



Valor nutritivo y biofuncional de las bebidas de soja y de almendra estabilizadas por ultra alta presión de homogeneización

Natalia Toro Funes

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA

**VALOR NUTRITIVO Y BIOFUNCIONAL DE LAS BEBIDAS
DE SOJA Y DE ALMENDRA ESTABILIZADAS POR ULTRA
ALTA PRESIÓN DE HOMOGENEIZACIÓN**

NATALIA TORO FUNES

2014

UNIVERSIDAD DE BARCELONA

FACULTAT DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA

PROGRAMA DE DOCTORADO "ALIMENTACIÓN Y NUTRICIÓN" 2010-2014

**VALOR NUTRITIVO Y BIOFUNCIONAL DE LAS BEBIDAS DE SOJA Y DE
ALMENDRA ESTABILIZADAS POR ULTRA ALTA PRESIÓN DE
HOMOGENEIZACIÓN**

Memoria presentada por Natalia Toro Funes para optar al título de doctor por la
Universidad de Barcelona

Dirección

M. Carmen Vidal Carou

M. Teresa Veciana Nogués

Doctoranda

Natalia Toro Funes

NATALIA TORO FUNES

2014

Este trabajo ha sido financiado por:

- Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (CICYT) (Ministerio de Economía y Competitividad, España) mediante la concesión del proyecto de investigación AGL 2008-05430-C02-02.

- Ajut de recerca de la Secció de ciències del Institut d'Estudis Catalans IEC mediante la concesión de los proyectos “Estudio del valor nutritivo de las leches de almendra” y “Estudio del potencial antioxidante de las poliaminas naturales espermina y espermidina”.

- El Programa Nacional de Profesorado Universitario (Ministerio de Educación y Ciencia, España) mediante la concesión de una Beca de Formación de Profesorado Universitario (F.P.U.), disfrutada desde octubre de 2014 hasta septiembre de 2014.

- El Programa Nacional de Profesorado Universitario (Ministerio de Educación y Ciencia, España), mediante la concesión de una Ayuda para Estancias Breves en el Extranjero para becarios F.P.U., realizada entre 17 de febrero de 2012 y 17 de junio de 2012, en el “Molecular Nutrition Group, School of Chemistry, Food and Pharmacy, University of Reading” Reading, Inglaterra.

RESUMEN	9
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	15
1. COMPOSICIÓN NUTRICIONAL DE SOJA Y ALMENDRA	15
2. COMPUESTOS BIOACTIVOS DE LA SOJA Y ALMENDRA	32
2.1. <i>Las isoflavonas</i>	<i>32</i>
2.2. <i>Los esteroides vegetales.....</i>	<i>47</i>
2.3 <i>Aminas biológicamente activas</i>	<i>53</i>
3. PRODUCTOS DERIVADOS DE LA SOJA	65
4. LA ULTRA ALTA PRESIÓN DE HOMOGENEIZACIÓN	81
5. PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS DEL ESTUDIO.....	87
MATERIAL Y METODOS	93
6. METODOLOGÍA ANALÍTICA	95
5.1. <i>Composición centesimal básica</i>	<i>95</i>
5.2. <i>Determinación de los componentes nutritivos.....</i>	<i>97</i>
5.3. <i>Determinación de los compuestos bioactivos.....</i>	<i>99</i>
5.4. <i>Determinación de los parámetros de calidad proteica</i>	<i>102</i>
5.5. <i>Determinación de los parámetros de oxidación</i>	<i>104</i>
5.6. <i>Cultivos celulares.....</i>	<i>105</i>
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	107
7. VALOR NUTRITIVO Y BIOFUNCIONAL DE LAS BEIDAS DE SOJA Y DE ALMENDRA	109
7.1. <i>Desarrollo y validación de un método de cromatografía líquida rápida de alta resolución (UHPLC) para la determinación de isoflavonas libres y conjugadas presentes en la soja ..</i>	<i>111</i>

7.2. Valor nutritivo y biofuncional de la bebida de soja comercializada en el mercado español en comparación con la bebida de almendra.....	127
8. EFECTO DE LA ULTRA ALTA PRESIÓN DE HOMOGENEIZACIÓN SOBRE LOS COMPUESTOS BIOACTIVOS DE LAS BEBIDAS DE SOJA Y ALMENDRA	145
8.1. Efecto de la Ultra Alta Presión de Homogeneización sobre los compuestos bioactivos de las bebidas de soja y de almendra	147
8.2. Estabilidad de los compuestos nutritivos y bioactivos de la bebida de soja tratada por UHPH durante el almacenamiento en refrigeración y a temperatura ambiente	175
9. ESTIMACIÓN DE LA EXPOSICIÓN Y DEL RIESGO DE ALGUNOS COMPUESTOS BIOACTIVOS DE LA SOJA	253
9.1. Aminas biológicamente activas en productos derivados de la soja. Aproximación a la evaluación del riesgo de las aminas biógenas	255
9.2. Isoflavonas en productos derivados de la soja. Aproximación a la evaluación de la exposición en adultos y del riesgo en lactantes	291
10. ALGUNOS EFECTOS BIOLÓGICOS DE LAS POLIAMINAS E ISOFLAVONAS	309
10.1. Evaluación de la capacidad antioxidante de las poliaminas por métodos “in vitro” .	311
10.2. Metabolismo intracelular de las isoflavonas en células endoteliales humanas.....	335
CONCLUSIONES	393
11. CONCLUSIONES	393
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	403
12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	405
ÍNDICE DE PUBLICACIONES	439

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1. Composición nutricional de las semillas de soja y de almendra	19
Tabla 1.2. Composición en aminoácidos (mg/g proteína) de semillas de soja y de almendra	20
Tabla 1.3. Composición de ácidos grasos de la soja y de la almendra	23
tabla 7.2.1. Características de las bebidas de soja y almendra comerciales	129
Tabla 7.2.2. Composición nutricional básica de las bebidas de soja y almendra comerciales	130
Tabla 7.2.3. Composición nutricional media de las bebidas de soja, las bebidas líquidas de almendra y la leche de vaca entera	133
Tabla 7.2.4. Contenido de fitoesteroles (mg/L) en las bebidas comerciales de soja y de almendra..	138
Tabla 7.2.5. Contenido de tocoferoles (mg/L) en las bebidas de soja y de almendra comerciales....	139
Tabla 7.2.6. Aminas biógenas y poliaminas (mg/L) en bebidas comerciales de soja y de almendra .	141
Tabla 7.2.7. Contenido de isoflavonas (mg/L) en las bebidas comerciales de soja	142
Tabla 8.1.1. Composición nutricional básica del producto base, pasteurizada (PA), UHT y las muestras de bebida de soja y de almendra tratadas por UHPH.....	150
Tabla 9.1.1. Contenido medio y máximo de histamina (mg) por ración de producto fermentado de soja y consumo necesario para alcanzar el límite seleccionado por la EFSA	258
Tabla 9.1.2. Contenido de TY (mg) por ración de cada producto fermentado de soja y consumo necesario para alcanzar los valores establecidos por la EFSA	259
Tabla 9.2.1. Contenido de isoflavonas (mg/kg) en los productos derivados de la soja.....	293
Tabla 9.2.2. Contenido de isoflavonas (mg) por ración de los productos derivados de la soja	294
Tabla 9.2.3. Exposición diaria de isoflavonas en intolerantes a la lactosa, vegetarianos de consumo de soja moderado y de consumo de soja elevado.....	296
Tabla 9.2.4. Contenido de isoflavonas (mg/kg) en las fórmulas infantiles a base de soja	297
Tabla 9.2.5. Ingesta estimada diaria (mg/ kg de peso corporal/día) de isoflavonas totales (1), de genisteína (2) y de genisteína total (3) en lactantes alimentados con fórmulas infantiles a base de soja.....	299
Tabla 10.1.1. Actividad antioxidante expresada como mmol/L de TROLOX en metanol y acetato de etilo	313
Tabla 10.2.1. Resumen del metabolismo las isoflavonas en las líneas celulares HUVEC, HepG2 y Caco2.....	342

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Estructura de la tiamina (vitamina B1) y de su forma activa, el pirofosfato de tiamina	26
Figura 1.2. Estructura de la riboflavina (vitamina B2) y de sus derivados, la riboflavina fosfato y el flavín adenín fosfato (FAD)	27
Figura 1.3. Estructura del ácido nicotínico (niacina) y de la nicotinamida	29
Figura 1.4. Estructura de los tocoferoles	30
Figura 2.1. Estructura química de las agliconas (a) y de sus derivados conjugados (b)	33
Figura 2.2. Principales acciones de las isoflavonas sobre el sistema cardiovascular	41
Figura 2.3. Estructura química del colesterol, los fitoesteroles y fitoestanoles	48
Figura 2.4. Posibles efectos de los esteroides vegetales en el metabolismo lipídico y lipoproteico (De Jong, et al., 2003).....	49
Figura 2.5. Estructuras químicas y vías de formación de las aminas biógenas y poliaminas	54
Figura 2.6. Metabolización de la tiramina	55
Figura 2.7. Metabolización de la histamina por parte de las enzimas diamino-oxidasa (DAO), monoamino-oxidasa (MAO), aldehído-deshidrogenasa (ALDH) e histamina-metiltransferasa (HNMT)	56
Figura 2.8. Síntesis y metabolismo de las poliaminas	61
Figura 2.9. Resumen de los mecanismos de acción de la espermidina. Fuente: Minois (2014)	64
Figura 3.1. Métodos de procesamiento de bebida de soja.....	71
Figura 3.2. Diagrama de flujo de la fabricación de salsa de soja	73
Figura 3.3. Diagrama de flujo de elaboración de sufu	76
Figura 3.4. Diagrama de flujo de la fabricación de miso	77
Figura 3.5. Diagramas de flujo de la fabricación de tempeh por el método tradicional (a) y el industrial (b) por el método de Martinelli y Hesseltine (1964)	79
Figura 4.1. Diseño de (A) una válvula convencional de homogenización (APV-Gaulin) y (B) una válvula de un homogeneizador de alta presión (Stansted). Fuente: Flourey et al. (2004b)	82
Figura 4.2. Vista esquemática de un equipo UHPH. Fuente: Poliseli-Scopel (2012).....	84
Figura 7.1.1. Cromatograma de las isoflavonas de bebida de soja por UHPLC-UV. 1: Daidzina, 2: Glicitina, 3: Genistina, 4: Malonil-daidzina, 5: Malonil-glicitina, 6: Acetil-daidzina, 7:	

Malonil-genistina, 8: Acetil-glicitina, 9: Daidzeína, 10: Gliciteína, 11: Acetil-genistina y 12: Genisteína.....	113
Figura 7.1.2. Espectro de masa exacta de acetil-daidzina (ADI), acetil-genistina (AGI), acetil-glycitina (AGLY), malonil-daidzina (MDI), malonil-genistina (MGI) y malonil-glycitina (MGLY)	114
Figura 7.2.1. Composición básica nutricional de las bebidas de almendra comerciales. Contenido medio de las bebidas líquidas de almendra (AM A, AM B y AM C) y contenido en las muestras ya reconstituidas	132
Figura 7.2.2. Composición nutricional básica de todas las bebidas de soja y de las bebidas líquidas de almendra	134
Figura 7.2.3. Perfil de aminoácidos de las bebidas de soja y de almendra comerciales	136
Figura 7.2.4. Porcentaje de lisina bloqueada en las bebidas de soja y de almendra comerciales	136
Figura 7.2.5. Perfil de ácidos grasos en bebidas comerciales de soja y de almendra	136
Figura 8.1.1. Porcentaje de digestibilidad de las proteínas en bebidas de soja y de almendra	152
Figura 8.1.2. Contenido total de fitosteroles (mg/L) en las bebidas de soja y de almendra ...	156
Figura 8.1.3. Contenido total de tocoferoles (mg/L) en las bebidas de soja y de almendra ...	158
Figura 8.1.4. Contenido total de isoflavonas (mg/L) en las bebidas de soja	160
Figura 8.2.1. Contenido total de isoflavonas (mg/L) en las bebidas de soja pasteurizadas durante el almacenamiento en refrigeración	178
Figura 8.2.2. Contenido total de isoflavonas (mg/L) en las bebidas de soja esterilizadas durante el almacenamiento a temperatura ambiente	180
Figura 8.2.3. Contenido total de fitoesteroles (mg/L) en las bebidas de soja pasteurizadas durante el almacenamiento en refrigeración	182
Figura 8.2.4. Contenido total de tocoferoles (mg/L) en las bebidas de soja pasteurizadas durante el almacenamiento en refrigeración	183
Figura 8.2.5. Contenido total de tocoferoles (mg/L) en las bebidas de soja esterilizadas durante el almacenamiento a temperatura ambiente	184
Figura 8.2.6. Evolución del porcentaje de digestibilidad en las bebidas de soja pasteurizadas durante el almacenamiento en refrigeración	185

Figura 8.2.7. Evolución del porcentaje de digestibilidad en las bebidas de soja esterilizadas durante el almacenamiento a temperatura ambiente	186
Figura 8.2.8. Evolución del porcentaje de lisina bloqueada durante el almacenamiento en refrigeración en las muestras de soja pasteurizadas	187
Figura 8.2.9. Evolución del porcentaje de lisina bloqueada durante el almacenamiento a temperatura ambiente en las muestras de soja esterilizadas	188
Figura 9.1.1. Contenido de aminas biógenas (mg/kg) en productos fermentados de soja. El contenido de aminas biógenas en el sufu se muestra es una escala secundaria ..	257
Figura 9.2.1. Contenido de isoflavonas (mg/Kg) en los productos derivados de la soja	291
Figura 10.1.1: Esquema simplificado de las principales etapas del proceso de la oxidación lipídica (Teruelo et al., 2008)	310
Figura 10.1.2. Evolución del índice de peróxidos (IP) a tres concentraciones de poliaminas a 50, 100 y 150 mg/ml en las muestras de aceite a 50 °C (a), y las variaciones del factor de protección (FP) de aceite estabilizado con poliaminas a 0-1250 mg/ml (b)	314
Figura 10.1.3. Evolución del Índice de peróxidos (IP) (a), coeficientes específicos de extinción a 232 (b), 270 (c) y 280 nm (d) en las muestras estabilizadas con los diferentes antioxidantes a 50°C	316
Figura 10.1.4. Evolución del FP frente a la concentración de hierro Imendra.....	317
Figura 10.2.1. Perfil de estabilidad de las isoflavonas en medio celular a 37 °C	336
Figura 10.2.2. Resumen del metabolismo celular de la epicatequina en HUVEC	337
Figura 10.2.3. Resumen del metabolismo de la epicatequina en las células HepG2	337
Figura 10.2.4. Resumen del metabolismo de la epicatequina en las células Caco-2.....	338
Figura 10.2.5. Metabolismo de las isoflavanos, genisteína y daidzeína en HUVEC	339
Figura 10.2.6. Metabolismo de las isoflavonas genisteína y daidzeína en células HepG2	340
Figura 10.2.7. Resumen del metabolismo de las isoflavonas genisteína (a) y daidzeína (b) en células Caco-2 en monocapa	341

RESUMEN

RESUMEN

El consumo de las bebidas de soja y de almendra está aumentando en Europa porque son útiles como alternativa a la leche de vaca para los individuos intolerantes a la lactosa, con alergia a las proteínas de la leche, o para aquellos que evitan la leche por otras razones. También su popularidad aumenta por los efectos beneficiosos para la salud que se le atribuyen.

Las bebidas de soja y de almendra comerciales están normalmente procesadas por tratamientos térmicos, especialmente UHT, no sólo para estabilizarlas sino también para mejorar su palatabilidad y digestibilidad ya que, entre otros efectos, destruyen componentes indeseables, tales como los inhibidores de tripsina. No obstante, los tratamientos térmicos pueden afectar a sus componentes nutritivos y compuestos bioactivos. La ultra alta presión de homogeneización (UHPH) es una tecnología no térmica emergente que consiste en la aplicación de presiones de hasta 400 MPa utilizando un sistema de homogeneización, especialmente diseñado para producir un efecto conservador, al mismo tiempo que mejora la estabilidad coloidal. En el marco de un proyecto del Plan Nacional (AGL 2008-05430-C02-02) realizado en coordinación con el grupo del Centre Especial Planta de Tecnologia dels Aliments (CERPTA) de la Universidad Autònoma de Barcelona, se pretende aplicar la UHPH para la obtención de bebidas de soja y almendra y comparar los efectos de esta tecnología con los de los convencionalmente aplicados a este tipo de productos (pasteurización y UHT). En el primer apartado de esta memoria se valora el efecto que esta tecnología provoca sobre una serie de parámetros nutritivos y biofuncionales (perfil de aminoácidos, perfil de ácidos grasos, digestibilidad de las proteínas, disponibilidad de la lisina, tocoferoles, fitoesteroles, aminos biógenas, poliaminas e isoflavonas), extendiendo el estudio a no solo al efecto inmediato del tratamiento si no también durante la vida útil de los productos. En términos generales, se concluye que los tratamientos por UHPH mantienen o mejoran, en comparación con los térmicos, el valor nutritivo y biofuncional de las bebidas de soja y de almendra.

La soja aporta compuestos bioactivos, como las isoflavonas, cuyo consumo puede presentar efectos beneficiosos para la salud pero hay controversia sobre la seguridad de su consumo por

parte de lactantes, ya que se ha señalado que pueden ejercer efectos endocrinos indeseables sobre el desarrollo y el sistema reproductor. En la segunda parte de esta tesis, se realiza una aproximación a una estimación de la exposición y del riesgo de estos compuestos bioactivos en productos derivados de la soja de mayor consumo. Aún no existen datos de consumo de productos derivados de soja en Europa, pero la estimación muestra que una dieta que incluya habitualmente productos derivados de la soja aporta contenidos de isoflavonas suficientes para lograr sus potenciales efectos beneficiosos. Por otro lado, el consumo de fórmulas infantiles a base de soja por lactantes supone un cierto riesgo de sufrir los efectos adversos de las isoflavonas, ya que su consumo sobrepasa los niveles de seguridad establecidos por el Panel de Expertos (NTP-CERHR). Además, los productos derivados de la soja, especialmente los fermentados, contienen niveles elevados de algunas aminas biógenas. La ingesta de algunos de estos productos de soja puede suponer un riesgo de aparición de los efectos adversos de estas aminas, especialmente cuando hay un tratamiento con fármacos específicos.

En la tercera parte, se estudia algunos efectos biológicos de las poliaminas e isoflavonas. Las poliaminas son compuestos naturales con un papel reconocido como antioxidante endógeno en frente al estrés oxidativo celular. Se estudia su capacidad antioxidante *in vitro* y el mecanismo de acción y se concluye que su capacidad antioxidante es superior al de otros antioxidantes reconocidos (galato de octilo, palmitato de ascorbilo y α -tocoferol) y que su potencia antioxidante se debe a su capacidad para secuestrar metales y radicales libres. Por otro último, se estudia el metabolismo intracelular de las isoflavonas en células endoteliales por su importancia potencial en los mecanismos de acción cardioprotectores del sistema vascular. Se concluye que las isoflavonas entran en las células endoteliales y son metabolizadas mediante glucuronidación, sulfatación y metilación.

ABSTRACT

Soy milk and almond milk are particularly useful as an alternative of cow's milk for people who are lactose-intolerant, allergic to milk proteins, or for those who avoid milk for other reasons, and their consumption also has potential health benefits.

Ultra high pressure homogenization (UHPH) is a useful non-thermal technology to obtain safe and high-quality liquid foods. UHPH is based on the same principle as conventional homogenization, but it works at significantly higher pressures (up to 400 MPa). In the first part of this thesis, in the frame of the project "The application of Ultra high pressure homogenization (UHPH) to produce high quality vegetable milks (soy and almond)" (AGL 2008-05430- C02-02), the aim was to study the effects of the UHPH treatment on the nutritional and biofunctional compounds of soy milk and almond milk compared to conventional thermal pasteurization and UHT treatments. As a result, it was concluded that UHPH treatments maintained or improved the nutritional and biofunctional value of soy milk and almond milk, compared to conventional thermal pasteurization and UHT treatments.

Soybean provides bioactive compounds, such as isoflavones, whose consumption has potential beneficial health effects for adults and also could have significant effects on the endocrine and reproductive system development in infants. In the second part of this thesis, an estimation of exposure and risk of these bioactive compounds in soybean products was performed. In general, the consumption of these products provides similar or higher isoflavone contents to achieve the beneficial effects. On the other hand, the consumption of soybean-based infant formulas could involve a potential risk to infants. Additionally, the fermented soybean products contain high levels of certain biogenic amines. Adverse effects of some biogenic amines as a result of the consumption of the soybean products in general would be unlikely, except for individuals under specific drug therapies.

In the third part, some biological effects of polyamines and isoflavones were studied. The mechanism by which polyamines act as antioxidants was evaluated by *in vitro* methods, concluding that it seems to be related to its ability to chelate metals. Furthermore, the intracellular metabolism of isoflavones in endothelial cells was studied because it can be

important in the elucidation of the mechanism of action of isoflavones in the cardiovascular system.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Composición nutricional de soja y almendra

La soja cultivada, *Glycine max* (L) Merrill, también es conocida como judía de Manchuria o guisante de China. Todas las variedades cultivadas proceden de una especie que crece espontáneamente en China, Manchuria, Corea y Siberia meridional y que se conoce como *Glycine ussuriensis*. La soja pertenece a la familia de las leguminosas, aunque por su contenido elevado de lípidos se incluye también en las oleaginosas. La palabra *glycine* deriva del griego *glykys* (dulce) y se refiere, probablemente al dulzor de los tubérculos comestibles producidos por la enredadera leguminosa, *Glycine apios*, que ahora se conoce como *Apios americana*. La palabra *max* significa "grande" refiriéndose a los grandes nódulos de la planta de soja (Liu, 2004).

La almendra pertenece al género *Prunus* y al subgénero *amygdalus*, dentro de la familia de las rosáceas. La almendra cultivada se designa como *Prunus dulcis*; otros sinónimos incluyen *Prunus amygdalus* Batsch y *Prunus communis* L., así como una anterior designación *Amygdalus communis* L. (USDA, 2010). El sabor dulce o amargo de las almendras es una característica heredada (Dicenta y García, 1993). Esta tesis se centra en la almendra dulce, que es el tipo mayoritario cultivado a nivel mundial. La almendra dulce se ha cultivado durante miles de años en muchas regiones templadas y subtropicales del mundo, principalmente en cuatro regiones, California, Mediterráneo, Asia central y Australia (Yada, et al., 2011).

1.1. Composición aproximada de las semillas de soja y de almendra

La semilla de soja (del japonés shoyu) es una legumbre de alto valor nutritivo que contiene alrededor de un 10% de agua, (Liu, 2004; Jooyandeh, 2011), mientras que la almendra contiene un 5% de agua (Yada, et al., 2011), lo que asegura su estabilidad durante el almacenamiento. Ambas semillas son fuente de una amplia variedad de componentes orgánicos, entre los que destaca su elevado porcentaje de proteínas, que en promedio en la soja es del 40% aproximadamente (Isanga y Zhang, 2008; Jooyandeh, 2011) y alrededor del

20% en la almendra (Yada, et al., 2011). También destaca el contenido en lípidos, la soja contiene un 20%, que en su mayor parte son triglicéridos de ácidos grasos poliinsaturados, y la almendra contiene entre un 45 y 60% de lípidos, en su mayoría de ácidos grasos monoinsaturados. Además, ambas semillas contienen alrededor del 2-5% de fosfolípidos, y pequeñas cantidades de otros lípidos en forma de fitoesteroles (Jooyandeh, 2011). El resto de materia seca está compuesta principalmente por glúcidos (30% en la soja y 20% en la almendra) y un 4-5% de minerales, principalmente potasio y fósforo. En la soja y almendra se encuentran también vitaminas, sobre todo del grupo B (tiamina, niacina y ácido pantoténico), y tocoferoles (vitamina E). En la tabla 1.1 se muestra la composición nutricional de la soja y de la almendra.

La semilla de soja contiene también importantes cantidades de derivados fenólicos, principalmente isoflavonas, y de otros compuestos orgánicos antioxidantes, como las poliaminas (Soda, 2011). Por último, otros componentes minoritarios, aunque importantes, son las saponinas, también se les han atribuido el sabor amargo y astringente de la semilla de soja. Sin embargo, presentan interés por sus beneficios en la prevención de problemas cardiovasculares. El contenido de saponinas representa entre 0,62 a 6,16% de la semilla de soja (Shiraiwa et al., 1991; Yoshiki et al., 1998). En la variedad de almendra amarga, *Prunus dulcis* var. *Amara*, se encuentran cantidades significativas de amigdalina (3-9%), un diglucósido, que libera ácido cianhídrico y benzaldehído bajo hidrólisis enzimática (Wirthensohn et al., 2008).

1.2. Las proteínas de la soja y de la almendra

Los productos de soja han representado una gran fuente de proteína en la dieta de países orientales durante siglos (Molina y cols., 2001). Desde el punto de vista de su función biológica, las proteínas de soja y de almendra son mayoritariamente proteínas de almacenamiento en la planta. Desde el punto de vista de la solubilidad, la mayor parte de éstas son globulinas, solubles en disoluciones salinas diluidas (Wolf, 1970). Una manera más precisa de denominar las proteínas es mediante sus coeficientes de sedimentación aproximados, usando la ultracentrifugación (Thanh et al., 1975; Howard et al., 1983). Bajo condiciones tamponadas apropiadas, las proteínas de soja presentan cuatro fracciones después de la ultracentrifugación: 2, 7, 11 y 15S; S hace referencia a las unidades Svedburg, que se

relacionan con la velocidad de sedimentación por unidad de fuerza centrífuga. Las proteínas de soja más abundantes (70 %) son las globulinas, glicinina (11S) y conglicinina (7S). La glicinina es una proteína hexamérica con un peso molecular de alrededor de 350 kDa, que consta de cinco subunidades compuestas de un polipéptido ácido de 37 a 42 kDa y uno básico de 20 kDa unidos por un puente disulfuro (Staswick et al., 1984; Nielsen, 1985). La fracción 2S supone un 20% de la proteína e incluye los inhibidores de la tripsina y el citocromo C, mientras que la fracción 15S, está constituida únicamente por un 10% de la proteína extraíble y se cree que está formada por un polímero de glicinina.

Tabla 1.1. Composición nutricional de las semillas de soja y de almendra.

Contenido por 100 g	Soja	Almendra
Energía (Kcal)	416	575
Proteínas (g)	36	21,2
Carbohidratos (g)	30	21,7
Fibra (g)	9	12,2
Grasas totales (g)	20	49,4
Lípidos poliinsaturados (g)	11	12,1
Lípidos monoinsaturados (g)	23,6	30,9
Lecitina (g)	1-5	-
Colesterol (mg)	0	0
Sodio (mg)	5	1
Potasio (mg)	1700	705
Calcio (mg)	277	264
Magnesio (mg)	280	268
Hierro (mg)	16	3,7
Zinc (mg)	3	3,1
Fósforo (mg)	700	484
Yodo (µg)	6	-
Flúor (µg)	130	-
Cobre (µg)	406	996
Tiamina (vitamina B1) (mg)	0,9	0,2
Riboflavina (vitamina B2) (mg)	0,4	1
Niacina (mg)	3	3,4
Vitamina K (µg)	190	0
Vitamina A (UI)	94	1
Vitamina E (mg)	13,3	27,1
Isoflavonas (mg)	200-500	nd

Fuentes: Calvo Aldea, D. (2006). La soja: Valor dietético y nutricional. <http://www.diodora.com>

American Soybean Association, 2006. <http://www.soygrowers.com>. USDA (2010).

En la proteína de la almendra, un 90-95% de la proteína de la almendra está formada por dos fracciones 11S mayoritarias, amandina (75%) y albúmina (20%), mientras que la glutelina y prolamina representa fracciones mucho menores. La amandina es una proteína oligomérica que contiene monómeros prunina. Los monómeros prunina están formados por una cadena α ácida de 40 o 42 kDa y una cadena β básica de 20 kDa. Dos trímeros de amandina forman un homohexámero similar al hexámero de glicinina (Albillos, et al., 2008).

Tabla 1.2. Composición en aminoácidos (mg/g proteína) de semillas de soja y de almendra.

Aminoácido	mg/g proteína (peso seco)	
	Soja	Almendra
Ácido Aspártico	68,86 \pm 3,39	18,36 \pm 0,16
Treonina	41,94 \pm 1,79	5,20 \pm 0,20
Serina	54,05 \pm 1,66	7,34 \pm 0,36
Ácido glutámico	190,16 \pm 3,42	53,56 \pm 2,18
Prolina	52,91 \pm 2,38	10,18 \pm 0,76
Glicina	36,72 \pm 0,15	13,76 \pm 0,14
Alanina	40,23 \pm 1,11	9,70 \pm 0,20
Cisteína	25,00 \pm 0,67	0,60 \pm 0,01
Valina	54,27 \pm 0,32	8,82 \pm 0,24
Metionina	10,70 \pm 0,31	1,62 \pm 0,40
Isoleucina	51,58 \pm 0,50	7,58 \pm 0,24
Leucina	81,69 \pm 0,73	14,38 \pm 0,38
Tirosina	41,55 \pm 0,64	4,42 \pm 0,90
Fenilalanina	56,29 \pm 0,63	10,92 \pm 0,22
Histidina	34,38 \pm 5,65	5,94 \pm 0,28
Lisina	68,37 \pm 1,06	6,12 \pm 0,60
Arginina	77,16 \pm 2,35	20,18 \pm 0,58
Triptófano	12,73 \pm 0,41	1,40 \pm 0,02

Fuente: (Zarkadas et al., 1993). Venkatachalam y Sathe (2006).

La composición de aminoácidos de la proteína de soja y de almendra, que determina el valor nutricional de las mismas, se presenta en la tabla 1.2. El aminoácido más abundante en la soja es el ácido glutámico, que junto con el ácido aspártico, constituyen una cuarta parte del total de aminoácidos; la lisina, arginina e histidina representan una quinta parte. El ácido glutámico también es el aminoácido mayoritario en la almendra, seguido por la arginina y el ácido aspártico. El valor nutritivo de la proteína depende de en qué medida su contenido de aminoácidos esenciales se adapta a las necesidades de estos compuestos por el organismo

humano (proteínas completas). Se asume que la proteína del huevo entero de gallina tiene esta calidad. Las proteínas vegetales, por lo general, no contienen todos los aminoácidos esenciales en las cantidades requeridas (proteínas incompletas). En el caso de la semilla de soja, los aminoácidos limitantes son metionina y cisteína pero es rica en lisina (Zarkadas et al., 1993). En la almendra también son limitantes la metionina y la cisteína, además de la lisina, en contraste con la soja.

A pesar del elevado contenido en proteínas y la calidad de éstas, reflejada en la presencia de todos los aminoácidos esenciales, una de las desventajas del consumo de la soja y de sus productos derivados en comparación con los productos de origen animal, es la presencia de factores antinutricionales. De ellos, los más importantes son los inhibidores de proteasas, comúnmente llamados inhibidores de tripsina. Constituyen una pequeña parte de la proteína de soja (2,5%), aunque el 30-40% de la cisteína está asociada con ellos (Kwok & Niranjana, 1995). Existen dos tipos de inhibidores de la tripsina presentes en la soja, el inhibidor de Kunitz y el inhibidor de Bowman-Birk. Estos inhibidores de proteasas tienen una fuerte afinidad por las enzimas digestivas humanas; interfieren en la digestión y la absorción de las proteínas y pueden causar hipertrofia del páncreas e hiperplasia de las células exocrinas, responsables de la producción de tripsina, quimotripsina, y otras proteasas, así como amilasas y lipasas (Gallaher y Schneeman, 1986; Weder, 1986; Liener et al, 1988; Kwok y Niranjana, 1995). Por otro lado, algunos autores han señalado que los inhibidores de proteasas de la soja pueden contribuir a la prevención del cáncer debido a sus propiedades anticancerígenas y quimiopreventivas (Kennedy, 1998; Sessa y Wolf, 2001; Akoum et al, 2006).

Para evitar una mal digestión y malabsorción de las proteínas, los inhibidores de proteasas de la soja deben ser inactivados. Sin embargo, son bastante estables al calor debido a la presencia de puentes disulfuros en su estructura molecular. Para alcanzar el 90% de inactivación de los inhibidores de tripsina, se requieren tratamientos térmicos intensos, por ejemplo 30 min a 100 °C, o 22 min a 110 °C (Liu, 2004). Para eliminar completamente la actividad de los inhibidores de las proteasas, se requiere un sobrecalentamiento que puede destruir importantes aminoácidos tales como la cisteína, arginina y lisina. Por lo tanto, el tratamiento térmico es crítico para la elaboración de productos de soja con máximo valor nutricional (Kwok & Niranjana, 1995; Liu, 2004).

1.3. Los lípidos de la soja y de la almendra

Los lípidos constituyen entre el 18 y el 24% de la semilla de soja, de los que el 90% son triglicéridos, el 7% fosfolípidos y el 3% glicolípidos. Los ácidos grasos se distribuyen en un 15% de saturados y un 85% de insaturados (USDA, 2003). En la almendra, los lípidos constituyen entre un 45-60%, de los que el 90% son triglicéridos, el 8% fosfolípidos y el 2% esfingolípidos (Soler, et al., 1988).

La Tabla 1.3 muestra la composición de ácidos grasos en la soja y la almendra. El ácido graso más abundante en la soja es el ácido linoleico (18:2, ω -6), representando aproximadamente la mitad del contenido total, aunque también contiene niveles considerables de otros ácidos grasos, como el ácido oleico (18:1) y el ácido linolénico (18:3, ω -3) (Prawiradjaja, 2003; Liu, 2004; Sangwan et al., 1986). En la almendra, el ácido graso monoinsaturado, el ácido oleico (18:1), es el predominante con un rango de 60-80% del total de ácidos grasos, seguido del ácido linoleico (18:2, ω -6) (Yada, et al 2011).

Los ácidos grasos poliinsaturados linoleico y linolénico son esenciales; es decir, que nuestro organismo no los puede sintetizar, por lo que deben estar presentes en la dieta. El ácido linoleico es el sustrato para la síntesis de los distintos ácidos grasos de la denominada "serie ω -6", entre los que se encuentra el ácido araquidónico, a partir del cual se forman compuestos de enorme importancia funcional para nuestro organismo, como son las prostaglandinas (Herrera, 1991). A su vez, el ácido linolénico es el sustrato para la síntesis de los ácidos grasos de la "serie ω -3", en la que se forman los ácidos grasos ω -3, característicos de la grasa del pescado, como los ácidos eicosapentaenoico (EPA) y docosahexaenoico (DHA), precursores a su vez de otras prostaglandinas (Herrera, 1991). Numerosas acciones, entre las que destacan la inflamación y la coagulación, se regulan fisiológicamente, entre otros factores, por el equilibrio de prostaglandinas de las dos series (ω -3 y ω -6). Tanto el ácido oleico como los ácidos grasos de la serie ω -3 son bien conocidos por sus efectos antiaterogénicos (Lada & Rudel, 2002; De Caterina & Massaro, 2005), por lo que su abundante presencia en la soja y la almendra justifican que el consumo regular de estos alimentos pueden contribuir activamente a prevenir las enfermedades cardiovasculares.

Tabla 1.3. Composición de ácidos grasos de la soja y de la almendra.

Ácidos grasos	Porcentaje (%)	
	Soja	Almendra
Saturados		
Ác. Palmítico (C16:0)	9 - 17	5 - 8
Ác. Esterárico (C18:0)	2 - 7	1 - 2
Insaturados		
Ác. Oleico (C18:1)	15 - 29	62 - 80
Ác. Linoleico (C18:2)	33 - 59	20 - 24
Ác. Linolénico (C18:3)	4 - 15	0,1 - 0,3

Una parte importante de los ácidos grasos poliinsaturados presentes en la soja se encuentran formando parte de los fosfolípidos (alrededor del 2-5%), principalmente en forma de lecitina, que tiene un valor comercial significativo como agente emulsionante en la industria alimentaria. La lecitina es un fosfolípido que además de ácidos grasos contiene glicerol, fosfato y colina y se encuentra presente en todas las células de nuestro organismo, y en particular en las del tejido nervioso, corazón, riñones y glándulas endocrinas. Se han descrito diversos beneficios a la ingesta de lecitina (Wilson et al., 1998; Sachan, et al., 2005), entre los que se podrían citar: 1) en cerebro, la colina se transforma en acetilcolina, que es un neurotransmisor, por lo que se ha relacionado el consumo de la lecitina con un efecto protector y de refuerzo del sistema nervioso; 2) en hígado, la colina favorece la metabolización de las grasas, evitando su infiltración, por lo que una deficiencia de colina se ha asociado al desarrollo de hígado graso, e incluso de cirrosis hepática; 3) la lecitina facilita la movilización y oxidación de grasas endógenas, contribuyendo a evitar su acumulación; 4) la lecitina contribuye a corregir las deficiencias de colina que pueden causar degeneración hemorrágica en los riñones; 5) por su acción emulsionante, la lecitina favorece la absorción intestinal de las grasas.

1.4. Los hidratos de carbono y la fibra de la soja y la almendra

El contenido de hidratos de carbono (HC) se halla alrededor del 35% en peso seco en la semilla de soja (Jooyandeh, 2011) y del 20% en la almendra (Yada, et al., 2011). Los HC de la

soja se dividen en monosacáridos, tales como la glucosa y la arabinosa, y oligosacáridos también conocidos como α -galactósidos de sacarosa, incluyendo la verbascosa, la rafinosa y la estaquiosa. Estos α -galactósidos de la soja se incluyen en la categoría de la fibra soluble y su concentración varía del 1,4 al 4,1% para la estaquiosa y del 0,1 al 0,9% para la rafinosa (Liu, 2004). La fibra insoluble, constituida sobre todo por celulosa y hemicelulosa, supone el 9% de la semilla de soja en peso seco. La fracción de HC solubles de la almendra incluye principalmente sacarosa, la cual supone un 5-6%, y pequeñas cantidades de glucosa, fructosa e inositol. La almendra también contiene rafinosa y almidón (1-2%). La fracción de la fibra insoluble de la almendra incluye hemicelulosa, celulosa y lignina, y representa un 10-14% de la almendra en peso seco (Yada, et al., 2011).

La presencia de verbascosa, rafinosa y estaquiosa en la soja está ligada a molestias abdominales por flatulencia, ya que estos oligosacáridos pasan intactos al intestino siendo fermentados por microorganismos anaerobios (Guimarães et al., 2001). Estas molestias pueden ser un factor limitante en la aceptación de la soja y otras legumbres. No obstante, algunos estudios han demostrado su carácter de fibra prebiótica y que su incorporación en la dieta se ha relacionado con diversos beneficios para la salud. El principal beneficio reportado fue la estimulación del crecimiento de bifidobacterias en el tracto intestinal, las cuales pueden prevenir problemas de estreñimiento y contribuir al aporte de vitaminas (Gibson y Roberfroid, 1995; Martínez et al., 2005).

1.5. Minerales de la soja y de la almendra

En comparación con otras legumbres, la soja aporta una mayor cantidad de minerales expresados en cenizas totales, representan aproximadamente un 5%. Destaca el potasio (1,800 mg/100 g), fósforo (700 mg/100 g), magnesio (280 mg/100 g) y calcio (277 mg/100 g) (USDA, 2010). El ácido fítico es la principal fuente de fósforo en la soja, su contenido está en un intervalo del 1 al 1,5% en base seca (Liu, 2004). Minerales menores incluyen el hierro (15,7 mg/100 g), el zinc (5 mg/100 g) y el selenio (18 μ g/100 g). La almendra contiene alrededor de un 3,5% de cenizas totales, compuesta principalmente por potasio (700 mg/100 g), fósforo (480 mg/100 g), magnesio (270 mg/100 g) y calcio (270 mg/100 g) (USDA, 2010). Otros minerales incluyen el hierro (4,3 mg/100 g), el zinc (3,4 mg/100 g) y el cobre (1,2 mg/100 g). El

bajo contenido en sodio hace a estos alimentos especialmente interesantes para las personas hipertensas.

1.6. Vitaminas de la soja y la almendra

La soja y la almendra contienen vitaminas hidrosolubles del grupo B, que incluyen la tiamina, riboflavina, niacina, ácido pantoténico y ácido fólico, y las vitaminas liposolubles A, E, D y K (USDA, 2003). Sin embargo, solamente se encuentran en cantidades significativas la tiamina (vitamina B₁), la riboflavina (vitamina B₂), la niacina (vitamina B₃), y la vitamina E o tocoferoles.

