, Liener IE. Contribution of trypsin inhibitors to the deleterious effects of unheated soybeans fed to rats. *J Nutr* 1973; **103**.
- 140 Feng J, Liu X, Xu ZR, Lu YP, Liu YY. Effect of fermented soybean meal on intestinal morphology and digestive enzyme activities in weaned piglets. *Dig Dis Sci* 2007; **52**: 1845-1850.
- 141 Liener IE. Toxic constituents of plant foodstuffs. *Proc Nutr Soc* 1970; **29**: 56-57.
- 142 Kumar V, Rani A, Pandey V, Chauhan GS. Changes in lipoxygenase isozymes and trypsin

- inhibitor activity in soybean during germination at different temperatures. *Food Chem* 2006; **99**: 563-568.
- 143 Anderson-Hafermann JC, Zhang Y, Parsons CM, Hymowitz T. Effect of heating on the nutritional quality of Kunitz-trypsin-inhibitor-free and conventional soybeans for chicks'. *Poult Sci* 1992; **711**: 700-1709.
- 144 Wilson RP, Poe WE. Effects of feeding soybean meal with varying trypsin inhibitor activities on growth of fingerling channel catfish. *Aquaculture* 1985; **46**: 19-25.
- 145 Habib H, Fazili KM. Plant protease inhibitors : a defense strategy in plants. *Biotechnol Mol Biol Rev* 2007; **2**: 68-85.
- 146 Dunse KM, Stevens JA, Lay FT, Gaspar YM, Heath RL, Anderson MA. Coexpression of potato type I and II proteinase inhibitors gives cotton plants protection against insect damage in the field. *Proc Natl Acad Sci* 2010; **107**: 15011-15015.
- 147 Dunaevsky YE, Elpidina EN, Vinokurov KS, Belozersky MA. Protease Inhibitors in Improvement of Plant Resistance to Pathogens and Insects. *Mol Biol* 2005; **39**: 608-613.
- 148 Mithöfer A, Boland W. Plant Defense Against Herbivores: Chemical Aspects. *Annu Rev Plant Biol* 2012; **63**: 431-450.
- 149 Kim JY, Park SC, Hwang I, Cheong H, Nah JW, Hahm KS *et al*. Protease inhibitors from plants with antimicrobial activity. *Int J Mol Sci* 2009; **10**: 2860-2872.
- 150 de Souza Cândido E, Pinto MFS, Pelegrini PB, Lima TB, Silva ON, Pogue R *et al*. Plant storage proteins with antimicrobial activity: novel insights into plant defense mechanisms. *FASEB J* 2011; **25**: 3290-3305.
- 151 Lippman SM, Matrisian LM. Protease inhibitors in oral carcinogenesis and chemoprevention. *Clin Cancer Res* 2000; **6**: 4599-603.
- 152 Kennedy A. Chemopreventive Agents Protease Inhibitors. *Pharmacol Ther* 1998; **78**: 167-209.
- 153 Castro-Guillén JL, García-Gasca T, Blanco-Labra A. Protease Inhibitors as Anticancer Agents. En: Vazquez CM (ed). *New approaches in the treatment of cancer*. 2010, pp 91-124.
- 154 Rakashanda S, Amin S. Proteases as Targets in Anticancer Therapy Using Their Inhibitors. *J Life Sci* 2013; **5**: 133-138.
- 155 Troll W, Wiesner R. Protease inhibitors: Possible anticarcinogens in edible seeds. *Prostate* 1983; **4**: 345-349.
- 156 Kennedy AR. The Evidence for Soybean Products as Cancer Preventive Agents. *J Nutr* 1995; **125**: 733-743.
- 157 Kennedy AR. The Bowman-Birk inhibitor from soybeans as an anticarcinogenic agent. *Am J Clin Nutr* 1998; **68**.
- 158 Kennedy AR, Szuha BF, Newberne PM, Billings PC. Preparation and production of a cancer chemopreventive agent, bowman-birk inhibitor concentrate. *Nutr Cancer* 1993; **19**: 281-302.
- 159 Sun XY, Donald SP, Phang JM. Testosterone and prostate specific antigen stimulate generation of reactive oxygen species in prostate cancer cells. *Carcinogenesis* 2001; **22**: 1775-1780.
- 160 Dittmann K, Virsik-Köpp P, Mayer C, Rave-Fränk M, Rodemann HP. Bowman-Birk protease inhibitor activates DNA-dependent protein kinase and reduces formation of radiation-induced dicentric chromosomes. *Int J Radiat Biol* 2003; **79**: 801-808.

- 161 Sharma S, Ghoddoussi M, Gao P, Kelloff GJ, Steele VE, Kopelovich L. A quantitative angiogenesis model for efficacy testing of chemopreventive agents. *Anticancer Res* 2001; **21**: 3829-3837.
- 162 Kennedy AR, Wan XS. Effects of the Bowman-Birk inhibitor on growth, invasion, and clonogenic survival of human prostate epithelial cells and prostate cancer cells. *The Prostate* 2002; **50**: 125-133.
- 163 Chen YW, Huang SC, Lin-Shiau SY, Lin JK. Bowman-Birk inhibitor abates proteasome function and suppresses the proliferation of MCF7 breast cancer cells through accumulation of MAP kinase phosphatase-1. *Carcinogenesis* 2005; **26**: 1296-1306.
- 164 Clark DA, Day R, Seidah N, Moody TW, Cuttitta F, Davis TP. Protease inhibitors suppress in vitro growth of human small cell lung cancer. *Peptides* 1993; **14**: 1021-1028.
- 165 Weed HG, Mcgandy RB, Kennedy AR. Protection against dimethylhydrazine-induced adenomatous tumors of the mouse colon by the dietary addition of an extract of soybeans containing the bowman-birk protease inhibitor. *Carcinogenesis* 1985; **6**: 1239-1241.
- 166 Kennedy AR, Beazer-Barclay Y, Kinzler KW, Newberne PM. Suppression of carcinogenesis in the intestines of Min mice by the soybean-derived Bowman-Birk inhibitor. *Cancer Res* 1996; **56**: 679-682.
- 167 Von Hofe E, Newberne PM, Kennedy AR. Inhibition of N-nitrosomethylbenzylamine-induced esophageal neoplasms by the bowman-birk protease inhibitor. *Carcinogenesis* 1991; **12**: 2147-2150.
- 168 St. Clair WH, Billings PC, Carew JA, Keller-McGandy C, Newberne P, Kennedy AR. Suppression of Dimethylhydrazine-induced Carcinogenesis in Mice by Dietary Addition of the Bowman-Birk Protease Inhibitor. *Cancer Res* 1990; **50**: 580-586.
- 169 Witschi H, Kennedy AR. Modulation of lung tumor development in mice with the soybean-derived bowman-birk protease inhibitor. *Carcinogenesis* 1989; **10**: 2275-2277.
- 170 Kobayashi H, Fukuda Y, Yoshida R, Kanada Y, Nishiyama S, Suzuki M *et al.* Suppressing effects of dietary supplementation of soybean trypsin inhibitor on spontaneous, experimental and peritoneal disseminated metastasis in mouse model. *Int J Cancer* 2004; **112**: 519-524.
- 171 Messadi D V., Billings P, Shklar G, Kennedy AR. Inhibition of Oral Carcinogenesis by a Protease Inhibitor. *JNCI J Natl Cancer Inst* 1986; **76**: 447-452.
- 172 Kennedy AR, Billings PC, Maki PA. Effects of Various Preparations of Dietary Protease Inhibitors on Oral Carcinogenesis in Hamsters Induced by DMBA. *Nutr Cancer* 1993; **19**: 191-200.
- 173 Rao KVN, Johnson WD, Bosland MC, Lubet RA, Steele VE, Kelloff GJ *et al.* Chemoprevention of Rat Prostate Carcinogenesis by Early and Delayed Administration of Dehydroepiandrosterone. *Cancer Res* 1999; **59**: 3084-3089.
- 174 McCormick DL, Rao KVN, Steele VE, McCormick DL, Rao KVN, Steele VE *et al.* Chemoprevention of Rat Prostate Carcinogenesis by 9- cis -Retinoic Acid Advances in Brief Chemoprevention of Rat Prostate Carcinogenesis by 9- cis -Retinoic Acid. *Cancer Res* 1999; **59**: 521-524.
- 175 Wan XS, Ware JH, Zhang L, Newberne PM, Evans SM, Clark LC *et al.* Treatment with soybean-derived Bowman Birk inhibitor increases serum prostate-specific antigen concentration while suppressing growth of human prostate cancer xenografts in nude mice. *Prostate* 1999; **41**: 243-52.

- 176 Armstrong WB, Wan XS, Kennedy AR, Taylor TH, Meyskens Jr. FL. Development of the Bowman-Birk inhibitor for oral cancer chemoprevention and analysis of Neu immunohistochemical staining intensity with Bowman-Birk inhibitor concentrate treatment. *Laryngoscope* 2003; **113**: 1687-1702.
- 177 Bruce Malkowicz S, McKenna WG, Vaughn DJ, Wan XS, Propert KJ, Rockwell K *et al.* Effects of Bowman-Birk inhibitor concentrate (BBIC) in patients with benign prostatic hyperplasia. *Prostate* 2001; **48**: 16-28.
- 178 Huang M-T, Xie J-G, Lin C, Kizoulis M, Seiberg M, Shapiro S *et al.* Inhibitory Effect of Topical Applications of Nondenatured Soymilk on the Formation and Growth of UVB-Induced Skin Tumors. *Oncol Res Featur Preclin Clin Cancer Ther* 2004; **14**: 387-397.
- 179 Johnson W, Dooley L, Morrissey R, Arp L, Kapetanovic I, Crowell J *et al.* Oncogenicity evaluations of chemopreventive soy components in p53 (+/-) (p53 knockout) mice. *Int J Toxicol* 2006; **25**: 219-228.
- 180 Doppalapudi RS, Riccio ES, Rausch LL, Shimon JA, Lee PS, Mortelmans KE *et al.* Evaluation of chemopreventive agents for genotoxic activity. *Mutat Res - Genet Toxicol Environ Mutagen* 2007; **629**: 148-160.
- 181 da Silva Bezerra C, de Oliveira CFR, Machado OLT, de Mello GSV, da Rocha Pitta MG, de Melo Rêgo MJB *et al.* Exploiting the biological roles of the trypsin inhibitor from *Inga vera* seeds: A multifunctional Kunitz inhibitor. *Process Biochem* 2016; **51**: 792-803.
- 182 Batista IFC, Chudzinski-Tavassi AM, Faria F, Simons SM, Barros-Batesti DM, Labruna MB *et al.* Expressed sequence tags (ESTs) from the salivary glands of the tick *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). *Toxicon* 2008; **51**: 823-834.
- 183 Akagi EM, Júnior PL de S, Simons SM, Bellini MH, Barreto SA, Chudzinski-Tavassi AM. Proapoptotic effects of Amblyomin-X in murine renal cell carcinoma « in vitro ». *Biomed Pharmacother* 2012; **66**: 64-69.
- 184 Kobayashi H, Yoshida R, Kanada Y, Fukuda Y, Yagyu T, Inagaki K *et al.* Suppression of lipopolysaccharide-induced cytokine production of gingival fibroblasts by a soybean, Kunitz trypsin inhibitor. *J Periodontal Res* 2005; **40**: 461-468.
- 185 Kobayashi H, Yoshida R, Kanada Y, Fukuda Y, Yagyu T, Inagaki K *et al.* Dietary Supplementation of Soybean Kunitz Trypsin Inhibitor Reduces Lipopolysaccharide-Induced Lethality in Mouse Model. *Shock* 2005; **23**: 441-447.
- 186 Kobayashi H, Yoshida R, Kanada Y, Fukuda Y, Yagyu T, Inagaki K *et al.* A soybean Kunitz trypsin inhibitor reduces tumor necrosis factor-alpha production in ultraviolet-exposed primary human keratinocytes. *Exp Dermatol* 2005; **14**: 765-74.
- 187 Karr-Lilienthal LK, Grieshop CM, Spears JK, Fahey GC. Amino acid, carbohydrate, and fat composition of soybean meals prepared at 55 commercial U.S. soybean processing plants. *J Agric Food Chem* 2005; **53**: 2146-2150.
- 188 Wilson R. Seed composition. En: Boerma HR, Specht JE (eds). *Soybeans: improvement, production and uses*. American Society of Agronomy: Madison, USA, 2004, pp 621-677.
- 189 Krause DO, Easter RA, Mackie RI. Fermentation of stachyose and raffinose by hind-gut bacteria of the weanling pig. *Lett Appl Microbiol* 1994; **18**: 349-352.
- 190 Liying Z, Li D, Qiao S, Johnson EW, Li B, Thacker PA *et al.* Effects of stachyose on performance, diarrhoea incidence and intestinal bacteria in weanling pigs. *Arch Anim Nutr* 2003; **57**: 1-10.
- 191 Parsons CM, Zhang Y, Araba M. Nutritional evaluation of soybean meals varying in

- oligosaccharide content. *Poult Sci* 2000; **79**: 1127-1131.