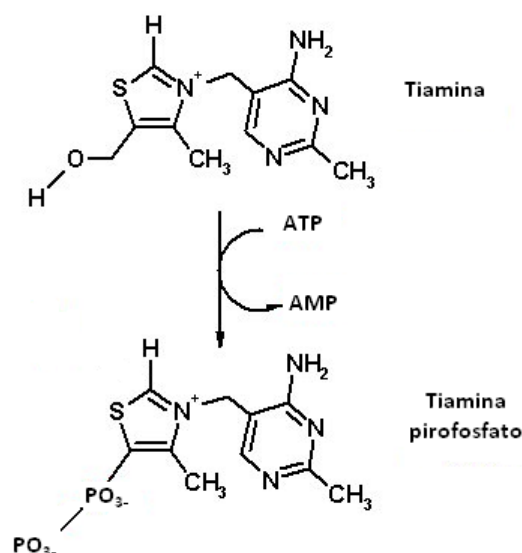
1.6.1. Tiamina (vitamina B₁): La enfermedad asociada a una baja ingesta de esta vitamina en los países en vías de desarrollo es el Beri-beri, pero en los países industrializados el déficit nutricional de esta vitamina se relaciona con el consumo crónico de grandes cantidades de alcohol. La tiamina se absorbe en el intestino con facilidad y es rápidamente fosforilada, de forma que en su mayor parte (del orden de un 80%) se encuentra en el nuestro organismo como pirofosfato de tiamina (TPP). La tiamina no se acumula en ningún tejido específico, por lo que tiene una vida media en nuestro organismo relativamente corta (de 9 a 18 días), teniendo que ser aportada regularmente. Su excreción y la de sus metabolitos se realiza por la orina.

La tiamina actúa a dos niveles: bioquímica y neurofisiológico. Las acciones bioquímicas siempre se realizan en forma de TPP, actuando como coenzima de reacciones claves del metabolismo, concretamente en los procesos de descarboxilación oxidativa de los α -cetoácidos. En lo referente a las funciones neurofisiológicas, por un lado, actúa en el metabolismo de cuatro neurotransmisores [acetilcolina, ácido γ -amino butírico (GABA), glutamato y aspartato], y por otro, en la conducción nerviosa. El papel de la tiamina en el metabolismo de los neurotransmisores, se considera que tiene lugar en la síntesis de los mismos a través del metabolismo oxidativo de la glucosa.

La ingesta recomendada diaria de tiamina es de 0,8-1,2 mg para la población adulta española (Moreiras et al., 2013). La tiamina se encuentra ampliamente distribuida en los alimentos, y en particular la semilla de soja aporta alrededor de 0,85 mg de tiamina por cada 100 g y la almendra alrededor de 0,2 mg/100 g.

La estructura de la tiamina se presenta en la Figura 1.1. Su estabilidad en disolución acuosa es relativamente baja. Depende del pH, la temperatura y la fuerza iónica. Los nucleófilos fuertes, como son el HSO_3^- y el OH^- producen la degradación rápida con formación de 5-(2-hidroxiethyl)-4-metiltiazol- y 2-metil-4-amino-5-hidroximetilpirimidina, respectivamente. La descomposición térmica de la tiamina produce en primer lugar la fragmentación en los citados derivados de tiazol y pirimidina. Los productos de degradación del derivado tiazólico, entre ellos derivados del furano, tiofeno, dihidrotiofeno y H_2S , participan en la formación del aroma a carne de los alimentos calentados.

Figura 1.1. Estructura de la tiamina (vitamina B_1) y de su forma activa, el pirofosfato de tiamina.



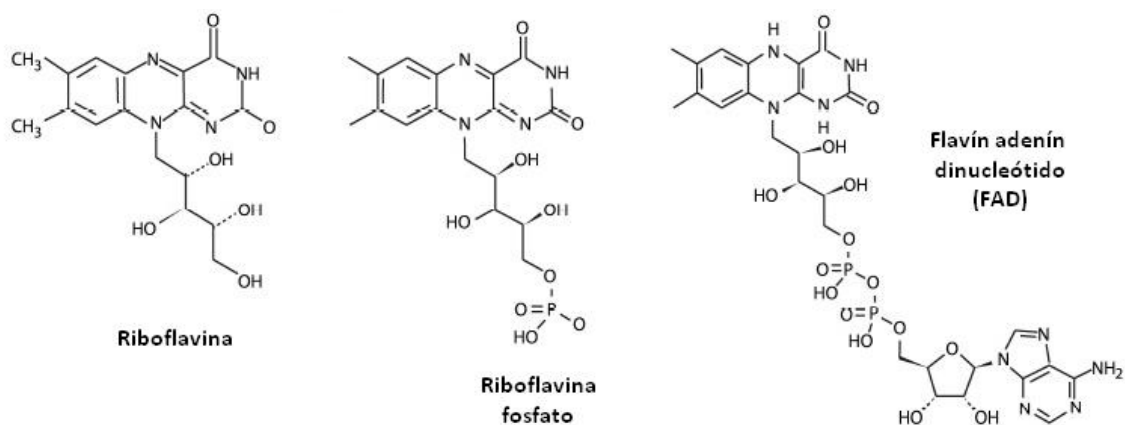
1.6.2. Riboflavina (vitamina B_2): La deficiencia de riboflavina (ariboflavinosis) suele estar acompañada de otras deficiencias nutricionales y frecuentemente se asocia a la deficiencia de vitamina B_6 y niacina. Enfermedades como el cáncer, alteraciones cardiacas y diabetes mellitus precipitan o exacerban la deficiencia en riboflavina, que se manifiestan, entre otros, por trastornos oculares, bucales y cutáneos. La riboflavina se absorbe en forma libre en la parte alta del tracto gastrointestinal, a través de un eficaz mecanismo de transporte activo y se elimina por vía urinaria en forma de riboflavina o de sus derivados.

La acción bioquímica de esta vitamina se debe a que forma parte de coenzimas tales como la flavín-mononucleótido (FMN), flavín-dinucleótido (FDA) y otras coenzimas de flavina. Estas coenzimas participan en numerosas reacciones del metabolismo, y en particular, en reacciones de óxido-reducción. El FAD participa en la cadena respiratoria, y tiene un papel fundamental en la célula para la formación de ATP. También participa en la formación de glutatión reducido, que es un agente esencial en los procesos de reducción intracelular y, de esta forma, contribuye activamente a la protección frente al estrés oxidativo.

La ingesta recomendada diaria de riboflavina es de 1,1-1,8 mg para la población adulta española (Moreiras et al., 2013). La semilla de soja aporta alrededor de 0,4 mg de riboflavina por cada 100 g y la almendra alrededor de 1 mg/100 g.

La estructura química de la riboflavina se muestra en la Figura 1.2. La riboflavina es bastante estable a las condiciones habituales de manipulación y almacenamiento de los alimentos, con pérdidas del orden del 10-15%. La iluminación, especialmente en la zona del 420-560 nm, da lugar, mediante reacción fotoquímica, a la formación de lumiflavina.

Figura 1.2. Estructura de la riboflavina (vitamina B₂) y de sus derivados, la riboflavina fosfato y el flavín adenín fosfato (FAD).



1.6.3. Niacina (vitamina B₃): La deficiencia clásica de niacina da lugar a la pelagra que, en los países industrializados, aparece sólo en personas con alcoholismo crónico o en situaciones que impiden el metabolismo del triptófano. No hay efectos adversos asociados con el consumo

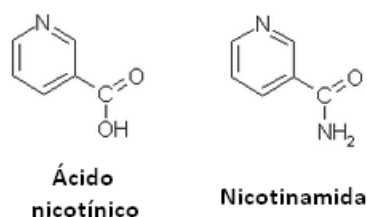
excesivo de niacina procedente de alimentos tal y como se presenta en la naturaleza, pero sí pueden aparecer por ingesta excesiva a partir de complementos o alimentos enriquecidos. Los efectos adversos potenciales de la ingesta excesiva de niacina incluyen rubor, náuseas, vómitos, hepatotoxicidad, visión borrosa y alteración en la tolerancia a la glucosa.

La niacina o ácido nicotínico y su amida, la nicotinamida, son derivados del alcaloide nicotina, y fue descubierta como factor capaz de prevenir el desarrollo de la pelagra. El término niacina incluye una serie de compuestos (vitámeros) con actividad biológica asociada a la nicotinamida, incluyendo al ácido nicotínico, la propia nicotinamida y una amplia variedad de nucleótidos de piridina. La nicotinamida se denomina también niacinamida, vitamina PP y vitamina B₃. Tanto la nicotinamida como el ácido nicotínico se absorben en el estómago y el intestino delgado a través de un sistema de co-transporte dependiente de sodio o por difusión pasiva. La mayor parte de la niacina se convierte a NAD en las células intestinales, donde posteriormente es transformada en nicotinamida, para ser liberada a la circulación. El hígado constituye un órgano central en el metabolismo de la niacina, donde, además de acumularse preferentemente en forma de NAD, se transforma en distintos metabolitos metilados y/o hidroxilados, que son eliminados por la orina.

Las formas biológicamente activas de la niacina son las coenzimas nicotinamida-adenina-dinucleótido (NAD⁺) y nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato (NADP⁺), que participan en reacciones de óxido-reducción. Aparte de sus efectos como sustrato en la síntesis de niacina, el ácido nicotínico inhibe la lipólisis en el tejido adiposo y, por ello se utiliza como agente hipolipemiante en situaciones de hiperlipidemia. De esta forma, puede ser considerado como un factor protector frente a la enfermedad cardiovascular en dichos pacientes hiperlipidémicos (Sahebkar, 2014).

La ingesta recomendada diaria de equivalentes de niacina es de 12-20 mg para la población adulta española (Moreiras et al., 2013). 1 equivalente de niacina = 1 mg de niacina = 60 mg de triptófano dietético. La semilla de soja aporta alrededor de 3 mg de niacina por cada 100 g y la almendra contiene alrededor de 3,5 mg/100 g. La niacina es estable a las condiciones ordinarias de manipulación de los alimentos. Su estructura se representa en la Figura 1.3.

Figura 1.3. Estructura del ácido nicotínico (niacina) y de la nicotinamida.



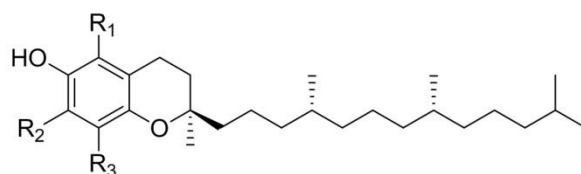
1.6.4. La vitamina E (tocoferoles): La vitamina E está constituida por una serie de sustancias denominadas tocoferoles, que se diferencian en el número y posición de los grupos metilo en el anillo bencénico y de los cuales el α -tocoferol es el más abundante en nuestro organismo y es el que presenta una mayor actividad biológica. Su estructura se representa en la Figura 1.4.

La aparición de deficiencias de vitamina E debidas a la dieta en España es rara, generalmente solo ocurre en personas con problemas, normalmente hereditarios, de absorción o metabolismo de esta vitamina. La ingesta recomendada diaria de vitamina E es de 10-12 mg para la población adulta española (Moreiras et al., 2013). La semilla de soja aporta alrededor de 15 mg/100 g, siendo el γ -tocoferol su forma mayoritaria (Warner & Gehring, 2009). La almendra contiene alrededor de 27 mg por cada 100 g. Las almendras son consideradas uno de los alimentos más ricos en α -tocoferol (Chen et al., 2006).

Durante el procesado y almacenamiento de los aceites y a lo largo de la preparación de los alimentos ocurren pérdidas considerables en el contenido de vitamina E, siendo los procesos térmicos en los que dan lugar a las mayores pérdidas de esta vitamina, al existir un mayor contacto con el calor y el oxígeno (Mataix y Ochoa, 2002).

La principal función de la vitamina E en el organismo es que, coordinada con otras moléculas y enzimas, participa en la defensa de las células frente a los efectos nocivos de los radicales libres, considerándose actualmente un antioxidante que aporta sustanciales beneficios al organismo. Sin embargo, ciertos estudios *in vitro* han encontrado un efecto prooxidante del tocoferol, efecto que sería menos importante *in vivo* gracias a su regeneración por el ubiquinol-10 o el ácido ascórbico (Niki et al., 2005).

Figura 1.4. Estructura de los tocoferoles.



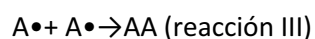
α -tocopherol: R₁ = CH₃, R₂ = CH₃; R₃ = CH₃

β -tocopherol: R₁ = CH₃, R₂ = H; R₃ = CH₃

γ -tocopherol: R₁ = H, R₂ = CH₃; R₃ = CH₃

δ -tocopherol: R₁ = H, R₂ = H; R₃ = CH₃

El mecanismo de acción antioxidante, tanto en el organismo como en los alimentos, consiste en la interrupción de las etapas de propagación del proceso de autooxidación y de la reacción con el oxígeno singulete en el proceso de fotooxidación. En la autooxidación, los tocoferoles interrumpen las reacciones en cadena mediante la donación de un hidrógeno al radical peroxilo originando un radical ariloxilo y un hidroperóxido (reacción I) (Burton e Ingold, 1986). Los radicales ariloxilo resultantes se estabilizan por deslocalización electrónica de la estructura fenólica, reaccionando fácilmente con otros radicales peroxilo para formar productos estables (reacción II), resultando poco probable que abstraigan átomos de hidrógeno de moléculas lipídicas intactas. Los múltiples productos de oxidación de los tocoferoles, que pueden formarse a partir de los radicales ariloxilo mediante una complicada gama de reacciones, incluyendo reacciones bimoleculares de radicales ariloxilo para formar dímeros (reacción III), constituyen un tema de estudio complejo de gran importancia debido a que no se conoce claramente su contribución al efecto antioxidante (Kamal-Eldin y Appelqvist, 1996; Frankel, 1996).



La actividad antioxidante de los tocoferoles presenta un creciente interés desde que se les atribuyó carácter protector frente a enfermedades degenerativas crónicas como las enfermedades coronarias o metabólicas (Packer y Obermüller-Jevic, 2002; Walsh, 2005; Karademir & Ozer, 2013). Aunque su utilidad en la prevención de trombos en las arterias es

aún discutible (Stanley, 2005), se ha reconocido su actividad antihipertensiva (Perona et al., 2004). También se ha relacionado con un efecto protector frente a la degeneración neuronal y la aparición de diferentes tumores (Smolarek y Suh, 2011; Karademir y Ozer, 2013). La vitamina E, específicamente el succinato de α -tocoferol, su forma más activa, puede inducir apoptosis directa o indirectamente en las células tumorales, dependiendo de la dosis, del periodo de exposición y del tipo de células (Flebes et al., 2002; Smolarek y Suh, 2011). Además, se ha observado que la vitamina E, puede ayudar a retrasar el inicio de la diabetes mellitus tipo 2, e incluso, mejorar el control de la glucemia (Packer y Obermüller-Jevic, 2002). Igualmente, se ha señalado que juega un importante papel como “regulador genético” a nivel del ARNm, lo que podría tener consecuencias en la regulación de transcripción de genes, estabilidad del ARNm, traducción de proteínas y estabilidad proteica (Gliszczynska-Swiglo y Sikorska, 2004).

Compuestos bioactivos de la soja y almendra

2.1. Las isoflavonas

Las isoflavonas pertenecen al grupo de los flavonoides y son un conjunto de más de 5.000 compuestos químicos pertenecientes a la familia de los polifenoles. Se trata de un amplio y heterogéneo grupo de moléculas que comparten la característica de poseer en su estructura varios grupos fenólicos. Los flavonoides son compuestos naturales pigmentados específicos de las plantas, en las que desempeñan un importante papel, ya que intervienen en el control del crecimiento y diferenciación de la planta. El organismo humano no puede sintetizarlos, pero se les han atribuido propiedades saludables y protectores frente a enfermedades cuando se ingieren regularmente.

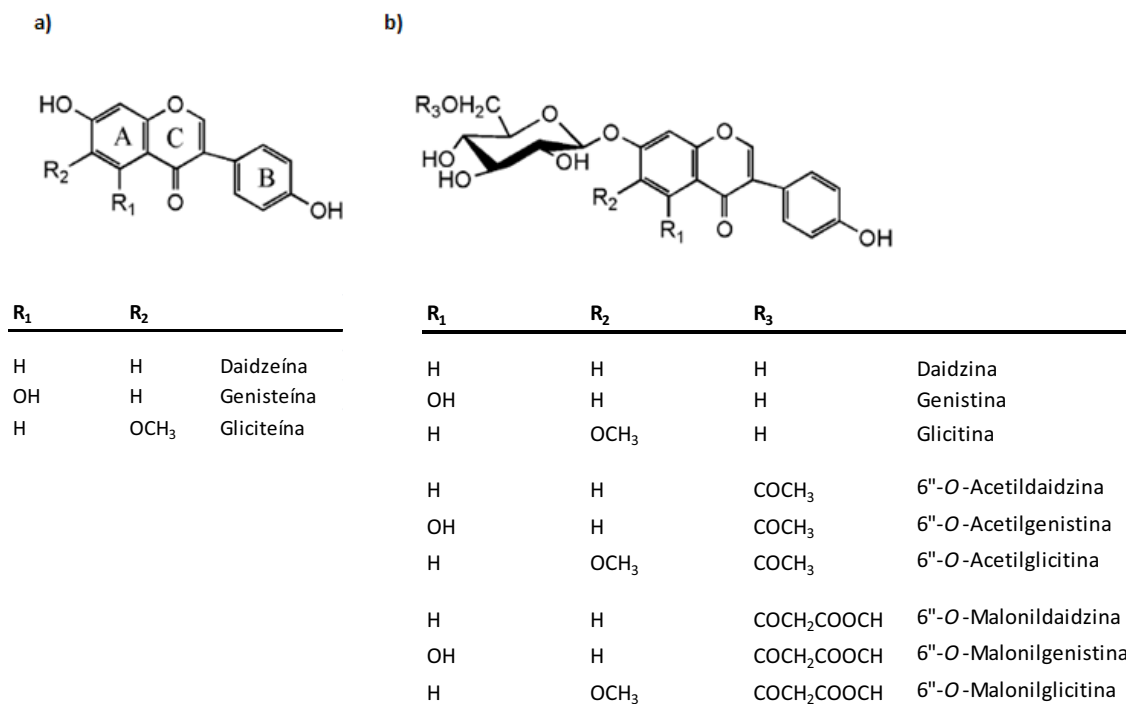
Las isoflavonas son los flavonoides más abundantes y de mayor interés de la soja, que es el único alimento que las contiene en cantidades relevantes (Mazur, 1998). Existen tres formas libres (agliconas) mayoritarias de isoflavonas: Genisteína (Ge), Daidzeína (De) y Gliciteína (Gle). Las isoflavonas normalmente se encuentran en los alimentos en forma de:

- a) agliconas (Ge, De y Gle),
- b) β -glucósidos (Genistina (Gi), Daidzina (Di), y Glicitina (Gly)),
- c) acetil- β -glucósidos (6''-O-acetil- β -genistina (AGI), 6''-O-acetildaidzina (ADI) y 6''-O-acetilglicitina (AGLY)), y
- d) malonil- β -glucósidos (6''-O-malonilgenistina (MGI), 6''-O-malonyldaidzina (MDI), y 6''-O-malonilglicitina (MGLY)) (Wang & Murphy, 1994) (Figura 2.1).

En la semilla de soja, las isoflavonas están presentes mayoritariamente en forma de malonil- β -glucósidos (un 70-80%), seguido de β -glucósidos (Charron et al., 2005). El contenido total de isoflavonas en las semillas de soja puede variar en función de la variedad de la semilla de soja, que a su vez puede depender del cultivo, el origen geográfico, el momento de la cosecha, las condiciones de crecimiento y factores genéticos, o el grado de maduración (Wang y Murphy, 1994; Tsukamoto, et al., 1995; Hutabarat et al., 2001; Lee et al., 2007). El procesado y almacenamiento de los productos derivados de la soja afecta tanto al contenido como a la

distribución de las formas químicas de las isoflavonas (Eisen et al. 2003; Huang et al., 2006; Villares et al., 2011).

Figura 2.1. Estructura química de las agliconas (a) y de sus derivados conjugados (b).



Las tablas de composición de alimentos generalmente no incluyen datos de contenido en isoflavonas aunque la base de datos del Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA) sí que incluye contenidos de Genisteína, Daidzeína y Gliciteína en diferentes alimentos derivados de la soja (U.S. Department of Agriculture, 2008). También incluye datos de isoflavonas, la base de datos VENUS, objeto del proyecto de la Unión Europea “Vegetal Estrogens in Nutrition and the Skeleton (VENUS)” (<http://www.phytohealth.org/venus/>), desarrollada para evaluar la ingesta de isoflavonas en la población europea (Italia, Reino Unido, Irlanda y Holanda) (Kiely et al., 2003).

Las isoflavonas pueden alcanzar contenidos de 500 mg/100 g en la semilla (Isanga & Zhang, 2008). En estado natural se encuentran asociadas a las proteínas. Las isoflavonas están presentes en prácticamente todos los productos que se obtienen a partir de la semilla de soja, con la excepción del aceite de soja, tales como bebida de soja, tofu, tempeh, harina, miso, o proteína vegetal texturizada, entre otros.

Otras legumbres, como lentejas, guisantes, judías blancas y garbanzos tienen una cantidad de isoflavonas mucho menor que la soja (0,1-0,7 mg/100g) (según tablas U.S. Department of Agriculture, 2008). Las crucíferas (col y coliflor) contienen muy poca cantidad de isoflavonas (5-10 µg/100 g peso seco). La cebada es el único cereal que contiene isoflavonas (10-15 µg/100 g de peso seco) (Mazur, 1998) y un estudio realizado con cervezas Checas y Eslovacas reporta una concentración de isoflavonas en estas cervezas de 0,17-6,74 nM (Lapčík et al., 1998).

2.1.1. Consumo de isoflavonas

La soja es la fuente más importante de isoflavonas de la dieta (Rozman et al., 2006) por lo que el consumo de productos derivados de la soja determina de manera muy importante el consumo humano de isoflavonas. En este sentido, la población asiática es la que ingiere más isoflavonas debido al elevado consumo de soja y sus productos derivados, siendo el consumo medio en los países Asiáticos de 20-50 mg/día (Adlercreutz, et al., 1991; Nagata, et al., 1997; Klein y King, 2007). En Estados Unidos el consumo de isoflavonas se encuentra en 0,15-3 mg/día, y en algunos países de Europa la ingesta de isoflavonas es inferior a 1 mg /día (Committee on Toxicity, 2003; Rozman et al., 2006; van Erp-Baart, et al., 2003; Valsta, et al., 2003; Mulligan et al., 2007; Klein y King, 2007). La dosis saludable de isoflavonas se ha establecido entre 30-50 mg/día (Lye, et al., 2009). Además del contenido de isoflavonas de la dieta, otra fuente importante en mujeres es la utilización de complementos alimenticios con extracto de isoflavonas para el tratamiento de la menopausia, los cuales aportan concentraciones de 40 a 80 mg de isoflavonas.

2.1.2. Absorción y metabolismo de las isoflavonas

Diversos estudios han demostrado que las isoflavonas se absorben preferentemente como agliconas, que son más fácilmente absorbidas que los glucósidos debido a su mayor liposolubilidad y menor peso molecular (Kano et al., 2006; Cassidy, 2006). La absorción de isoflavonas requiere una hidrólisis previa de las formas β-glucosidadas a sus formas agliconas y este hecho, dependiendo de que se encontraran mayoritariamente como glucósidos o como agliconas, sería un factor determinante de la velocidad de absorción de las isoflavonas de los alimentos (Manach et al., 2004). Hay estudios que no encuentran diferencias en la absorción

entre las formas β -glucosidadas y las agliconas (Richelle et al., 2002; Zubik et al., 2003) mientras que otros demuestran una mayor absorción y más rápida de las agliconas (Izumi et al., 2000; Kano et al., 2006; Cassidy, 2006). También parece que la matriz del alimento y la edad de los consumidores pueden condicionar la biodisponibilidad y farmacocinética de las isoflavonas (Cassidy et al., 2006).

Cuando se ingieren β -glucósidos de isoflavonas, estos son hidrolizados por β -glucosidasas de la mucosa intestinal y de bacterias de la microbiota intestinal, liberándose la aglicona (Setchell, 2002a; Barnes, 2010). La actividad β -glucosidasa del intestino parece aumentar con el consumo habitual de productos de soja (Wiseman et al., 2004). Las agliconas pueden ser directamente absorbidas o bien ser metabolizadas por las bacterias de la flora intestinal a diferentes metabolitos que son posteriormente absorbidos. En el caso de la genisteína, se ha descrito que es convertida en dihidrogenisteína y 6'-hidroxi-O-desmetilangiolensina, las cuales son más fácilmente absorbibles y tienen mayor biodisponibilidad. A su vez, la daidzeína es convertida en equol y O-desmetilangiolensina (Barnes, 2010). De estos metabolitos el que ha generado más interés es el equol, que parece tener una actividad más potente que la propia isoflavona (Setchell et al. 2002b) (Setchell et al., 2005). Mientras que todos los roedores alimentados con proteína de soja generan equol (Brown et al., 2001), solo el 20-30% de humanos son productores de equol después de ingerir isoflavonas (Hedlund et al., 2005). Se sugiere por ello que los humanos productores de equol presentan respuestas más favorables a los efectos de las isoflavonas (Hedlund et al., 2005) (Setchell et al., 2005) y se ha determinado que la capacidad de producir equol está favorecida por el consumo de altas cantidades de soja de forma continuada (Hedlund et al., 2005).

Una vez absorbidas, las agliconas son rápidamente conjugadas en el intestino con ácido glucurónico (por medio de la UDP-glucuronosil transferasa) y en menor proporción con sulfato (sulfotransferasas) (Barnes, 2010). La conjugación se puede producir también en el hígado ya que se ha demostrado que este órgano también posee actividad gluconosil transferasa y sulfotransferasa (Ronis et al., 2006; Barnes, 2010).

Las isoflavonas circulan por el plasma mayoritariamente en forma conjugada con ácido glucurónico (forma mayoritaria) y sulfato; las formas libres son minoritarias (Hosoda et al., 2010). Las isoflavonas conjugadas y sus metabolitos son excretados por la bilis y la orina. Los conjugados excretados vía biliar pueden ser eliminados en las heces o hidrolizados y/o

metabolizados por las bacterias intestinales posibilitando su reabsorción (circulación enterohepática) (Barnes, 2010). La actividad de las bacterias intestinales hidrolizando los conjugados de isoflavonas y la generación de metabolitos más activos que las formas parentales explican que el perfil de la microflora intestinal individual puede afectar de manera significativa la biodisponibilidad y actividad de la isoflavonas (Committee on Toxicity, 2003).

Las isoflavonas y sus metabolitos se encuentran ampliamente distribuidos en los fluidos corporales, pero no hay estudios definitivos de su distribución tisular en humanos. La concentración plasmática de genisteína en la población asiática es de 90-1200 nM y en Finlandia y Canadá es de 0,5-8 nM para omnívoros y 17-45nM para vegetarianos (Rozman et al., 2006b). La concentración máxima plasmática se alcanza entre 1 y 8 horas después de ingerir las isoflavonas. Hay evidencias del paso de isoflavonas y sus metabolitos al compartimento fetal, encontrándose en el plasma del cordón umbilical y en el fluido amniótico concentraciones similares a las del plasma materno (Rozman et al., 2006b) (Committee on Toxicity, 2003). Diferentes estudios indican que las isoflavonas llegan a la leche materna siendo por tanto una fuente de isoflavonas para los lactantes (Rozman et al., 2006a).

2.1.3. Mecanismo de acción

La capacidad de las isoflavonas para unirse a los receptores estrogénicos se conoce desde hace más de 40 años (Barnes, 2010), aunque esta capacidad puede verse mermada tanto por la metilación como por la glucosilación de los grupos hidroxilo. Estudios con células humanas han demostrado la selectividad de las isoflavonas por los receptores estrogénicos de tipo β , siendo esta afinidad de 7 a 30 veces mayor que la afinidad por el tipo α , a diferencia del 17 β -estradiol que presenta afinidades similares por los receptores estrogénicos tipo α y β (Fitzpatrick, 2003). El complejo resultante de la unión de las isoflavonas es funcionalmente equivalente al formado por el 17 β -estradiol ya que es capaz de inducir actividad transcripcional, aunque para que esto ocurra es necesario que la concentración de genisteína o daidzeína sea 10^4 veces mayor que la del 17 β -estradiol. No obstante, esta actividad no es exactamente igual a la inducida por el 17 β -estradiol, debido a que la estructura conformacional del complejo que forma la isoflavona con el receptor estrogénico es diferente a la del complejo que forma el estradiol, aunque esto se compensa por el hecho de que las isoflavonas tienen mayor afinidad por los receptores estrogénicos que el 17 β -estradiol

(Barnes, 2010). De hecho, aunque la potencia estrogénica de las isoflavonas de la soja sea inferior a la del estradiol, niveles elevados de ellas en sangre pueden generar una amplia variedad de efectos fisiológicos. También se encuentra documentada la posibilidad de que las isoflavonas tengan capacidad antiestrogénica. Parece que la actividad estrogénica agonista o antagonista de las isoflavonas depende de la cantidad de estrógenos endógenos, de manera que actuarían como agonistas a concentraciones bajas de estrógenos y de antagonistas a concentraciones elevadas (Hwang et al., 2006). Existen también estudios que han demostrado efectos de la genisteína y el coumestrol inhibiendo la conversión de estrona a 17 β -estradiol (Head, 1999).

Es importante destacar que las isoflavonas también modulan diferentes receptores nucleares, mecanismo por el cual pueden ejercer sus funciones fisiológicas (Xiao et al., 2008). Las isoflavonas, especialmente la genisteína, modulan la expresión de los receptores nucleares: receptor de estrógenos, receptor de progesterona, receptor de andrógenos, receptor de la vitamina D y receptor del ácido retinoico. La regulación de la expresión de estos receptores se ejercería mediante la acción de las isoflavonas sobre el receptor de estrógenos, o por mecanismos no ligados a receptores, como la inhibición de la tirosina quinasa.

2.1.4. Isoflavonas como antioxidantes

Los fitoestrógenos de la soja tienen la propiedad de actuar como agentes antioxidantes en los sistemas biológicos. La capacidad antioxidante de las isoflavonas, como la del resto de los flavonoides, se debe, sobre todo, a que su estructura química incluye un número variable de grupos fenólicos. Sus efectos antioxidantes se llevan a cabo, principalmente, por su capacidad de inhibir enzimas generadoras de radicales, por activar las enzimas antioxidantes (Valsecchi et al., 2011), por su capacidad para unirse a enzimas, transportadores de hormonas, ADN y protegerlos, y por quelar iones metálicos como el hierro, cobre y zinc (Shaterzadeh et al., 2011). Sobre todo, destacan por ser potentes antioxidantes directos (scavenger) debido a su capacidad de secuestrar, desactivar y depurar radicales libres (Hsieh et al., 2011). Los radicales libres se caracterizan por su gran inestabilidad energética, lo que les convierte en agentes altamente reactivos, con un gran poder oxidante y lesivo para las células (Omoni et al., 2005; Opara & Rockway, 2006). Mediante la actividad antioxidante, las isoflavonas protegen a las células del ataque oxidativo de los radicales libres, siendo la genisteína la que presenta mayor

actividad in vitro (genisteína > daidzeína = equol > genistina = biochanina A = daidzina > formononetina; esta última apenas tiene actividad antioxidante) (Ruiz-Larrea et al., 1997).

Gran parte de la eficacia antioxidante de las isoflavonas se debe a su carácter anfifílico, es decir, a ser liposolubles e hidrosolubles, disolviéndose en las membranas celulares, a las que protege del ataque oxidativo de los radicales libres. Así, se ha observado que las isoflavonas bloquean la oxidación del ácido linoleico y de los fosfolípidos de las membranas celulares y lipoproteínas LDL, reduciendo también la citotoxicidad de las LDL oxidadas (Pansini et al., 2005; Ahn-Jarvis et al., 2012; Schrader, et al., 2012). Además, al ser también solubles en medios acuosos, como el plasma sanguíneo y el citoplasma celular, impiden la oxidación de las proteínas plasmáticas y de otros compuestos disueltos. Por esta razón, a diferencia de otros antioxidantes que no son anfifílicos, las isoflavonas de la soja pueden traspasar la barrera hematoencefálica y proteger a las células cerebrales, muy sensibles a las lesiones por radicales libres (Rice-Evan, 2004).

2.1.5. Efectos de las isoflavonas sobre la salud

En los últimos años se han efectuado numerosos estudios sobre el potencial efecto beneficioso de las isoflavonas, particularmente desde un punto de vista preventivo. La mayor parte de los estudios realizados están asociados al consumo de fitoestrógenos aislados, y es importante destacar que en la soja pueden existir otros componentes activos en que contribuyan a los efectos observados. En especial, el consumo de soja está asociado a una mejora de los síntomas menopáusicos en mujeres y a una reducción en la incidencia de algunas enfermedades de amplia prevalencia como son la enfermedad cardiovascular, la osteoporosis, la obesidad y el cáncer.

a) Menopausia

La menopausia implica un incremento de la concentración en suero de la hormona estimulante de los folículos (FSH), fallo ovárico y unos niveles plasmáticos reducidos de estradiol, lo cual provoca una serie de síntomas y patologías asociadas, principalmente de tipo cardiovascular y óseo. Para prevenir o paliar estos síntomas se emplea la Terapia Hormonal Sustitutiva (THS), constituida por hormonas esteroideas, principalmente estrógenos y

progestágenos (Simon, et al., 2001; Borrelli & Ernst, 2010). Sin embargo, la THS está siendo cuestionada ya que se ha descrito alguna asociación potencial con un incremento del riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares o cáncer de mama (Simon, et al., 2001; Beral, 2003; Borrelli & Ernst, 2010). La mayor parte de los estudios llevados a cabo en mujeres han sido orientados a examinar la habilidad de los fitoestrógenos para mitigar los síntomas de la menopausia, ya que se consideran una alternativa natural a la THS.

Existen numerosos ensayos clínicos y estudios epidemiológicos que examinan los efectos beneficiosos de los fitoestrógenos en la menopausia. Estos estudios demuestran que los complementos alimenticios con soja o isoflavonas reducen significativamente el número de sofocos y mejoran síntomas como palpitaciones, cefaleas, insomnio, cansancio, melancolía, irritabilidad, vértigos, fatiga, artromialgias, etc. (Ruíz-Larrea et al., 1997; Nagata et al., 2001; Somekawa et al., 2001; Beral, 2003; Turner et al., 2004; Bryant et al., 2005 ; Cassidy y Hooper, 2006; Ryan-Borchers et al., 2006; Borrelli y Ernst, 2010; Crawford, et al., 2013 ; Lagari y Levis, 2013; Liu, et al., 2014; Bedell, et al., 2014). En España, se realizó un ensayo clínico con un grupo de mujeres posmenopáusicas (n=109) en el que se observó una disminución estadísticamente significativa de la incidencia de varios síntomas asociada a un consumo de isoflavonas (Albert et al., 2002). Sin embargo, otros investigadores no observaron efectos significativos sobre ninguno de los síntomas climatéricos (Kronenberg y Fugh-Berman; 2002; Krebs et al.; 2004; Nelson et al., 2006; Reed, et al., 2013; Gold, et al., 2013). El Libro de Consenso en Fitoterapia Ginecológica (2008) concluye que se ha demostrado la eficacia de las isoflavonas para tratar los sofocos, mientras que aún no se ha evidenciado su eficacia en otros síntomas del climaterio.

b) Osteoporosis

La observación de que las mujeres del sureste asiático manifiestan una menor incidencia de osteoporosis propició la hipótesis de que la soja o los fitoestrógenos de la soja podían ser una alternativa a la terapia hormonal en la prevención de esta patología de tanta incidencia en las mujeres posmenopáusicas. La mayoría de los estudios realizados, indican que las isoflavonas de soja son efectivas en el mantenimiento de la densidad mineral del hueso en mujeres posmenopáusicas (Tyagi et al., 2012; Park y Weaver, 2012; Pru, 2012; Lagari y Levis, 2013; Lagari y Levis, 2014; Bedell et al., 2014). A esta evidencia se ha llegado mediante:

- a) estudios realizados en cultivos tisulares y con células aisladas de hueso, comprobando que la genisteína y daidzeína aumentan la proliferación y diferenciación osteoblástica y la síntesis de colágeno, desapareciendo el efecto si se añaden al medio “antiestrógenos”.
- b) estudios con animales de laboratorio demuestran que las isoflavonas previenen la pérdida de masa ósea e incrementan el número de osteoblastos y la actividad osteogénica, responsables de la formación del hueso.
- c) estudios en seres humanos en los que se observan efectos variables, no siempre coincidentes, pero en general señalan un cierto efecto protector frente a la osteoporosis, ya que la soja o sus isoflavonas reducen los niveles sanguíneos de varios marcadores de resorción ósea e incrementan los de los marcadores de la formación de hueso (osteocalcina, FA ósea e IGF-1). Sin embargo, otros investigadores no han logrado observar tal efecto, y tampoco se dispone de resultados contrastados que demuestren que la soja o sus derivados pueden ayudar a reducir el riesgo de fracturas en la práctica clínica (Omoni y Aluko, 2005; Pansini et al., 2005; Chen et al. 2003; Galagher et al. 2004; Turner et al., 2013).

El mecanismo de acción aún no es del todo conocido, pero se ha sugerido que las isoflavonas modulan el sistema de la osteoprotegerina, cuya alteración puede causar la osteoporosis. La osteoprotegerina es secretada por los osteoblastos que son los encargados de construir el hueso. Si la actividad de los osteoclastos, encargados de la reabsorción, es mayor que la de los osteoblastos habrá una reducción gradual de la estructura ósea, conduciendo a la osteoporosis. La osteoprotegerina neutraliza el sistema de ligandos nucleares $\kappa\beta$ regulando la diferenciación de osteoclastos y su actividad. Las isoflavonas y concretamente las genisteínas, estimulan la actividad de la osteoprotegerina. Esta actividad moderada es suficiente para estimular una formación continua de los huesos (Crisafulli et al., 2004; Morris et al., 2006; Bitto et al., 2010; Dai, et al., 2013; Park et al., 2014).

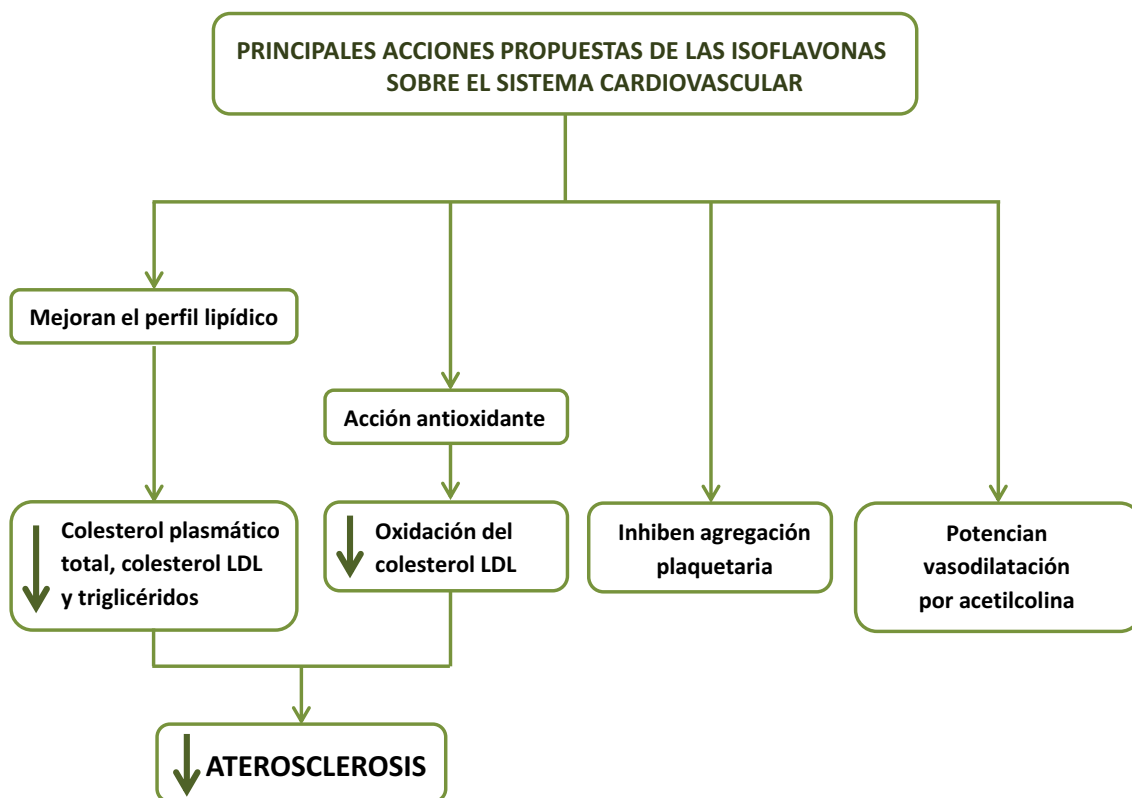
c) Enfermedad cardiovascular

Existen evidencias epidemiológicas de una menor incidencia de la enfermedad cardiovascular asociada al consumo de soja en países asiáticos, con una dieta menos rica en grasas saturadas y gran consumo de soja y derivados, en comparación con Europa y

Norteamérica. Sin embargo, hay que destacar que no ha sido posible concluir si los efectos anti hipercolesterolémicos descritos serían debidos a la soja o a sus fitoestrógenos.