- 192 Lopez-Garcia R, Park DL, Phillips TD. Integrated mycotoxin management systems. *Food, Nutr Agric* 1999; **23**: 38-48.
- 193 Mallmann CA, Hummes R, Leandro R, Giacomini L. Micotoxinas Y Sus Formas De Control. 2005.
- 194 Akande KE, Fabiyi EF. Effect of processing methods on some antinutritional factors in legume seeds for poultry feeding. *Int J Poult Sci* 2010; **9**: 996-1001.
- 195 Adrian J. Nutritional and physiological consequences of the Maillard reaction. *World Rev Nutr Diet* 1974; **19**: 71-122.
- 196 Zilic S, Bozovic I, Sukalovic VHT. Thermal inactivation of soybean bioactive proteins. *Int J Food Eng* 2012; **8**. doi:10.1515/1556-3758.2521.
- 197 Agrahar-Murugkar D, Jha K. Effect of drying on nutritional and functional quality and electrophoretic pattern of soyflour from sprouted soybean (*Glycine max*). *J Food Sci Technol* 2010; **47**: 482-487.
- 198 Jasti LS, Lavanya K, Fadnavis NW. Adsorption induced denaturation: application to denaturation of soybean trypsin inhibitor (SBTI) and lipoxygenase (LOX) in soymilk. *Biotechnol Lett* 2015; **37**: 147-151.
- 199 Murugkar DA. Effect of different process parameters on the quality of soymilk and tofu from sprouted soybean. *J Food Sci Technol* 2015; **52**: 2886-2893.
- 200 Chen Y. *Effects of Micronization, Ethanol Washing, and Enzymatic Hydrolysis Processing Alone or in Combination on Trypsin Inhibitors, Lipoxygenase Activities and Selected «Beany» Flavour Related Compounds in Soybean Flour*. 2015.
- 201 Carvalho AW de, Natal DIG, Silva CO da, Dantas MI de S, Barros EG de, Ribeiro SMR *et al*. Heat-treatment reduces anti-nutritional phytochemicals and maintains protein quality in genetically improved hulled soybean flour. *Food Sci Technol* 2013; **33**: 310-315.
- 202 Stewart OJ, Raghavan GS V, Orsat V, Golden KD. The effect of drying on unsaturated fatty acids and trypsin inhibitor activity in soybean. *Process Biochem* 2003; **39**: 483-489.
- 203 Andrade JC, Mandarino JMG, Kurozawa LE, Ida EI. The effect of thermal treatment of whole soybean flour on the conversion of isoflavones and inactivation of trypsin inhibitors. *Food Chem* 2016; **194**: 1095-1101.
- 204 Kaur S, Sharma S, Dar B, Singh B. Optimization of process for reduction of antinutritional factors in edible cereal brans. *Rev Agroquimica y Tecnol Aliment* 2012; **18**: 445-454.
- 205 Bayram M, Kaya A, Öner MD. Changes in properties of soaking water during production of soy-bulgur. *J Food Eng* 2004; **61**: 221-230.
- 206 Soares RRG, Azevedo AM, Van Alstine JM, Aires-Barros MR. Partitioning in aqueous two-phase systems: Analysis of strengths, weaknesses, opportunities and threats. *Biotechnol J* 2015; **10**: 1158-1169.
- 207 Zuloaga O, Olivares M, Navarro P, Vallejo A, Prieto A. Dispersive liquid – liquid microextraction : trends in the analysis of biological samples. *Bioanalysis* 2015; **7**: 2211-2225.
- 208 Zhang W, Liu X, Fan H, Zhu D, Wu X, Huang X *et al*. Separation and purification of alkaloids from *Sophora flavescens* Ait. by focused microwave-assisted aqueous two-phase extraction coupled with reversed micellar extraction. *Ind Crops Prod* 2016; **86**: 231-238.

- 209 Cordisco E, Haidar CN, Coscueta ER, Nerli BB, Malpiedi LP. Integrated extraction and purification of soy isoflavones by using aqueous micellar systems. *Food Chem* 2016; **213**: 514-520.
- 210 Alibrahim M. Cloud point extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons in aqueous solution with nonionic surfactants. *Tenside, Surfactants, Deterg* 2014; **51**: 333-338.
- 211 Chatzilazarou A, Katsoyannos E, Gortzi O, Lalas S, Paraskevopoulos Y, Dourtoglou E *et al.* Removal of polyphenols from wine sludge using cloud point extraction. *J Air Waste Manag Assoc* 2010; **60**: 454-459.
- 212 Becker JS, Thomas ORT, Franzreb M. Protein separation with magnetic adsorbents in micellar aqueous two-phase systems. *Sep Purif Technol* 2009; **65**: 46-53.
- 213 Bravo KE, Muñoz K, Calderón J, Osorio EJ. Development of an extraction method of golden berry (*Physalis peruviana* L.) polyphenol oxidase and isolation by aqueous two-phase system. *Rev la Fac Química Farm Univ Antioquia* 2011; **18**: 121-132.
- 214 Xie S, Paa MC, Li CF, Xiao D, Choi MMF. Separation and preconcentration of persistent organic pollutants by cloud point extraction. *J Chromatogr A* 2010; **1217**: 2306-2317.
- 215 Glembin P, Kerner M, Smirnova I. Cloud point extraction of microalgae cultures. *Sep Purif Technol* 2013; **103**: 21-27.
- 216 Gortzi O, Lalas S, Chatzilazarou A, Katsoyannos E, Papaconstantinou S, Dourtoglou E. Recovery of natural antioxidants from olive mill wastewater using Genapol-X080. *JAOCS, J Am Oil Chem Soc* 2008; **85**: 133-140.
- 217 Xing W, Chen L. Micelle-mediated extraction and cloud point preconcentration of bergenin from *Ardisia japonica*. *Sep Purif Technol* 2013; **110**: 57-62.
- 218 Heydari R, Hosseini M, Zarabi S. A simple method for determination of carmine in food samples based on cloud point extraction and spectrophotometric detection. *Spectrochim Acta - Part A Mol Biomol Spectrosc* 2015; **150**: 786-791.
- 219 Zhang W, Zhu D, Fan H, Liu X, Wan Q, Wu X *et al.* Simultaneous extraction and purification of alkaloids from *Sophora flavescens* Ait. by microwave-assisted aqueous two-phase extraction with ethanol/ammonia sulfate system. *Sep Purif Technol* 2015; **141**: 113-123.
- 220 Zaslavsky BY. *Aqueous two-phase partitioning: physical chemistry and bioanalytical applications*. M. Dekker, 1995.