Existen estudios que indican que las isoflavonas afectan positivamente al sistema vascular, tanto directamente, a través de su interacción con los receptores estrogénicos de la pared del sistema vascular, como indirectamente, modificando el perfil de lipoproteínas circulantes, o impidiendo mediante su acción antioxidante la oxidación del colesterol de las lipoproteínas LDL (Rubanyi et al., 2002; Navarro, 2005; Wong, et al., 2012; Pusparini et al., 2013). Numerosos estudios clínicos han revelado los efectos de las isoflavonas de la soja sobre el sistema cardiovascular (Dewell et al., 2006; Omoni et al., 2005; Cornell et al., 2004; Curtis, et al., 2012; Lee, et al., 2012; Wong, et al., 2012; Schrader, et al., 2012; Pusparini et al., 2013; Santhakumar et al., 2013; Lateef, et al., 2013), comprobando que disminuyen el riesgo de enfermedad cardiovascular (Figura 2.2):

Figura 2.2. Principales acciones de las isoflavonas sobre el sistema cardiovascular.



- **Efecto hipolipemiante y mejora del perfil lipídico**, las isoflavonas, junto con las proteínas de la soja, contribuyen a reducir el colesterol total, el colesterol LDL y los triglicéridos del plasma (Ahn-Jarvis et al., 2012; Zhang, et al., 2013; Curtis et al., 2012). Este efecto se ha observado en humanos, y se ha comprobado que no se produce sólo con dieta suplementada con proteína de soja sin isoflavonas (Dewell et al., 2006; Cassidy & Hooper, 2006; Curtis et al., 2012).
- **Efecto antiaterogénico indirecto**, debido a la acción antioxidante de las isoflavonas, que protege a las lipoproteínas LDL, cuya oxidación es una de las primeras fases en la formación de placas aterógenas en la pared vascular (Omoni et al., 2006, Cassidy & Hooper, 2006; Ahn-Jarvis et al., 2012; Schrader, et al., 2012).
- **Efecto antitrombótico**, inhibiendo la agregación plaquetaria mediante la inhibición de las tirosinquinazas, la inhibición competitiva de la unión del tromboxano A-2 a su receptor plaquetario o un mecanismo de bloqueo de los canales de calcio, lo que reduce el riesgo de tromboembolismo (Cornell et al., 2004; Montalbán, 2005; Santhakumar et al., 2013).
- **Acción vasodilatadora**, aumentando la respuesta a la acción vasodilatadora de la acetilcolina. Las isoflavonas reducen la producción de endotelina 1, un péptido vasoconstrictor, y la concentración de calcio libre intracelular, favoreciendo así la relajación del músculo liso de la pared vascular (Cassidy & Hooper, 2006; Henno et al., 2009; Yang et al., 2010).

No existe aún consenso sobre los efectos de las isoflavonas en las enfermedades cardiovasculares, pero cabe citar que el American Heart Association Nutrition Committee (Sacks et al., 2006) elaboró un informe sobre los efectos de las isoflavonas en factores de riesgo de las enfermedades cardiovasculares (colesterol-LDL, colesterol-HDL, triglicéridos, lipoproteína y presión arterial), a partir de la literatura científica publicada en los 10 años anteriores, y sus conclusiones son que las isoflavonas no reducen significativamente el colesterol-LDL y no modifican significativamente el colesterol-HDL, los triglicéridos y la presión arterial. Sin embargo, la American Heart Association, aunque recomienda no consumir complementos de isoflavonas, si aconseja consumir productos de soja por sus potenciales efectos beneficiosos para la salud cardiovascular, derivados de su alto contenido en grasa poliinsaturada, fibra, vitaminas y minerales y su bajo contenido en grasa saturada (Sacks et al., 2006).

d) Diabetes y obesidad

Dietas ricas en soja y derivados pueden tener también efectos beneficiosos sobre diversos aspectos de la diabetes y la obesidad (Kwon et al., 2010; Behloul & Wu, 2013; Sakamoto et al., 2013; Palacios-González et al., 2014). Estos efectos se han descrito tanto en humanos sanos como en obesos y en diabéticos; sin embargo, no está resuelto que componentes de la proteína de soja son los responsables. Podrían atribuirse a los fitoestrógenos, saponinas, inhibidores de tripsina, al tipo y cantidad de fibra, a la composición en aminoácidos de la proteína y a la composición en ácidos grasos del aceite de soja o a efectos sinérgicos entre los factores citados (Bhathean y Velasquez, 2002).

Las dietas ricas en proteína de soja podrían mejorar la diabetes y la obesidad reduciendo la resistencia a la insulina (Teixeira et al., 2004; Jayagopal et al., 2002; Sakamoto et al., 2013) y la adiposidad a través de inhibición de la secreción de insulina por las células β pancreáticas (Bhathean y Velasquez, 2002; Liu et al., 2006; Fu et al., 2010) o mediante una inhibición de la lipogénesis y un aumento de la lipólisis en hígado y tejido adiposo (Szkudelska et al., 2000; Kim et al., 2010; Behloul & Wu, 2013), pero hay información contradictoria y en mujeres premenopáusicas no se han podido constatar efectos sobre la diabetes y la obesidad (Duncan et al., 1999a y 1999b; Charles et al., 2009).

e) Cáncer

Numerosos estudios han intentado establecer la relación entre consumo de soja y diversos tipos de cáncer, ya que se ha observado que la incidencia es mucho menor en países asiáticos donde el consumo de soja y sus derivados es elevado. También se ha señalado que la baja incidencia podría estar relacionada con el estilo de vida, la dieta y la ingesta de grasas y fibras (Magee et al., 2004).

Diversos estudios clínicos y experimentales, *in vivo* e *in vitro*, han permitido comprobar que las isoflavonas de la soja, principalmente la genisteína, inhiben la actividad de numerosas enzimas celulares de gran importancia funcional, como la tirosina-quinasa (Zhang et al., 2011; Mita et al., 2013), y reducen el número de receptores celulares para diversos factores de crecimiento implicados en procesos de proliferación y diferenciación celular, tales como EGF (factor de crecimiento epidérmico), IGFs (factores de crecimiento relacionados con la insulina

o insulin-like grown factors), TGF (factor de crecimiento tumoral) y otros. Todos estos factores han sido implicados en el crecimiento de diversos tumores, y por ello la reducción del número de receptores provocado por las isoflavonas se traduciría en un menor riesgo de proliferación tumoral (Hwang et al., 2013). Entre los distintos tipos de cáncer estudiados cabe destacar los de mama, endometrio, próstata y colón.

Cáncer de mama: Los resultados recogidos en la bibliografía respecto a la relación entre estos cánceres y los fitoestrógenos son contradictorios. Por ejemplo, en algunos estudios se ha señalado que la genisteína puede ejercer un efecto protector en animales frente al cáncer de mama inducido químicamente, mientras que en otros se indica que la genisteína estimula el crecimiento de tumores mamarios implantados (Messina et al. 2006; Ma et al., 2014). En estudios clínicos y epidemiológicos en humanos se han encontrado también resultados contradictorios sobre el efecto protector de las isoflavonas en el cáncer de mama (Fritz, et al, 2013; Xie, et al., 2013; Virk-Baker et al., 2014). En España, la Sociedad Española de Ginecología y Fitoterapia (SEGIF) ha concluido que, a la vista de los estudios científicos, no se puede sustentar adecuadamente el efecto protector de las isoflavonas frente al desarrollo del cáncer de mama, aunque sí consideran que hay evidencia científica para sostener que las isoflavonas no suponen un factor de riesgo para el desarrollo de neoplasias mamarias. También se indica que no existen datos sobre su seguridad en pacientes con antecedentes de cáncer de mama (Jamo, 2006; Fritz et al., 2013).

Cáncer de endometrio, de colon y de próstata: Algunos autores han señalado que aunque se han podido observar varios efectos fisiológicos en el endometrio y en el colon asociados a un consumo de isoflavonas, aún es necesario establecer el papel que éstas desempeñan (Hale et al., 2002; Hyun et al., 2012; Bedell et al., 2014). Sin embargo, otros autores indican que aunque no se haya podido establecer una asociación directa entre la ingesta de fitoestrógenos y los cánceres de endometrio y de colon, el consumo de estos compuestos no suponen un factor de riesgo en pacientes con antecedentes de estas enfermedades (Committee on Toxicity, 2003; Crane et al., 2013; Neill, et al., 2013; Bedell et al., 2014).

Cáncer de próstata: algunos autores han revelado una relación entre consumo de isoflavonas y un menor riesgo de cáncer de próstata, aunque no se ha descrito el mecanismo específico por el que las isoflavonas protegerían frente a su desarrollo y progresión (Committee on

Toxicity, 2003; MacDonald et al., 2005; Raschke et al., 2006; Romagnolo & Selmin, 2012; Van Die, et al., 2013; Mahmoud et al., 2014).

2.1.6. Toxicidad

No está clara la seguridad de las isoflavonas y la información toxicológica disponible se considera insuficiente. Munro y colaboradores (2003), tras revisar la literatura asociada con la seguridad de las isoflavonas, concluyeron que su consumo es seguro si es en forma de productos de soja. En un estudio clínico, Zeng et al (2008) no observaron efectos adversos en individuos con una ingesta igual o mayor de 300 mg de isoflavonas al día.

En Estados Unidos se ha evaluado la toxicidad de las formulaciones de soja para niños y particularmente del posible efecto negativo de la genisteína sobre el sistema reproductor y el crecimiento (Rozman et al., 2006 a,b), concluyendo que no hay suficientes datos experimentales en humanos y animales para establecer su toxicidad, pues la mayoría de los estudios no tienen un grado de confianza suficiente (presentan problemas de diseño, número de individuos de la muestra, etc.). No obstante, en los últimos años, se ha incrementado la preocupación por el posible riesgo relacionado con las isoflavonas en las fórmulas infantiles a base de soja (Agostini et al., 2007; Bernbaum et al., 2008; Boucher et al., 2008). El Programa del Centro Nacional de Toxicología para la Evaluación de Riesgos para la Reproducción Humana (National Toxicology Program Center for the Evaluation of Risks to Human Reproduction (NTP-CERHR)) publicó, en 2011, un informe revisando la información actualizada sobre la toxicidad de las fórmulas infantiles a base de soja. El panel de expertos expresó una preocupación "mínima" por los efectos adversos en lactantes alimentados con fórmulas infantiles a base de soja. Su nivel de preocupación tuvo un valor de "2" en una escala de cinco niveles de preocupación que va desde la preocupación insignificante ("1") a seria ("5").

El panel de expertos que ha evaluado la genisteína concluye que, aunque no hay ensayos clínicos suficientes en humanos, los datos experimentales obtenidos con animales se pueden utilizar para evaluar el riesgo potencial de la genisteína en los humanos. Así, se ha comprobado que la genisteína purificada puede tener un efecto adverso sobre el desarrollo y el sistema reproductor de ratas y ratones y se ha establecido un LOAEL (lowest Observed Adverse Effect Level) de 35 mg/kg peso corporal/día para los machos y de 44 mg/kg peso corporal/día para

las hembras. El panel de expertos consideró que, en condiciones habituales, es muy difícil que las personas consuman una cantidad de genisteína suficiente para producir toxicidad; se estima que la población japonesa (la población humana más expuesta a la genisteína) consume 0,43 mg de genisteína/kg peso corporal/día, muy inferior al LOAEL basado los estudios en roedores (Rozman et al., 2006b).

2.1.7. Posicionamiento de organismos legislativos o comités científicos sobre los efectos beneficiosos de la soja

Según hemos visto en la literatura, el consumo de soja y sus componentes nutricionales y biofuncionales podría presentar potenciales beneficios sobre la salud. Además, son muchas las propiedades saludables que se le atribuyen a las isoflavonas y a la proteína de la soja. Sin embargo, la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) hasta la fecha no ha autorizado ninguna de las propiedades saludables que han sido solicitadas frente al la Comunidad Científica de la Unión Europea (EFSA, 2011; EFSA, 2012a; EFSA, 2012b). La EFSA concluye que, debido a la insuficiente información científica proporcionada, no existe una relación entre el consumo de soja y: a) Protección del ADN, proteínas y lípidos frente al daño oxidativo celular, b) Mantenimiento de las concentraciones sanguíneas normales de colesterol LDL, c) Reducción de los síntomas vasomotores asociados a la menopausia, d) Mantenimiento de la tonicidad normal de la piel normal en mujeres post-menopáusicas, e) Contribución al crecimiento normal del pelo, f) Contribución a la salud cardiovascular, g) Mantenimiento de la salud de la próstata sana y de la mama, h) Mantenimiento de la salud del tracto respiratorio superior.

Por otro lado, la Food and Drug Administration (FDA) de los EE.UU. autorizó en 1999 en el etiquetado de los alimentos que contengan un mínimo de 6,25 gramos de proteína de soja la alegación "25 gramos de proteína de soja al día, junto con una dieta baja en grasas saturadas y colesterol, pueden reducir el riesgo de sufrir enfermedades cardiovasculares". Esta propiedad saludable de la soja ha sido revisada por el Comité Científico de la American Heart Association (Sacks et al., 2006), siendo actualmente vigente en la legislación americana.

2.2. Los esteroides vegetales

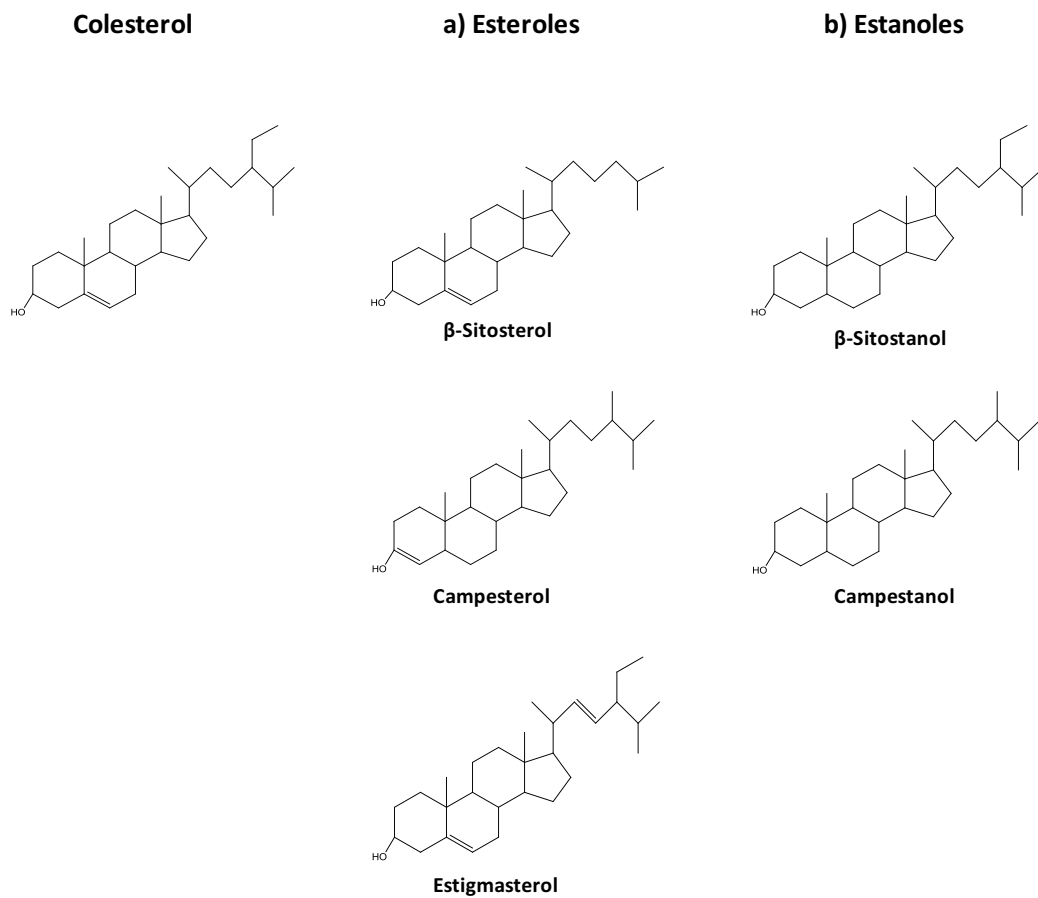
Los esteroides vegetales o fitoesteroides son esteroides derivados de plantas con estructuras similares y funciones análogas al colesterol de los vertebrados (Moreau, Whitaker & Hicks, 2002). En general se cree que estas sustancias actúan como componentes estructurales de las membranas vegetales a la vez que sirven de intermediarios para la biosíntesis de celulosa y numerosos productos vegetales secundarios, como los alcaloides, entre otros (Peng, Kawagoe, Hogan & Delmer, 2002; Read, & Bacic, 2002).

Los esteroides vegetales son miembros de la familia de los triterpenos, con una estructura similar a la del colesterol, pero incluyendo un grupo metilo o etilo en el C-24. Dentro de los esteroides vegetales existen dos categorías o subgrupos: los esteroides, con un doble enlace en posición 5, y los estanoles que no cuentan con ese doble enlace; es decir, con una reducción-5 α (Ostlund, 2002) (Figura 2.3). Los estanoles son mucho menos abundantes que los esteroides, y cuando se habla en términos generales de esteroides vegetales se suele hacer referencia a los esteroides.

Se han descrito más de 200 tipos diferentes de esteroides vegetales en distintas variedades de plantas, siendo el más abundante el sitosterol o β -sitosterol, seguido por el campesterol y el estigmasterol (Ostlund, Racette, Okeke, & stenson, 2002) (Figura 2.3). En la naturaleza, además de en forma libre, los esteroides vegetales pueden aparecer como compuestos "conjugados", en los cuales el grupo 3 β -OH del esteroide está esterificado con ácidos grasos, ferulato o ácido ferúlico (potente antioxidante semejante a la vitamina E y C), o bien glicosilados.

Prácticamente todos los alimentos vegetales contienen esteroides vegetales, pero la fuente más concentrada son los aceites vegetales, como los de maíz, girasol, soja y colza (que contienen entre un 0,1% y 0,8%). La ingesta diaria de fitoesteroides en las dietas occidentales se estima en unos 150-400 mg; aproximadamente la misma que la ingesta de colesterol, siendo mayor en algunas dietas vegetarianas y en la dieta japonesa, en las que puede llegar a 300-500 mg/día (12-17).

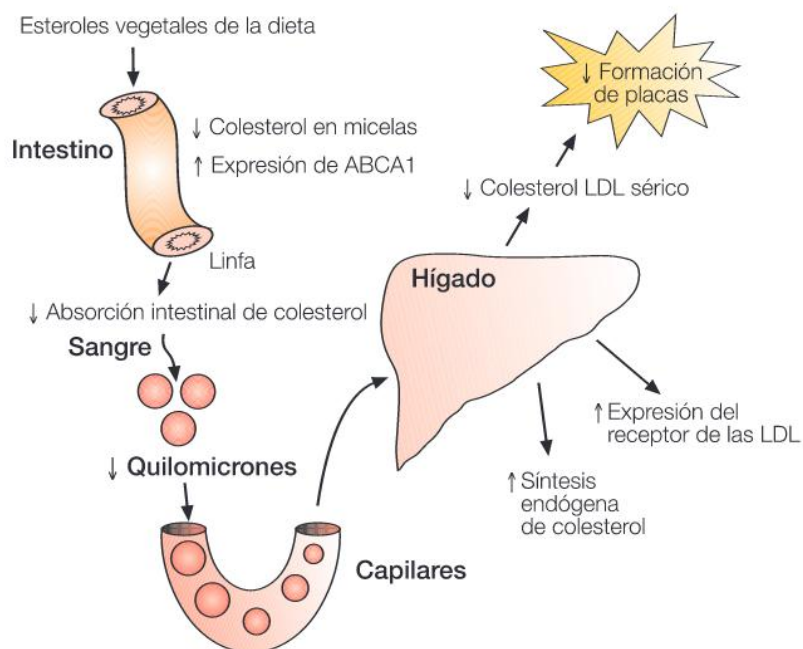
Figura 2.3. Estructura química del colesterol, los fitoesteros y fitoestanoles.



2.2.1. Mecanismos de acción de los esteroides vegetales

Hay una gran cantidad de evidencias experimentales que demuestran que los esteroides vegetales tienen un importante efecto hipocolesterolemizante, reduciendo tanto las concentraciones de colesterol total como las de colesterol LDL (Bitzur et al., 2013; Gylling et al., 2014). Se han propuesto diferentes posibilidades para explicar su mecanismo de acción. Los esteroides vegetales afectan la absorción intestinal de colesterol, su síntesis, y sus sistemas de eliminación (De jong et al., 2003) (Figura 2.4).

Figura 2.4: Posibles efectos de los esteroides vegetales en el metabolismo lipídico y lipoproteico (De Jong, et al., 2003).



2.2.2. Absorción intestinal de esteroides vegetales

A pesar de que su estructura química es similar, los esteroides vegetales y el colesterol difieren marcadamente en lo que respecta a su absorción intestinal. Así, a diferencia del colesterol, los esteroides de plantas se absorben poco en el intestino (0,2%-2%) y los estanoles aún menos (0,04%-0,2%). Una posible explicación a esta baja absorción es que la acil-coenzima A colesterol aciltransferasa, presenta una baja afinidad por los esteroides vegetales, por lo que resultan poco esterificados, y a los quilomicrones tan sólo se incorporan los esteroides y estanoles esterificados (Ostlund et al., 2002a). Como resultado de esta baja absorción y la eficiente excreción en la bilis después de la absorción por el hígado, los niveles circulantes son bajos, variando entre 7 de 24 mol/L (0,3-1,0 mg/dl) para los esteroides, y de 0,05 a 0,3 mol/L (0,002 a 0,012 mg/dl) para los estanoles (Björkhem et al., 2001); estos niveles son del orden de 500 veces y 10.000 veces menor, respectivamente, que las de colesterol. El consumo a largo plazo de alimentos con esteroides vegetales añadidos ($1,1 \pm 0,6$ g/día) aumenta sus niveles en la circulación (de 19 a 30 mmol/L [0,8-1,2 mg/dl] con el consumo de esteroides vegetales) (Fransen et al., 2007).

2.2.2. Absorción intestinal de esteroides vegetales

A pesar de que su estructura química es muy similar, los esteroides vegetales y el colesterol difieren marcadamente en lo que respecta a su absorción intestinal. Así, a diferencia del colesterol, los esteroides de plantas se absorben muy poco en el intestino (0,2%-2%) y los estanoles aún menos (0,04%-0,2%). Una posible explicación a esta baja absorción es que la acil-coenzima A colesterol-aciltransferasa presenta una baja afinidad por los esteroides vegetales, por lo que resultan poco esterificados, y por tanto no se incorporan a los quilomicrones, ya que a los mismos sólo se incorporan las formas esterificadas (Ostlund et al., 2002). El resultado de esta baja absorción junto con una eficiente excreción en la bilis después de la absorción, explica los bajos niveles circulantes, que varían entre 7 de 24 mol/L (0,3-1,0 mg/dl) para los esteroides, y de 0,05 a 0,3 mol/L (0,002 a 0,012 mg/dl) para los estanoles (Björkhem et al., 2001). Estos niveles son del orden de 500 veces y 10.000 veces menor, respectivamente, que los de colesterol. El consumo a largo plazo de alimentos con esteroides vegetales añadidos ($1,1 \pm 0,6$ g/día) aumenta sus niveles en la circulación (de 19 a 30 mmol/L [0,8-1,2 mg/dl]) (Fransen et al., 2007).

2.2.3. Efectos de los esteroides vegetales

Efectos de los esteroides vegetales sobre la absorción intestinal de colesterol

El efecto más estudiado de los esteroides vegetales es su inhibición de la absorción intestinal del colesterol, tanto del procedente de la dieta (unos 300 mg/día) como del colesterol endógeno recirculante procedente de la bilis (unos 1000 mg/día) y que puede ser parcialmente reabsorbido en el intestino (Gylling et al., 2014). Los esteroides vegetales, al ser más hidrofóbicos que el colesterol, pueden desplazarlo de las micelas de absorción, habiéndose demostrado, tanto *in vivo* como *in vitro*, que de esta manera se produce una disminución, por competición, de la incorporación de colesterol a las micelas (Jones et al., 1997), y, en consecuencia, disminuye su absorción intestinal..

Otro mecanismo que puede afectar a la menor tasa de absorción del colesterol es la inducción de expresión de unos transportadores, los ABC (ATP-Binding Cassette), tales como ABCA1, ABCG5 y ABCG8 (Berge, et al., 2000; Fransen et al., 2007). Estos transportadores intestinales eliminan colesterol y sitosterol para evitar su absorción y acumulación, aunque son

mucho más eficaces en el caso del sitosterol, devolviendo gran parte de este esteroide del enterocito de nuevo al intestino para su eliminación (Rozner et al., 2006; Calandra et al., 2011; Lee et al., 2012). Algunas mutaciones y determinados polimorfismos en genes que codifican para los transportadores ABCG5 o ABCG8 pueden desencadenar la aparición de fitosterolemia o sitosterolemia, un trastorno recesivo autosómico, poco frecuente y caracterizado por la absorción de cantidades masivas de esteroides vegetales (Fransen et al., 2007).

Efectos de los esteroides vegetales sobre el metabolismo lipídico y lipoproteico:

La inhibición de la absorción de colesterol provocada por los esteroides vegetales produce un incremento en la síntesis endógena de colesterol, pero que no llega a compensar el descenso que se produce por la inhibición de su absorción, incluso en individuos que ya ingieren cantidades bajas de colesterol en la dieta. Lo mismo ocurre con la síntesis del receptor de las LDL, que también aumenta (Plat et al., 2002; Gylling et al., 2014). Este hecho incrementa la eliminación de las LDL sin verse afectadas las concentraciones de triacilglicéridos ni de colesterol HDL (Hendricks et al., 1999).

Efectos de los esteroides vegetales sobre el metabolismo lipídico y lipoproteico:

La inhibición de la absorción de colesterol provocada por los esteroides vegetales produce un incremento en la síntesis endógena de colesterol, pero que no llega a compensar el descenso que se produce por la inhibición de su absorción, incluso en individuos que ya ingieren cantidades bajas de colesterol en la dieta. Lo mismo ocurre con la síntesis del receptor de las LDL, que también aumenta (Plat et al., 2002; Gylling et al., 2014). Este hecho incrementa la eliminación de las LDL sin verse afectadas las concentraciones de triacilglicéridos ni de colesterol HDL (Hendricks et al., 1999).

La Sociedad Europea de Aterosclerosis (EAS) (2014) ha establecido que una ingesta de esteroides vegetales de 2 g/día reduce los niveles de LDL plasmático hasta en un 10 %, y por lo tanto puede considerarse como un complemento adecuado para reducir factores de riesgo para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares. Es interesante destacar que el efecto reductor de las LDL es el mismo tanto si se ingiere una determinada cantidad de esteroides vegetales dos a tres veces al día como si se ingiere de una sola vez (Plat et al., 2000).

El descenso de colesterol LDL que produce la ingesta de esteroides vegetales podría asociarse también a una disminución en el riesgo de padecer aterosclerosis. Sin embargo, aunque se ha observado una reducción en la progresión de la lesión aterosclerótica, no existen estudios concluyentes sobre un posible efecto en la regresión de dicha lesión (Gylling et al., 2014).

2.2.3.1. Otros efectos biológicos de los esteroides vegetales

Además de las acciones sobre el metabolismo lipídico y lipoproteico, los esteroides vegetales pueden afectar a otros procesos metabólicos y proteger frente a diversas enfermedades.

Efectos sobre el cáncer: En los últimos años se ha despertado un gran interés por la posible relación entre esteroides vegetales y cáncer, ya que estudios epidemiológicos y experimentales sugieren que podrían ejercer un efecto protector frente a los tipos más comunes de cáncer en las sociedades occidentales, como son el de colon, mama y próstata (De Jong et al., 2003; Awad et al., 2000; Bradford & Awad, 2010). Este efecto protector se basaría en una serie de mecanismos que incluyen efectos sobre la estructura y función de la membrana en las células tumorales y del huésped, las vías de transducción de señales que regulan el crecimiento del tumor y la apoptosis, la función inmunitaria del huésped, y el metabolismo del colesterol en el huésped (Bradford & Awad, 2010).

Efectos sobre las propiedades de membrana: Se ha demostrado que el β -sitosterol y el stigmasterol pueden ser incorporados a las membranas celulares (Ratnayake et al., 2000), aumentando la fluidez de la membrana *in vitro* (Silva et al., 2011). También se ha demostrado un efecto deletéreo en las membranas de los glóbulos rojos de ratas hipertensas debido a un incremento en la incorporación de esteroides vegetales (Ratnayake et al., 2000). Este hecho se asoció a una menor esperanza de vida en estos animales, probablemente porque los esteroides reemplazaron al colesterol en las membranas de los eritrocitos, con lo cual serían menos deformables (Ratnayake et al., 2000) y más frágiles (Bruckdorfer et al., 1969). Sin embargo, hacen falta más estudios que puedan explicar los efectos de los esteroides vegetales sobre la fluidez y las propiedades de membrana.

Efectos sobre el sistema inmunitario: Algunas evidencias científicas sugieren que los esteroides vegetales pueden tener un efecto positivo sobre la respuesta inflamatoria y sobre el estado inmunológico en general. Varios estudios en modelos celulares (Desai et al., 2009; Brüll et al.,

2010), estudios en animales (Calpe-Berdiel et al., 2007; Valerio et al., 2011), y estudios de intervención humana en diferentes grupos de pacientes (Bouic & Lamprecht, 1999; Breytenbach et al., 2001; Brüll et al., 2009) han sugerido que los esteroides vegetales tienen propiedades moduladoras inmunitarias. En estos estudios se demuestra que los esteroides vegetales favorecen la respuesta de las células T-helper (Th)1 en células humanas o murinas T auxiliares, mediante un aumento de la producción de las citoquinas específicas de Th1, las IFN e IL-2 por la activación de los receptores tipo Toll 2, mientras que la producción de citoquinas específicas de Th2, las IL-4 e IL-13, se mantuvieron sin cambios.

2.3. Aminas biológicamente activas

Las aminas biológicamente activas se clasifican en dos grupos según su origen, las aminas biógenas y las poliaminas. Estos compuestos se clasifican en tres grupos según su origen y estructura química: aminas biógenas aromáticas, aminas biógenas alifáticas y poliaminas naturales (Figura 2.5). Las aminas biógenas se producen principalmente por la descarboxilación de los aminoácidos precursores por parte de enzimas específicos de origen microbiano. En este grupo se incluyen las aminas biógenas aromáticas (tiramina, feniletilamina, histamina y triptamina) y las aminas biógenas alifáticas (putrescina, cadaverina y agmatina).

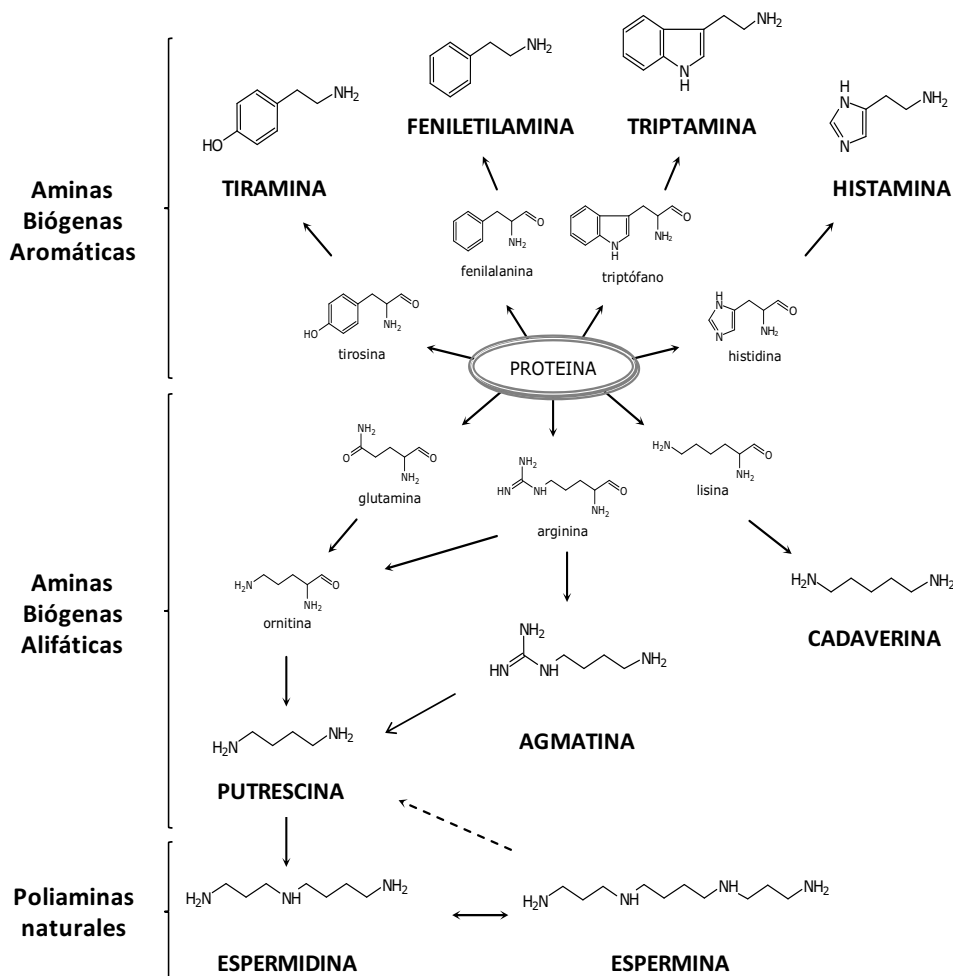
Las poliaminas naturales, espermidina y espermina, no están asociadas con la actividad microbiana y su biosíntesis intracelular en la mayoría de los seres vivos sigue procesos distintos a la descarboxilación de aminoácidos. Niveles bajos de putrescina pueden considerarse también de origen natural o fisiológico, como precursora de la poliamina SPD (Bardócz, 1995; Izquierdo-Pulido et al., 1999).

2.3.1. Metabolismo de las aminas biógenas

Las aminas biógenas son sustancias reguladoras universales implicadas en el control de la homeostasis y que afectan a múltiples funciones del cuerpo humano. De todas las aminas biógenas, la histamina (HI), la tiramina (TY) y, en menor medida, la feniletilamina (PHE), son las principales aminas implicadas en la aparición de efectos adversos psicoactivos o sobre el sistema cardiovascular, cuando se ingieren en cantidades muy elevadas. Las aminas atraviesan la barrera intestinal de modo pasivo y son metabolizadas *in situ*, por desaminación oxidativa

mediada por enzimas monoamino-oxidasa (MAO) y diamino-oxidasa (DAO), que constituyen una barrera normalmente efectiva para limitar el acceso de aminas libres a la circulación sistémica.

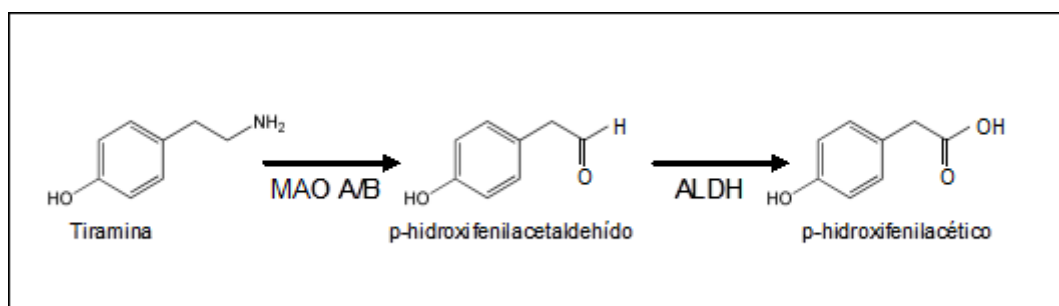
Figura 2.5. Estructuras químicas y vías de formación de las aminas biógenas y poliaminas.



La TY se metaboliza mayoritariamente vía desaminación oxidativa mediante la actuación de la enzima monoamino oxidasa (MAO) que origina p-hidroxifenilacetaldehído que posteriormente es transformado por la enzima aldehído deshidrogenasa en ácido p-hidroxifenilacético (Figura 2.6). La MAO es una enzima que presenta dos formas isoenzimáticas las cuales tienen preferencia por distintos sustratos y se encuentran en distintas localizaciones.

La MAO–A predomina en estómago, intestino, placenta, neuronas del sistema simpático y en el espacio extraneuronal mientras que la MAO–B se localiza en plaquetas, neuronas serotoninérgicas y predomina en el cerebro. La MAO-A es la responsable del metabolismo intestinal por lo que es la principal responsable de la metabolización de la TY de origen dietético (Azzaro et al. 2006; Broadley, 2010).

Figura 2.6. Metabolización de la tiramina.



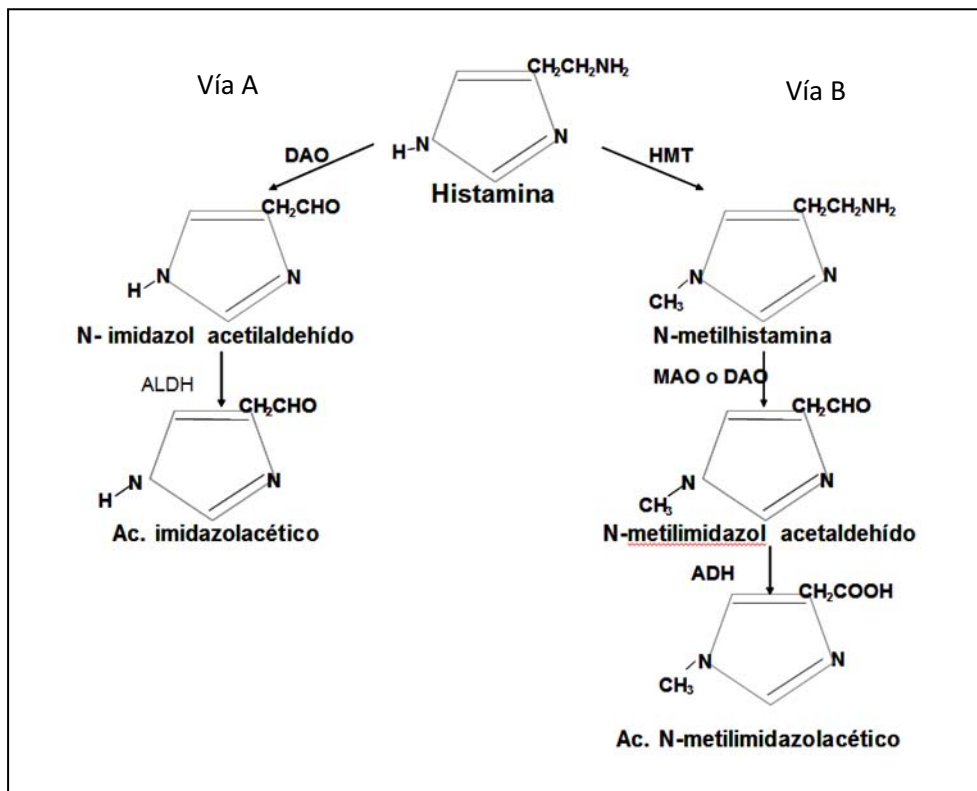
La metabolización de la HI de origen dietético implica fundamentalmente la actuación de enzimas de localización intestinal y hepática (Figura 2.7). A nivel intestinal la histamina es metabolizada principalmente por la DAO. Además de por la DAO, la histamina puede ser también metabolizada por la histamina-N-metil transferasa (HNMT), aunque esta segunda enzima tiene mayor actividad a nivel hepático (Jarisch, 2004). En el hígado la HNMT cataliza el paso de la histamina a N-metilhistamina, que posteriormente puede ser transformada a N-metilimidazol acetaldehído, tanto por la DAO como por la MAO-B. Finalmente el N-metilimidazol acetaldehído, por acción de la ALDH deshidrogenasa, pasa a ácido N-metilimidazol.

2.3.2. Efectos adversos de las aminas biógenas en la salud

En individuos sanos no medicados, las barreras enzimáticas a nivel intestinal y hepático son eficientes para metabolizar las aminas exógenas. Además, en circunstancias normales la presencia de estos compuestos en la dieta es baja o moderada, por lo que no constituyen un riesgo para la salud de la mayoría de los consumidores. Sin embargo, cuando existe una desproporción entre la cantidad de aminas ingerida y la capacidad de metabolización de las

mismas, se produce su acumulación en plasma, lo que desencadena la aparición de efectos adversos (Ladero et al., 2010). Este desequilibrio puede producirse tanto cuando la ingestión de aminas biógenas es muy elevada, como en casos en que se ve comprometida la capacidad del organismo para metabolizarlas.

Figura 2.7. Metabolización de la histamina por parte de las enzimas diamino-oxidasa (DAO), monoamino-oxidasa (MAO), aldehído-deshidrogenasa (ALDH) e histamina-metiltransferasa (HNMT).