- 221 Raja S, Murty VR, Thivaharan V, Rajasekar V, Ramesh V. Aqueous Two Phase Systems for the Recovery of Biomolecules – A Review. *Sci Technol* 2012; **1**: 7-16.
- 222 Albertsson P. Partition of Cell Particles and Macromolecules in Polymer Two-Phase Systems. En: *Advances in Protein Chemistry*. Academic Press, 1970, pp 309-341.
- 223 Rosen M, Kunjappu J. Surfactants and interfacial phenomena. 2012.
- 224 Kronberg B, Lindman B. *Surfactants and Polymers in aqueous Solution*. John Wiley & Sons, LTD.: West Sussex, England, 2003.
- 225 Muller N, Pellerin JH, Chen WW. Investigation of micelle structure by fluorine magnetic resonance. VI. Quaternary ammonium salts. *J Phys Chem* 1972; **76**: 3012-3017.
- 226 Winsor PA. Binary and multicomponent solutions of amphiphilic compounds. Solubilization and the formation, structure, and theoretical significance of liquid crystalline solutions. *Chem Rev* 1968; **68**: 1-40.

- 227 Carabias-Martínez R, Rodríguez-Gonzalo E, Moreno-Cordero B, Pérez-Pavón J, García-Pinto C, Fernández Laespada E. Surfactant cloud point extraction and preconcentration of organic compounds prior to chromatography and capillary electrophoresis. *J Chromatogr A* 2000; **902**: 251-265.
- 228 Frankewich RP, Hinze WL. Evaluation and Optimization of the Factors Affecting Nonionic Surfactant-Mediated Phase Separations. *Anal Chem* 1994; **66**: 944-954.
- 229 Lindman B, Wennerstroem H. Nonionic micelles grow with increasing temperature. *J Phys Chem* 1991; **95**: 6053-6054.
- 230 Nilsson PG, Wennerstroem H, Lindman B. Structure of micellar solutions of nonionic surfactants. Nuclear magnetic resonance self-diffusion and proton relaxation studies of poly(ethylene oxide) alkyl ethers. *J Phys Chem* 1983; **87**: 1377-1385.
- 231 Paleologos EK, Giokas DL, Karayannis MI. Micelle-mediated separation and cloud-point extraction. *TrAC Trends Anal* 2005; **24**. doi:10.1016/j.trac.2005.01.013.
- 232 Swe MM. *Aqueous phase behavior of surfactant and its application in cloud-point extraction*. 2003.
- 233 Li JL, Bai DS, Chen BH. Effects of additives on the cloud points of selected nonionic linear ethoxylated alcohol surfactants. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp* 2009; **346**: 237-243.
- 234 Santos-Ebinuma VC, Lopes AM, Converti A, Pessoa A, Rangel-Yagui C de O. Behavior of Triton X-114 cloud point in the presence of inorganic electrolytes. *Fluid Phase Equilib* 2013; **360**: 435-438.
- 235 Carale TR, Pham QT, Blankschtein D. Salt effects on intramicellar interactions and micellization of nonionic surfactants in aqueous solutions. *Langmuir* 1994; **10**: 109-121.
- 236 Phillis GDJ, Yambert JE. Solvent and Solute Effects on Hydration and Aggregation Numbers of Triton X-100 Micelles †. *Langmuir* 1996; **12**: 3431-3436.
- 237 Charlton ID, Doherty a P. Electrolyte-induced structural evolution of Triton X-100 micelles. *J Phys Chem B* 2000; **104**: 8327-8332.
- 238 Molina-Bolívar JA, Aguiar J, Carnero Ruiz C. Growth and hydration of triton X-100 micelles in monovalent alkali salts: A light scattering study. *J Phys Chem B* 2002; **106**: 870-877.
- 239 Cordisco E, Haidar CN, Goñi R, Nerli BB, Malpiedi LP. Physicochemical characterization of aqueous micellar systems formed by environmentally friendly salts. *Fluid Phase Equilib* 2015; **393**: 111-116.
- 240 Schott H. Effect of Inorganic Additives on Solutions of Nonionic Surfactants. X. Micellar Properties. *J Colloid Interface Sci* 1995; **173**: 265-277.
- 241 Li JL, Chen BH. Solubilization of model polycyclic aromatic hydrocarbons by nonionic surfactants. *Chem Eng Sci* 2002; **57**: 2825-2835.
- 242 Molina-Bolívar JA, Aguiar J, Ruiz CC. Light scattering and fluorescence probe studies on micellar properties of Triton X-100 in KCl solutions. *Mol Phys* 2001; **99**: 1729-1741.
- 243 Fischer I, Franzreb M. Direct determination of the composition of aqueous micellar two-phase systems (AMTPS) using potentiometric titration-A rapid tool for detergent-based bioseparation. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp* 2011; **377**: 97-102.
- 244 Molina-Bolívar JA, Ruiz C. Micellar size and phase behavior in n-octyl-β-D-thioglucoside/Triton X-100 mixtures: The effect of NaCl addition. *Fluid Phase Equilib* 2012;

- 327**: 58-64.
- 245 Balasubramanian D, Mitra P. Critical solution temperatures of liquid mixtures and the hydrophobic effect. *J Phys Chem* 1979; **83**: 2724-2727.
- 246 Kenkare P, Hall C, Kilpatrick P. The Effects of Salts on the Lower Consolute Boundary of a Nonionic Micellar Solution. *J Colloid Interface Sci* 1996; **184**: 456-68.
- 247 Koshy L, Saiyad AH, Rakshit AK. The effects of various foreign substances on the cloud point of Triton X 100 and Triton X 114. *Colloid Polym Sci* 1996; **274**: 582-587.
- 248 Schott H. Effect of Inorganic Additives on Solutions of Nonionic Surfactants .14. Effect of Chaotropic Anions on the Cloud Point of Octoxynol 9 (Triton X-100). *J Colloid Interface Sci* 1997; **189**: 117-122.
- 249 Tani H, Kamidate T, Watanabe H. Aqueous Micellar Two-Phase Systems for Protein Separation. *Anal Sci* 1998; **14**: 875-888.
- 250 Vieira FA, Guilherme RJR, Neves MC, Abreu H, Rodrigues ERO, Maraschin M *et al*. Single-step extraction of carotenoids from brown macroalgae using non-ionic surfactants. *Sep Purif Technol* 2017; **172**: 268-276.
- 251 Katsoyannos E, Chatzilazarou A, Gortzi O, Lalas S, Konteles S, Tataridis P. Application of cloud point extraction using surfactants in the isolation of physical antioxidants (phenols) from olive mill wastewater. En: *Fresenius Environmental Bulletin*. 2006, pp 1122-1125.
- 252 Mata JP. Hydrodynamic and Clouding Behavior of Triton X-100+SDS Mixed Micellar Systems in the Presence of Sodium Chloride. *J Dispers Sci Technol* 2006; **27**: 49-54.
- 253 Kundu K, Das A, Bardhan S, Chakraborty G, Ghosh D, Kar B *et al*. The mixing behaviour of anionic and nonionic surfactant blends in aqueous environment correlates in fatty acid ester medium. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp* 2016; **504**: 331-342.
- 254 Al-Hadabi BA, Aoudia M. Surfactant-surfactant and surfactant-solute interactions in SLES-Brij35 mixed micelles: Effect of the degree of ethoxylation on pyrene solubilization enhancement in water. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp* 2014; **459**: 82-89.
- 255 Sosa Ferrera Z, Padrón Sanz C, Mahugo Santana C, Santana Rodríguez JJ. The use of micellar systems in the extraction and pre-concentration of organic pollutants in environmental samples. *TrAC - Trends Anal. Chem.* 2004; **23**: 469-479.
- 256 Quina FH, Hinze WL. Surfactant-Mediated Cloud Point Extractions: An Environmentally Benign Alternative Separation Approach. *Ind Eng Chem Res* 1999; **38**: 4150-4168.
- 257 Gu T, Galera-Gómez PA. Clouding of Triton X-114: The effect of added electrolytes on the cloud point of Triton X-114 in the presence of ionic surfactants. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp* 1995; **104**: 307-312.
- 258 Zhao X, Wei Z, Du F, Zhu J. Effects of surfactant and salt species in reverse micellar forward extraction efficiency of isoflavones with enriched protein from soy flour. *Appl Biochem Biotechnol* 2010; **162**: 2087-2097.
- 259 Bera A, Kumar S, Mandal A. Temperature-dependent phase behavior, particle size, and conductivity of middle-phase microemulsions stabilized by ethoxylated nonionic surfactants. *J Chem Eng Data* 2012; **57**: 3617-3623.
- 260 Glembin P, Racheva R, Kerner M, Smirnova I. Micelle mediated extraction of fatty acids from microalgae cultures: Implementation for outdoor cultivation. *Sep Purif Technol* 2014; **135**: 127-134.

- 261 Sirimanne SR, Patterson DG, Ma L, Justice JB. Application of cloud-point extraction–reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1998; **716**: 129-137.
- 262 Jiantao He, Ziwei Zhao, Zhihong Shi, Meiping Zhao *, Yuanzong Li and, Chang W *et al.* Analysis of isoflavone daidzein in Puerariae radix with micelle-mediated extraction and preconcentration. *J Agric Food Chem* 2005; **53**: 518-523.
- 263 Luthria DL, Biswas R, Natarajan S. Comparison of extraction solvents and techniques used for the assay of isoflavones from soybean. *Food Chem* 2007; **105**: 325-333.
- 264 Susi H, Byler DM. [13] Resolution-Enhanced Fourier Transform Infrared Spectroscopy of Enzymes. *Methods Enzymol* 1986; **130**: 290-311.
- 265 Arrondo JLR, Muga A, Castresana J, Goni FM. Quantitative studies of the structure of proteins in solution by fourier-transform infrared spectroscopy. *Prog Biophys* 1993; **59**: 23.
- 266 Zana R, Lévy H, Kwetkat K. Mixed Micellization of Dimeric (Gemini) Surfactants and Conventional Surfactants. I. Mixtures of an Anionic Dimeric Surfactant and of the Nonionic Surfactants C12E5 and C12E8. *J Colloid Interface Sci* 1998; **197**: 370-376.
- 267 Watanabe H, Tanaka H. A non-ionic surfactant as a new solvent for liquid-liquid extraction of zinc(II) with 1-(2-pyridylazo)-2-naphthol. *Talanta* 1978; **25**: 585-589.
- 268 Israelachvili J, Degiorgio V, Corti M. Physics of amphiphiles: micelles, vesicles and microemulsions. *Int Sch Phys ÔEnrico ...* 1985.
- 269 Briganti G, Puvvada S, Blankschtein D. Effect of urea on micellar properties of aqueous solutions of nonionic surfactants. *J Phys Chem* 1991; **95**: 8989-8995.
- 270 Israelachvili JN, Mitchell DJ, Ninham BW. THEORY OF SELF-ASSEMBLY OF LIPID BILAYERS AND VESICLES. *Biochim Biophys Acta* 1977; **470**: 185-201.
- 271 Mitchell DJ, Ninham BW. Micelles, vesicles and microemulsions. *J Chem Soc Faraday Trans 2* 1981; **77**: 601.
- 272 Tanford C. *The Hydrophobic Effect: Formation of Micelles and Biological Membranes 2d Ed.* 1980 doi:10.1002/pol.1980.130181008.
- 273 Malvern Instruments Worldwide. Introduction to the calculators in the Zetasizer software. 2014.
- 274 Kakade. Determination of Trypsin Inhibitor Activity of Soy Products: A Collaborative Analysis of an Improved Procedure. *Cereal Chem.* 1974.
- 275 AOCS. Trypsin inhibitor activity. En: *Sampling and analysis of oilseed by-products*. American Oil Chemist's Society: Champaign, IL, EUA, 2009.
- 276 Wolf WJ. Soybean Proteins : Their Functional, Chemical, and Physical Properties. *J Agr Food Chem* 1970; **18**: 969-976.
- 277 Nielsen P m., Petersen D, Dambmann C. Improved Method for Determining Food Protein Degree of Hydrolysis. *J Food Sci* 2001; **66**: 642-646.
- 278 Adler-Nissen J. Control of the proteolytic reaction and of the level of bitterness in protein hydrolysis processes. *J Chem Technol Biotechnol Biotechnol* 1984; **34**: 215-222.
- 279 Schägger H, von Jagow G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* 1987; **166**: 368-

- 379.
- 280 Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD *et al.* Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 1985; **150**: 76-85.
- 281 Contreras M del M, Hernández-Ledesma B, Amigo L, Martín-Álvarez PJ, Recio I. Production of antioxidant hydrolyzates from a whey protein concentrate with thermolysin: Optimization by response surface methodology. *LWT - Food Sci Technol* 2011; **44**: 9-15.
- 282 Ou B, Hampsch-Woodill M, Prior RL. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J Agric Food Chem* 2001; **49**: 4619-4626.