Vía A: localización mayoritariamente intestinal

Vía B: localización mayoritariamente hepática

Una ingesta muy elevada de TY, HI y, en menor medida, PHE, puede ocasionar trastornos, de distinto tipo e intensidad: intoxicaciones, intolerancias, subida de la presión arterial y cefaleas (Taylor, 1986; Bardócz, 1995; Mariné-Font et al., 1995; Shalaby 1996; Amon et al., 1999). Los mecanismos de acción de las aminas biógenas implican reacciones vasoactivas y psicoactivas. Las propiedades vasoconstrictoras de la TY y la PHE parecen ser responsables del

aumento de la presión arterial cuando alcanzan una concentración sanguínea mayor que la considerada fisiológicamente normal (Frascarelli et al., 2008). Además de la hipertensión, la TY también puede provocar dolor de cabeza, sudoración, vómitos y dilatación pupilas, entre otros síntomas. La HI produce vasodilatación y una subsecuente hipotensión, así como otros síntomas cutáneos (enrojecimiento y picor), gastrointestinales (diarrea, cólicos, vómitos) o neurológicos (dolor de cabeza, mareos), efectos todos ellos, mediados por los receptores de HI específicos de las membranas celulares (Stratton et al., 1991; Mariné-Font et al., 1995; Shalaby, 1996).

El carácter normalmente leve de los síntomas junto con un diagnóstico equivocado, en muchas ocasiones, (en el caso de la HI puede confundirse con una alergia alimentaria) explica que haya pocos datos, y a menudo no coincidentes, sobre la incidencia de efectos adversos derivados de una ingesta elevada de aminas biógenas. Este vacío de información es aún mayor en relación con alimentos fermentados, muy probablemente debido a que la toxicidad de la TY ha sido en gran medida relacionada con el consumo de queso (reacción del queso), mientras que la intoxicación por HI se ha asociado a productos pesqueros (intoxicación histamínica o escombroida) (Taylor, 1986; Lehane y Olley, 2000), cuando en realidad puede haber HI y TY en muchos otros alimentos.

Puede existir una sensibilidad crónica a estas aminas biógenas de los alimentos en aquellas personas que presentan un déficit congénito o adquirido de los enzimas DAO, MAO y HNMT, responsables de su metabolismo. Se ha descrito una deficiencia de estos enzimas en individuos afectados por enfermedades inflamatorias intestinales como la enfermedad de Crohn.

La sensibilidad aguda o temporal a estas aminas puede ser consecuencia de la administración de fármacos que inhiben los enzimas responsables del metabolismo de las aminas: monoamino-oxidasa (MAO), diamino-oxidasa (DAO). El efecto de la medicación puede ser en estos casos crítica, ya que no sólo los conocidos fármacos inhibidores de la MAO (IMAO) (antidepresivos y antiparkinsonianos) aumentan la susceptibilidad a las aminas, sino que más recientemente se ha señalado que un número considerable de medicamentos, algunos de uso bastante común, como acetilcisteína, metoclopramida, verapamilo, isoniazida, cefalosporinas, etc, muestran capacidad para inhibir la DAO (Veciana-Nogués y Vidal-Carou, 2008). Sattler y col. (1988) estiman que aproximadamente el 20% de la población europea podrían consumir alguno de estos fármacos inhibidores de la DAO. Además, otros componentes de los

alimentos, como otras aminas biógenas o el alcohol y su metabolito, el acetaldehído, podrían aumentar o potenciar la susceptibilidad a las aminas y, en consecuencia, el riesgo de sufrir reacciones adversas (Maintz y Novak, 2007).

La intolerancia a la histamina puede aparecer cuando la enzima DAO está afectada por deficiencias genéticas o por el uso de medicamentos inhibidores de la DAO. En cualquiera de los dos casos, el resultado es que se va acumulando histamina en el plasma, hasta que se sobrepasa un determinado nivel, a partir del cual se desencadenan los síntomas. En la intolerancia a la histamina, a diferencia de la intoxicación histamínica, la aparición de los síntomas no está ligada al consumo de un alimento en concreto, sino que puede aparecer tras el consumo de un producto con concentraciones bajas o muy bajas de esta amina (Maintz y Novak, 2007). La histamina se ha relacionado con la patogénesis de la migraña en individuos susceptibles que sufren de deficiencias de DAO (Maintz y Novak, 2007). Frecuentemente los alimentos ricos en histamina desencadenan dolor de cabeza en pacientes con migraña crónica, que se alivia con una dieta libre de histamina (Wantke et al., 1993).

No existen datos bien contrastados sobre la incidencia de individuos especialmente susceptibles a la presencia de aminas biógenas en alimentos. Se ha estimado que la intolerancia a la histamina puede afectar a 2-3% de la población.

No existe consenso sobre la dosis mínima de TY e HI que puede producir efectos tóxicos en la población en general. La elevada variabilidad de la respuesta humana a las aminas procedentes de la dieta, así como las sinergias entre ellas y con otros componentes de los alimentos, dificultan la caracterización del nivel umbral (Rauscher-Gabernig et al., 2009).

Histamina: En la mayoría de los brotes de intoxicación histamínica, la cantidad de HI del alimento responsable de la intoxicación es muy alta (desde 600 hasta 3000 mg/kg). Sin embargo, se han observado casos en los que 75 mg de HI puede producir leves efectos adversos (Wöhrl et al., 2004). En individuos con intolerancia a esta amina, la ingesta de cantidades mucho más bajas puede desencadenar síntomas, aunque tampoco existe consenso general en la dosis máxima tolerable. En la bibliografía se citan como desencadenantes de síntomas de intolerancia a la histamina cifras variables que van desde 50 µg de histamina, cuando se emplea como vehículo una ración de vino (125 ml), hasta 60-75 mg por administración de histamina pura.

Tiramina: La toxicidad derivada del efecto vasoconstrictor de la tiramina está documentada sobre todo en estudios clínicos sobre la interacción entre la tiramina procedente de la dieta y los medicamentos IMAO. Estos estudios demuestran que las barreras intestinales para la tiramina en voluntarios sanos no medicados (grupo placebo) son bastante eficaces, ya que son necesarios entre 200 mg y 2000 mg de tiramina para provocar una mínima respuesta en la presión arterial (Korn et al., 1988; Berlin et al., 1989; Zimmer et al., 1990; Patat et al., 1995). La situación es diferente en individuos tratados con fármacos IMAO, ya que estos impiden la correcta metabolización de la tiramina, lo que conduce a niveles elevados de tiramina en plasma después de la ingestión de alimentos ricos en esta amina. En estos casos, cantidades menores de tiramina pueden dar lugar a efectos significativos. No todos los fármacos IMAO tienen el mismo efecto inhibitor de la enzima. Los fármacos IMAO clásicos de primera generación (irreversibles y no selectivos, como tranilcipromina) ejercen una elevada inhibición, de manera que la sensibilidad a la tiramina se incrementa observándose efectos adversos con ingestas bajas de tiramina (6 mg) (McCabe, 1986). Sin embargo, actualmente se prescriben fármacos de nueva generación, más seguros, ya que su acción es reversible y/o selectiva para el isoenzima MAO-A o MAO-B. En estos casos, los efectos adversos se han observado con la exposición dietética a 50 - 150 mg de TY (Korn et al., 1988b; Dingemans et al., 1998; Patat et al., 1995).

La tiramina, junto con la feniletilamina, también se han señalado como agentes causales de determinadas migrañas. Sin embargo, la migraña es un problema multifactorial, en el que probablemente no sólo intervienen componentes de la dieta, sino también otros factores ambientales, fisiológicos y psicológicos. La poca investigación realizada sobre las dosis umbral de las aminas biógenas necesarias para desencadenar la migraña no se puede considerar concluyente.

2.3.4. Presencia de aminas biógenas en alimentos

Dado que las aminas biógenas son resultado de procesos metabólicos de los seres vivos, al igual que en el organismo humano, se encuentran también en animales, plantas y microorganismos. Los alimentos que pueden presentar elevados contenidos de aminas biógenas pueden agruparse en tres categorías:

- Alimentos en los que las aminas aparecen por la acción de microorganismos alterantes potencialmente formadores de aminas. En este grupo se pueden incluir alimentos de carácter proteico pues ofrecen a los microorganismos una elevada disponibilidad de aminoácidos, que son los precursores en la formación de las aminas biógenas. En estos alimentos la presencia elevada de aminas puede ser indicadora de malas prácticas higiénicas en las materias primas o en los procesos de elaboración. La presencia de aminas biógenas en cantidades elevadas se ha descrito en alimentos derivados de soja debido a su elevado contenido proteico (Shukla, et al., 2011).

- Alimentos que se obtienen por procesos de fermentación o maduración, en los que existe la participación de microorganismos potencialmente formadores de aminas. En estos alimentos la presencia de algunas aminas biógenas como la tiramina o la β -feniletilamina, puede ser consecuencia de la actividad fermentativa y por tanto no necesariamente indicadora de un defecto higiénico. En este grupo se incluyen productos cárnicos o quesos madurados y también productos fermentados derivados de la soja (Kung et al., 2007; Latorre-Moratalla, et al., 2008; Linares, et al., 2011; Bai, et al., 2013; Byun, et al., 2013).

- Alimentos en los que se encuentran aminas biógenas preformadas en cantidades significativas. En este caso la presencia de estas aminas no estaría relacionada, en principio, a ninguna actividad microbiana (Vidal-Carou, et al., 2007).

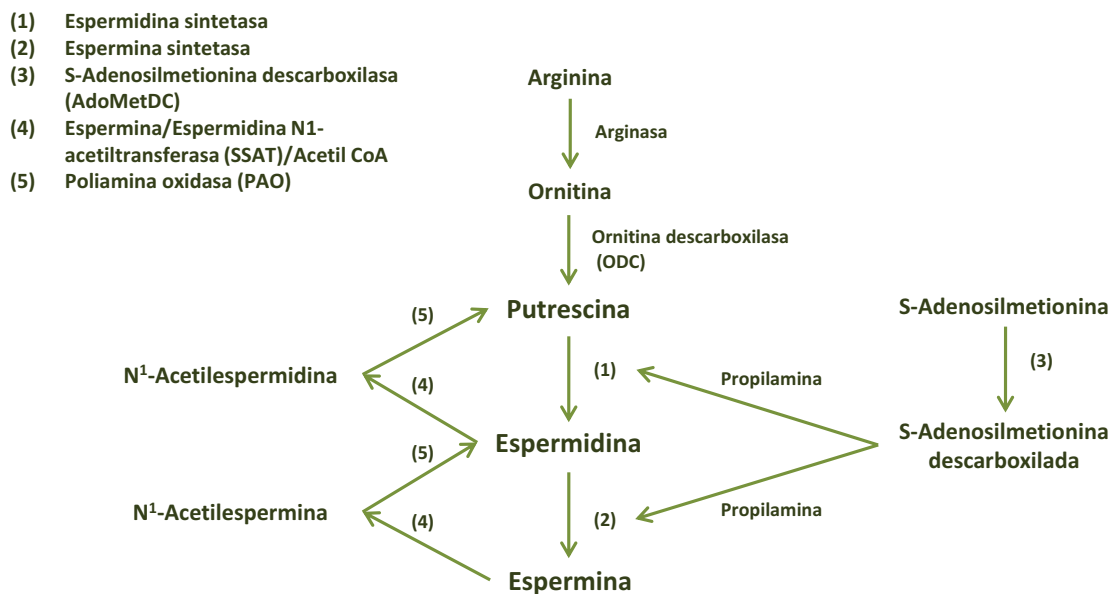
Las aminas biógenas son relevantes desde los puntos de vista higiénico y tecnológico (Brink et al., 1990; Mariné-Font et al., 1995; Izquierdo-Pulido et al., 1999). Varias aminas biógenas (principalmente las diaminas, putrescina y cadaverina, y la histamina) pueden formarse en cantidades muy elevadas como consecuencia de la actividad de ciertas bacterias contaminantes (enterobacterias y pseudomonas), por lo que estos compuestos pueden ser útiles como indicadores químicos de unas condiciones higiénicas defectuosas de las materias primas y/o de los procesos de elaboración (Latorre-Moratalla et al., 2008; Linares, et al., 2011).

Desde una perspectiva legal, solo se han fijado límites tolerables para la HI en pescados y en productos derivados. Así, la Food and Drug Administration (FDA) de EE. UU. y la Unión Europea establecen como nivel máximo un valor medio de 50 mg/kg.

2.4. Poliaminas

Las poliaminas, espermina, espermidina y putrescina, son compuestos orgánicos que tienen dos o más grupos amino primarios $-NH_2$. Las poliaminas se sintetizan a partir de arginina y se encuentran en casi todas las células (Figura 2.8). Son indispensables para el crecimiento y la diferenciación celular y están implicadas en diversas funciones, tales como la síntesis y la estabilidad del ADN, la regulación de la transcripción, la regulación de los canales iónicos, y la fosforilación de proteínas (Igarashi y Kashiwagi, 2000; Wang et al. 2003; Seiler y Raul, 2005; Kusano et al. 2008). Debido a su papel en diversos procesos metabólicos fundamentales, las poliaminas se pueden encontrar en varios compartimentos de las células, incluyendo las mitocondrias, cloroplastos y el núcleo (Martin-Tanguy, 2001). Las poliaminas se encuentran en todas las células animales y vegetales, con lo que casi todos los alimentos contienen poliaminas, pero en concentraciones muy variables. Las poliaminas no se degradan enzimáticamente en el tracto intestinal, se absorben rápidamente a partir de la luz intestinal y se distribuyen a todos los órganos y tejidos (Bardocz, 1995; Uda et al, 2003).

Figura 2.8. Síntesis y metabolismo de las poliaminas.



Las actividades enzimáticas requeridas para la síntesis de las poliaminas, en concreto las de las enzimas ornitina descarboxilasa (ODC) y S-adenosilmetionina descarboxilas, disminuyen gradualmente con el tiempo (Larqué, 2007). Así, la síntesis *de novo* y las concentraciones intracelulares de poliaminas en células y tejidos, especialmente los de SPM y SPD, disminuyen también con la edad (Soda, 2011). Además de la síntesis *de novo*, las poliaminas se obtienen de los alimentos y/o de la actividad de la microbiota intestinal. En estudios en animales, la restricción de ingesta de poliaminas, junto con la eliminación de bacterias intestinales por antibióticos, disminuye los niveles de poliaminas en sangre, lo que indica la importancia de las poliaminas procedentes de los alimentos y de la microbiota intestinal (Larqué et al., 2007).

La ingesta de alimentos ricos en poliaminas a corto plazo parece no aumentar los niveles de poliaminas en sangre (Brodal et al, 1999; Soda et al, 2009a, 2009b). La concentración intracelular de poliaminas está muy bien regulada por mecanismos tales como la síntesis, la degradación, y el transporte transmembrana; por lo tanto, la concentración de poliaminas puede ser estable. Sin embargo, Soda et al. (2009a y 2009b) demostraron que la ingesta de alimentos ricos en poliaminas a largo plazo aumenta gradualmente los niveles de poliaminas en sangre de ratones, y la ingesta continua de poliaminas aumenta gradualmente su concentración en sangre de humanos. Estos hallazgos sugieren que el proceso de incorporación de poliaminas a partir de fuentes exógenas es una respuesta adaptativa.

2.4.1. Las poliaminas como antioxidantes

Uno de los mecanismos potenciales de acción por el que las poliaminas pueden proteger a las células es la de actuar como antioxidantes. Diversos estudios han demostrado que las células con concentraciones reducidas de poliaminas son más sensibles al daño oxidativo (Chattopadhyay et al, 2002; Hunter y Burritt, 2008), lo que sugiere que las poliaminas pueden desempeñar un papel en la protección de las células de una amplia gama de organismos frente al daño oxidativo causado por concentraciones elevadas de radicales libres.

Algunos estudios han puesto a prueba la capacidad de las poliaminas de actuar como antioxidantes, sin embargo su mecanismo específico de acción todavía no está establecido (Chattopadhyay et al, 2002; Kakkar y Sawhney, 2002; Fujisawa y Kadoma, 2005; Groppa y Benavides, 2008). Se ha propuesto que las poliaminas podrían actuar como antioxidantes

debido a su capacidad ambivalente de unión aniónica y catiónica, lo que favorece la eliminación de radicales libres (Bors et al., 1989; Nayvelt et al., 2010). También se ha apuntado que las poliaminas pueden inhibir tanto la peroxidación lipídica como el estrés oxidativo catalizado por metales de transición (Løvaas, 1997; Das & Misra, 2004; Groppa, Tomaro, & Benavides, 2007). Otros mecanismos de acción antioxidante incluyen la habilidad de modular las cargas de superficie de membrana, la de inhibir enzimas o la de proteger el sustrato mecánicamente (Løvaas, 1997; Tadolini, 1988; Douki, et al., 2000).

2.4.2. Poliaminas y envejecimiento

La diversidad de funciones de las poliaminas en el metabolismo celular requiere que estén disponibles en tejidos en crecimiento rápido en grandes cantidades (Bardócz et al., 1995). Pero las poliaminas también actúan en diversos procesos biológicos, tales como la mediación de la acción de las hormonas y de factores de crecimiento (Bardócz et al., 1995), la modificación de la respuesta inmune, el bloqueo de los canales de iones de calcio y la regulación de la apoptosis (Moinard et al., 2005; Larqué et al., 2007). Por lo tanto, las poliaminas son esenciales para mantener la salud en todas las etapas de la vida. Con el envejecimiento, la síntesis *de novo* de las poliaminas disminuye gradualmente, debido a que disminuye la actividad de las enzimas de la biosíntesis de poliaminas, particularmente la ODC (Larqué et al., 2007; Vivó et al., 2001; Das y Kanungo, 1982).

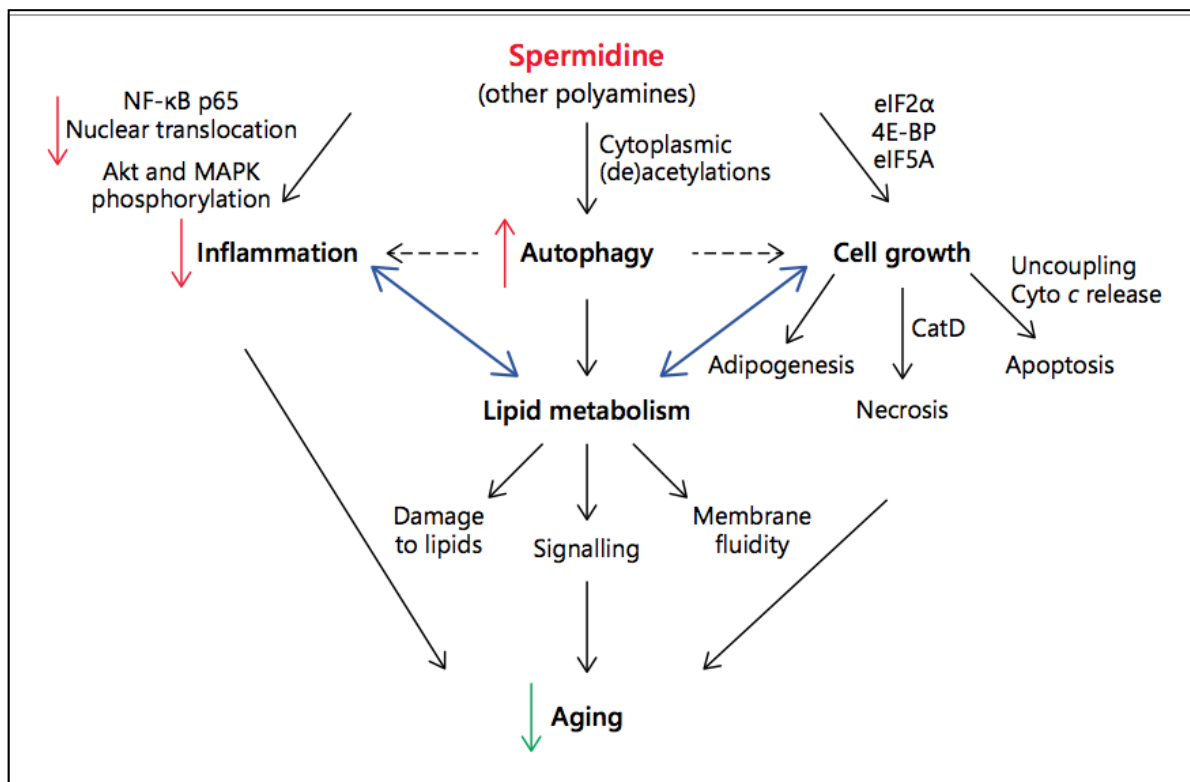
La evidencia científica acumulada sugiere que las poliaminas en general parecen tener implicaciones durante el proceso del envejecimiento. Sin embargo, recientemente se están descubriendo los posibles mecanismos de acción que ejercen las poliaminas. En una reciente revisión, Minois (2014) recoge información sobre las bases moleculares de las poliaminas y destaca sus principales mecanismos de acción (Figura 9.2). En esta revisión, se ha identificado a la autofagia como principal mecanismo de acción de la espermidina a nivel molecular. Sin embargo, otras investigaciones recientes muestran que la espermidina puede actuar también a través de otros mecanismos, mediante la reducción de la inflamación, el metabolismo de los lípidos y la regulación del crecimiento, proliferación y muerte celular.

El efecto que estos mecanismos ejercen sobre la salud todavía está bajo estudio. Sin embargo, un aumento de la ingesta de poliaminas parece tener un efecto positivo en

enfermedades asociadas a la edad, como enfermedades cardiovasculares, la inflamación crónica o la atrofia glomerular renal (Soda, et al., 2009a; Soda et al., 2012; Soda et al, 2013; Minois et al., 2011; Minois, 2014), y también en el mantenimiento de la integridad intestinal, debido a su participación en el proceso de renovación continua en el intestino (Majumdar, 2003; Zou et al., 2008; Seiler y Raul, 2007). Desafortunadamente, hay un número limitado de estudios que examinan la importancia de las poliaminas en la salud humana y el envejecimiento, y sus efectos en la salud se extrapolan en muchos casos de estudios in vitro y en roedores (Cerrada-Gimenez et al. 2011; Minois et al., 2011).

Hace unas décadas se recomendó la privación de ingesta dietética de poliaminas en pacientes con cáncer con la intención de frenar la progresión del tumor. Las células cancerosas tienen una mayor necesidad de poliaminas ya que son células de rápida división (Kalac y Krausová, 2005). En ausencia de tumor, un estudio de Soda et al. (2009a) indica que una dieta rica en poliaminas es beneficiosa para mantener la salud durante el envejecimiento. En apoyo de esta sugerencia se dispone de diversos estudios con modelos de ratones transgénicos o de modelos celulares (Alhonen et al., 1995; Nishimura et., 2006; Eisenberg et al., 2009).

Figura 2.9. Resumen de los mecanismos de acción de la espermidina. Fuente: Minois (2014).



Productos derivados de la soja

La soja ha recibido muy poca atención en Occidente hasta bien entrado el siglo XX, donde tradicionalmente se ha preferido al arroz, aún siendo su riqueza nutricional claramente inferior (Messina, 1999).

En la actualidad, el consumo de soja y la disponibilidad de productos derivados de la soja están creciendo en el mercado Europeo y la tendencia sigue en aumento. La industria alimentaria se ha implicado mucho en la elaboración de productos de soja y las empresas más importantes del sector han subvencionado investigaciones para profundizar en el conocimiento de sus beneficios para la salud. Esto ha hecho que ya se disponga de más y mejores tipos de harina, de aislados y concentrados proteicos y que se hayan incorporado sus componentes funcionales (lecitina, isoflavonas, tocoferoles, fitoesteroles y otros) a muchos productos alimenticios.

Los principales productos industriales derivados de la soja son el aceite de soja y la harina de soja. Y como ingrediente el más utilizado en la industria alimentaria es el concentrado de proteína o proteína de soja texturizada, que se emplean para mejorar el aporte de proteína o para aumentar la calidad de la misma con vistas al procesado (incremento de la capacidad de retención de agua o estabilización de las emulsiones) de productos cárnicos, alimentos infantiles o productos de panadería. Mundialmente se producen unos 20 millones de toneladas de aceite de soja que, desde 1945, se obtiene de sus semillas por extracción con disolventes. A nivel mundial es el aceite más utilizado culinariamente. La harina de soja se obtiene por molienda de las habas o semillas. Se presenta en el mercado bajo dos formas: bruta (o con sus enzimas activas) y desactivada, cuyas enzimas se han destruido tratando a las semillas térmicamente.

La obtención de los concentrados de proteína de soja se realiza principalmente a partir de harina de soja floculada y desgrasada. Comprende el ablandamiento de los copos en agua, la acidificación a pH 4-5, la separación de los compuestos solubles por centrifugación, el lavado y

el secado del residuo. Los refinados con mayor contenido proteico se obtienen extrayendo primero los componentes solubles de la harina de soja con agua o álcali diluido (pH 8-9) y después precipitando de nuevo las proteínas a partir del extracto ajustando al pH 4-5. Tanto la harina de soja como los concentrados poseen excelentes propiedades ligantes y aumentan la retención de agua. Los concentrados, igual que las proteínas purificadas, son buenos emulsionantes y fijadores del sabor; en cambio, para desarrollar las capacidades espumantes se emplean los aislados proteicos y la proteína hidrolizada (Ohr, 2004).

Los alimentos tradicionales u orientales derivados de la soja están presentes desde hace relativamente poco tiempo en el mercado Europeo y su consumo está en aumento. Estos alimentos se clasifican en:

- a) **productos sin fermentar:** soja verde (con o sin vaina) y/o edamame, semillas germinadas y brotes, semillas tostadas, bebida de extracto de soja y tofu,
- b) **productos fermentados:** Salsa de soja, sufu, miso, natto, tempeh y otros.

3.1. Productos tradicionales sin fermentar

3.1.1. Vainas verdes y brotes de soja

Los alimentos orientales de soja sin fermentar que gozan de mayor demanda, como ingredientes culinarios, son las vainas verdes o sin madurar conocidas como edamame, que se consumen como ensaladas, verdura cocida y guarnición de muchos platos, y las habas, tanto secas como germinadas. En ocasiones, molturadas, como harina, se usan en forma de pastas, sopas, ensaladas y bebidas.

Los brotes de soja corresponden a la soja germinada de 3-4 días. Los brotes de soja comúnmente vendidos en el mercado no siempre proceden de semillas de soja germinadas, sino de otra especie que se le parece (*Vigna radiata*) que, aunque pertenece a la misma familia que la soja, dista mucho de tener sus propiedades. Los brotes se obtienen siempre de habas de soja sanas que se siembran y cultivan en invernaderos dotados de riego por aspersión con agua tibia (40-42 °C).

3.1.2. Bebida de soja

La bebida de soja se ha consumido en China desde hace 2000 años. Desde entonces, su consumo ha sido mayor en China y los países asiáticos que el consumo de leche en los países occidentales. La bebida de soja es un extracto acuoso de la semilla de soja. Desde un punto de vista físico-químico, la bebida de soja es, en términos generales, una emulsión de aceite en agua. Sin embargo, como la gran mayoría de alimentos coloidales, presenta mayor complejidad, es decir, se trata de una dispersión coloidal formada por una fase acuosa en la que se encuentran las proteínas y las gotas de grasa en dispersión. La bebida de soja se asemeja a la leche en apariencia y es, por tanto, una alternativa al consumo de leche para individuos con determinados problemas de intolerancia o alergias a los componentes de la leche, así como para personas que prefieren el consumo de productos de origen vegetal debido a los efectos beneficiosos que se les atribuyen (Johnson et al., 1983; Reilly, et al., 2006). Por todo esto, la bebida de soja es el producto a base de soja más consumido en el mundo (FAO, 2002).

El consumo de bebida de soja en los países occidentales ha sido un tanto restringido, principalmente por sus características organolépticas y su típico sabor a judía cruda (Yuan y Chang, 2007; Achouri et al, 2008). Sin embargo, una vez identificados los componentes causantes de los aromas desagradables, y las operaciones tecnológicas necesarias para inactivarlos, así como el conocimiento de las propiedades saludables que puede suponer el consumo de bebida de soja, su consumo ha experimentado un fuerte incremento en occidente (FAO, 2002), ganando popularidad en Europa en los últimos años.

Para obtener la bebida de soja, se realiza una extracción acuosa de las semillas de soja (Liu, 2004). En método tradicional implica varias operaciones unitarias que, generalmente, son: la hidratación de la soja, el descascarillado, la molienda, el tratamiento térmico y la filtración (Kwok y Niranján, 1995; Iwuoha y Kenneth, 1997; Mullin et al., 2001). El tratamiento térmico es un factor importante para obtener un licuado de soja con características específicas (Liu, et al., 2004). Sin embargo, el tratamiento térmico influye negativamente en el color de la bebida de soja y éste es uno de los problemas hacia donde se han dirigido más esfuerzos para remediarlo, así como también, para la inactivación de los inhibidores de tripsina, la eliminación del flavor de la soja y la precipitación de sólidos durante el almacenamiento (Ang et al., 1985).

Estos retos han propiciado el desarrollo de nuevos sistemas de procesamiento para mejorar el producto.

Existen diferentes métodos industriales para la producción de bebida de soja. Los procesos mostrados en la Figura 3.1 representan el método tradicional y las principales modificaciones del proceso general de la bebida de soja. Algunos de estos ejemplos son: el método de Cornell (Wilkins et al., 1967), el método de Illinois (Nelson et al., 1976), la cocción rápida por hidratación hidrotérmica (Johnson et al., 1983), la molienda fría al vacío (PROSOYA) (Gupta y Gupta, 1988), los métodos que introducen la desodorización o los que introducen la utilización de antioxidantes y álcalis (Liu, 2004; Kwok y Niranjana, 1995; Prawiradjaja, 2003). También se han propuesto modificaciones de los ingredientes crudos de la bebida de soja y modificaciones genéticas de la soja, con el fin de inactivar la lipoxigenasa, eliminar el sabor desagradable (off-flavor) de la soja, y combinaciones de estos métodos para obtener una bebida de soja agradable y nutritiva, con alto contenido en sólidos y proteína (Kwok y Niranjana, 1995; Prawiradjaja, 2003). A pesar de que algunas modificaciones del proceso han mejorado la calidad de la bebida de soja, cada método tiene sus propias ventajas y desventajas. En el método de cocción rápida por hidratación hidrotérmica, por ejemplo, se aplican temperaturas de alrededor de 154 °C lo que produce cambios químicos que pueden favorecer la formación de compuestos volátiles, responsables de sabores indeseables y cambios de color en la bebida de soja. En el resto de los métodos se aplica una temperatura moderada (100 °C), lo que puede garantizar una baja carga microbiana pero una vida útil corta. Además, se ha sugerido que para mejorar los aromas desagradables se deben controlar los parámetros del proceso, tales como el tiempo, la temperatura y la relación agua/semilla de soja (Achouri et al., 2008).

En el procesamiento para la obtención de la bebida de soja se barajan diferentes variables que dan lugar a condiciones muy diversas tales como altas o bajas temperaturas, tiempos cortos o prolongados de cocción, uso de ultra altas temperaturas (UHT), combinaciones de estas variables con procesamiento en medio alcalino, o con otros reactivos químicos. En todos estos pasos, se producen modificaciones químicas y/o fisicoquímicas y sensoriales de la bebida de soja (Toda et al., 2007; Kwok y Niranjana, 1995; Kwok et al., 2002; Guo et al., 1997; Ono et al., 1996). Así, en el caso de las proteínas, a temperaturas de alrededor de 70 °C se desnaturaliza la β -conglucina y a 90 °C la glicina (Zhang et al., 2004; Liu et al., 2004). Durante el tratamiento térmico, se produce un fraccionamiento de las partículas de proteína

de la bebida de soja debido a que los puentes disulfuro de las partículas de mayor tamaño se rompen y se unen a subunidades β de la fracción 7S y subunidades 11S, que son partículas de tamaño medio. Asimismo, el calentamiento provoca modificación en la fracción lipídica dando lugar por una parte a la interacción de proteína y fosfolípidos y, por otra, a la hidrólisis de triglicéridos (Ono et al., 1996).

Por otra parte, los ácidos grasos poliinsaturados se oxidan durante el procesamiento de la bebida de soja, lo que se demuestra por el aumento del índice del ácido tiobarbitúrico (TBA) después del tratamiento térmico (Wang et al., 2001). El contenido de azúcares se ve disminuido hasta un 8,87% después del tratamiento térmico, ya que se produce pardeamiento no enzimático de Maillard, que implica la reacción de los azúcares reductores con los grupos amino libres (Wang et al., 2007; Kwok et al., 1998; Kwok et al., 1999; Lakshmanan et al., 2006). Algunas vitaminas como la tiamina, el ácido ascórbico y la piridoxina, pueden también sufrir pérdidas notables durante el tratamiento térmico. La extensión de la destrucción térmica de los nutrientes depende en gran medida de la combinación tiempo-temperatura durante el procesado (Kwok y Niranjana, 1995; Kwok et al., 1998).

Además de los cambios que se producen en los nutrientes, el tratamiento térmico es muy importante para inactivar el inhibidor de tripsina (IT). El calentamiento produce una inactivación parcial del IT y se puede llevar a cabo mediante el blanqueado de las semillas de soja, por cocción de la semilla mediante molienda con agua, o por calentamiento de la bebida de soja después de la filtración (Kwok y Niranjana, 1995). El tiempo de calentamiento que se requiere para inactivar el 90% del IT puede variar de entre 30 a 75 min a 93°C, mientras que a 121°C el tiempo varía de 5 a 10 min (Liu, 2004). Dado que el IT es bastante resistente al calor, una parte de su actividad residual permanece en la bebida de soja después de tratamiento térmico. Para inactivar el IT aplicando temperaturas por debajo de 100°C se necesitarían tiempos prolongados de tratamiento (Kwok y Niranjana, 1995), y estos tratamientos afectarían excesivamente otras propiedades de la bebida de soja, como el sabor y el color, debido a reacciones de pardeamiento, o a la calidad de las proteínas, como resultado de degradación de aminoácidos y también sería mayor la pérdida de vitaminas (Friedman y Brandon, 2001; Kwok et al., 1998).

Desde un punto de vista reológico, algunas bebidas de soja exhiben cierto grado de carácter pseudoplástico (Fávaro Trindade et al., 1997; Wang et al., 2001), este comportamiento

aumenta con la intensidad del tratamiento térmico a causa de la desnaturalización de las proteínas, debido a que el calor modifica el estado de agregación de las mismas (Oguntunde & Akintoye, 1991). Este hecho conlleva que, durante el tiempo de almacenamiento, pueda producirse la sedimentación de partículas y disminuir así la viscosidad de la bebida de soja (Achouri et al., 2007b).

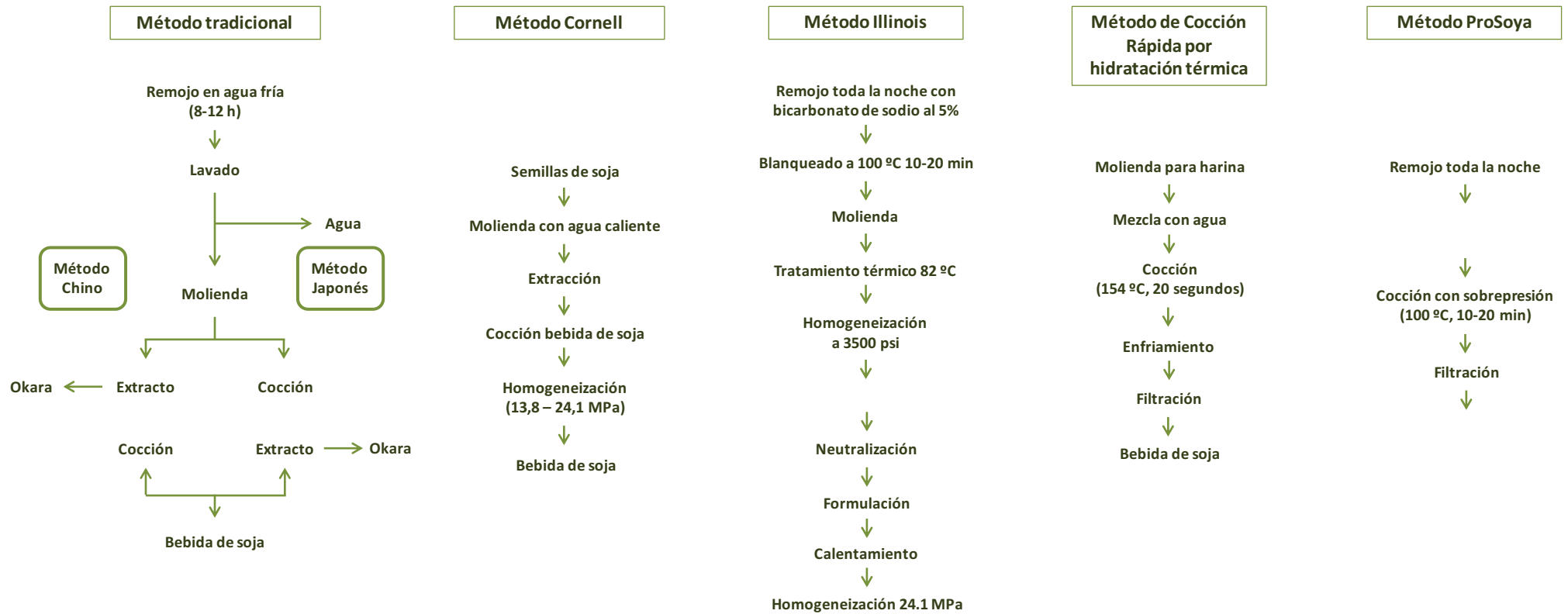
Todos estos cambios provocados por los tratamientos térmicos proporcionan las características sensoriales de la bebida de soja, que le aportan una serie de atributos relacionados entre sí, y se engloban como un leve flavor a soja, en el que se incluyen el sabor a hierba, a cocido, astringente y amargo (Iwuoha y Umunnakwe, 1997; Torres-Penaranda y Reitmeier, 2001). Algunos productos derivados de la bebida de soja han conseguido modificar aún más estas características, consiguiendo atributos sensoriales con mayor aceptabilidad por parte de los consumidores (Donkor et al., 2007).

3.1.3. Tofu

El tofu se obtiene coagulando la bebida de extracto de soja; en su aspecto se parece a un queso fresco, recién hecho, o a un yogur bastante firme. Aunque hay bastantes diferencias en la metodología seguida para elaborar este producto, el fundamento y las etapas básicas son las mismas que se siguen en el método tradicional de fabricación de China: las semillas de soja se dejan en agua durante la noche y al día siguiente se lavan y se trituran. La mezcla obtenida se filtra con gasa, se recoge el filtrado y se somete a ebullición durante unos 10 minutos. A continuación se añade al filtrado un coagulante (sulfato cálcico, glucono-delta-lactona o cloruro magnésico) y se deja actuar media hora, aproximadamente, para que coagule. Terminada la coagulación, se prensa el coágulo para eliminar el líquido, con lo que se obtiene el tofu firme o prensado; si se prefiere el tofu blando o “sedoso”, se prescinde del prensado.

El tofu es un alimento barato y muy nutritivo que se consume en todos los países del Este asiático. Por su textura blanda y suave puede mezclarse con muchos otros productos alimenticios (sopas, guisos de carne, hortalizas hervidas y como relleno de empanadillas). Junto con la bebida de soja es el derivado sin fermentar de esta legumbre más popular en EE.UU., Europa, Canadá y Australia.

Figura 3.1. Métodos de procesamiento de bebida de soja.



Fuente: Johnson et al., 1983; Gupta y Gupta, 1988; Golbitz, 1995; Kwok y Niranjan, 1995; Liu, 1999; Prawiradjaja, 2003.

3.2. Productos de soja fermentados

Europa es el continente que produce más variedad de productos fermentados, sobre todo lácteos, panarios, bebidas (especialmente vino y cerveza), embutidos y encurtidos. Sin embargo, la producción de derivados fermentados de soja y de alimentos feculentos fermentados es meramente testimonial. Norteamérica ocupa el segundo lugar, debido al predominio de la población de origen europeo que posee, pero al mismo tiempo aventaja a Europa en la cantidad de alimentos fermentados a base de soja que produce, lo que se debe a su fuerte inmigración asiática. Hay escritos históricos que indican que la salsa de soja y el miso se elaboraban en China unos 1.000 años a.C. y que alrededor del año 600 a.C. su tecnología de elaboración pasó a Japón (Yokosuka, 1986). En los países del Sureste asiático y en China, Japón y Corea los productos fermentados derivados de la soja y del pescado continúan siendo los más populares. Los productos fermentados de pescado son generalmente de consumo local y prácticamente no se exportan, pero no ocurre así con los de soja, cuya demanda sigue creciendo en EE.UU. y en la UE.

Si bien una parte no despreciable de la producción asiática se realiza siguiendo una metodología tradicional y poco evolucionada, que se ha transmitido de generación en generación, actualmente se está utilizando también la más moderna y avanzada tecnología, sobre todo en Japón, que ha sido y sigue siendo el país que más ha contribuido al conocimiento científico de los cambios microbiológicos y bioquímicos que acaecen en estas fermentaciones.