- 283 Hernández-Ledesma B, Dávalos A, Bartolomé B, Amigo L. Preparation of antioxidant enzymatic hydrolysates from alpha-lactalbumin and beta-lactoglobulin. Identification of active peptides by HPLC-MS/MS. *J Agric Food Chem* 2005; **53**: 588-593.
- 284 Sentandreu MÁ, Toldrá F. A rapid, simple and sensitive fluorescence method for the assay of angiotensin-I converting enzyme. *Food Chem* 2006; **97**: 546-554.
- 285 Quirós A, Contreras M del M, Ramos M, Amigo L, Recio I. Stability to gastrointestinal enzymes and structure-activity relationship of β -casein-peptides with antihypertensive properties. *Peptides* 2009; **30**: 1848-1853.
- 286 López-Expósito I, Quirós A, Amigo L, Recio I. Casein hydrolysates as a source of antimicrobial, antioxidant and antihypertensive peptides. *Lait* 2007; **87**: 241-249.
- 287 Singleton VL, Rossi JA. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *Am J Enol Vitic* 1965; **16**: 144-158.
- 288 Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T *et al.* Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 2012; **9**: 676-682.
- 289 Myers RH, Montgomery DC. *Response Surface Methodology: Process and Product Optimization using Designed Experiments*. 2002 doi:10.1080/00401706.1996.10484509.
- 290 Derringer GC, Suich R. Simultaneous Optimization of Several Response Variables. *J Qual Technol* 1980; **12**: 214-219.
- 291 Sair L. Proteinaceous soy composition and method of preparing. 1959.
- 292 Aura AM. In vitro digestion models for dietary phenolic compounds. VTT Publ. 2005; : 1-107.
- 293 Laurent C, Besançon P, Caporiccio B. Flavonoids from a grape seed extract interact with digestive secretions and intestinal cells as assessed in an in vitro digestion/Caco-2 cell culture model. *Food Chem* 2007; **100**: 1704-1712.
- 294 Tukey JW. Comparing individual means in the analysis of variance. *Biometrics* 1949; **5**: 99-114.
- 295 Franco VG, Mantovani VE, Goicoechea HC, Olivieri AC. Teaching Chemometrics with a Bioprocess: Analytical Methods Comparison Using Bivariate Linear Regression. *Chem Educ* 2002; **7**: 265-269.
- 296 Zhang X, Jackson JK, Burt HM. Determination of surfactant critical micelle concentration by a novel fluorescence depolarization technique. *J Biochem Biophys Methods* 1996; **31**: 145-150.
- 297 Alargova RG, Kochijashky II, Sierra ML, Kwetkat K, Zana R. Mixed Micellization of Dimeric (Gemini) Surfactants and Conventional Surfactants. *J Colloid Interface Sci* 2001; **235**: 119-129.

- 298 Mitchell DJ, Tiddy GJT, Waring L, Bostock T, McDonald MP. Phase Behaviour of Polyoxyethylene Surfactants with Water. *J Chem Soc, Faraday Trans I* 1983; **79**: 975-1000.
- 299 Alibrahim M. Study of the Cloud Point of C 12 EO 6 and C 12 EO 8 Nonionic Surfactants : Effect of Additives. *Tenside Surfactants Deterg* 2012; **49**: 330-334.
- 300 Strey R. Water-Nonionic Surfactant Systems and the Effect of Additives. *Ber Bunsenges Phys Chem* 1996; **100**: 182-189.
- 301 Liu C, Kamei DT, King JA, Wang DL, Blankschtein D. Separation of proteins and viruses using two-phase aqueous micellar systems. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1998; **711**: 127-138.
- 302 Schott H, Royce AE. Effect of inorganic additives on solutions of nonionic surfactants VII. Suspension stability. *Colloids and Surfaces*. 1986; **19**: 399-418.
- 303 Tanford C, Huggins ML. Physical Chemistry of Macromolecules. *J Electrochem Soc* 1962; **109**: 98C.
- 304 Shi S, Uchida M, Cheung J, Antochshuk V, Shameem M. Method qualification and application of diffusion interaction parameter and virial coefficient. *Int J Biol Macromol* 2013; **62**: 487-493.
- 305 Robson R, Dennis E. The size, shape, and hydration of nonionic surfactant micelles. Triton X-100. *J Phys Chem* 1977; **81**: 1075-1078.
- 306 Li X, Mya KY, Ni X, He C, Leong KW, Li J. Dynamic and Static Light Scattering Studies on Self-Aggregation Behavior of Biodegradable Amphiphilic Poly (ethylene oxide) -Poly [(R) -3-hydroxybutyrate] -Poly (ethylene oxide) Triblock Copolymers in Aqueous Solution. *J Phys Chem B* 2006; **110**: 5920-5926.
- 307 Whaley WL, Rummel JD, Kastropeli N. Interactions of Genistein and related isoflavones with lipid micelles. *Langmuir* 2006; **22**: 7175-7184.
- 308 Gatel F. Protein quality of legume seeds for non-ruminant animals: a literature review. *Anim Feed Sci Technol* 1994; **45**: 317-348.
- 309 Westfall BJ, Hatjge SM. The nutritive quality and the trypsin inhibitor content of soybean flour heated at various temperatures. *Nutrition* 1947; **35**: 379-389.
- 310 LIU K, MARKAKIS P. Effect of maturity and processing on the trypsin inhibitor and oligosaccharides of soybeans. *J Food Sci* 1987; **52**: 222-223.
- 311 Stauffer CE. Measuring trypsin inhibitor in soy meal: suggested improvements in the standard method. *Cereal Chem* 1990; **67**: 296-302.
- 312 Meyers RA (Robert A. *Molecular biology and biotechnology : a comprehensive desk reference*. VCH, 1995.
- 313 Wouters AGB, Rombouts I, Fierens E, Brijs K, Delcour JA. Relevance of the Functional Properties of Enzymatic Plant Protein Hydrolysates in Food Systems. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 2016; **15**: 786-800.
- 314 Shahidi F. *Maximising the value of marine by-products*. Woodhead, 2007.
- 315 Sarmadi BH, Ismail A. Antioxidative peptides from food proteins: A review. *Peptides* 2010; **31**: 1949-1956.
- 316 Halldorsdottir SM, Kristinsson HG, Sveinsdottir H, Thorkelsson G, Hamaguchi PY. The effect of natural antioxidants on haemoglobin-mediated lipid oxidation during enzymatic

- hydrolysis of cod protein. *Food Chem* 2013; **141**: 914-919.
- 317 Venuste M, Zhang X, Shoemaker CF, Karangwa E, Abbas S, Kamdem PE. Influence of enzymatic hydrolysis and enzyme type on the nutritional and antioxidant properties of pumpkin meal hydrolysates. *Food Funct* 2013; **4**: 811.
- 318 Wu H, Ong ZY, Liu S, Li Y, Wiradharma N, Yang YY *et al.* Synthetic β -sheet forming peptide amphiphiles for treatment of fungal keratitis. *Biomaterials* 2015; **43**: 44-49.
- 319 García-Moreno PJ, Pérez-Gálvez R, Espejo-Carpio FJ, Ruiz-Quesada C, Pérez-Morilla AI, Martínez-Agustín O *et al.* Functional, bioactive and antigenicity properties of blue whiting protein hydrolysates: effect of enzymatic treatment and degree of hydrolysis. *J Sci Food Agric* 2017; **97**: 299-308.
- 320 Tavares T, Contreras MDM, Amorim M, Pintado M, Recio I, Malcata FX. Novel whey-derived peptides with inhibitory effect against angiotensin-converting enzyme: In vitro effect and stability to gastrointestinal enzymes. *Peptides* 2011; **32**: 1013-1019.
- 321 Salampessy J, Reddy N, Kailasapathy K, Phillips M. Functional and potential therapeutic ACE-inhibitory peptides derived from bromelain hydrolysis of trevally proteins. *J Funct Foods* 2015; **14**: 716-725.
- 322 Elavarasan K, Shamasundar BA, Badii F, Howell N. Angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity and structural properties of oven- and freeze-dried protein hydrolysate from fresh water fish (*Cirrhinus mrigala*). *Food Chem* 2016; **206**: 210-216.
- 323 Pihlanto A. Antioxidative peptides derived from milk proteins. *Int Dairy J* 2006; **16**: 1306-1314.
- 324 Hernández-Ledesma B, Amigo L, Ramos M, Recio I. Release of angiotensin converting enzyme-inhibitory peptides by simulated gastrointestinal digestion of infant formulas. *Int Dairy J* 2004; **14**: 889-898.
- 325 Gupta YP. Anti-nutritional and toxic factors in food legumes: a review. *Plant Foods Hum Nutr* 1987; **37**: 201-228.
- 326 Machado FPP, Queiróz JH, Oliveira MGA, Piovesan ND, Peluzio MCG, Costa NMB *et al.* Effects of heating on protein quality of soybean flour devoid of Kunitz inhibitor and lectin. *Food Chem* 2008; **107**: 649-655.
- 327 Olguin MC, Hisano N, D'Ottavio AE, Zingale MI, Revelant GC, Calderari SA. Nutritional and antinutritional aspects of an Argentinian soy flour assessed on weanling rats. *J Food Compos Anal* 2003; **16**: 441-449.
- 328 Qin GX, Verstegen MWA, Van Der Poel AFB. Effect of temperature and time during steam treatment on the protein quality of full-fat soybeans from different origins. *J Sci Food Agric* 1998; **77**: 393-398.
- 329 Kuehl RO. *Designs of experiments: statistical principles of research design and analysis*. 2°. Duxbury Press, 2000.
- 330 van de Velde F, Pirovani ME, C??mara MS, G??emes DR, Bernardi CM del H. Optimization and Validation of a UV-HPLC Method for Vitamin C Determination in Strawberries (*Fragaria ananassa* Duch.), Using Experimental Designs. *Food Anal Methods* 2012; **5**: 1097-1104.
- 331 EMA. Guideline on bioanalytical method validation. 2012 doi:EMA/CHMP/EWP/192217/2009.
- 332 Rizzello CG, Tagliazucchi D, Babini E, Sefora Rutella G, Taneyo Saa DL, Gianotti A. Bioactive

- peptides from vegetable food matrices: Research trends and novel biotechnologies for synthesis and recovery. *J. Funct. Foods*. 2016; **27**: 549-569.
- 333 Barać M, Stanojević SP, Jovanović ST, Pešić MB. Soy protein modification - A review. *Apteff* 2004; **35**: 3-16.
- 334 Chiang W-D, Tsou M-J, Tsai Z-Y, Tsai T-C. Angiotensin I-converting enzyme inhibitor derived from soy protein hydrolysate and produced by using membrane reactor. *Food Chem* 2006; **98**: 725-732.
- 335 Lee J. *Soy protein hydrolysate; solubility, thermal stability, bioactivity, and sensory acceptability in a tea beverage*. 2011.
- 336 Lamsal BP, Jung S, Johnson LA. Rheological properties of soy protein hydrolysates obtained from limited enzymatic hydrolysis. *LWT - Food Sci Technol* 2007; **40**: 1215-1223.
- 337 Hrkčková M, Rusňáková M, Zemanovič J. Enzymatic Hydrolysis of Defatted Soy Flour by Three Different Proteases and their Effect on the Functional Properties of Resulting Protein Hydrolysates. *Czech J Food Sci* 2002; **20**: 4-17.
- 338 Jung S, Murphy PA, Johnson LA. Physicochemical and Functional Properties of Soy Protein Substrates Modified by Low Levels of Protease Hydrolysis. *J Food Sci* 2005; **70**: C180-C187.
- 339 Neužil J, Gebicki JM, Stocker R. Radical-induced chain oxidation of proteins and its inhibition by chain-breaking antioxidants. *Biochem J* 1993; **293**: 601-606.
- 340 Ranamukhaarachchi S, Meissner L, Moresoli C. Production of antioxidant soy protein hydrolysates by sequential ultrafiltration and nanofiltration. *J Memb Sci* 2013; **429**: 81-87.
- 341 Amigo-Benavent M, Silván JM, Moreno FJ, Villamiel M, Del Castillo MD. Protein quality, antigenicity, and antioxidant activity of soy-based foodstuffs. *J Agric Food Chem* 2008; : 6498-6505.
- 342 Mondorf UF, Russ A, Wiesemann A, Herrero M. Contribution of Angiotensin I Converting Enzyme Gene Polymorphism and Angiotensinogen Gene Polymorphism to Blood Pressure Regulation in Essential Hypertension. *Am J Hypertens* 1998; **11**: 174-183.
- 343 Cha M, Park JR. Production and characterization of a soy protein-derived angiotensin I-converting enzyme inhibitory hydrolysate. *J Med Food* 2005; **8**: 305-310.
- 344 Hideaki K, Kunio D, Shigeru S, Hideyo U, Ryuji S, Umeji M *et al*. Antihypertensive effect of tryptic hydrolysate of milk casein in spontaneously hypertensive rats. *Comp Biochem Physiol Part C, Comp* 1990; **96**: 367-371.
- 345 Endres JG. *Soy protein products: characteristics, nutritional aspects, and utilization*. 2001 doi:61826-3489.