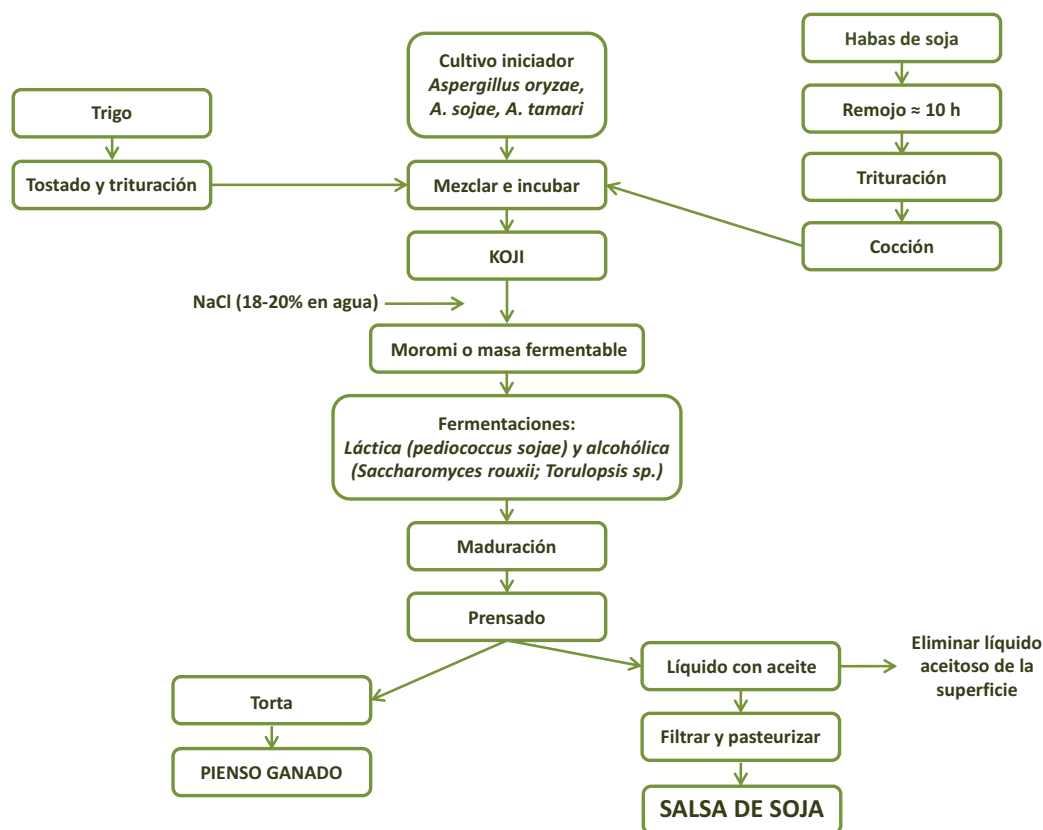
3.2.1. Shoyu o salsa de soja

Aunque es originaria de China, donde la llaman *chiang-yu*, su aceptación fue muy grande en otros países orientales (Nunomura, 1986). En Japón, donde es conocida como *shoyu*, disponen de la tecnología de elaboración más avanzada del mundo y aunque son más de 400 los fabricantes de *shoyu*, las cinco fábricas más importantes elaboran el 60% o más de la producción total. Una de las grandes empresas niponas de salsa de soja, Kikkoman Company Ltd., cuenta además con una fábrica en Walworth (Wisconsin) para atender al mercado de EE.UU.

Este producto derivado de la soja se obtiene por fermentación fúngica, seguida de salazón. Es un líquido de color marrón oscuro, salado y con sabor a carne, que se utiliza como aromatizante de muchos tipos de preparaciones culinarias. Al principio se elaboraba sólo con habas de soja; actualmente se emplea como sustrato una mezcla de semillas de soja y trigo.

La tecnología de elaboración de la salsa de soja, a pesar de los avances conseguidos y de disponer de equipos modélicos, sigue en lo fundamental el procedimiento tradicional (Figura 3.2). Antes se elaboraba sólo con semillas de soja enteras, pero actualmente se prefieren sus harinas y copos desgrasados, a los que se adicionan un 50% en peso de trigo tostado y triturado. Hoy día en Japón sólo se elabora artesanalmente menos del 10% de la producción total.

Figura 3.2. Diagrama de flujo de la fabricación de salsa de soja.



En el método tradicional, las habas de soja se lavan y se dejan en remojo toda la noche. Se escurren y se cuecen varias horas a 100-115 °C. En el método industrial se prefieren

temperaturas de cocción más altas (120-125 °C) y tiempos más cortos (15 minutos). La cocción de las semillas sirve para facilitar la biodisponibilidad nutrientes, eliminar los microorganismos que podrían alterar el producto terminado y destruir los factores antinutritivos de la soja. Sin embargo, la sobrecocción es perjudicial, ya que se forman enlaces intra e interpeptídicos que convierten su proteína en más resistente a la hidrólisis enzimática, con lo que disminuye la calidad del producto final (Hesseltine, 1984). El tostado y trituración del trigo adicionado a las habas de soja mejora el aroma y el color de la salsa resultante y al mismo tiempo destruye los microorganismos superficiales que contaminan los granos, todo lo cual colabora a una mejor hidrólisis enzimática. Además, el trigo aporta precursores de monosacáridos, ácidos y compuestos aromáticos. El trigo es rico en ácido glutámico y aporta aminoácidos azufrados de los que son deficientes las semillas de soja que, sin embargo, son ricas en lisina, aminoácido que escasea en los cereales. Una vez preparadas las semillas de soja y de trigo, se mezclan, procurando que el trigo se reparta uniformemente por toda la masa, lo que favorecerá el desarrollo de los mohos iniciadores y la inhibición de las bacterias, al absorber el exceso de humedad de las habas cocidas, con lo que la a_w pasa de 0,80 a 0,65, que son unos valores en los que sólo crecen los mohos más xerotolerantes.

Como agente iniciador de la fermentación se utiliza el *Aspergillus oryzae* (o también *A. Sojae* o *A. Tamari*). Tradicionalmente, la mezcla de soja-trigo se sembraba con koji, esto es, con un volumen dado de salsa de soja de una elaboración previa, que contenía los iniciadores fúngicos. En la actualidad, en vez de emplear koji, se prefiere el tane-koji, que consiste en cultivar los mohos en un sustrato sólido (semillas de soja, de trigo o mezcla de ambas) para que se originen en ellas enzimas proteolíticas que provoquen la degradación de la materia prima y proporcionen sustratos fermentables a las levaduras y bacterias de la siguiente fase del proceso fermentativo.

La mezcla de soja y trigo se siembra con un 0,1-0,2% de koji o tane koji y se incuba a 30 °C durante 72 horas. Posteriormente, se le adiciona un volumen igual de una salmuera al 25-30%. Esta mezcla de koji y salmuera constituye el moromi o masa de fermentación. La fermentación del moromi requiere un tiempo de 8 a 12 meses, en agitación y aireación, a una temperatura constante. Durante la fermentación se desarrollan diversos microorganismos, principalmente, dos géneros de bacterias lácticas (*Lactobacillus* y *Pediococcus*) y una levadura (*Saccharomyces rouxii*). Al finalizar el proceso de maduración, el moromi se prensa, obteniéndose un líquido, la

salsa de soja, y una torta que se emplea como pienso del ganado. La salsa de soja, a continuación, se esteriliza a 120 °C durante 2 segundos.

3.2.2. Sufu

El sufú es el producto que se obtiene a partir del tofu o cuajada de bebida de extracto de soja. En China se consume mucho como merienda y tentempié. Es un producto de sabor suave, delicado, carente de fibra, con un alto contenido proteico (10%), un 4% aproximadamente de lípidos y un 80% de agua. En su fabricación se distinguen cuatro etapas: 1) Obtención de la bebida de extracto de soja. 2) Preparación de la cuajada o tofu. 3) Siembras, fermentación y moldeado. 4) Sazonado y maduración (Figura 3.3).

Una vez obtenida la cuajada de bebida de extracto de soja o tofu, se corta en cubos pequeños, de unos 9-10 mm de lado. A continuación, los cubos se someten a un tratamiento de pasteurización (70-80 °C, 10-15 minutos) para destruir los posibles microorganismos alterantes que pudieran contener y para disminuir su contenido acuoso. Los cubos así tratados, una vez que alcanzan los 25-30 °C se inoculan con *Actinomyces elegans* y *Mucor sp.*, dejándolos fermentar 2-3 días a 25 °C. Terminada la fermentación, los cubos se sazonan en salmueras (5% NaCl) que contienen algo más que sal, por ejemplo, moromi de arroz, pasta de soja fermentada, etc. Después se dejan madurar 1 a 2 meses, lo que depende de la salmuera utilizada. Durante la maduración, los cubos de sufú también experimentan proteólisis y lipólisis. Alcanzada la maduración deseada, el producto terminado se pone directamente a la venta o bien se enlata y etiqueta debidamente para poder venderlo en lugares alejados de su lugar de producción.

3.2.3. Miso

El miso, lo mismo que la salsa de soja o shoyu, se elabora a partir de semillas de soja y de cereales (arroz, cebada o trigo), adicionadas de salmuera y sometidas a fermentación por los mismos mohos, levaduras y bacterias que intervienen en la elaboración de la salsa de soja. Se distinguen tres tipos de miso, dependiendo de la materia prima empleada como sustrato de fermentación:

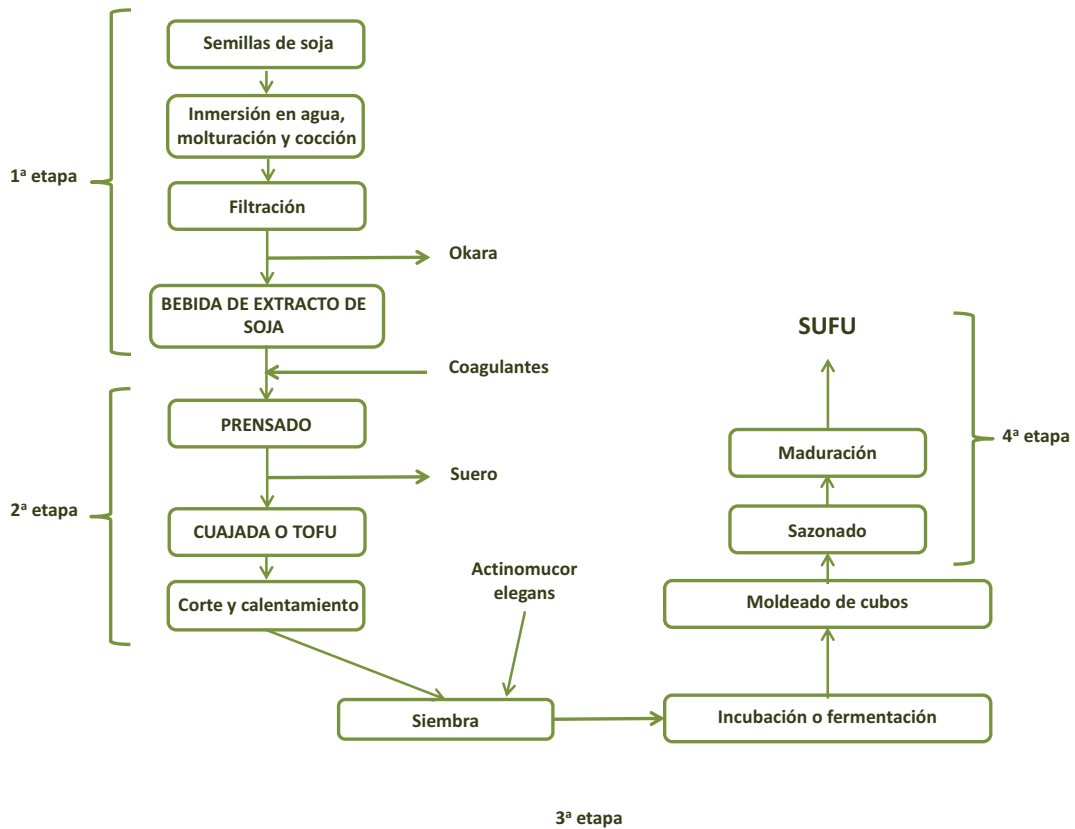
- 1) miso de arroz, elaborado con koji de arroz, semillas de soja cocidas y sal;

2) miso de cebada, hecho de koji de cebada, semillas de soja cocidas y sal; y

3) miso de soja, elaborado con koji de semillas de soja y sal.

A su vez, estos tres tipos de miso se subdividen en varios grupos, atendiendo a su contenido de sal (dulce, medio y salado) y a su color (blanco, amarillo y rojo).

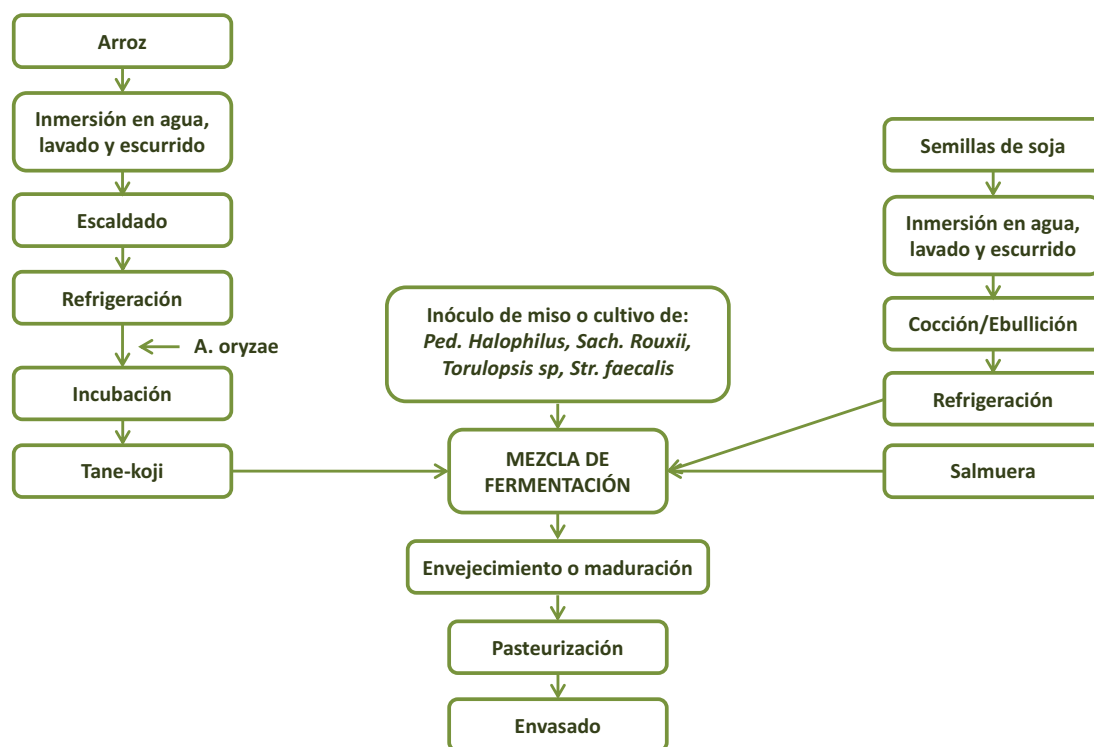
Figura 3.3. Diagrama de flujo de elaboración de sufu.



La elaboración del miso varía de unos países a otros y también de unas variedades a otras, pero su fundamento es el mismo en todos los casos. En la Figura 3.4 se muestra un diagrama de flujo de su fabricación. Las semillas de soja, debidamente acondicionadas, se someten a cocción y el cereal (arroz) se escalda, se lleva a 25-30 °C y se inocula con *Aspergillus oryzae* para obtener tane-koji. Después se prepara la masa o mezcla de fermentación con los dos componentes y se le incorpora salmuera (6-12% de sal). Se traslada a un tanque de fermentación y se inocula o siembra con miso de una fabricación anterior o con los correspondientes microorganismos fermentadores del inóculo (*Pediococcus halophilus*,

Saccharomyces rouxii, Torulopsis, sp, Streptococcus faecalis). La humedad de la mezcla, que en esta fase es conocida como miso verde, se ajusta al 48-50% y se deja fermentar en el tanque a una temperatura de 25-30 °C. Después se deja envejecer o madurar y finalmente se pasteuriza y prepara para la venta.

Figura 3.4. Diagrama de flujo de la fabricación de miso.



3.2.4. Natto

El natto japonés y su variedad itobi, el thua-nao tailandés y el dawadawa zaireño son representantes típicos de productos obtenidos por una sola fermentación bacteriana de habas de soja. Se trata de masas que desprenden un fuerte olor amoniacal (por el amoniaco originado en su elaboración), su color varía del gris al marrón cuero y su sabor es intenso.

Para su elaboración se emplean semillas enteras (Japón), o harina mezclada con agua en forma de una masa espesa y densa (Tailandia). Durante la fermentación, las semillas enteras se cubren, lo mismo que la masa, de una capa mucilaginosa, bastante pegajosa y viscosa. El microorganismo iniciador responsable de la fermentación es *Bacillus natto*, una cepa de *B. subtilis* fijadora de nitrógeno que contamina de forma natural la paja de arroz. Para elaborar el

natto se envuelven con paja de arroz porciones, aproximadamente iguales, de una mezcla de semillas de soja cocidas o de la masa de la harina citada, y se dejan incubar unas 16 horas a temperatura ambiente. En los métodos japoneses modernos se emplean, como agentes fermentadores, cultivos iniciadores puros, en vez de los bacilos presentes de manera natural en la paja de arroz. Durante la fermentación, a partir de las proteínas de la soja se originan péptidos y aminoácidos, llegando incluso a la formación de amoníaco (Sanz, 2006). Se sabe que el material mucilaginoso de la superficie se compone de glicopéptidos ácidos, pero no se conoce bien su mecanismo específico de producción.

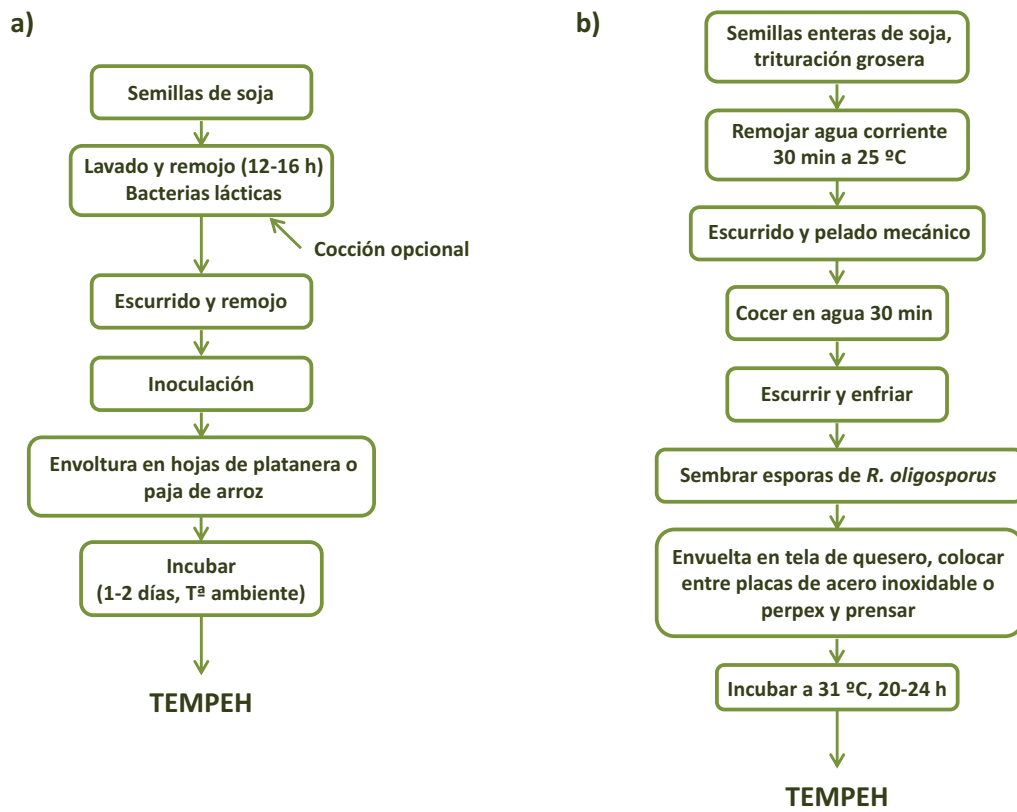
3.2.5. Tempeh

El tempeh es un producto en cuya elaboración intervienen dos fermentaciones, una bacteriana por bacterias lácticas y otra fúngica a cargo de diversas especies de *Rhizopus*, *Mucor* y *Actinomucor elegans*; a veces también colabora *Neurospora sitophila*. Hay dos métodos distintos de fabricar tempeh (Figura 3.5): el tradicional y el industrial.

En el sistema tradicional las semillas de soja se lavan y se dejan en remojo unas 12-16 horas (la cocción es opcional). Después se dejan a temperatura ambiente otras 12-16 horas para el desarrollo de las bacterias lácticas que poseen. A continuación se escurre toda el agua y se pelan las habas. Los cotiledones se inoculan o siembran con pequeñas porciones de tempeh bien desmenuzadas, procedentes de una fabricación anterior; en otras ocasiones se emplean como inóculo las envolturas de una partida de tempeh elaborado previamente o incluso añadiéndoles ragi tempeh, cultivo iniciador comercial. Después, los cotiledones se envuelven bien apretados en hojas de platanera o en paja de arroz y se dejan fermentar en un lugar templado 1 o 2 días.

Martinelli y Heseltine (1964) idearon un nuevo sistema de elaboración de tempeh, método industrial, que utiliza como sustrato semillas de soja enteras (sin desgrasar) que se trituran groseramente (4-5 trocitos/haba), permitiendo reducir el remojo a sólo 30 minutos.

Figura 3.5. Diagramas de flujo de la fabricación de tempeh por el método tradicional (a) y el industrial (b) por el método de Martinelli y Hesseltine (1964).



La Ultra Alta Presión de Homogeneización

En la actualidad, los consumidores valoran positivamente características de los alimentos que les confieran mayor valor añadido, como son la escasa manipulación del producto de partida, la ausencia de aditivos o el empleo de aditivos naturales, y la conservación o potenciación de las propiedades nutricionales y de las cualidades beneficiosas para la salud. Esta tendencia hace que frecuentemente se introduzcan en el mercado productos novedosos que cumplan con estas características. Las preferencias por los alimentos mínimamente procesados motiva la investigación de nuevas tecnologías que permitan obtener productos nutritivos, seguros y con una vida útil adecuada en términos microbiológicos, sensoriales y que, a la vez, mantengan unas características en el producto final lo más cercanas posible a las del producto fresco.

Durante las pasadas décadas se han desarrollado distintas alternativas a los métodos tradicionales de conservación. Una de la alternativa a los tratamientos térmicos más reciente es la aplicación de la alta presión. Dentro del campo de las altas presiones existen dos procesos que tienen características comunes pero difieren entre ellos en lo referente a sus sistemas de aplicación y en muchos casos, en los mecanismos de destrucción de microorganismos que predominan durante el procesamiento. Estos procesos son:

- a) las altas presiones hidrostáticas (HHP), aplicadas en sistemas discontinuos o semicontinuos, y
- b) la ultra alta presión de homogeneización (UHPH) también conocida en la literatura como alta presión dinámica (Guamis et al., 2006).

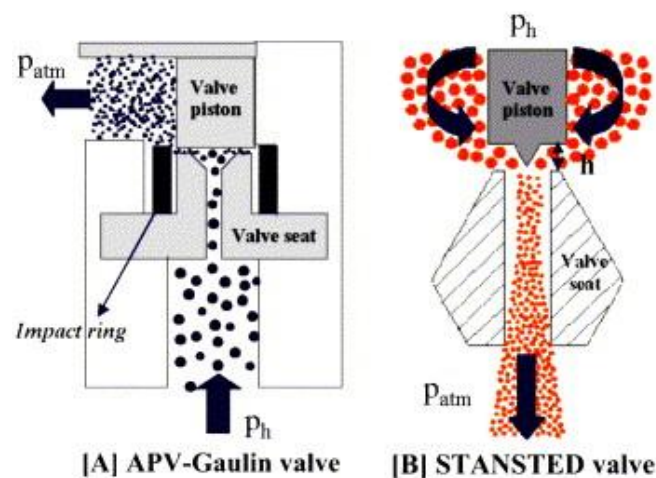
La UHPH es una tecnología basada en los mismos principios de diseño que la homogeneización convencional pero alcanzando presiones muy superiores, de hasta 300-400 MPa. La homogeneización convencional se utiliza desde hace muchos años en la industria láctea, con presiones entre 18 y 20 MPa, para reducir el tamaño del glóbulo graso, con el fin de evitar el desnatado y la coalescencia de la grasa durante el período de almacenamiento de la leche (Diels et al., 2005; Zamora et al., 2007) y, en productos lácteos como natas y helados,

para obtener una emulsión fina con propiedades adecuadas de textura y un alto grado de estabilidad (Desrumaux y Marcand, 2002).

En el diseño clásico (Figura 4.1a), el fluido procesado pasa a través de una sección convergente llamada espacio de la válvula, que es el espacio comprendido entre el cabezal y el asiento de la válvula. El fluido es bombeado por un estrecho espacio a través del asiento contra el cabezal de la válvula, produciéndose un choque contra éste y el anillo de impacto, con lo que sufre una ultrarrápida depresión antes de abandonar el homogeneizador a presión atmosférica (Kleinig & Middelberg, 1996; Kelly & Muske, 2004). El diseño APV-Gaulin es convencionalmente utilizado en la industria láctea, en la que se utilizan procesos de homogenización a gran escala bajo presiones moderadas (70-100 MPa) (Thiebaud et al., 2003; Pereda et al., 2007).

Con el paso del tiempo, la tecnología de homogenización ha evolucionado y la demanda de productos con mayor calidad nutricional, larga vida útil y mejor estabilidad coloidal ha generado avances tecnológicos como la UHPH (Hayes & Kelly 2003a; Hayes & Kelly 2003b; Thiebaud et al., 2003; Cruz, et al., 2007; Suárez-Jacobo et al., 2011; Polisel-Scopel et al., 2012; Valencia-Flores et al., 2013). Gracias a los avances en la ciencia de materiales se ha progresado en el diseño de homogeneizadores que alcanzan presiones superiores a las de la homogenización convencional, dando lugar productos de alta calidad. Un homogeneizador de UHPH consta de un generador de alta presión, ensamblado a una válvula diseñada especialmente para resistir la aplicación de presiones muy altas.

Figura 4.1. Diseño de (A) una válvula convencional de homogenización (APV-Gaulin) y (B) una válvula de un homogeneizador de alta presión (Stansted). Fuente: Flourey et al., (2004b).



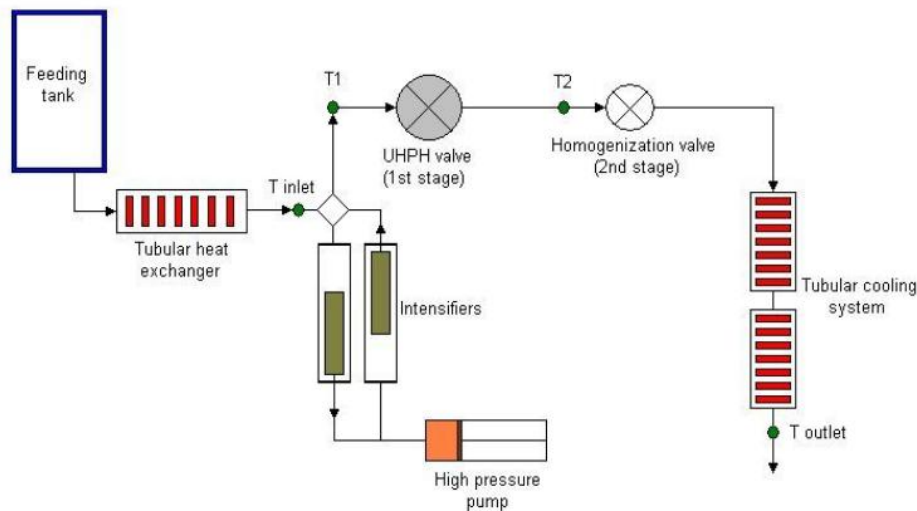
El homogeneizador Stansted (Figura 4.2b) es un equipo que incorpora material cerámico en su válvula, que lo hace capaz de soportar presiones de hasta 400 MPa. Lo interesante de este equipo es que la geometría de la válvula ha sido modificada respecto a la de válvula clásica APV-Gaulin (Figura 4.1a) y el paso del fluido en el equipo Stansted se realiza de manera inversa. Esta nueva tecnología permite aumentar la presión de homogeneización, debido a que el paso entre la válvula y el asiento en este diseño es mucho más estrecho (2-5 μm) que en la válvula APV-Gaulin (10-30 μm). Además, este homogeneizador cuenta también con una segunda válvula neumática, localizada después de la primera válvula de cerámica, que tiene la capacidad de soportar presiones por encima de 50 MPa. Por lo tanto, se pueden realizar procesos utilizando la primera válvula de presión (primera etapa) o la segunda válvula de presión (segunda etapa) o una combinación de ambas.

En la válvula de Stansted (Figura 2-4) los sentidos de flujo a través de la válvula se invierten, el fluido es alimentado primero axialmente a alta presión a lo largo de la parte móvil de la válvula y fluye con una alta velocidad a través del hueco estrecho entre la válvula y el asiento de la válvula. El tamaño de la brecha y la velocidad resultante del fluido, generada por la alta presión, dependen de la fuerza que actúa en el pistón de la válvula, que se puede ajustar para regular la intensidad de homogeneización. La caída de presión del fluido en la válvula se llama la presión de homogeneización (Floury et al., 2004ab). Las altas presiones alcanzadas por la válvula de Stansted (400 MPa) se deben a la estrecha abertura (2-5 micras vs 10-30 micras) (Floury et al., 2004a). Consecuentemente, en la válvula se producen una combinación de fuerzas de cizalla, cavitación, turbulencia y coalescencia en la superficie del fluido (Floury et al., 2004b). La Figura 4.2 muestra el equipo UHPH (FPG11300:400, Stansted Fluid Power Ltda., UK) utilizado para la elaboración de las muestras analizadas en esta tesis.

Generalmente la tecnología UHPH se considera una alternativa a los tratamientos térmicos. Sin embargo, durante su aplicación se produce un aumento de temperatura debido al calentamiento adiabático generado cuando el fluido impacta a alta velocidad en la válvula de homogeneización (Floury et al., 2003; Sandra & Dalgleish, 2005; Bouaouina et al., 2006; Serra et al., 2008a). Este incremento de temperatura es de 18-20 $^{\circ}\text{C}$ por cada 100 MPa, dependiendo de la temperatura de entrada al equipo de alta presión de homogeneización Stansted FPG11300 (Thiebaud et al, 2003; Pereda et al., 2007; Donsì et al., 2009; Serra et al., 2008a; Poliseli-Scopel et al., 2012; Valencia-Flores et al., 2013). Este aumento de temperatura resultante en la válvula de alta presión, de acuerdo con la temperatura de entrada y la presión aplicada, puede

alcanzar temperaturas superiores a 120 °C, aunque durante un tiempo muy breve <0,7 s (Picart et al., 2006). Por lo tanto, un producto tratado por UHPH se somete a un efecto resultante de la combinación de presión y temperatura durante un tiempo muy corto, reduciendo al mínimo el daño térmico en la calidad general del producto.

Figura 4.2. Vista esquemática de un equipo UHPH. Fuente: Polisel-Scopel (2012).



4.1. Aplicación de la UHPH en alimentos.

La alta presión de homogenización se utilizó inicialmente en la industria química, cosmética y farmacéutica, aplicando presiones de entre 20 y 50 MPa, para preparar o estabilizar emulsiones y suspensiones y modificar sus propiedades reológicas (Roesch y Corredig, 2003; Flourey, 2002). Más tarde se introdujo la aplicación de estas presiones moderadas en los alimentos para cambiar las propiedades de las emulsiones (Diels et al., 2005). Más recientemente se plantea la aplicación de presiones de 200 y 300 MPa (UHPH) en alimentos para conseguir la inactivación de microorganismos y enzimas, además de modificar las propiedades reológicas y, por supuesto, prevenir el cremado (Pereda et al., 2006; Pereda et al., 2007; Picart et al., 2006; Zamora et al., 2007; Diels, et al., 2005; Hayes et al., 2005; Hayes & Kelly, 2003a; Hayes & Kelly, 2003b; Kielczewska et al., 2003).

Otro enfoque en la aplicación de la UHPH es el efecto en los productos derivados de la leche, como son las propiedades de coagulación, la viscosidad, la estructura y la textura del gel, entre otras (Zamora et al., 2007; Serra et al., 2007, Serra et al., 2008; Pereda et al., 2008). También

se ha estudiado la inactivación de microorganismos inoculados en leche y derivados, en bebidas vegetales, en batidos y en zumo (Diels et al., 2005; Briñez et al., 2006a; Briñez et al., 2006b; Briñez et al., 2006c; Briñez et al., 2007; Cruz, et al., 2007; Serra et al., 2008; Suárez-Jacobo et al., 2010; Suárez-Jacobo et al., 2011; Polisel-Scopel et al., 2012; Valencia-Flores et al., 2013; Velázquez-Estrada, et al., 2013).

OBJETIVOS

PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS

El consumo de las bebidas de soja y de almendra está aumentando en Europa porque son útiles como alternativa a la leche de vaca para los individuos intolerantes a la lactosa, con alergia a las proteínas de la leche, o para aquellos que evitan la leche por otras razones, pero también debido a los efectos beneficiosos para la salud que se le atribuye. No hay información en la literatura acerca del efecto de la alta presión de homogeneización sobre los componentes nutritivos y bioactivos de las bebidas de soja y de almendra. Tampoco se han encontrado datos sobre el valor nutritivo y biofuncional de la bebida de almendra, a pesar de ser un producto elaborado a partir de una materia prima muy bien caracterizada nutricionalmente. Además, los componentes bioactivos más relevantes de estos productos presentan potenciales efectos beneficiosos sobre la salud.

El trabajo de esta tesis se resume en tres partes:

- 1) Estudiar los efectos de la ultra alta presión de homogeneización sobre el valor nutritivo y biofuncional de las bebidas de soja y de almendra
- 2) Estimar la exposición y el riesgo de los compuestos bioactivos más relevantes en productos derivados de la soja
- 3) Estudiar los efectos biológicos de algunos compuestos bioactivos: capacidad antioxidante de las poliaminas y estudio del metabolismo intracelular de las isoflavonas en células endoteliales

Efectos de la ultra alta presión de homogeneización sobre el valor nutritivo y biofuncional de las bebidas de soja y de almendra: Esta parte de la tesis se encuentra enmarcada dentro de un proyecto de Plan Nacional (AGL 2008-05430-C02-02), el cual pretende aplicar una tecnología emergente, la ultra alta presión de homogeneización (UHPH), para la obtención de bebidas de soja y almendra y comparar esta tecnología con las convencionalmente aplicadas a este tipo de productos (pasteurización y UHT). Este proyecto fue realizado en coordinación con el grupo del Centre Especial Planta de Tecnologia dels Aliments (CERPTA) de la Universidad Autònoma de Barcelona, y su participación en el proyecto fue estudiar las condiciones de UHPH que permitan obtener productos de buena calidad físico-químico, microbiológico y sensorial y durabilidad equiparables a los obtenidos por tratamientos térmicos convencionales de pasteurización y esterilización. Nuestro objetivo fue estudiar el efecto que estos tratamientos provocaban sobre una serie de parámetros nutritivos y biofuncionales previamente seleccionados.

Estimación de la exposición y del riesgo de algunos de los compuestos bioactivos en productos derivados de la soja. La soja es una fuente de isoflavonas, cuyo consumo presenta potenciales efectos beneficiosos para la salud, asociados a una mejora de los síntomas menopáusicos en mujeres y a una reducción del riesgo de sufrir algunas enfermedades, como las cardiovasculares. Por otra parte, el consumo de estos compuestos por los lactantes podrían tener efectos endocrinos significativos sobre el desarrollo y el sistema reproductor de los infantes. A su vez, los productos derivados de la soja, especialmente los fermentados, pueden contener niveles elevados de aminas biógenas, que pueden suponer un riesgo para la salud.

Efectos biológicos de algunos compuestos bioactivos. Las poliaminas son compuestos naturales que, entre sus numerosas funciones en diversos procesos metabólicos fundamentales, cuenta con un papel reconocido como antioxidantes contra el estrés oxidativo celular. Por otro lado, el metabolismo intracelular de las isoflavonas en células endoteliales pueden resultar importantes en los mecanismos de acción cardioprotectores en el sistema vascular. Esta parte fue realizada como complemento de formación ligado a una estancia predoctoral en el grupo de investigación de Nutrición Molecular de la Universidad de Reading (UK) con el objetivo de aprender técnicas moleculares con cultivos celulares.

En concreto los **OBJETIVOS** a desarrollar fueron:

1.1) Estudiar la composición nutritiva y biofuncional de bebidas de soja y almendra y compararla con la leche de vaca.

1.2) Evaluar el efecto de la ultra alta presión de homogeneización sobre los compuestos nutritivos y bioactivos en las bebidas de soja y almendra y compararlo con los tratamientos térmicos convencionales.

1.3) Estudiar la estabilidad de algunos compuestos bioactivos (isoflavonas, fitoesteroles y tocoferoles) y de la calidad proteica (en términos de digestibilidad y de disponibilidad de la lisina) de la bebida de soja pasteurizada y esterilizada por UHPH comparada con la de los tratamientos térmicos.

2.1) Estudiar la exposición y el riesgo del consumo de las aminas biógenas en productos fermentados y no fermentados derivados de la soja.

2.2) Comparar el aporte de isoflavonas derivado del consumo de productos derivados de la soja con el de los complementos alimenticios y estudiar en qué medida se alcanzan los valores recomendados para sus efectos beneficiosos en la menopausia y en la reducción de la hipercolesterolemia.

2.3) Estimar el riesgo asociado al consumo de fórmulas infantiles a base de soja por lactantes de 0 a 6 meses.

3.1) Evaluar *in vitro* la capacidad antioxidante de las poliaminas y su mecanismo de acción.

3.2) Estudiar el metabolismo intracelular de las isoflavonas en las células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC), usando hepatocitos HepG2 y células intestinales Caco-2 en monocapa como controles positivos.

MATERIAL Y MÉTODOS

METODOLOGÍA ANALÍTICA

6.1. Composición centesimal básica

6.1.1. Extracto seco

Para determinar el extracto seco de las muestras líquidas, las muestras se congelaron a -80°C durante a 24h, y posteriormente fueron liofilizadas en un liofilizador (Telstar, Cryodos, Terrassa, Spain). El contenido acuoso se determinó para poder expresar los resultados en peso seco.

6.1.2. Contenido de proteína

La determinación del contenido del nitrógeno total se realizó mediante el método Kjeldahl descrito en los métodos de la AOAC (2001.11). El método de Kjeldahl consta de las siguientes etapas: 1) la mineralización o digestión con ácido sulfúrico concentrado de la muestra, transformando el nitrógeno orgánico en iones amonio, 2) la destilación del amoniaco y, 3) la valoración volumétrica ácido-base del nitrógeno destilado.

Para calcular el contenido de proteínas de la soja y sus productos derivados, el contenido del nitrógeno total fue multiplicado por el factor de conversión específico de 5.71. Y para el contenido de proteínas de la bebida de almendra, se utilizó el factor de conversión de 5.18 (FAO, 1970).

6.1.3. Contenido total de grasa

La determinación del contenido de grasa se realizó mediante el método Soxhlet (AOAC, 2000). Se basa en una extracción semicontinua de la grasa con un disolvente orgánico, el cual se calienta, se volatiliza y condensa goteando sobre la muestra la cual queda sumergida en el disolvente. El contenido de grasa se cuantifica por diferencia de peso.

6.1.4. Contenido total de cenizas

El contenido total de cenizas se determinó mediante el método oficial de la AOAC (2000). El método se basa en la destrucción de la materia orgánica presente en la muestra por calcinación y determinación gravimétrica del residuo.

6.1.5. Determinación de la fibra dietética

El contenido total de fibra dietética se determinó mediante el kit comercial de Sigma Co (St. Louis, MO, USA) basado en el método de la AOAC (2000). Este método se basa en la determinación gravimétrica del residuo resultante de la digestión enzimática de las muestras. Brevemente, las muestras se gelatinizan con la enzima α -amilasa térmicamente estable, y posteriormente digeridas enzimáticamente con las enzimas proteasa y amiloglucosidasa para eliminar la proteína y el almidón. La fibra soluble se precipita por la adición de etanol, el residuo se filtra, se lava con acetona, se seca y se pesa.

$$\text{Fibra dietética total} = \text{Peso del residuo} - \text{Peso (proteína + cenizas)}$$

6.1.6. Determinación de sacarosa

El contenido de sacarosa se determinó mediante el kit comercial de Sigma Co (St. Louis, MO, USA). Este método se basa en la determinación enzimática cuantitativa de la sacarosa. La sacarosa se hidroliza en glucosa y fructosa por la acción de la enzima invertasa. La glucosa y la fructosa son fosforiladas por la trifosfato de adenosina (ATP) en la reacción catalizada por la hexoquinasa. A continuación, la glucosa-6-fosfato (G6P) se oxida a 6-fosfogluconato en presencia de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD) en una reacción catalizada por la deshidrogenasa de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH). Durante esta oxidación, una cantidad equimolar de NAD es reducida a NADH. El aumento de la absorbancia a 340 nm es directamente proporcional a la concentración de sacarosa.