- 346 Rosenthal A, Pyle DL, Niranjana K. Simultaneous Aqueous Extraction of Oil and Protein from Soybean: Mechanisms for Process Design. *Food Bioprod Process* 1998; **76**: 224-230.
- 347 Murphy PA, Barua K, Hauck CC. Solvent extraction selection in the determination of isoflavones in soy foods. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci* 2002; **777**: 129-138.
- 348 Xu HN, He CH. Separation and purification of puerarin with solvent extraction. *Sep Purif Technol* 2007; **56**: 397-400.
- 349 Rostagno MA, Palma M, Barroso CG. Ultrasound-assisted extraction of soy isoflavones. *J Chromatogr A* 2003; **1012**: 119-128.

- 350 Bajkacz S, Adamek J. Evaluation of new natural deep eutectic solvents for the extraction of isoflavones from soy products. *Talanta* 2017; **168**: 329-335.
- 351 Sharma S, Kori S, Parmar A. Surfactant mediated extraction of total phenolic contents (TPC) and antioxidants from fruits juices. *Food Chem* 2015; **185**: 284-288.
- 352 Hosseinzadeh R, Khorsandi K, Hemmaty S. Study of the Effect of Surfactants on Extraction and Determination of Polyphenolic Compounds and Antioxidant Capacity of Fruits Extracts. *PLoS One* 2013; **8**: 1-7.
- 353 Božič M, Majerič M, Denac M, Kokol V. Mechanical and barrier properties of soy protein isolate films plasticized with a mixture of glycerol and dendritic polyglycerol. *J Appl Polym Sci* 2015; **132**. doi:10.1002/app.41837.
- 354 Grumezescu AM, Holban AM. *Ingredients Extraction by Physicochemical Methods in Food*. Elsevier Science, 2017.
- 355 Rickert DA, Meyer MA, Hu J, Murphy PA. Effect of Extraction pH and Temperature on Isoflavone and Saponin Partitioning and Profile During Soy Protein Isolate Production. *J Food Sci* 2004; **69**: C623-C631.
- 356 Cao Y, Xing H, Yang Q, Bao Z, Su B, Yang Y *et al*. Separation of soybean isoflavone aglycone homologues by ionic liquid-based extraction. *J Agric Food Chem* 2012; **60**: 3432-3440.
- 357 Yazdi AS. Surfactant-based extraction methods. *TrAC - Trends Anal Chem* 2011; **30**: 918-929.
- 358 Mahesha HG, Singh SA, Srinivasan N, Appu Rao AG. A spectroscopic study of the interaction of isoflavones with human serum albumin. *FEBS J* 2006; **273**: 451-467.
- 359 Baú TR, Ida EI. Soymilk processing with higher isoflavone aglycone content. *Food Chem* 2015; **183**: 161-168.
- 360 Alibhai Z, Mondor M, Moresoli C, Ippersiel D, Lamarche F. Production of soy protein concentrates/isolates: traditional and membrane technologies. *Desalination* 2006; **191**: 351-358.
- 361 Ryan JT, Ross RP, Bolton D, Fitzgerald GF, Stanton C. Bioactive peptides from muscle sources: Meat and fish. *Nutrients* 2011; **3**: 765-791.
- 362 Korhonen H, Pihlanto A. Bioactive peptides: Production and functionality. *Int Dairy J* 2006; **16**: 945-960.
- 363 Seber LE, Barnett BW, McConnell EJ, Hume SD, Cai J, Boles K *et al*. Scalable purification and characterization of the anticancer lunasin peptide from soybean. *PLoS One* 2012; **7**. doi:10.1371/journal.pone.0035409.
- 364 Serra A, Gallart-Palau X, See-Toh RS-E, Hemu X, Tam JP, Sze SK. Commercial processed soy-based food product contains glycated and glycoxidated lunasin proteoforms. *Sci Rep* 2016; **6**: 26106.
- 365 Singh BP, Yadav D, Vij S. Soybean Bioactive Molecules: Current Trend and Future Prospective. En: Mérillon J-M, Ramawat KG (eds). *Bioactive Molecules in Food*. Springer International Publishing, 2017, pp 1-29.
- 366 Dong A, Prestrelski SJ, Allison SD, Carpenter JF. Infrared spectroscopic studies of lyophilization- and temperature-induced protein aggregation. *J Pharm Sci* 1995; **84**: 415-424.
- 367 French DL, Arakawa T, Li T. Fourier Transformed Infrared Spectroscopic Investigation of Protein Conformation in Spray-Dried Protein/Trehalose Powders. *Biopolymers* 2004; **73**:

- 524-531.
- 368 Pivato M, De Franceschi G, Tosatto L, Frare E, Kumar D, Aioanei D *et al.* Covalent α -Synuclein Dimers: Chemico-Physical and Aggregation Properties. *PLoS One* 2012; **7**. doi:10.1371/journal.pone.0050027.
- 369 Zhao X, Chen F, Xue W, Lee L. FTIR spectra studies on the secondary structures of 7S and 11S globulins from soybean proteins using AOT reverse micellar extraction. *Food Hydrocoll* 2008; **22**: 568-575.
- 370 Jankowiak L, Kantzas N, Boom R, Van Der Goot AJ. Isoflavone extraction from okara using water as extractant. *Food Chem* 2014; **160**: 371-378.
- 371 Thakker C, San K-Y, Bennett GN. Soybean Carbohydrates as a Renewable Feedstock for the Fermentative Production of Succinic Acid and Ethanol - ACS Symposium Series (ACS Publications). *ACS Symp Ser* 2014; : 81-107.
- 372 Chang MC, Tanaka J. FT-IR study for hydroxyapatite/collagen nanocomposite cross-linked by glutaraldehyde. *Biomaterials* 2002; **23**: 4811-4818.
- 373 Nishinari K, Fang Y, Guo S, Phillips GO. Soy proteins: A review on composition, aggregation and emulsification. *Food Hydrocoll* 2014; **39**: 301-318.
- 374 Fabian H, Choo LPI, Szendrei GI, Jackson M, Halliday WC, Otvos L *et al.* Infrared spectroscopic characterization of Alzheimer plaques. *Appl Spectrosc* 1993; **47**: 1513-1518.
- 375 Fisher RR, Glatz CE, Murphy PA. Effects of mixing during acid addition on fractionally precipitated protein. *Biotechnol Bioeng* 1986; **28**: 1056-1063.
- 376 Roberts PR, Burney JD, Black KW, Zaloga GP. Effect of chain length on absorption of biologically active peptides from the gastrointestinal tract. *Digestion* 1999; **60**: 332-337.