6.1.7 Valores de pH

El pH se determinó mediante la lectura directa del potencial eléctrico creado en la membrana de un electrodo de vidrio (Crison®, modelo Xerolyt).

6.2. Determinación de los componentes nutritivos

6.2.1. Determinación de aminoácidos

6.2.1.1. Determinación de aminoácidos totales

El método seleccionado para la determinación de los aminoácidos totales fue la cromatografía de intercambio catiónico y derivatización post-columna con ninhidrina.

Preparación de la muestra: Las muestras (5 mL) se pesan en tubos Pyrex de 10 mL con tapón de rosca y junta de teflón. Se añaden 5 mL de HCl 12N y se agita. Se borbotea nitrógeno durante 1 minuto para crear una atmósfera inerte. La hidrólisis ácida se lleva a cabo a 110 °C durante 23 h. A continuación se deja enfriar a temperatura ambiente. Los hidrolizados se pasan por filtros de papel humedecidos. Se añade 75 µL de disolución madre de patrón interno (norleucina, NLE) 2,5mM a 250 µL del hidrolizado. La disolución se evapora a sequedad y se redissuelve en 1 mL de tampón de citrato a pH 2,2. Posteriormente se inyecta 60 µL en el cromatógrafo.

La separación cromatográfica de los aminoácidos se realiza mediante elución con tampones de citrato de litio con pH y fuerza iónica creciente según las recomendaciones del fabricante del instrumento, derivatización post-columna con ninhidrina y detección simultánea a 440 y 570 nm (siguiendo el método de Spackman, Moore y Stein, 1958). Se utiliza un analizador de aminoácidos modelo Biochrom 30 (Biochrom, UK).

6.2.1.1. Determinación de triptófano

El triptófano se determinó por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) en fase reversa con detección UV sin derivatización previa, tras una hidrólisis básica (Viadel et al., 1999).

Preparación de la muestra: Las muestras (0.087 g proteína) se pesan en un tubo Pyrex de 10 mL con tapón de rosca y junta de teflón. Se añaden 2.625 g de hidróxido de bario octahidratado y 5 mL de agua a 100 °C. La mezcla se agita en vortex. Se burbujea nitrógeno durante 2 minutos manteniendo los tubos en el baño de ultrasonidos y se lleva a 120 °C durante 8 horas. El hidrolizado se pasa por filtros de papel humedecidos y el filtrado se recoge en matraces aforados de 25 mL. Se deja enfriar a temperatura ambiente, se ajusta el pH a 4-6

con HCl 18.5% (v/v) utilizando papel indicador del pH y el volumen se completa a 25 mL con agua destilada. El contenido del matraz aforado se transfiere a tubos de polipropileno de 50 mL y se centrifuga a 3000g y 25 °C durante 10 minutos. El sobrenadante filtrado (filtros de 0.45 µm) se inyecta directamente en el cromatógrafo.

La determinación de triptófano se realiza mediante el sistema de HPLC (Waters 474 plus, Milford, MA) y detección UV a 280 nm. La columna es una Nova-Pack C18 (3,9 x 150mm, 4 µm) (Waters Cromatografía), que se mantiene a 25 °C durante el análisis. El flujo es de 1 mL/min y el volumen de inyección es de 20 µL. La separación se realiza de manera isocrática con la fase móvil formada por acetato sódico anhidro 0,01 M y 10% acetonitrilo ajustado a pH 5.8 con ácido acético glacial 1M.

6.2.2. Determinación de ácidos grasos

Los ácidos grasos se determinaron por cromatografía de gases (CG) y detección de espectrometría de masas.

Preparación de la muestra: primero, se liofilizan las muestras en un liofilizador (Telstar, Cryodos, Terrassa, Spain). Luego, se realiza una extracción de la grasa tres veces a partir de 100 mg de muestra liofilizada con 10 mL de una mezcla de cloroformo-metanol (2:1 v/v) con ácido acético al 5%. El extracto se lleva a sequedad en un rotavapor a temperatura ambiente. Se añade 100 µL de metil-nonadecanoato (10.000 mg/L) como patrón interno. Los ésteres metílicos de los ácidos grasos (FAMES) se preparan a partir de la grasa extraída de acuerdo a la UNE-55-004-73.

La determinación cromatográfica de los FAMES se realiza mediante un sistema de CG Thermo Trace GC Ultra system (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) equipado con una columna BPX70 (30 m x 0.25 mm d.i. x 0.25 µm) con helio como gas transportador, acoplado a un espectrómetro de masas Thermo ITQ 900. El inyector automático trabaja sin split. El volumen de inyección es de 1 µL. La temperatura del inyector es de 260 °C. El programa de temperatura del horno comienza a 70 °C durante 1 min, seguido de una rampa de 4 °C/min hasta 240 °C donde se mantiene la temperatura 5 minutos. Se utiliza un detector de masas opera con una fuente de ionización a 200 °C, realizando un barrido de 35 a 350 m/z 2 veces por segundo.

6.2.3. Determinación de tocoferoles

La determinación de tocoferoles se llevó a cabo mediante cromatografía líquida de ultra alta presión (UHPLC) y detección UV.

Preparación de la muestra: la preparación de la muestra se realiza siguiendo el método descrito por Alves, Casal y Oliveira (2009), ligeramente modificado. Primero, se liofilizan las muestras en un liofilizador (Telstar, Cryodos, Terrassa, Spain). Luego, se disuelve 0,2 g de muestra liofilizada en 1,25 mL de agua desionizada. Se añade 20 µL de acetato de α -tocoferol (1000 mg/L) como patrón interno, 0,125 mL de ácido ascórbico (100 mg/L) como antioxidante para prevención de la oxidación de los tocoferoles durante el procedimiento de extracción, y 2,5 mL de metanol. Después de la homogenización, se realiza tres veces la extracción de los tocoferoles con 1,5 mL de hexano-acetato de etilo (90:10). Se recoge la fase orgánica y se lleva a sequedad bajo una corriente de nitrógeno. El residuo se redisuelve en 750 µL de diclorometano-metanol (2:1) para el análisis cromatográfico. El procedimiento se realiza en ausencia de luz y utilizando material opaco.

La separación cromatográfica de α -, γ - and δ -tocopherol se lleva a cabo en Waters Acquity Ultra Liquid Chromatographic System (UPLC™) (Milford, MA, USA). Las muestras se filtran por a 0.22 µm (GHP, Waters Corp, Milford, MA) y se inyecta 1 µL en una columna de fase reserva Acquity UPLC™ EH C18 1,7 µm (2,1 mm×50 mm) (Waters corp., Milford, MA, USA), que se mantiene a temperatura de 30 °C. El sistema UPLC consiste en una bomba binaria y un inyector automático con un detector de fotodiodo (Waters 2996, Milford, MA), el cual es programado a 292 nm. La óptima separación se realiza de modo isocrático con 100% de la fase móvil, la cual consiste en acetonitrilo-metanol (60:40) a un flujo constante de 0,6 mL/min.

6.3. Determinación de los compuestos bioactivos

6.3.1. Determinación de isoflavonas

Las isoflavonas se determinaron por UHPLC en fase reversa con detección UV (Toro-Funes et al., 2012).

Preparación de la muestra: la extracción de las isoflavonas se basa en el procedimiento descrito por Kao y Chen (2002). Según el contenido de isoflavonas, se pesan entre 0,5 y 5 g de muestra en un tubo de centrifuga y se añaden 5 mL de acetona-ácido hidroclicóric 0,1N (5:1 v/v). La mezcla se deja en un plato magnético en agitación durante 2 h a temperatura ambiente. Después, se centrifuga a 6.000 rpm a 25 °C durante 20 minutos. El sobrenadante se evapora a sequedad a 35 °C con un rotavapor, y se redisuelve con 5 mL de metanol. Antes del análisis por UHPLC, los extractos se pasan por filtros de 0,22 µm (GHP, Waters Corp, Milford, MA).

La determinación cromatográfica simultánea de 12 isoflavonas se realiza mediante el sistema UHPLC (Waters Acquity System, Milford, MA, USA) y detector fotofiodo (Waters 2996, Milford, MA) a 262 nm. La separación cromatográfica se lleva a cabo en una columna Acquity UPLC EH C18 1,7 µm (2,1 mm x 50 mm) (Waters corp., Milford, MA, USA), que se mantiene a 35 °C. Las fases móviles se componen de acetonitrilo con ácido acético al 1% (Fase A) y agua con ácido acético al 1% (Fase B). El gradiente de elución empleado consiste en: un gradiente lineal de 10 a 12% de A, 0-1 min; gradiente lineal de 12 a 22 % A, 1-3 min; gradiente lineal de 22 a 23% A, 3-4 min; gradiente lineal de 23 a 35% A, 4-5 min; gradiente lineal de 35 a 50% A, 5-6 min; gradiente lineal hasta alcanzar las condiciones iniciales en 2 min. El flujo es de 0,6 mL/min y el volumen de inyección es de 2 µL.

6.3.2. Determinación de fitoesteroles

Los fitoesteroles se determinaron por CG y detección de espectrometría de masas.

Preparación de la muestra: primero, se liofilizan las muestras en un liofilizador (Telstar, Cryodos, Terrassa, Spain). Luego, se realiza una extracción de la grasa tres veces a partir de 100 mg de muestra liofilizada con 10 mL de una mezcla de cloroformo-metanol (2:1 v/v) con ácido acético al 5%. El extracto se lleva a sequedad en un rotavapor a temperatura ambiente. Se añade 20 µL de 5- α -colestano (1.000 mg/L) como patrón interno. Los fitoesteroles se preparan a partir de la grasa extraída de acuerdo a la European Pharmacopoeia (01/2008:20423).

La determinación simultánea del campesterol, stigmasterol, stigmastanol, fucosterol, Δ^5 -avenasterol y β -sitosterol (Sigma S.A.) se realiza mediante un sistema de CG Thermo Trace GC

Ultra system (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) equipado con una columna BD-5 MS (30 m x 0,25 mm d.i. x 0,25 μm) con helio como gas transportador, acoplado a un espectrómetro de masas Thermo ITQ 900. El inyector automático opera en modo pulsado splitless. El volumen de inyección es de 1 μL . La temperatura del inyector es programada a 270 $^{\circ}\text{C}$ y el programa de temperatura del horno comienza a 70 $^{\circ}\text{C}$ durante 0,5 min, seguido de una rampa de 20 $^{\circ}\text{C}$ hasta 210 $^{\circ}\text{C}$ donde se mantiene la temperatura 0,5 minutos, y finalmente una rampa de 3 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ hasta 300 $^{\circ}\text{C}$ donde se mantiene la temperatura 10 minutos. Se utiliza un detector de masas opera con una fuente de ionización a 200 $^{\circ}\text{C}$, realizando un barrido de 50 a 550 m/z 3 veces por segundo.

6.3.3. Determinación de aminas biológicamente activas

Las aminas biógenas y poliaminas fueron determinadas por UHPLC, con derivatización post-columna y detección de fluorescencia (Waters Acquity System, Milford, MA, USA) siguiendo el método descrito y validado por Latorre-Moratalla y col. (2009).

Preparación de la muestra: según el contenido de aminas biológicamente activas, se pesan entre 5 y 10 g de muestra en un tubo de centrifuga. Se añade 9 mL de una solución de ácido perclórico 0,6 M y se deja en agitación durante 20 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se centrifuga durante 20 minutos a 10.000 rpm a 4 $^{\circ}\text{C}$. El sobrenadante se recoge en un matraz de 25 mL. El procedimiento se repite de igual manera y se ajusta el volumen final a 25 mL. Antes del análisis por UHPLC, los extractos se pasan por filtros de 0,22 μm (GHP, Waters Corp, Milford, MA).

La determinación cromatográfica simultánea de 12 aminas biógenas y poliaminas se realiza mediante el sistema UHPLC (Waters Acquity System, Milford, MA, USA), acoplado a una bomba post-columna y detector fluorescencia (Waters 2475). La separación cromatográfica se lleva a cabo en una columna Acquity UPLC EH C18 1,7 μm (2,1 mm x 50 mm) (Waters corp., Milford, MA, USA), que se mantiene a 42 $^{\circ}\text{C}$. El volumen de inyección es de 1 μL . La detección fluorimétrica se realiza a 340 nm de excitación y 445 nm de emisión.

A continuación se muestran la composición de las fases móviles y del reactivo de derivatización, y el gradiente de elución lineal.

Eluyente A:

Acetato sódico 0,1 M
octanosulfonato sódico 10 mM; pH 4,8.

Eluyente B:

Eluyente A : acetonitrilo (6,6:3,4); pH 4,5.

Flujo de la fase móvil (A:B): 0,8 mL/min

Programa de elución:

0 min = A:B (80:20); 2 min = A:B (80:20);
3 min = A:B (60:40); 4 min = A:B (50:50);
5 min = A:B (40:60); 6 min = A:B (20:80);
6,40 min = A:B (80:20); 7 min = A:B (80:20)

Flujo del reactivo derivatizante:

0,4 mL/min

Reactivo de derivatización:

31 g/L de ácido bórico
26,2 g/L de hidróxido sódico
0,2 g/L de *orto*-ftaldehído en 5 mL de metanol
3 mL/L de 2-mercaptoetanol
3 mL/L de éter de polioxietilenaúrico al 30%.

6.4. Determinación de parámetros de calidad proteica

6.4.1. Determinación de furosina

La furosina se determina por HPLC en fase reversa con detección UV a 280 nm, según el método descrito por según el método descrito por Ferrer et al. (2000).

Preparación de la muestra: Se pesan alícuotas de muestra que correspondan a 40-50 mg de proteína, en tubos Pyrex de 10 mL con tapón de rosca y junta de teflón. Se añaden 8 mL de HCl 8N y se burbujea nitrógeno durante 1 minuto. La muestra se hidroliza a 110 °C durante 23 h. A continuación, se pesan los tubos y se añade, si es necesario, la cantidad suficiente de HCl 8N para recuperar el peso previo a la hidrólisis. El hidrolizado se filtra, recogiendo en tubos opacos. Se toma 1 mL del filtrado y se le añaden 4 mL de HCl 3N (1-2 µg proteínas/µL). Se realiza entonces una extracción en fase sólida; para ello, se añaden 0,5 mL del hidrolizado diluido a un cartucho Sep-Pak C₁₈ plus, acondicionado previamente con 5 mL de metanol y 10

mL de agua, y se descarta el extracto. La furosina se eluye con 3 mL de HCl 3N y se lleva a sequedad con el sistema de vacío a 43 °C, disolviendo el residuo en 2 mL de fase móvil. Tras filtrar (0,45 µm), se inyecta en el cromatógrafo.

La determinación cromatográfica de la furosina se realiza mediante el sistema de HPLC (Waters 474 plus, Milford, MA). La columna es una Nova-Pack C18 (3,9 x 150mm, 4 µm) (Waters Cromatografía), que se mantiene a 25 °C. El flujo es de 0,8 mL/min y el volumen de inyección, de 20 µL. La separación se realiza de modo isocrático con 100% de la fase móvil, la cual consiste en heptanosulfonato de sodio 5 mM, 20% de acetonitrilo y 0.2% de ácido fórmico, de preparación diaria.

El porcentaje de lisina bloqueada puede calcularse a partir del contenido de furosina y el valor inicial de lisina determinada por HPLC en la muestra, con la expresión:

$$\% \text{ bloqueo} = (3.1 \cdot \text{furosina} \cdot 100) / (\text{lisina por CLAR} + 1.86 \cdot \text{furosina})$$

Esta fórmula se utiliza cuando en la determinación de furosina la hidrólisis se realiza con HCl 6 M (Bujard y Finot, 1978; Finot et al., 1981; Pizzoferrato et al., 1998).

6.4.2. Determinación del porcentaje de digestibilidad "in vitro" de las proteínas

La digestibilidad de las proteínas se realiza mediante un método enzimático descrito por Hsu y col. (1977) que involucra el uso de tripsina pancreática, quimotripsina bovina y peptidasa porcina intestinal.

Procedimiento: la solución multienzimática (1,6 mg tripsina, 3,1 mg quimotripsina y 1,3 mg peptidasa/mL) se mantiene en hielo y se ajusta a pH 8.0 con HCl y /o NaOH 0,1N. 50 mL de una solución acuosa de 1 mg de nitrógeno/mL de muestra liofilizada se ajusta a pH 8,0 a 37 °C en agitación. Se añade 5 mL de la solución multienzimática a la solución proteica y se mantiene a 37 °C en agitación. Después de 10 min, se mide el pH, el cual desciende debido a la liberación de los grupos carboxílicos de las uniones peptídicas hidrolizadas por las enzimas. El valor de la digestibilidad es calculado de acuerdo a la fórmula:

$$\% \text{ Digestibilidad} = 210.46 - 18.10 \cdot (\text{pH a los 10 min})$$

6.5. Parámetros de oxidación lipídica

6.5.1. Determinación del Índice de peróxidos

El índice de peróxidos se determinó empleando el procedimiento espectrofotométrico basado en la capacidad de los peróxidos en oxidar los iones ferrosos a iones férricos para determinar el valor de peróxido (PV) por Hornero Méndez y col (2001). La absorbancia se midió a 500 nm en cubeta de vidrio en un espectrofotómetro UV-VIS (Shimadzu UV-160A, Kyoto, Japón). Los resultados se expresaron miliequivalentes de peróxido por kilogramo de muestra.

6.6.2. Determinación de los Coeficientes específicos de extinción K_{232} , K_{270} y K_{280} (Compuestos conjugados)

Los coeficientes específicos de extinción K_{232} , K_{270} y K_{280} sirven para estimar la concentración de dienos, trienos y carbonilos conjugados respectivamente. Estos coeficientes se determinaron mediante el método oficial de la Unión Europea EEC/2568/1991 para el aceite de oliva, adaptado en nuestro laboratorio para el aceite de soja (Reglamento EEC/2568/91 European Commission). Brevemente, una alícuota de 0,05-0,1 g del aceite se diluyó a un volumen final de 20 mL con ciclohexano. La absorbancia se midió a 232 nm para los dienos conjugados (K_{232}), a 270 nm para los trienos conjugados (K_{270}), y a 280 nm para los carbonilos conjugados (K_{280}).

6.5.3. Determinación de las especies reactivas del Ácido Tiobarbitúrico (Compuestos carbonílicos)

Para medir las especies reactivas al ácido barbitúrico (TBARS) se usó el método oficial de la AOCS Cd 19-90. Brevemente, una alícuota de 0,05-0,1 g de muestra se diluyó hasta 25 mL en 1-butanol. 5mL de la solución de la muestra y 5 mL de una solución de TBA (200 mg de ácido 2-tiobarbitúrico en 100 mL de 1-butanol) se transfirieron a un tubo de cierre hermético, y se incuban a 95 °C durante 120 minutos en un baño de agua. Finalmente, se midió la absorbancia

a 530 nm frente a agua ultrapura y los resultados se expresaron como equivalentes de malonaldehído en $\mu\text{g/g}$ de aceite.

6.5.3. Determinación del Índice de estabilidad oxidativa

El índice de estabilidad oxidativa se determinó mediante la formación de compuestos volátiles utilizando un equipo Rancimat, modelo 679 (Metrohm, Herisau, Suiza), siguiendo el Método Oficial AOCS Cd 12b-92 (AOCS. American Oil Chemists Society, 2009). Alícuotas de 2,5-3 g se transfirieron a tubos de reacción y se calientan a 100 °C, con un flujo de aire de 15 L/h. El índice de estabilidad del aceite (OSI) (tiempo de inducción) se define como el cambio máximo de la velocidad de oxidación de las muestras o, matemáticamente, como el máximo de segunda derivada de la conductividad respecto al tiempo. Los resultados se expresaron como factor de protección (FP), que se calcula de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\text{FP} = \text{OSI}_s / \text{OSI}_0$$

donde OSI_s y OSI_0 son las OSI de la muestra y de control, respectivamente.

6.5.4. Determinación de la Capacidad antioxidante global

La capacidad antioxidante se determinó por el método del secuestro del radical estable 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) según el método descrito por Odriozola-Serrano, Soliva-Fortuny y Martín-Belloso (2008). La absorbancia se midió a 515 nm en un espectrofotómetro UV-vis UV-160A (Shimadzu, Kyoto, Japón). Los resultados se expresaron como micromoles de equivalente de Trolox por kg de muestra.

6.6. Cultivos celulares

Los cultivos celulares se realizaron con *células* endoteliales de la vena de *cordón umbilical* humano (HUVEC) (Lonza, UK), *células* de hepatocarcinoma humano (Hep-G2) (ATCC, US) y *células* de adenocarcinoma de colon (Caco-2) (ECACC, UK) mantenidos a 37 °C con una concentración del 5% de CO_2 en una atmósfera humidificada.

6.6.1. HUVEC

Las células HUVEC se suplementaron con medio de cultivo endotelial, el cual consiste en: de suero fetal bovino inactivado (10 mL) más suplementos [hEGF (0,5 mL), hidrocortisona (0,2 mL), GA-1000 (Gentamicina, Anfotericina-B) (0,5 mL), VEGF (0,5 mL), hFGF-B (2 mL), R3-IGF-1 (0,5 mL), ácido ascórbico (0,5 mL), heparina (0,5 mL) en 500 mL de medio celular basal sin rojo fenol. El medio de cultivo se cambió cada 2-3 días. Las células HUVEC se subcultivaron a partir de los pases 2-3 en placas de petri (diámetro 100 mm) hasta una confluencia de 80-90%, aproximadamente $0,5-1 \times 10^6$ células/placa.

6.6.2. HepG2

Estas células se suplementaron con el medio Dulbecco's modified Eagle's F-12 con la adición de glutamina (5 mL), de suero fetal bovino inactivado (50 mL) y una solución de antibiótico/antimicótico al 1% (5 mL), por cada 500 mL de medio. El medio de cultivo se cambió cada 2-3 días. Las células se subcultivaron en placas de petri (diámetro 100 mm) hasta una confluencia de 80-90%, aproximadamente $0,5-1 \times 10^6$ células/placa.

6.6.3. Caco-2

Estas células se suplementaron con el medio Dulbecco's modified Eagle's con adición de glutamina (5 mL), de suero fetal bovino inactivado (50 mL), de aminoácidos no esenciales (1%), penicilina (100 U/mL), y estreptomina (100 lg/mL), por cada 500 mL de medio. Las células Caco-2 se subcultivaron en placas de cultivo de 6 pocillos con insertos de membrana de poro de 0,4 mm y diámetro de 24 mm, hasta una $2-2,5 \times 10^5$ células/inserto. Después en 20-22 días las células se diferenciaron en monocapas celulares. La integridad de las membranas se comprobó mediante la medida de la resistencia eléctrica transepitelial a través de la monocapa (TEER), usando un volímetro Millicell-ERS (Millipore Co., Bedford, MA).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7

VALOR NUTRITIVO Y BIOFUNCIONAL DE LAS BEBIDAS DE SOJA Y DE ALMENDRA

Este capítulo recoge dos trabajos que pretenden caracterizar la bebida de soja y de almendra desde un punto de vista nutricional y biofuncional. En el primer trabajo se desarrolla y valida un método analítico por cromatografía líquida de ultra alta presión y detección UV que permite la determinación simultánea de 12 isoflavonas, que son unos de los compuestos bioactivos más relevantes de la soja. La bebida de soja es el producto derivado de la soja más consumido por la población mundial. En el segundo trabajo se estudian sus componentes nutricionales y compuestos bioactivos y se comparan con la bebida de almendra, sustitutivo tradicional de la leche de vaca en el área del Mediterráneo.

7.1. Desarrollo y validación de un método de cromatografía líquida rápida de alta resolución (UHPLC) para la determinación de isoflavonas libres y conjugadas presentes en la soja

Artículo I.

N. Toro-Funes, I. Odriozola-Serrano, J. Bosch-Fuste, M.L. Latorre-Moratalla, M.T. Veciana-Nogues, M. Izquierdo-Pulido, M.C. Vidal-Carou. (2012). Fast simultaneous determination of free and conjugated isoflavones in soy milk by UHPLC-UV. *Journal of Food Chemistry*, 135, 2832-2838.

Índice de impacto (JCR 2012): 3.334

Posición en área "Food and Science Technology": 10/124

7.1.1. Planteamiento y objetivo del estudio

La determinación analítica de las isoflavonas en los productos a base de soja ha sido realizada mediante una amplia variedad de técnicas, incluyendo espectrofotometría (César et al., 2008; Kotenko, et al., 1993), electroforesis capilar (Mellenthin y Galensa, 1999; Micke, et al., 2006), análisis inmunológico (Dentith y Lockwood, 2008), cromatografía líquida (Apers et al., 2004; Prabhakaran et al., 2005), cromatografía gaseosa (Ghosh y Fenner, 1999) y cromatografía de capa fina (César et al., 2007). Muchos de estos métodos determinan la cantidad de agliconas liberadas después de una hidrólisis enzimática (Liggins, et al., 1998), hidrólisis ácida fuerte (Mazur et al., 1996) o saponificación (Klump et al., 2001). Por lo tanto, estos métodos son útiles solamente para la determinación del contenido total de las agliconas pero no de los diferentes conjugados de éstas.

La cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), acoplada a diferentes técnicas de detección, es el procedimiento más usado para la determinación simultánea de las agliconas y sus correspondientes β -glucósidos en productos a base de soja (Peñalvo et al., 2004a). Aunque la técnica de HPLC tiene algunas ventajas respecto a la especificidad y la sensibilidad que otras

técnicas, el tiempo requerido es relativamente largo (de 20 a 80 min). En los últimos años ha aparecido una nueva técnica, la cromatografía líquida rápida de alta resolución (UHPLC) que, en comparación con la HPLC, reduce notablemente el tiempo de análisis, a la vez que aumenta la resolución y la sensibilidad (Yang y Hodges, 2005).

El objetivo de este trabajo fue el desarrollo y la optimización de un método rápido y preciso para la determinación de isoflavonas en bebida de soja mediante UHPLC y detección UV.

7.1.2. Diseño experimental

La fiabilidad del método para la determinación de las isoflavonas en bebida de soja mediante UHPLC/UV se validó en términos de linealidad, sensibilidad, precisión y exactitud. La validación del método se realizó mediante el uso de patrones comerciales de las agliconas y de sus formas β -glucosiladas. La identificación de las formas conjugadas de las isoflavonas se llevó a cabo mediante un espectrómetro de masas LQT Orbitrap.

7.1.3. Resultados y discusión

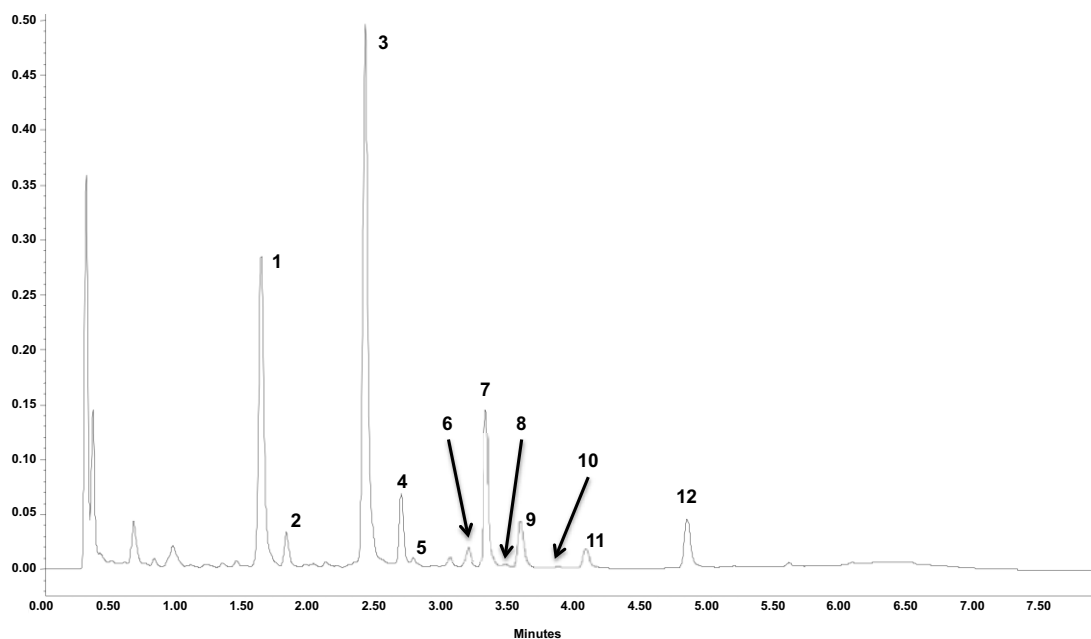
El método de UHPLC desarrollado permite determinar un total de 12 isoflavonas presentes en la bebida de soja en menos de 8 minutos de elución cromatográfica (Figura 7.1.1). Esto representa una importante reducción de tiempo respecto al que requieren los métodos mediante HPLC.

Identificación y cuantificación

La elevada sensibilidad del LQT Orbitrap permitió la identificación de 12 isoflavonas, agliconas (De, Ge y Gle), sus correspondientes formas glucosiladas (DI, GI y GLY), y sus conjugados acetiles y maloniles de las formas glucosiladas (MDI, MGI, MGLY, ADI, AGI y AGLY). Los espectros de masas de los conjugados acetiles y maloniles de las formas glucosiladas de las isoflavonas se muestran en la Figura 7.1.2. La cuantificación de las agliconas y de los β -glucósidos en las muestras se realizó por el método del patrón externo construyendo sus

correspondientes rectas de calibrado. La cuantificación de cada conjugado acetil y malonil se realizó tomando como referencia la respuesta de su correspondiente aglicona.

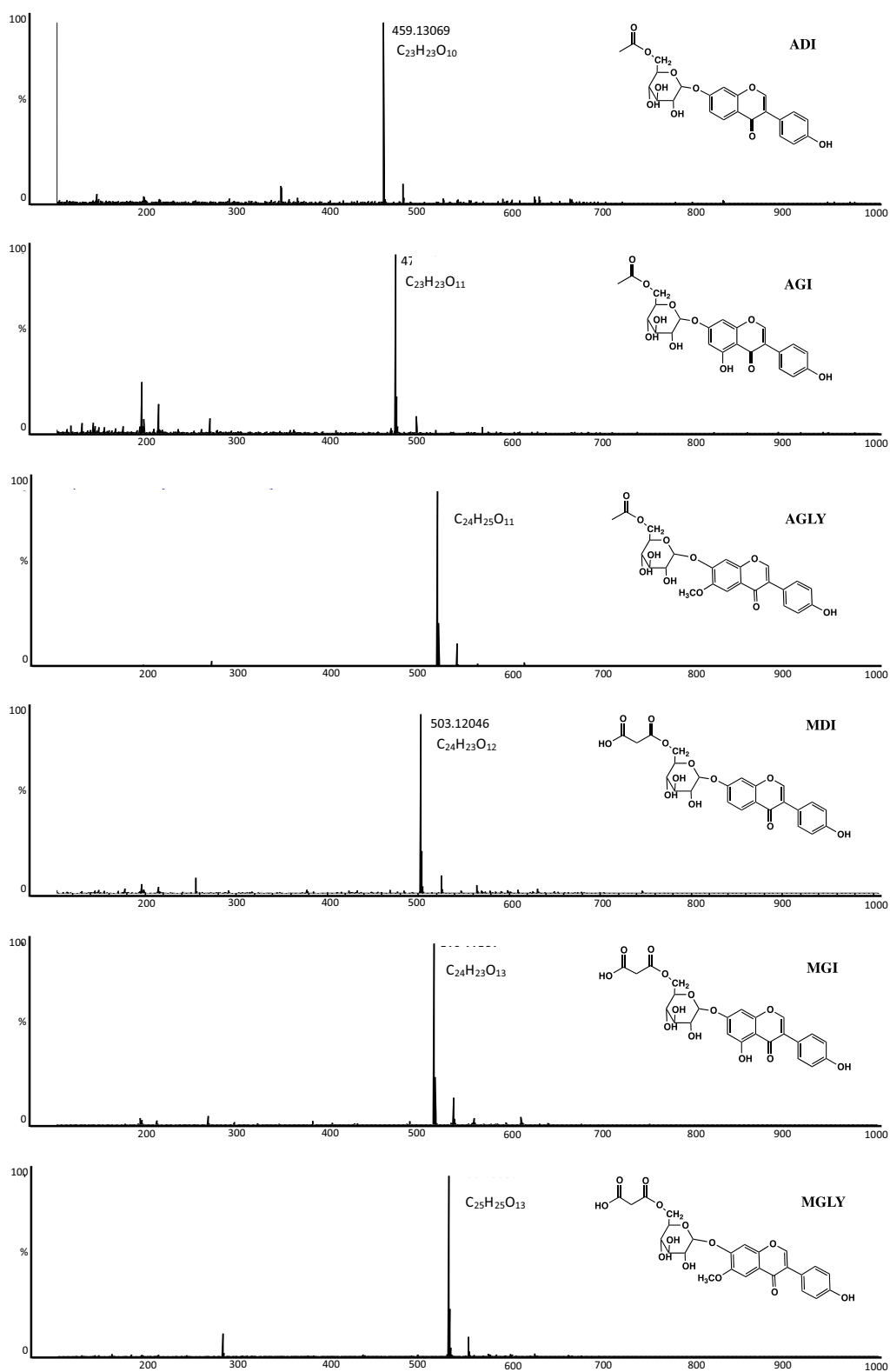
Figura 7.1.1. Cromatograma de las isoflavonas de bebida de soja por UHPLC-UV. 1: Daidzina, 2: Glicitina, 3: Genistina, 4: Malonil-daidzina, 5: Malonil-glicitina, 6: Acetil-daidzina, 7: Malonil-genistina, 8: Acetil-glicitina, 9: Daidzeína, 10: Gliciteína, 11: Acetil-genistina y 12: Genisteína.



Validación del método

La linealidad del método se observa en un intervalo de 0,1 a 5 $\mu\text{L/mL}$ (coeficiente de correlación de $R \geq 0.9980$, para las agliconas y sus formas β -glucosiladas). La sensibilidad, en términos de límite de detección ($< 0,05 \mu\text{L/mL}$) y de determinación ($< 0,17 \mu\text{L/mL}$), se consideró muy satisfactoria. La precisión, evaluada en términos de repetitividad, y expresada como desviación estándar relativa, fue en todos los casos inferior al 5%. Los resultados de repetitividad fueron satisfactorios de acuerdo con el criterio de Horwitz para estudios intralaboratorio (Horwitz, 1982). La recuperación media de todas las isoflavonas, agliconas y sus formas β -glucosiladas, fue superior al 95%.

Figura 7.1.2. Espectro de masa exacta de acetil-daizina (ADI), acetil-genistina (AGI), acetil-glycitina (AGLY), malonil-daizina (MDI), malonil-genistina (MGI) y malonil-glycitina (MGLY).



7.1.3. Aportaciones más relevantes

- ✓ El método de UHPLC descrito se muestra como un procedimiento fiable para la determinación de 12 isoflavonas en la bebida de soja, mostrando una linealidad, sensibilidad, precisión y exactitud muy satisfactorias.
- ✓ El tiempo de elución cromatográfica del método propuesto (8 minutos) implica una reducción considerable del tiempo de análisis en comparación con los procedimientos por HPLC descritos hasta la fecha.
- ✓ Hasta donde llega nuestro conocimiento, este es el primer método de UHPLC con detección UV para la determinación simultánea de 12 isoflavonas presentes en la bebida de soja.

Artículo I.

N. Toro-Funes, I. Odriozola-Serrano, J. Bosch-Fuste, M.L. Latorre-Moratalla, M.T. Veciana-Nogues, M. Izquierdo-Pulido, M.C. Vidal-Carou. (2012). Fast simultaneous determination of free and conjugated isoflavones in soy milk by UHPLC–UV. *Journal of Food Chemistry*, 135, 2832-2838.

Índice de impacto (JCR 2012): 3,334

Posición en área “Food and Science Technology”: 10/124



Analytical Methods

Fast simultaneous determination of free and conjugated isoflavones in soy milk by UHPLC–UV

N. Toro-Funes, I. Odriozola-Serrano, J. Bosch-Fusté, M.L. Latorre-Moratalla, M.T. Veciana-Nogués, M. Izquierdo-Pulido, M.C. Vidal-Carou*

Department of Nutrition and Food Science-XaRTA, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, Av. Joan XXII s/n, Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 May 2011

Received in revised form 23 February 2012

Accepted 7 June 2012

Available online 26 June 2012

Keywords:

UHPLC–UV method

Isoflavones

Validation

Soy milk

ABSTRACT

Ultra high pressure liquid chromatography (UHPLC) has become a widely used technique in separation science as it can shorten analysis time while maintaining resolution and increasing sensitivity. Here we developed a UHPLC method with UV detection for the simultaneous determination of isoflavone aglycones (daidzein, glycitein and genistein), their corresponding glycoside forms (daidzin, glycitin and genistin), and acetyl and malonyl conjugate forms of glycosides (malonyldaidzin, malonylglycitin, malonylgenistin, acetyldaidzin, acetylglycitin, acetylgenistin) in soy milk. The method allowed reliable determinations of 12 isoflavones in less than 8 min of chromatographic elution. It provided a satisfactory linearity ranging from 0.1 to 5 mg/L, except for daidzin and genistin, for which it ranged from 0.1 to 10 mg/L. In addition, it showed acceptable chromatographic sensitivity, with a detection limit lower than 0.05 mg/L and a determination limit below 0.2 mg/L. The precision, in terms of relative standard deviation, was lower than 5% and the accuracy, as mean recovery, was greater than 95%. Total isoflavone content in commercial soy milk samples ($n = 8$) ranged from 1805.22 to 3195.59 mg/kg dw. Genistin and Daidzin were the major isoflavones in all samples. The proportion of aglycones, β -glucosides, and acetyl and malonyl glucosides differed among the samples. β -Glucosides were identified as the predominant forms.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

There are an increasing number of soy-derived products on the market. These range from products containing soy ingredients (soy flour and concentrate, isolate and textured protein) to soy foods (soy milk, tofu, tofu spreads, soy butter, candy bars, yogurts and frozen desserts). Soy milk is the highest consumed soy-based product not only because it can be used as an alternative for people who are lactose-intolerant, allergic to milk proteins, or for those who avoid milk for other reasons, but also because it has potential health benefits (Reilly, Lanou, Barnard, Seidl, & Green, 2006). A large number of epidemiological studies have shown that the increased intake of products made with soy prevents breast, prostate, intestine and stomach cancer (Messina & Barnes, 1991; Rowland et al., 2003; Wu, Yu, Tseng, & Pike, 2008). Moreover, several clinical studies in humans have indicated that the consumption of soy-based foods protects against chronic diseases, including osteoporosis and cardiovascular diseases (Benassayag, Perrot-Appianat, & Ferre, 2002). One of the main bioactive compounds in soy and soy products are isoflavones. These compounds

and some of their metabolites are considered to act as selective oestrogen-receptor modulators, interacting with oestrogenic receptors in humans and thus capable of exerting protective effects against hormone-related disorders (Anderson, Anthony, Cline, Washburn, & Garner, 1999).

There are 12 major isoflavones in soybean and soy products, three aglycones, namely daidzein (7,4-dihydroxyisoflavone, DE), genistein (5,7,4-trihydroxyisoflavone, GE) and glycitein (7,4-dihydroxy-6-methoxyisoflavone, GLE), their respective β -glucosides daidzein-7-O- β -D-glucoside (DI), genistein-7-O- β -D-glucoside (GI), and glycitein-7-O- β -D-glucoside (GLY), their respective acetyl glucosides 6'-O-acetyldaidzin (ADI), 6'-O-acetylglycitin (AGLY), and 6'-O-acetylgenistin (AGI) and their respective malonyl glucosides 6'-O-malonyldaidzin (MDI), 6'-O-malonylglycitin (MGLY), and 6'-O-malonylgenistin (MGI). GI and DI and their corresponding conjugates are the major isoflavones in soy beans while smaller amounts of GLE and its conjugates are found (Wang & Murphy, 1994). Malonyl and acetyl glucosides are susceptible to heat and they convert quickly to the more stable β -glucosides (Barnes, Kirk, & Coward, 1994); therefore, depending on the extent of soybean processing, the relative proportions of these conjugates can vary considerably (Franke, Custer, Cerna, & Narala, 1995; Wang & Murphy, 1994).

* Corresponding author. Tel.: +34 934024513; fax: +34 934035931.

E-mail address: mcvidal@ub.edu (M.C. Vidal-Carou).

Analytical determination of isoflavones in soy products can be carried out through a variety of approaches, including spectrophotometry (César et al., 2008; Kotenko, Mamatkhanov, & Turakhozhayev, 1993), capillary electrophoresis (Mellenthin & Galensa, 1999; Micke, Fujiya, & Tonin, 2006), immuno-analysis (Dentith & Lockwood, 2008), liquid chromatography (Apers et al., 2004; Prabhakaran, Perera, & Valiyaveetil, 2005), gas chromatography (Ghosh & Fenner, 1999) and thin layer chromatography (César et al., 2007). Most of these methods have been developed to determine the release of aglycones after enzymatic hydrolysis (Liggins, Bluck, Coward, & Bringham, 1998), strong acid hydrolysis (Mazur et al., 1996) or saponification (Klump, Allred, Macdonald, & Ballam, 2001). Therefore, these techniques are useful only for the determination of the total amount of the isoflavones aglycones but not of the different conjugates. High performance liquid chromatography (HPLC) is the most commonly used procedure in the simultaneous determination of aglycones and their corresponding β -glucosides in soy products (Peñalvo, Nurmi, & Adlercreutz, 2004). Several HPLC methods for determining isoflavone aglycones and glucosides in the same run have been described with UV (Klump et al., 2001), DAD (Franke et al., 1995), electrochemical (Setchell & Welsh, 1987) and MS-detection (Wiseman, Clarke, Barnes, & Bowey, 2002). Although HPLC procedures have some advantages regarding specificity, sensitivity and straightforward operation, the time required is relatively long (from 20 to 80 min). Ultra high pressure liquid chromatography (UHPLC) technology markedly reduces the time required for analysis while maintaining the resolution and increasing peak capacity and sensitivity through the use of columns packed with smaller diameter particles (1.7 μm) that can withstand higher backpressures than conventional HPLC instrumentation (Yang & Hodges, 2005). Therefore, UHPLC is becoming a widely used new trend technique in separation science. Several new UHPLC methods for the determination of health-related compounds in various food matrices have recently been developed (Latorre-Moratalla et al., 2009; Nováková, Spáčil, Seifrtová, Opletal, & Solich, 2010). However, to our knowledge, no UHPLC method has been designed and validated for the determination of isoflavones in food.

The aim of this work was to study the feasibility of an UHPLC method with UV detection for the determination of isoflavones in soy milk. The procedure was validated in terms of linearity, sensitivity, precision and accuracy. In addition, the isoflavone profiles of 8 brands of commercial soy milk were assessed and compared.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

HPLC grade acetonitrile and formic acid were obtained from Scharlau Chemie S.A. (Barcelona, Spain). Acetone and hydrochloric acid were from Panreac Quimica S.A. (Barcelona, Spain). Ultra pure water was obtained by the Milli-Q system (Bedford, MA, USA). Isoflavone standards, including DI, GLY, GI, DE, GLE and GE, were purchased from Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA).

2.2. Samples and sample preparation

Eight samples of different brands of UHT soy milk were purchased from retail stores in Spain and coded as A, B, C, D, E, F, G and H. The UHPLC method was validated using soy milk A. The isoflavone profiles of the 8 samples were determined by the proposed UHPLC method.

Samples were frozen at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 24 h and then lyophilised with a freeze dryer (Telstar, Cryodos, Terrassa, Spain). Isoflavone extraction was based on a procedure described by Kao and Chen

(2002). An aliquot of 0.5 g of soy milk powder was accurately weighed in a centrifuge tube and thoroughly mixed with 5 mL acetone-hydrochloric acid 0.1 N (5:1 v/v) in a magnetic stirring plate for 2 h at room temperature. The solution was then centrifuged at 6000 rpm and $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 20 min. The supernatant was evaporated to dryness under vacuum at $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ with a rotary evaporator, and re-suspended with 5 ml of methanol.

2.3. Chromatographic conditions

2.3.1. UHPLC–UV analysis

Two milliliters of sample was passed through a 0.22 μm filter (GHP, Waters Corp, Milford, MA) and 1 μL was injected in a reversed-phase Acquity UPLCTM EH C18 1.7 μm column (2.1 \times 50 mm) (Waters Corp., Milford, MA, USA), which was placed in an oven at a constant temperature ($35\text{ }^{\circ}\text{C}$). The UPLCTM system (Waters Acquity System, Milford, MA, USA) consisted of a binary pump and an auto-sampler equipped with a diode array detector (Waters 2996, Milford, MA) set to 262 nm. Solvent A was ultra pure water with 0.1% formic acid, and solvent B was acetonitrile with 0.1% formic acid. Linear gradient conditions were as follows: 0 min – 10% B; 1 min – 12% B; 3 min – 22% B; 4 min – 23% B; 5 min – 35% B; 6 min – 50%; 8 min – 50% B; 8.1 min – 10% B at flow of 0.6 mL/min. Vials filled with either standard solutions or samples were kept at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ in the auto sampler.

2.3.2. Accurate mass

An LTQ Orbitrap Velos mass spectrometer (Thermo Scientific, Hemel Hempstead, UK) equipped with an ESI source in positive mode was used to acquire mass spectra in profile mode with a setting of 30000 resolution at m/z 400. Operation parameters were set as follow: source voltage, 3.5 kV; sheath gas, 50 (arbitrary units); auxiliary gas, 20 (arbitrary units); sweep gas, 0 (arbitrary units); and capillary temperature, $275\text{ }^{\circ}\text{C}$. Default values were used for most other acquisition parameters (Fourier transform (FT) Automatic gain control (AGC) target 5×10^5 for MS mode and 5×10^4 for MSⁿ mode). Samples were first analysed in full MS mode with the Orbitrap resolution set at 30000 at m/z 400. The maximum injection time was set to 100 ms with two micro scans for MS mode and to 1000 ms with one micro scan for MSⁿ mode. The mass range was from 100 to 1000 m/z . Data analyses were performed using XCalibur software. We used an Accela liquid chromatograph (Thermo Scientific, Hemel Hempstead, UK) equipped with a quaternary pump, a photodiode array detector (PDA) and a thermostated autosampler. An Acquity UPLCTM EH C18 1.7 μm column (2.1 \times 50 mm) (Waters corp., Milford, MA, USA) with solvent A (ultra pure water with 0.1% formic acid) and B (acetonitrile with 0.1% formic acid) was used. Linear gradient conditions were the same as described above. The injection volume was 2 μL .

2.4. Statistical analysis

All statistical tests were performed by means of the Statistical Software Package for Windows PASW Statistic 18.0 (SPSS, Chicago, IL, USA).

3. Results and discussion

3.1. Identification

The high sensitivity of LTQ Orbitrap allowed us to identify a total of 12 isoflavone compounds (DE, GLE, GE, DI, GLY, GI, AGI, ADI, AGLY, MGI, MDI, and MGLY). Moreover, DAD spectra and retention times of standards (DI, GLY, GI, DE, GLE and GE) were used to confirm the identification. These results are in agreement with the

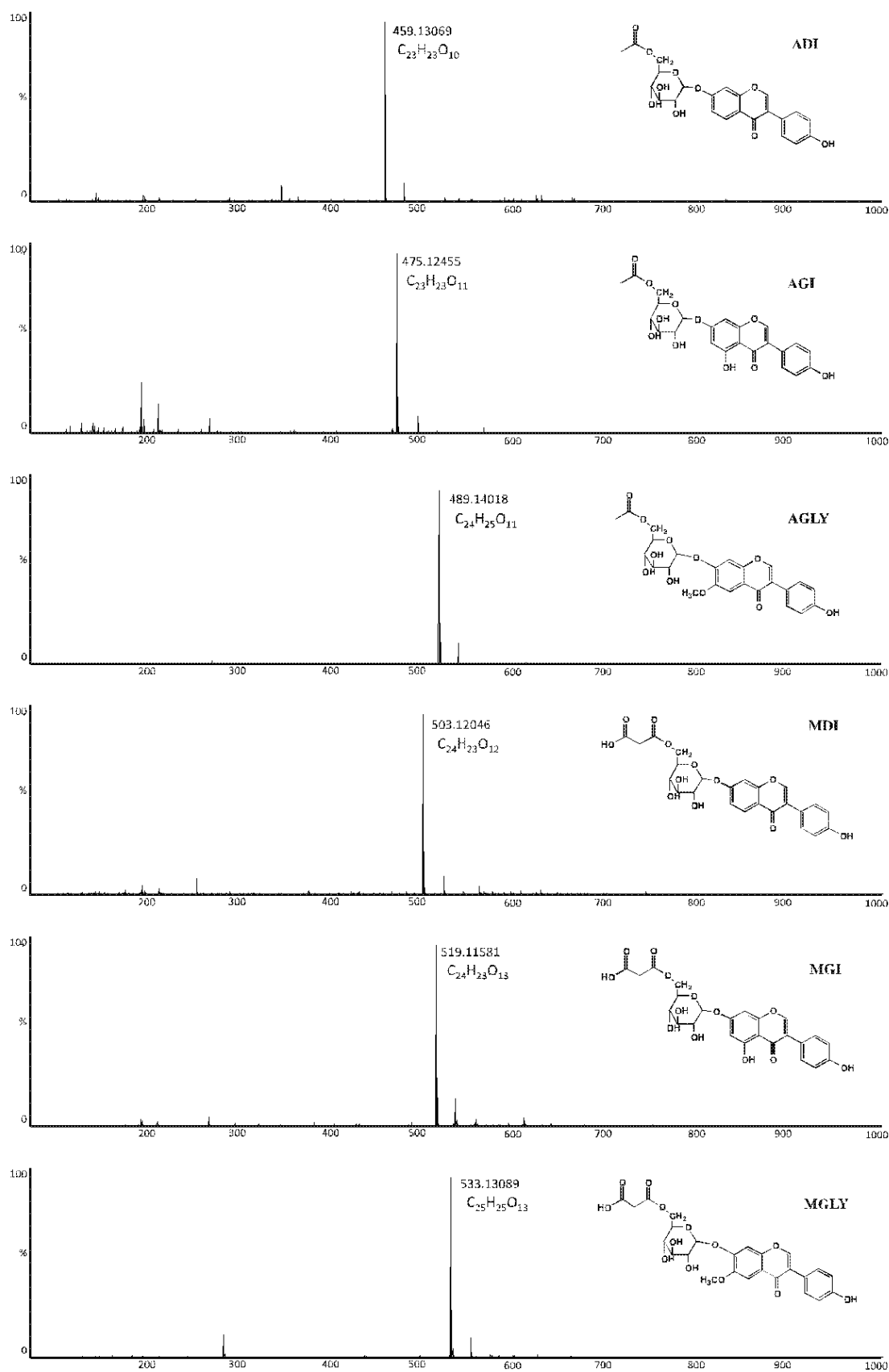


Fig. 1. Accurate mass spectra of acetyldaidzin (ADI), acetylgenin (AGI), acetylglycitin (AGLY), malonyldaidzin (MDI), malonylgenin (MGI) and malonylglycitin (MGLY).

chromatographic profile reported in other studies (Barnes et al., 1994; Griffith & Collison, 2001). The accurate mass spectra of ADI, AGI, AGLY, MDI, MGI and MGLY are shown in Fig. 1. Quantification of each isoflavone in samples was made using the calibration curve of each standard while acetyl and malonyl isoflavones were quantified as their corresponding aglycone.

3.2. Method validation

Here we developed a UHPLC–UV method for determining and quantifying the isoflavone content of commercial soy milks. This technique was then validated using available standards, which included the aglycones (DE, GLE, and GE) and their β -glucosides (DI, GLY, and GI). The UHPLC–UV chromatogram obtained at 262 nm for a commercial soy milk sample was simple, without interferences, and with the certain identification of isoflavones on the basis of their retention time by comparison with the standard and accurate mass (Fig. 2). The method allowed the determination of 12 isoflavones in 8 min. This time represents an important reduction on that required for HPLC methods.

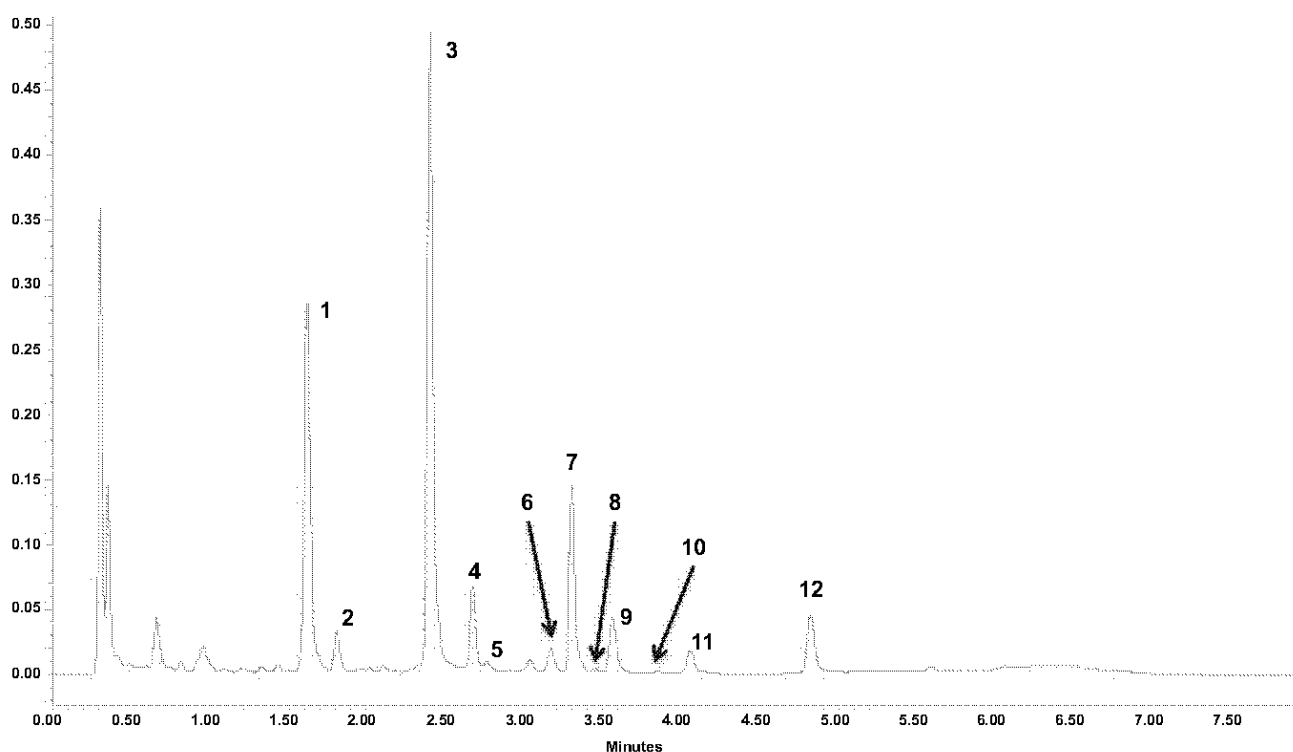


Fig. 2. Representative UPLCTM–UV chromatogram of soy milk A. 1: daidzin, 2: glycitin, 3: genistin, 4: malonyldaidzin, 5: malonylglycitin, 6: acetyldaidzin, 7: malonylgenistin, 8: acetylglycitin, 9: daidzein, 10: glycitein, 11: acetylgenistein and 12: genistein.

Table 1
Linearity of standard curves and sensitivity for the determination of isoflavones.

Isoflavones ^a	Linearity				Sensitivity	
	Slope	Intercepted point	Correlation coefficient (<i>r</i>)	Determination coefficient (<i>R</i> ²)	Detection limit (DL) ^b	Quantification limit (QL) ^b
GE	8.011×10^{-5}	1.2×10^1	0.9980	99.74	0.04	0.14
DE	9.171×10^{-5}	2.8×10^3	0.9994	99.89	0.02	0.07
GLE	7.435×10^{-5}	3.2×10^2	0.9990	99.82	0.03	0.09
GI	8.714×10^{-5}	1.3×10^1	0.9988	99.77	0.05	0.17
DI	1.298×10^{-4}	4.6×10^2	0.9992	99.85	0.04	0.12
GLY	1.425×10^{-4}	2.3×10^2	0.9993	99.88	0.02	0.08

^a GE: genistein, DE: daidzein, GLE: glycitein, GI: genistin, DI: daidzin, GLY: glycitin.

^b mg/Kg dw.

The QL is the lowest amount of analyte in the sample that can be quantitatively determined with precision and accuracy. Baseline noise was determined using methanol as a blank. The DLs were lower than or equal to 0.05 mg/L for all the isoflavones (aglycones and glucosides) (Table 1). The QLs for GLY, DE and GLE were lower than 0.1 mg/L, while the corresponding values for DI, GI and GE were lower than or equal to 0.17 mg/L. The QLs achieved through this method were lower than the content of these compounds in soy milk reported in the literature (Chen & Wei, 2008; Prabhakaran et al., 2005). Thus the UHPLC–UV method showed sufficient sensitivity for the determination of DI, GLY, GI, DE, GLE, and GE in soy milk.

3.2.3. Precision

The precision of the method indicates the degree of dispersion within a series of determinations of the same sample. To evaluate the precision, 8 determinations of the same sample (soy milk A) were performed using the same UHPLC–UV conditions (reagent and apparatus) (Table 2). Sample was spiked with known amounts of all the isoflavones at two concentration levels (500 and 1000 mg/kg for DI and GI; and 25 and 50 mg/kg for GLY, DE, GLE and GE). The relative standard deviations (RSDs) were calculated and their adequacy was assessed according to the Horwitz criterion (Horwitz, 1982). The RSDs obtained for all isoflavones were lower than the calculated RSDs for intra-laboratory studies. On the basis of our results, we conclude that the proposed UHPLC–UV method is precise.

Table 2
Precision and recovery of the method for the determination of isoflavones in soy milk A.

Isoflavones ^a	Initial content (mg/kg dw)	Addition level I ^b			Addition level II ^c			Cochran's test ^f	Mean recovery
		Content after addition (mg/kg dw)	RSD _{Horwitz} ^e	RSD(%) ^d	Content after addition (mg/kg dw)	RSD _{Horwitz} ^e	RSD(%) ^d		
GE	77.38	130.37	6.40	11.49	104.04	3.33	11.49	0.78	101.50
DE	43.32	92.22	5.47	11.84	61.99	4.01	11.84	0.65	97.50
GLE	nd	47.88	7.24	15.10	25.05	5.90	15.10	0.59	98.00
GI	1462.79	2324.29	3.71	7.41	2034.95	4.09	7.41	0.68	97.00
DI	1138.16	2009.80	3.59	7.53	1717.27	5.62	7.51	0.75	97.40
GLY	178.63	214.50	6.13	10.32	203.36	5.71	10.32	0.50	95.80

nd: not detected.

^a GE: genistein, DE: daidzein, GLE: glicitein, GI: genistin, DI: daidzin, GLY: glycitin.

^b 1000 mg/kg for GI and DI and 50 mg/kg for GE, DE, GLE, and GLY.

^c 500 mg/kg for GI and DI and 25 mg/kg for GE, DE, GLE, and GLY.

^d RSD (%): relative standard deviation for the eight determinations.

^e RSD_{Horwitz}: upper limit of the acceptance range for relative standard deviations according to Horwitz's formula for intra-laboratory study.

^f Cochran test: $C_{tab}(7.2, 0.001) = 0.8988$.

Table 3
Isoflavone contents (mg/kg dw) of commercial soy milks.

Isoflavones ^a	A	B	C	D	E	F	G	H
GE	77.38 ± 0.70	144.95 ± 3.37	70.88 ± 0.45	172.40 ± 2.99	79.29 ± 0.50	69.98 ± 1.46	53.19 ± 3.69	97.56 ± 0.25
DE	43.32 ± 1.65	73.08 ± 2.80	32.04 ± 1.91	137.93 ± 2.35	71.33 ± 0.57	34.43 ± 0.57	52.02 ± 0.50	75.15 ± 0.64
GLE	nd	nd	20.25 ± 0.64	10.08 ± 0.12	nd	9.32 ± 0.06	9.41 ± 0.06	9.23 ± 0.06
GI	1462.79 ± 32.33	1506.33 ± 21.38	747.95 ± 7.95	1170.95 ± 22.71	1279.85 ± 26.66	1260.54 ± 13.10	1166.90 ± 40.02	1181.07 ± 9.29
DI	1138.16 ± 11.58	832.86 ± 27.62	528.89 ± 12.66	716.54 ± 12.42	955.98 ± 30.03	900.18 ± 2.41	814.64 ± 21.44	940.41 ± 4.20
GLY	178.71 ± 0.13	57.47 ± 0.83	1.26 ± 0.15	60.39 ± 0.12	82.98 ± 1.27	118.26 ± 2.03	121.64 ± 10.11	102.96 ± 3.31
AG I	74.93 ± 1.08	100.94 ± 0.83	55.62 ± 1.40	nd	44.06 ± 0.31	49.64 ± 0.57	53.19 ± 3.69	51.44 ± 0.06
ADI	nd	nd	nd	nd	nq	nd	nd	nq
AGLY	2.61 ± 0.13	nd	0.77 ± 0.09	nd	0.23 ± 0.06	nd	1.08 ± 0.12	0.23 ± 0.06
MGI	235 ± 7.13	367.97 ± 5.41	232.26 ± 12.60	36.45 ± 0.89	43.38 ± 1.14	nd	97.29 ± 7.89	45.81 ± 0.13
MDI	100.65 ± 3.18	109.58 ± 4.65	115.38 ± 7.51	2.97 ± 0.12	8.91 ± 0.76	nd	31.50 ± 3.81	10.17 ± 0.13
MGLY	21.78 ± 0.51	2.43 ± 0.18	nd	10.08 ± 0.13	12.69 ± 0.12	nd	11.39 ± 0.06	2.25 ± 0.63
Total isoflavones	3159.95 ± 58.23	3195.59 ± 12.03	1805.22 ± 41.75	2317.77 ± 13.49	2578.68 ± 61.09	2442.33 ± 14.89	2412.23 ± 90.30	2516.27 ± 11.65

nd: not detected, nq: not quantified.

^a GE: genistein, DE: daidzein, GLE: glicitein, GI: genistin, DI: daidzin, GLY: glycitin, AGI: acetylgenistin; ADI: acetyldaidzin, AGLY: acetylglycitin, MGI: malonylgenistin, MDI: malonyldaidzin, MGLY: malonylglycitin.

3.2.4. Recovery

The accuracy of the method was tested by the standard addition procedure using two addition concentrations (500 and 1000 mg/kg for DI and GI; and 25 and 50 mg/kg for GLY, DE, GLE and GE). Eight determinations were carried out for each sample and each addition level, and recovery (%) was calculated in each case. The homogeneity of the recovery variances in both levels of addition was verified by a Cochran test (Steel & Torrie, 1980). All the variances were homogeneous, thereby indicating that recovery was not dependent on the isoflavone content. In addition, the Student's *t*-test was applied to compare the experimental recovery with the optimal theoretical value of 100% for the mean recoveries for each isoflavone (Table 2). The mean recovery of these compounds was greater than 95%, which was not significantly different from the theoretical value 100%.

3.3. Quantification of the isoflavones

To prove the versatility of the method, the determination of isoflavones was carried out in 8 samples of UHT soy milks available in Spain (Table 3). Total isoflavones were calculated as a result of the sum of each individual isoflavone as quantified by UHPLC–UV. Total isoflavone content varied among samples from 1805.22 to 3195.59 mg/kg dw. These concentrations are consistent, with those reported by Chen and Wei (2008) and Prabhakaran et al. (2005). The variability observed could be due to the type of soybean used in the preparation of soy milk as well as other factors. Cultivar,

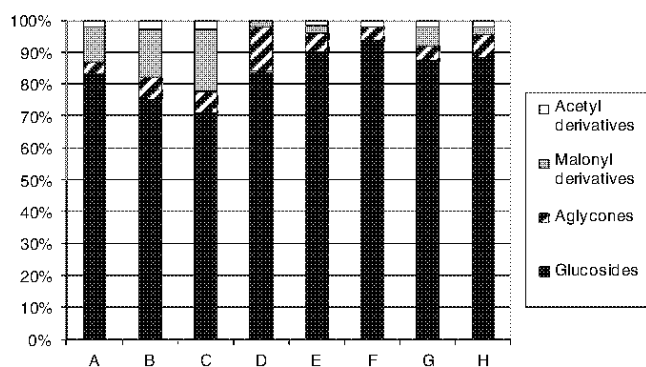


Fig. 3. Proportion of aglycones and conjugated forms of isoflavones in commercial soy milks.

geographical origin, harvesting season, growth conditions and also genetic factors could all influence the isoflavone content of soybeans (Tsukamoto et al., 1995).

Several authors (Prabhakaran et al., 2005; Vacek, Klejdus, Lojková, & Kubán, 2008) have reported that the predominant isoflavones in unfermented soy products, such as soy milk, are β -glucosides, because heat treatment at elevated temperature (83 °C) hydrolyses malonyl and acetyl conjugates, which go onto form β -glucosides. We found that the DI, GI and GLY contents were higher than that of their aglycone and conjugate forms (Table 3). GI was the main isoflavone (747.95–1506.33 mg/kg dw), followed by DI (528.89–955.98 mg/kg dw). Prabhakaran et al. (2005) also reported GI and DI as the two predominant isoflavones in soy milk. Regarding aglycones, the concentration of GE in the samples ranged from 53.19 to 172.40 mg/kg dw, whereas DE ranged from 32.04 to 137.93 mg/kg dw and GLE from 9.23 to 20.25 mg/kg dw. MGI was found to be predominant among the malonyl glucosides (from 36.45 to 367.97 mg/kg dw), followed by MDI (from 2.97 to 115.38 mg/kg dw). GLY was the minor malonyl glucoside. In general, acetyl glucosides were the minor isoflavones in the soy milk samples, the predominant compound being AGI (44.06 to 100.94 mg/kg dw). Although ADI was detected in some samples, it was not quantified.

The proportion of aglycones, β -glucosides, and acetyl and malonyl glucosides differed among samples (Fig. 3). It has been reported that the isoflavone composition of soy milk is influenced by the raw soy beans but also by the processing steps, such as soaking and temperature processing (Ishihara, Singh, Chung, & Tam, 2007). Soaking transforms malonyl glucosides into acetyl glucosides, which are then rapidly transformed into β -glucosides or aglycones (Jackson et al., 2002; Wang & Murphy, 1994). Likewise, the processing temperature also affects the distribution of isoflavones. Toda, Sakamoto, Takayanagi, and Yokotsuka (2000) reported that most malonyl glucosides are transformed into β -glucosides at 95 °C.

The manufacturing conditions of the soy milk samples analysed are unknown; however, it can be hypothesised that the processing temperature used to obtain sample F was higher than in the other samples, since only one acetyl glucoside (AGI) was detected in this soy milk. In contrast, samples A and B, which showed the highest amount of conjugates, were probably manufactured using a milder heat treatment.

4. Conclusions

A UHPLC–UV method for the simultaneous determination of 12 isoflavones commonly found in soy milks was validated for the

first time. The proposed method is a reliable procedure that shows satisfactory linearity, sensitivity, precision, and accuracy. The selected chromatographic conditions allowed complete baseline separation of the isoflavones. The total run time of 8 min is about three- to ten-times faster than the HPLC methods reported in the literature. Furthermore, this new method requires lower amounts of solvents than conventional HPLC approaches. The characteristics of the UHPLC–UV method comply with current environmental sustainability criteria.

Acknowledgements

The authors would like to thank the *Direcció General de Recerca* of the *Generalitat de Catalunya* (2008-00668 SGR) for their support and for a grant from the *Ministerio de Educación y Ciencia* (Spain) to the Ph.D., student Natalia Toro-Funes. This work was also supported by the Interministerial Commission for Science and Technology (CICYT) of the *Ministerio de Educación y Ciencia (Spain)* through the Project AGL-2008-05430-C02-02.

References

- Anderson, J. J. B., Anthony, M. S., Cline, J. M., Washburn, S. A., & Garner, S. C. (1999). Health potential of soy isoflavones for menopausal women. *Public Health Nutrition*, 2, 489–504.
- Apers, S., Naessens, T., Van Den Steen, K., Cuyckens, F., Claeys, M., Pieters, L., & Vlietinck, L. (2004). Fast high-performance liquid chromatography method for quality control of soy extracts. *Journal of Chromatography A*, 1038, 107–112.
- Barnes, S., Kirk, M., & Coward, L. (1994). Isoflavones and their conjugates in soy foods: extraction conditions and analysis by HPLC-mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, 2466–2474.
- Benassayag, C., Perrot-Appinat, M., & Ferre, F. (2002). Phytoestrogens as modulators of steroid action in target cells. *Journal of Chromatography B*, 777, 233–248.
- César, I. D. C., Braga, F. C., Vianna-Soares, C. D., Nunan, E. D. A., Barbosa, T. A. F., & Moreira-Campos, L. M. (2007). Determination of daidzein, genistein and glycitein in isoflavone capsules by thin layer chromatography (TLC) and high performance liquid chromatography (HPLC). *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 17, 616–625.
- César, I. D. C., Braga, F. C., Vianna-Soares, C. D., Nunan, E. D. A., Pianetti, G. A., & Moreira-Campos, L. M. (2008). Quantification of genistein and genistin in soy dry extracts by UV-visible spectrophotometric method. *Química Nova*, 31, 1933–1936.
- Chen, T. R., & Wei, Q. H. (2008). Analysis of bioactive aglycone isoflavones in soy bean and soybean products. *Nutrition and Food Science*, 38, 540–547.
- Dentith, S., & Lockwood, B. (2008). Development of techniques for the analysis of isoflavones in soy foods and nutraceuticals. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 11, 242–247.
- Franke, A. A., Custer, L. J., Cerna, C. M., & Narala, K. (1995). Rapid HPLC analysis of dietary phytoestrogens from legumes and from human urine. *Proceeding of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 208, 18–26.
- Ghosh, P., & Fenner, G. P. (1999). Improved method for gas chromatographic analysis of genistein and daidzein from soybean (*Glycine max*) seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 3455–3456.
- Horwitz, W. (1982). Evaluation of analytical methods used for regulation of foods and drugs. *Analytical Chemistry*, 54(1), 67–76.
- Griffith, A. P., & Collison, M. W. (2001). Improved methods for the extraction and analysis of isoflavones from soy-containing foods and nutritional supplements by reversed-phase high-performance liquid chromatography and liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 913, 397–413.
- Ishihara, M., Singh, H., Chung, G., & Tam, C. (2007). Content composition and antioxidant activity of isoflavones in commercial and homemade soymilk and tofu. *Journal of the Science and Food Agriculture*, 87, 2844–2852.
- Jackson, C. J. C., Dini, J. P., Lavandier, C., Rupasinghe, H. P. V., Faulkner, H., Poysa, V., Buzzell, D., & DeGrandis, S. (2002). Effects of processing on the content and composition of isoflavones during manufacturing of soy beverage and tofu. *Process Biochemistry*, 37, 1117–1123.
- Kao, T. H., & Chen, B. H. (2002). An improved method for determination of isoflavones in soybean powder by liquid chromatography. *Chromatographia*, 56, 423–430.
- Klump, S. P., Allred, M. C., Macdonald, J. L., & Ballam, J. M. (2001). Determination of isoflavones in soy and selected foods containing soy by extraction, saponification and liquid chromatography: collaborative study. *Journal of AOAC International*, 84, 1865–1883.
- Kotenko, L. D., Mamatkhanov, A. U., & Turakhozhayev, M. T. (1993). Spectrophotometric determination of flavones. *Chemistry of Natural Compounds*, 29, 590–591.

- Latorre-Moratalla, M. L., Bosch-Fusté, J., Lavizzari, T., Bover-Cid, S., Veciana-Nogués, M. T., & Vidal-carou, M. C. (2009). Validation of an ultrahigh pressure liquid chromatographic method for the determination of biologically active amines in food. *Journal of Chromatography A*, 1216, 7715–7720.
- Liggins, J., Bluck, L. J. C., Coward, W. A., & Bringham, S. A. (1998). Extraction and quantification of daidzein and genistein in food. *Analytical Biochemistry*, 264, 1–7.
- Mazur, W., Fotsis, T., Wahala, K., Ojala, S., Salakka, A., & Adlercreutz, H. (1996). Isotope dilution gas chromatographic-mass spectrometric method for the determination of isoflavones, coumestrol and lignans in food samples. *Analytical Biochemistry*, 233, 169–180.
- Mellenthin, O., & Galensa, R. (1999). Analysis of polyphenols using capillary zone electrophoresis and HPLC: detection of soy, lupin, and pea protein in meat products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 594–602.
- Messina, M. J., & Barnes, S. (1991). The role of soy products in reducing cancer risk. *Journal of the National Cancer Institute*, 83, 541–546.
- Micke, G. A., Fujiya, N. M., & Tonin, F. G. (2006). Method development and validation for isoflavones in soy germ pharmaceutical capsules using micellar electrokinetic chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41, 1625–1632.
- Nováková, L., Spáčil, Z., Seifrtová, M., Opletal, L., & Solich, P. (2010). Rapid qualitative and quantitative ultra high performance liquid chromatography method for simultaneously analysis of twenty nine common phenolic compounds of various structures. *Talanta*, 80, 1970–1979.
- Peñalvo, J. L., Nurmi, T., & Adlercreutz, H. (2004). A simplified HPLC method for total isoflavones in soy products. *Food Chemistry*, 87, 297–305.
- Prabhakaran, M. P., Perera, C. O., & Valiyaveetil, S. (2005). Quantification of isoflavones in soymilk and tofu from south East Asia. *International Journal of Food Properties*, 8, 113–123.
- Reilly, J. K., Lanou, A. J., Barnard, N. D., Seidl, K., & Green, A. A. (2006). Acceptability of soymilk as a calcium-rich beverage in elementary school children. *Journal of the American Dietetic Association*, 106, 590–593.
- Rowland, I., Faughnan, M., Hoey, L., Wahala, K., Williamson, G., & Cassidy, A. (2003). Bioavailability of phytoestrogens. *The British Journal of Nutrition*, 89, 45–58.
- Setchell, K. D. R., & Welsh, M. B. (1987). High-performance liquid chromatographic analysis of phytoestrogens in soy protein preparations with ultraviolet, electrochemical and thermospray mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography*, 386, 315–323.
- Steel, R. G. D., & Torrie, J. H. (1980). *Principles and procedures of statistics. A biometrical approach*. New York: McGraw-Hill Book Company.
- Thompson, M., Ellison, S., & Wood, R. (2002). Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. *Pure and Applied Chemistry*, 74, 835–855.
- Toda, T., Sakamoto, A., Takayanagi, T., & Yokotsuka, K. (2000). Changes in isoflavone compositions of soybean foods during cooking process. *Food Science Technology Research*, 6, 314–319.
- Tsukamoto, C., Shimada, S., Igita, K., Kudou, S., Kokubun, M., Okubo, K., & Kitamura, K. (1995). Factors affecting isoflavone content in soybean seeds: changes in isoflavones, saponins, and composition of fatty acids at different temperatures during seed development. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 1184–1192.
- Vacek, J., Klejdus, B., Lojtková, L., & Kubán, V. (2008). Current trends in isolation, separation, determination and identification of isoflavones: A review. *Journal of Separation Science*, 31, 2054–2067.
- Wang, H. J., & Murphy, P. A. (1994). Isoflavone content in commercial soybean foods. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 42, 1666–1673.
- Wiseman, H. C., Clarke, D. B., Barnes, K. A., & Bowey, E. (2002). Isoflavone aglycone and glucosylated of high- and low-soy U.K. foods used in nutritional studies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 1404–1410.
- Wu, A. H., Yu, M. C., Tseng, C. C., & Pike, M. C. (2008). Epidemiology of soy exposures and breast cancer risk. *British Journal of Cancer*, 98, 9–14.
- Yang, Y., & Hodges, C. (2005). *Separation Science Redefined*, (special issue of LC-GC N. Am.), May.

7.2. Valor nutritivo y biofuncional de la bebida de soja comercializada en el mercado español en comparación con la bebida de almendra

Artículo II.

N. Toro-Funes, M.T. Veciana-Nogues, M.C. Vidal-Carou. Nutritional and Biofunctional composition of soymilk and almond milk available from the Spanish market. En preparación para Journal of food composition and analysis.

7.2.1. Planteamiento y objetivo del estudio

La semilla de soja es una fuente importante de nutrientes, fibra, y componentes bioactivos, como fitosteroles, isoflavonas, etc. (Jooyandeh, 2011). En las últimas décadas, se ha producido un aumento del consumo de productos derivados de la soja en Europa debido a los potenciales efectos beneficiosos sobre la salud que se le atribuyen, especialmente en la protección frente a algunas enfermedades, como la osteoporosis, y las enfermedades cardiovasculares (Patisaul y Jefferson, 2010). Por otro lado, las almendras también son una fuente importante de proteínas y lípidos en la dieta (King et al., 2008), a la vez que son alimentos con un elevado contenido en fibra dietética, vitamina E, fitoesteroles y otros micronutrientes que contribuyen a un perfil nutricional saludable. El consumo diario de frutos secos ha sido asociado a una mejora del perfil lipídico sanguíneo y a la prevención de enfermedades cardiovasculares (Coates y Howe, 2007; Salas-Salvadó, et al., 2008; Richardson et al., 2009).

Tanto la soja como la almendra se utilizan generalmente para producir bebidas de origen vegetal en forma de emulsiones de aspecto lechoso. La bebida de soja es el producto a base de soja más consumido en el mundo y es, también, la bebida vegetal de mayor consumo debido a que se le atribuyen potenciales beneficios para la salud (Reilly, et al., 2006). La bebida de almendra se ha consumido en el área del Mediterráneo tradicionalmente como un sustituto de la leche de vaca y su consumo está aumentando en Europa. Ambos tipos de bebidas vegetales

son una alternativa adecuada para las personas intolerantes a la lactosa, que, en España, representan un 15% de la población (Sociedad Española de individuos intolerantes a la lactosa, ADILAC, 2013). Además, son particularmente útiles como alternativa para los individuos con alergia a las proteínas de la leche, o para aquellos que evitan la leche por otras razones. Por otra parte, la bebida de soja y de almendra puede jugar un papel importante en la ingesta diaria de compuestos bioactivos.

El objetivo de este apartado de la tesis es conocer los componentes nutricionales y los compuestos bioactivos de las bebidas de soja del mercado, y compararla con la bebida de almendra, sustitutivo tradicional de la leche de vaca en el área del Mediterráneo.

7.2.2. Diseño experimental

Se adquirieron ocho bebidas de soja de marcas comerciales diferentes de supermercados locales, codificadas como SM de la A a la H, y se almacenaron a -30 °C hasta su análisis. Entre la amplia variedad de formulaciones de bebida de soja disponibles, se seleccionaron los productos que no llevaban adicionado calcio ni otros ingredientes.

Por otro lado, se adquirieron siete bebidas de almendra diferentes de supermercados locales. Debido a la baja oferta de bebidas de almendra comerciales disponibles, los productos seleccionados presentaron diferente formulación: tres productos líquidos, codificados como AM de A a C, y cuatro concentrados que requerían su reconstitución en agua, de los cuales tres eran de textura en pasta, codificados como AM de D a F, y uno en polvo parcialmente desgrasado, codificado como AM G. Todos los productos elegidos contenían algún tipo de azúcar añadido entre los ingredientes, excepto la muestra AM D que no contenía. Las muestras en pasta y en polvo se reconstituyeron tal como indicaban las instrucciones del fabricante, correspondiendo en todos los casos a 30 g en 250 mL de agua. Las muestras se almacenaron a -30 °C hasta su análisis. La Tabla 7.2.1 muestra las características de las muestras de bebida de soja y de almendra comerciales, tal como se declaran en la etiqueta. Como puede observarse la información disponible del contenido de materia prima en las bebidas de almendra es muy escasa.

De cada bebida de soja y de almendra comercial, se realizó el análisis por triplicado de los compuestos nutritivos (composición básica nutricional, perfil de aminoácidos, porcentaje de

digestibilidad de las proteínas y perfil de ácidos grasos) y los compuestos bioactivos (fitosteroles, tocoferoles, aminas biógenas, poliaminas e isoflavonas).

Tabla 7.2.1. Características de las bebidas de soja y almendra comerciales.

	Formulación	Materia prima según etiqueta	Azúcar añadido	Otros ingredientes	Presentación	Reconstitución
SM A	Líquida	Granos de soja (14,6%)	No	Agua	Tetra Brick	No
SM B	Líquida	Habas de soja (12%)	No	Agua	Tetra Brick	No
SM C	Líquida	Habas de soja descascarilladas (7,2%)	No	Agua	Tetra Brick	No
SM D	Líquida	Habas de soja descascarilladas (7,2%)	No	Agua	Tetra Brick	No
SM E	Líquida	Soja descascarillada (8,3%)	No	Agua	Tetra Brick	No
SM F	Líquida	Soja pelada (7,2%)	No	Agua	Tetra Brick	No
SM G	Líquida	Soja descascarillada (14%)	No	Agua, sal marina	Tetra Brick	No
SM H	Líquida	Habas de soja	No	Agua	Tetra Brick	No
AM A	Líquida	Almendra (7%)	Maltodextrina; azúcar de caña	Agua	Tetra Brick	No
AM B	Líquida	Almendra	Fructosa	Agua, lecitina de soja	Tetra Brick	No
AM C	Líquida	Almendra	Sacarosa	Agua	Tetra Brick	No
AM D	Pasta almendra	Almendra sin piel	No	No	Vidrio	Sí
AM E	Concentrado almendra	Almendra	Fructosa	Agua	Vidrio	Sí
AM F	Crema almendra	Almendra	Jarabe glucosa, sacarosa	Agua	Lata	Sí
AM G	Polvo	Almendra parcialmente desgrasada	Maltodextrinas; maltosa	No	Lata	Sí

7.2.3. Resultados y discusión

Composición nutricional básica

La composición nutricional básica de las bebidas comerciales de soja y de almendra se muestra en la Tabla 7.2.2. Entre las bebidas de soja, sólo se observaron diferencias en el total de hidratos de carbono, azúcar y fibra, que han sido claramente más elevadas en las muestras

SM A y SM E. En conjunto, este resultado no se corresponde con el de la información declarada en la etiqueta en cuanto al porcentaje de materia prima, ya que los niveles más altos se encuentran en las muestras que declaran un 8,3% y un 14,6% de materia prima. La composición nutricional básica de las bebidas es proporcional a la que se encuentra en la semilla de soja, la cual tiene un 30-40% de proteína, un 20-30% de lípidos y un 20-30% de hidratos de carbono (Isanga y Zhang, 2008). En cuanto a las bebidas de almendra, las muestras líquidas (AM A, AM B y AM C) mostraron una composición nutricional similar, y las muestras que requieren reconstitución en agua mostraron una mayor variabilidad entre ellas ($p < 0,05$), debido probablemente a la diferente proporción de los ingredientes y al tipo de formulación empleada. Las almendras contienen un 16-23% de proteína, un 44-60% de lípidos y un contenido de hidratos de carbono muy variables (Yada et al., 2011).

Tabla 7.2.2. Composición nutricional básica de las bebidas de soja y almendra comerciales.

	Contenido en agua	Proteína	Grasa	Fibra	Cenizas	Hidratos de carbono ¹	Azúcar	Energía ² (Kcal/Kj)	
Bebida de soja	SM A	89.70 ± 0.21	3.51 ± 0.12	2.56 ± 0.10	1.70 ± 0.01	0.88 ± 0.01	1.65 ± 0.02	0.89 ± 0.06	47.08 / 196.04
	SM B	91.31 ± 0.33	3.35 ± 0.21	2.36 ± 0.08	1.30 ± 0.02	1.07 ± 0.02	0.61 ± 0.01	0.45 ± 0.02	39.68 / 165.04
	SM C	92.02 ± 0.41	3.41 ± 0.13	2.39 ± 0.13	0.93 ± 0.01	0.94 ± 0.01	0.31 ± 0.01	0.19 ± 0.01	38.25 / 159.11
	SM D	91.62 ± 0.52	3.50 ± 0.15	2.26 ± 0.12	1.03 ± 0.03	1.14 ± 0.03	0.45 ± 0.01	0.27 ± 0.01	38.20 / 159.01
	SM E	90.73 ± 0.53	3.71 ± 0.17	2.15 ± 0.11	1.40 ± 0.05	1.15 ± 0.02	0.86 ± 0.05	0.44 ± 0.08	40.43 / 168.44
	SM F	90.31 ± 0.48	3.66 ± 0.12	2.59 ± 0.15	1.32 ± 0.04	1.30 ± 0.05	0.82 ± 0.03	0.36 ± 0.04	43.87 / 182.55
	SM G	91.34 ± 0.47	3.34 ± 0.09	2.54 ± 0.10	1.27 ± 0.02	1.14 ± 0.04	0.37 ± 0.01	0.15 ± 0.01	40.24 / 167.21
	SM H	91.25 ± 0.42	3.64 ± 0.10	2.23 ± 0.08	1.12 ± 0.03	1.16 ± 0.03	0.60 ± 0.01	0.25 ± 0.01	39.27 / 163.55
Bebida de almendra	AMA	89.53 ± 0.58	1.09 ± 0.01	2.13 ± 0.07	0.73 ± 0.01	1.14 ± 0.01	5.47 ± 0.10	5.07 ± 0.38	46.87 / 196.17
	AMB	88.36 ± 0.47	1.05 ± 0.01	1.91 ± 0.06	0.66 ± 0.01	1.25 ± 0.02	6.85 ± 0.12	6.41 ± 0.26	50.11 / 210.25
	AMC	87.87 ± 0.39	1.16 ± 0.01	2.15 ± 0.05	0.84 ± 0.02	1.34 ± 0.03	6.58 ± 0.15	6.33 ± 0.13	51.99 / 217.85
	AMD	5.56 ± 0.20	17.98 ± 1.02	49.93 ± 1.20	8.94 ± 0.10	5.60 ± 0.11	11.99 ± 0.72	4.05 ± 0.05	587.13 / 2428.42
	AME	16.25 ± 0.22	5.72 ± 0.01	12.62 ± 0.21	4.14 ± 0.01	3.76 ± 0.01	56.24 ± 1.15	52.79 ± 0.25	369.70 / 1547.38
	AMF	14.61 ± 0.91	6.25 ± 0.01	11.89 ± 0.16	6.18 ± 0.04	1.72 ± 0.01	59.75 ± 2.08	38.98 ± 0.12	383.37 / 1604.63
	AMG	nd	11.44 ± 0.41	12.26 ± 0.22	11.75 ± 0.66	5.22 ± 0.14	59.33 ± 1.14	52.90 ± 0.14	416.92 / 1750.71

¹ Hidratos de carbono = 100 – (Contenido en agua + Proteína + Grasa + Fibra + Cenizas).

² Energía calculada de la Normativa Europea (EU) No 1169/2011

A fin de comparar las bebidas de almendra entre sí, la Figura 7.2.1 muestra la composición nutricional media de las bebidas líquidas de almendra (AM A, AM B y AM C) y el contenido en las muestras sólidas (pasta y polvo) ya reconstituidas. Puede observarse que hay grandes diferencias en su valor nutritivo, pese a que los datos están referidos a productos listos para el consumo. La muestra AM D, que corresponde a la pasta de almendra sin piel y sin azúcar añadido, es la que presenta un mayor contenido de proteína y grasa y un menor contenido de azúcares. Es por esta razón la que destaca por el valor energético. A la vista de estos datos, cabe concluir que, a diferencia de lo que ocurre con las bebidas de soja y las bebidas líquidas de almendra, la composición de los formatos en pasta y en polvo está poco estandarizada.

En la Figura 7.2.2 se compara la composición nutricional media de las bebidas de soja y las bebidas líquidas de almendra. Debido a la dispersión de datos, solamente se comparan con las bebidas líquidas de almendra. En general, la bebida de soja mostró un mayor porcentaje de proteínas (del orden del triple), y la bebida de almendra un mayor porcentaje de hidratos de carbono y de azúcar (del orden de 5 veces más), debido a la adición de azúcar entre los ingredientes.

Dado que ambos tipos de bebidas se utilizan como alternativa a la leche de vaca, en la Tabla 7.2.3 se resume la composición nutricional de la leche de vaca y las bebidas de soja y las líquidas de almendra. Se observa que la bebida de soja aporta una cantidad similar de proteínas que la leche de vaca, siendo el contenido de ambas casi el triple del de la bebida de almendra. La leche de vaca presenta una mayor cantidad de grasa que las bebidas vegetales.

Por otro lado, la bebida de almendra aporta un mayor contenido de azúcares que la leche de vaca, siendo el azúcar de esta última mayoritariamente en forma de lactosa. Un dato importante a destacar es que las bebidas de almendra llevan adicionados diferentes tipos de azúcares. Por ejemplo la muestra AM E, indicada para individuos diabéticos ya que no contiene sacarosa, es la única que lleva adicionadas grandes cantidades de fructosa. Este hecho es importante ya que su alto consumo podría favorecer la incidencia y prevalencia de enfermedades crónicas como la obesidad, la diabetes, las dislipidemias, el síndrome metabólico y las enfermedades cardiovasculares (Solís y Salas, 2009).

Perfil de aminoácidos y digestibilidad de las proteínas

El perfil de aminoácidos de las bebidas de soja y de almendra comerciales se muestra en la Figura 7.2.3. Ambas bebidas vegetales mostraron un perfil de aminoácidos similar, excepto el ácido glutámico. Sin embargo, la variabilidad en el perfil de aminoácidos fue algo mayor entre las bebidas de almendra que de soja. El perfil de aminoácidos de ambas bebidas se corresponde a los que han sido descritos para sus materias primas, en los que la glutamina + ácido glutámico (Glx) son los aminoácidos mayoritarios (aproximadamente el 35% en la bebida de almendra y el 20% en la bebida de soja), seguido por la asparragina (Asp) (aproximadamente el 10% en ambos tipos de muestras). El aminoácido limitante es la

metionina (Met), seguido del triptófano (Trp) y la cisteína (Cys), tanto para la bebida de soja como para las de almendra (Yada, et al., 2011; Esteves, et al., 2010).

Figura 7.2.1. Composición básica nutricional de las bebidas de almendra comerciales. Contenido medio de las bebidas líquidas de almendra (AM A, AM B y AM C) y contenido en las muestras ya reconstituidas.

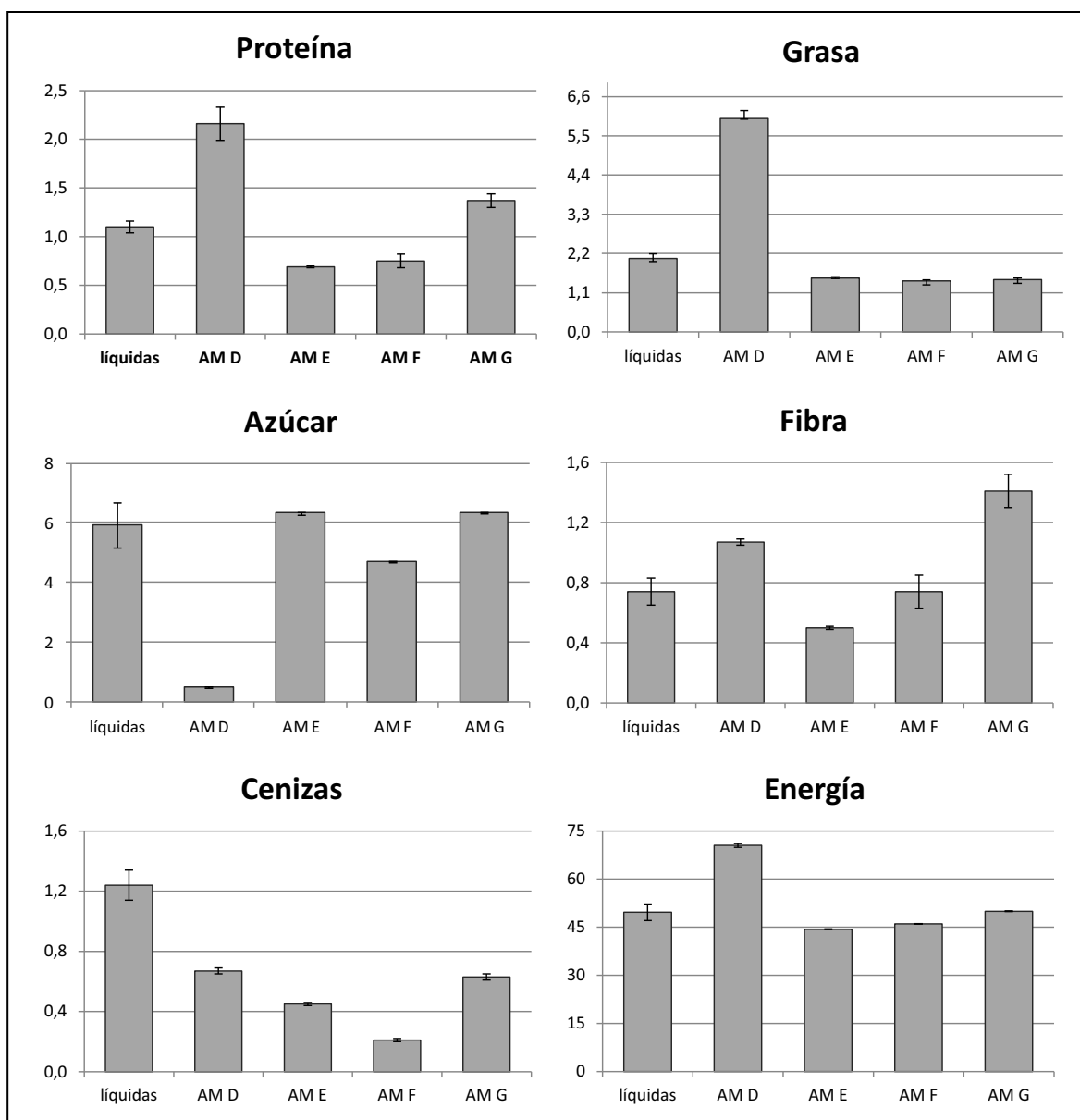


Figura 7.2.2. Composición nutricional básica de todas las bebidas de soja y de las bebidas líquidas de almendra.

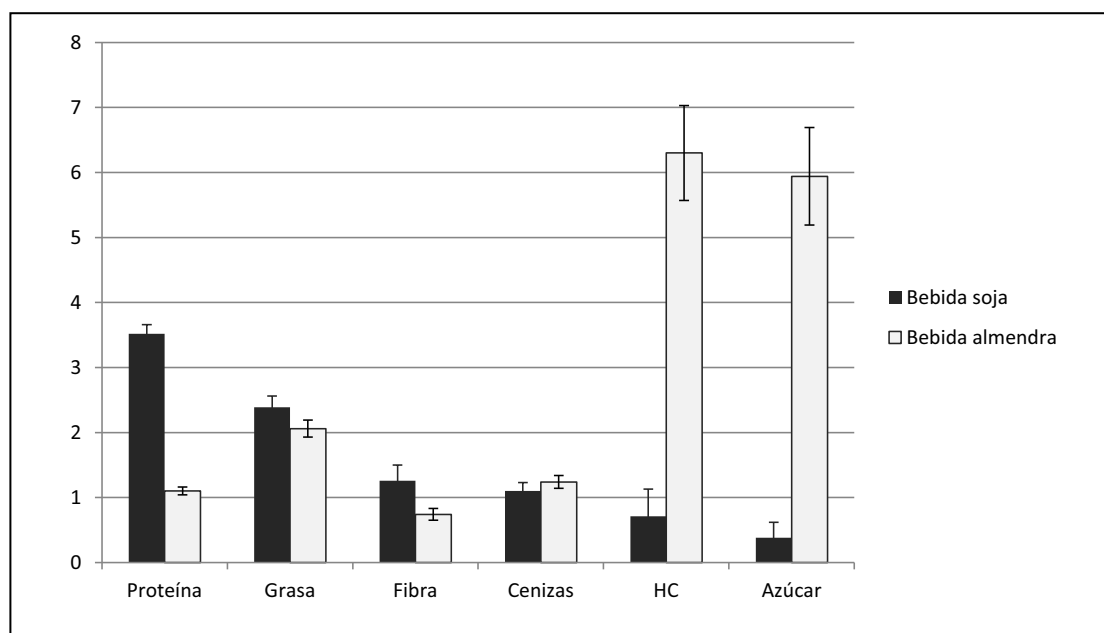


Tabla 7.2.3. Composición nutricional media de las bebidas de soja, las bebidas líquidas de almendra y la leche de vaca entera.

	Agua	Proteína	Grasa	Fibra	Cenizas	Hidratos de carbono ¹	Azúcar	Energía ² (Kcal/Kj)
Bebida soja	91.03 ± 0.82	3.52 ± 0.14	2.39 ± 0.17	1.26 ± 0.24	1.10 ± 0.13	0.71 ± 0.42	0.38 ± 0.24	40.95 / 170,42
Bebida almendra	88.59 ± 0.85	1.10 ± 0.06	2.06 ± 0.13	0.74 ± 0.09	1.24 ± 0.10	6.30 ± 0.73	5.94 ± 0.75	49.62 / 207.94
Leche de vaca³	87.40 ± 0.06	3.38 ± 0.44	3.57 ± 0.08	nd	0.74 ± 0.10	4.91 ± 0.85	4.70 ± 0.03	65.29 / 273.02

¹ Hidratos de carbono = 100 - (Contenido en agua + Proteína + Grasa + Fibra + Cenizas).

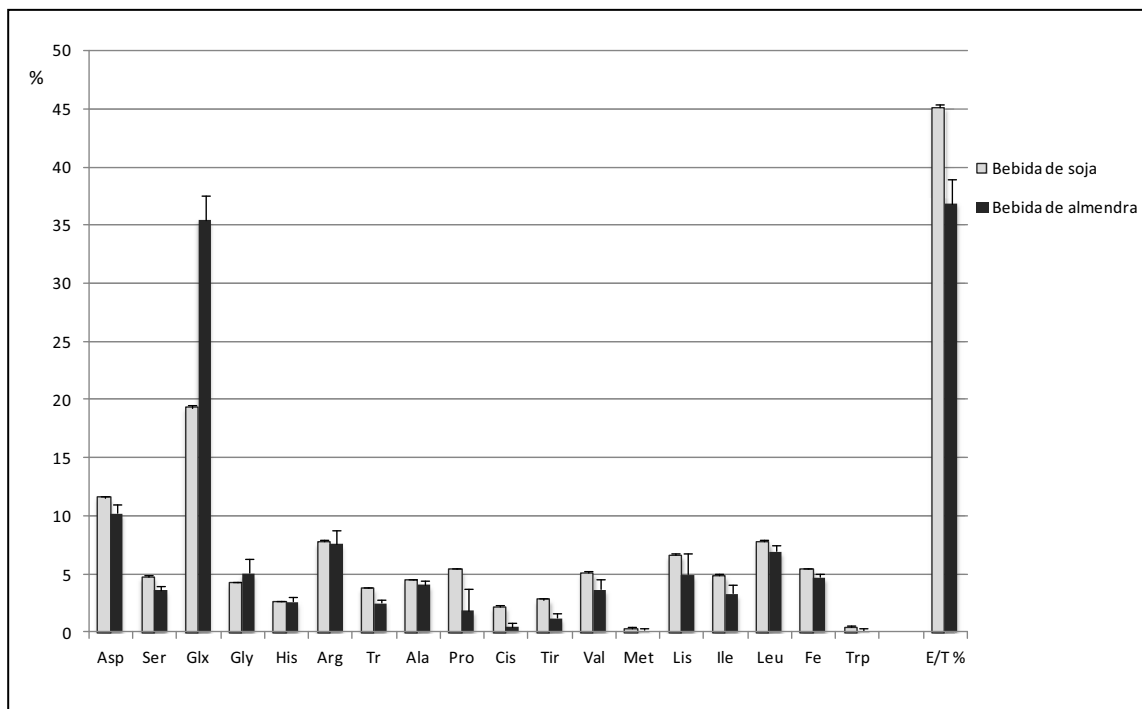
² Energía calculada de la Normativa Europea (EU) No 1169/2011

³ Fuente: Food Composition Tables Souci-Fachmann-Kraut (2008)

Para completar la evaluación nutricional de las proteínas, también se han calculado los porcentajes de aminoácidos esenciales (Figura 7.2.3). La bebida de soja mostró valores de 44,77-46,46 %, mientras que en las bebidas de almendra, los valores fueron más bajos, debido a su mayor contenido de Glx, y más variados (33,72-39,04%). Estos resultados están en consonancia con la proporción de aminoácidos esenciales descritos en la soja por Grieshop y Fahey (2001) y en la almendra por Yada et al. (2011). La proporción de aminoácidos esenciales

de las proteínas de la bebida de soja comercial fue similar a la de la proteína de la leche de vaca (Csapó-Kiss et al, 1995; Food Composition Tables Souci-Fachmann-Kraut, 2008), y más alta que la proteína de la bebida de almendra.

Figura 7.2.3. Perfil de aminoácidos de las bebidas de soja y de almendra comerciales.



La digestibilidad de las proteínas en las bebidas de soja y de almendra comerciales osciló entre el 87,2% y el 94,7% y el 84,0% y 91,6%, respectivamente, sin diferencias entre las muestras ($p < 0,05$; datos no mostrados). Dado que Polisel et al. (2012) señalan que los inhibidores de proteasas de la semilla de soja requieren tratamientos térmicos intensos para su completa inactivación, se podría esperar que los valores de digestibilidad fueran más altos en la bebida de almendra que en las bebidas de soja. Sin embargo, la digestibilidad no sólo depende de la presencia de factores antinutritivos sino que también depende del grado de desnaturalización de las proteínas. En general, se reconoce que el calor aumenta la digestibilidad ya que conduce a una desnaturalización de la proteína aumentando la accesibilidad de las enzimas proteolíticas sobre el enlace peptídico (Liu, 2004). Este hecho podría explicar que no hubiera diferencias en el porcentaje de digestibilidad entre las bebidas comerciales de soja y de almendra tratadas térmicamente. Además, ambos tipos de bebidas mostraron valores de digestibilidad de la proteína similares a los de la leche de vaca, la cual es alrededor del 90% (Sarwar, et al., 1989).

La disponibilidad de la lisina generalmente se utiliza como indicador del valor biológico potencial de las proteínas, ya que es un aminoácido esencial, limitante en numerosos alimentos. Por otra parte, la lisina es también un precursor de los compuestos de Amadori formados en la primera etapa de la reacción de Maillard. El bloqueo de la lisina, como consecuencia de esta reacción, provoca pérdidas en la calidad nutricional y en la digestibilidad de las proteínas (O'Brien, et al., 1989). En este sentido, el porcentaje de lisina bloqueada de las bebidas de soja y de almendra comerciales, tanto las líquidas como las bebidas ya reconstituidas, se muestra en la Figura 7.2.4. Ambos tipos de muestras mostraron una alta variabilidad en la lisina bloqueada, probablemente debido a diferencias en las condiciones de tratamiento y/o almacenamiento. Esta variabilidad fue mayor entre las bebidas de almendra (CV=100%) que entre las bebidas de soja (CV=68%).

La composición de la proteína y de azúcares reductores, los tratamientos térmicos aplicados en el proceso de elaboración y la vida útil favorecen el desarrollo de la reacción de Maillard. A pesar de que las condiciones de fabricación y de almacenamiento de las muestras analizadas son desconocidas, la variabilidad en las bebidas de soja cabe atribuirlo al tratamiento recibido en su elaboración, ya que no hay diferencias en el contenido de azúcar. En el caso de las bebidas de almendra, la mayor variabilidad puede ser debida en parte a las diferencias en su composición. En las tres bebidas líquidas resulta curioso destacar la no detección de la lisina bloqueada en las dos primeras y casi el 70% en la AM C. Esta muestra es la que declaraba en su etiqueta como azúcar añadido la sacarosa, mientras que las otras dos muestras fueron maltodextrina, azúcar de caña y fructosa. En las muestras en forma de pasta (AM D, AM E y AM F), la AM F fue la que mayor % de lisina bloqueada presentaba, que también contenía sacarosa entre sus ingredientes. Sin embargo, en la muestra en polvo cabría esperar que hubiera un mayor % de lisina bloqueada debido a la intensidad del tratamiento, pero resulta menor que la muestra AM F y mayor que la AM E. Por tanto se puede concluir que además del tratamiento, el tipo de azúcar añadido afecta a la lisina bloqueada.

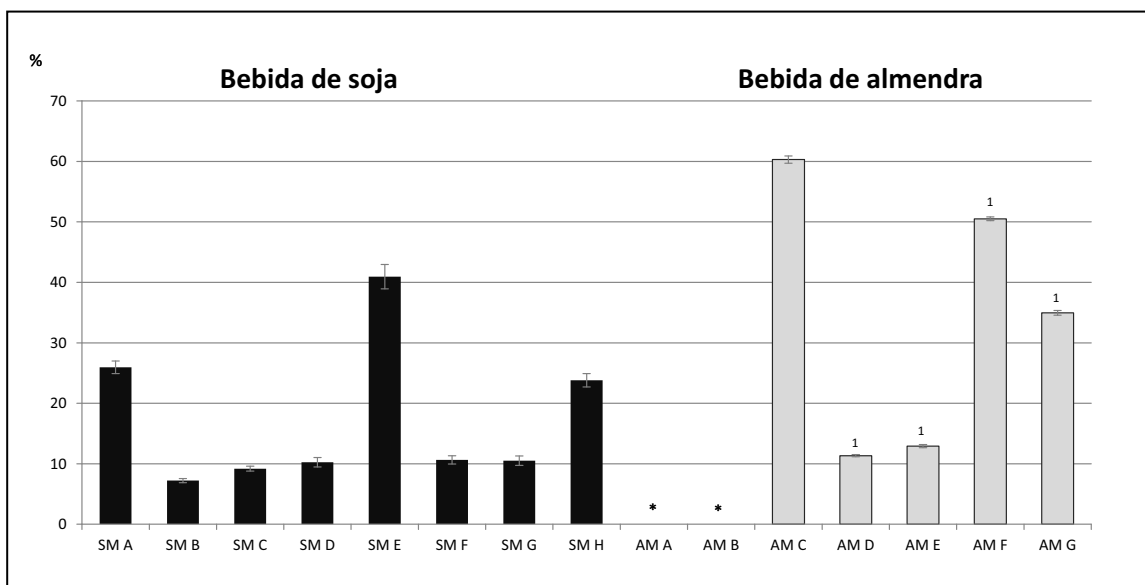
Perfil de ácidos grasos

El perfil de los ácidos grasos en las bebidas comerciales de soja y de almendra se muestra en la Figura 7.2.5. En la bebida de soja, el ácido cis-cis inoleico (52,4-56,6%) fue el ácido graso mayoritario, seguido del ácido cis-oleico (19,1-23,9%), del ácido palmítico (9,4-12,3%), α -linolénico (6,3-8,7%) y del ácido esteárico (3,9-5,9%). Hubo poca variabilidad entre las diferentes muestras de bebida de soja ($p < 0,05$). El perfil lipídico observado concuerda con el señalado por Peñalvo et al. (2004b) en bebida de soja.

Para la bebida de almendra, no hay información disponible en la literatura sobre el perfil de ácidos grasos, pero los resultados obtenidos en la bebida de almendra están en consonancia con el perfil de ácidos grasos reportado para la grasa de almendra (Yada et al., 2011). Así, el ácido cis-oleico (47,6-58,3%) es el principal ácido graso, seguido por el ácido cis-cis linoleico (16,8-23,9%), ácido palmítico (6,1-15,4%) y ácido esteárico (8,2-14,1%). Otros ácidos grasos,

como los ácidos mirístico, palmitoleico y heptadecanoico aparecieron en niveles mucho más bajos (< 2%) en todas las bebidas de soja y de almendra comerciales.

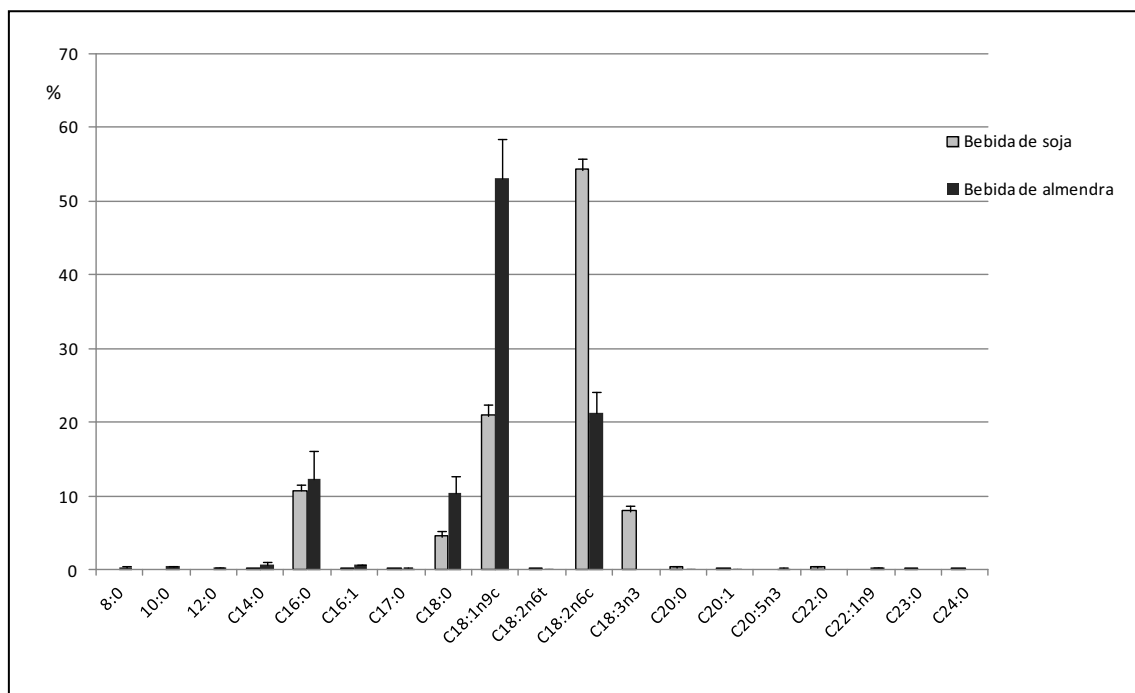
Figura 7.2.4. Porcentaje de lisina bloqueada en las bebidas de soja y de almendra comerciales.



* no detectado.

¹ Contenidos en bebidas de almendra reconstituidas.

Figura 7.2.5. Perfil de ácidos grasos en bebidas comerciales de soja y de almendra.



Las bebidas de soja mostraron una mayor proporción de ácidos grasos poliinsaturados, ácido linoleico y α -linolénico (59,7-64,4%), que las bebidas de almendra (17,3-24,1%). Mientras que las bebidas de almendra contenían una mayor proporción de ácidos grasos monoinsaturados, ácido oleico, con un 48,8-61,2%, que la bebida de soja con un 19,3-24,2%. Ambas bebidas vegetales presentaron una proporción mucho más baja de ácidos grasos saturados (15,5-19,4% y 16,0-33,5%, respectivamente) que la leche de vaca, la cual tiene más del 60%. La relación de ácidos grasos saturados/insaturados (SAT/INSAT) fue de 0,20 y 0,35 en la bebida de soja y de almendra, respectivamente. Estos valores son mucho más bajos que la proporción de saturados que aporta la leche de vaca, la que concretamente tiene un cociente de SAT/INSAT de 2,70 (Food Composition Tables Souci-Fachmann-Kraut, 2008). Por otra parte, el porcentaje de ácidos grasos *trans* que se encuentran en las bebidas de soja y de almendra comerciales representaba menos del 0,4%, mientras que la grasa de la leche de vaca, en general, parece contener aproximadamente 3-6% de ácidos grasos *trans* (Craig- Schmidt y Teodorescu, 2007).

Vitaminas hidrosolubles

La soja y la almendra son alimentos ricos en vitaminas hidrosolubles, como la tiamina, riboflavina, niacina, ácido pantoténico y ácido fólico (USDA, 2003). En cambio, en las bebidas de soja y de almendra comerciales se detectaron concentraciones por debajo de 2 mg/L de las vitaminas hidrosolubles, niacina, riboflavina y tiamina (datos no presentados). Este contenido observado de vitaminas hidrosolubles fue menor que el de sus materias primas. Las condiciones tecnológicas aplicadas para su elaboración y la relación de la materia prima/agua que diluye su contenido en las muestras líquidas finales, explica que estos dos tipos de productos no sean una fuente significativa de vitaminas hidrosolubles.

Esteroles vegetales

El contenido total y la composición de fitosteroles (mg/L) en las bebidas comerciales de soja y de almendra se muestran en la Tabla 7.2.4. En las bebidas de soja comerciales, el fitosterol principal fue el β -sitosterol, el cual varió desde el 42,84% hasta el 51,08 % del total de fitoesteroles en todas las muestras, seguido por el campesterol y el estigmasterol, con 22,01-27,83% y 18,62-25,55%, respectivamente. En las bebidas de almendra, el β -sitosterol fue también el fitosterol mayoritario con un rango desde el 72,73% hasta el 80,97%, seguido por el Δ^5 -avesnasterol con un 6,24% al 14,91%. No hay datos disponibles en la literatura acerca de la composición de fitosteroles en la bebida de soja y de almendra. Sin embargo, se ha señalado un perfil similar en la semilla de soja por Shi et al. (2010) e Isanga y Zhang (2008), y en la almendra por Phillips et al. (2005).

Tabla 7.2.4. Contenido de fitosteroles (mg/L) en las bebidas comerciales de soja y de almendra.

	β -Sitosterol	Campesterol	Δ^5 -Avesnasterol	Stigmasterol	Stigmastanol	TOTAL	mg/g grasa
SM A	30.12 \pm 1.70	15.82 \pm 0.83	2.61 \pm 0.15	12.08 \pm 0.04	1.29 \pm 0.04	61.92 \pm 3.90 ^a	24.19 \pm 2.15 ^a
SM B	29.60 \pm 1.02	18.33 \pm 0.72	2.30 \pm 0.12	16.98 \pm 0.62	1.88 \pm 0.04	69.09 \pm 3.56 ^a	29.28 \pm 2.13 ^a
SM C	34.49 \pm 1.04	20.62 \pm 1.37	2.47 \pm 0.05	14.04 \pm 0.84	2.46 \pm 0.06	74.08 \pm 4.75 ^a	31.00 \pm 2.81 ^a
SM D	30.73 \pm 1.80	16.32 \pm 0.24	2.61 \pm 0.13	16.66 \pm 0.30	2.27 \pm 0.08	68.59 \pm 3.60 ^a	30.35 \pm 2.25 ^a
SM E	30.86 \pm 1.46	14.54 \pm 0.36	1.58 \pm 0.07	11.25 \pm 0.38	2.18 \pm 0.13	60.41 \pm 3.40 ^a	28.10 \pm 2.62 ^a
SM F	31.02 \pm 1.36	14.06 \pm 0.57	2.17 \pm 0.05	14.71 \pm 0.74	1.93 \pm 0.04	63.89 \pm 3.90 ^a	22.90 \pm 2.74 ^a
SM G	34.67 \pm 1.97	17.57 \pm 0.44	2.45 \pm 0.16	15.42 \pm 0.74	2.51 \pm 0.02	72.62 \pm 4.70 ^a	30.73 \pm 3.90 ^a
SM H	30.85 \pm 1.78	15.42 \pm 0.58	2.50 \pm 0.02	17.73 \pm 0.41	2.01 \pm 0.05	68.52 \pm 4.01 ^a	32.73 \pm 2.59 ^a
AM A	58.46 \pm 2.35	5.44 \pm 0.14	6.35 \pm 0.24	2.72 \pm 0.01	1.76 \pm 0.02	74.74 \pm 3.90 ^a	35.09 \pm 2.69 ^a
AM B	64.61 \pm 3.87	3.45 \pm 0.13	12.66 \pm 0.39	2.25 \pm 0.02	1.93 \pm 0.08	84.92 \pm 6.34 ^a	42.46 \pm 4.69 ^a
AM C	65.23 \pm 3.85	4.60 \pm 0.07	7.28 \pm 0.45	2.47 \pm 0.09	1.67 \pm 0.03	81.25 \pm 6.35 ^a	37.79 \pm 4.35 ^a
AM D¹	94.64 \pm 4.12	8.86 \pm 0.69	15.71 \pm 0.80	4.27 \pm 0.10	6.61 \pm 0.47	130.09 \pm 8,74 ^b	30.75 \pm 2,92 ^a
AM E¹	31.27 \pm 2.26	2.93 \pm 0.18	5.19 \pm 0.02	1.41 \pm 0.08	2.18 \pm 0.11	42.99 \pm 3.74 ^c	29.45 \pm 3,50 ^a
AM F¹	33.58 \pm 2.12	3.15 \pm 0.23	5.58 \pm 0.42	1.52 \pm 0.03	2.34 \pm 0.09	46.16 \pm 4.08 ^c	32.28 \pm 4,03 ^a
AM G¹	35.61 \pm 1.50	3.33 \pm 0.24	5.91 \pm 0.60	1.61 \pm 0.06	2.49 \pm 0.30	48.94 \pm 3.74 ^c	33.29 \pm 3,60 ^a

¹ Contenidos en bebidas de almendra reconstituidas.

^{a-c} Letras indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) en los contenidos totales de fitosteroles.

El contenido medio de fitosteroles en las bebidas de soja fue de $67,35 \pm 4,90$ mg/L, no encontrándose diferencias entre las marcas ($p < 0,05$). Por otro lado, sí que se observaron diferencias entre las bebidas de almendra, en las que las muestras líquidas AM A, AM B y AM C mostraron contenidos totales similares a las bebidas de soja. La muestra sin azúcar añadido mostró el mayor contenido de fitosteroles, que se explica porque presenta el mayor contenido de grasa. Las muestras reconstituidas (AM E, AM F y AM G) mostraron las cantidades más bajas ($p < 0,05$), del orden de la mitad. Sin embargo, cuando los contenidos totales de fitosteroles se normalizan por gramo de grasa, no se observan diferencias significativas entre las bebidas de soja y almendra comerciales. Por tanto, se puede concluir que el contenido de fitosteroles no parece estar influenciado por el tipo de tratamiento y solo depende del % de materia prima. En comparación con la vaca, ambas bebidas de soja y almendra, como productos vegetales que son, no solo no contienen colesterol si no que también contienen fitosteroles que, como es sabido tienen una estructura similar al colesterol, controlan los niveles séricos de colesterol total y producen un descenso del colesterol LDL (Marangoni y Poli, 2010), por lo que presentan una ventaja para las personas hipercolesterolémicos o que quieren controlar sus niveles séricos.

Tocoferoles

El contenido de tocoferoles (mg/L) en las bebidas de soja y de almendra comerciales se muestra en la Tabla 7.2.5. En todas las bebidas de soja se encontraron las tres formas químicas de los tocoferoles, mientras que el δ -tocoferol no se detectó en las bebidas de almendra. La forma predominante en todas las bebidas de soja fue el γ -tocoferol (54,61%-61,93%), seguido por el δ -tocoferol (28,17-40,70 %) y el α -tocoferol (4,68-12,05%). Este perfil de tocoferoles concuerda con los observados por Guzmán y Murphy (1986) y Britz y Kremer (2002) en las semillas de soja. En cambio, en las bebidas de almendra, la forma predominante fue el α -tocoferol, el cual varió desde el 60,28% hasta el 95,86% de los tocoferoles totales. Es conocido que el α -tocoferol es el tocoferol principal en las almendras (alrededor del 90%) y el γ -tocoferol el minoritario (Yada et al., 2011).

Tabla 7.2.5. Contenido de tocoferoles (mg/L) en las bebidas de soja y de almendra comerciales.

	γ -tocoferol	α -tocoferol	δ -tocoferol	Total	mg/g grasa
SM A	1.51 ± 0.06	0.15 ± 0.01	1.07 ± 0.05	2.73 ± 0.17 ^a	1.07 ± 0.09 ^a
SM B	1.27 ± 0,07	0.17 ± 0.01	0.82 ± 0.06	2.26 ± 0.19 ^a	0.96 ± 0.11 ^a
SM C	1.49 ± 0.08	0.15 ± 0.02	0.94 ± 0.03	2.58 ± 0.18 ^a	1.08 ± 0.11 ^a
SM D	1.57 ± 0.09	0.14 ± 0.01	1.17 ± 0.06	2.88 ± 0.23 ^a	1.27 ± 0.14 ^a
SM E	2.20 ± 0.13	0.44 ± 0.02	1.04 ± 0.07	3.67 ± 0.31 ^{a,b}	1.71 ± 0.12 ^b
SM F	2.96 ± 0.14	0.28 ± 0.01	1.61 ± 0.06	4.85 ± 0.30 ^b	1.74 ± 0.15 ^b
SM G	2.72 ± 0.11	0.41 ± 0.01	1.28 ± 0.10	4.41 ± 0.31 ^b	1.74 ± 0.17 ^b
SM H	2.85 ± 0.11	0.37 ± 0.01	1.38 ± 0.04	4.60 ± 0.20 ^b	2.06 ± 0.13 ^b
AM A	0.42 ± 0.02	0.64 ± 0.02	nd	1.07 ± 0.06 ^c	0.50 ± 0.03 ^c
AM B	0.38 ± 0.03	0.68 ± 0.02	nd	1.06 ± 0.07 ^c	0.55 ± 0.05 ^c
AM C	0.38 ± 0.01	0.79 ± 0.03	nd	1.17 ± 0.06 ^c	0.54 ± 0.03 ^c
AM D¹	0.46 ± 0.02	10.69 ± 0.68	nd	11.15 ± 0.99 ^d	2.13 ± 0.17 ^b
AM E¹	0.21 ± 0.01	4.31 ± 0.03	nd	4.53 ± 0.06 ^b	3.00 ± 0.06 ^e
AM F¹	0.30 ± 0.01	4.66 ± 0.01	nd	4.96 ± 0.01 ^b	3.47 ± 0.01 ^f
AM G¹	0.69 ± 0.03	2.56 ± 0.01	nd	3.25 ± 0.06 ^a	2.21 ± 0.06 ^b

¹ Contenidos en bebidas de almendra reconstituidas.

^{a-f} Letras indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

Hubo una gran variabilidad en el contenido total de tocoferoles entre las bebidas de soja y de almendra ($p < 0,05$). Entre las bebidas de soja, las muestras SM F, SM G y SM H mostraron contenidos más altos de tocoferoles, que se mantienen al normalizar los valores por gramo de grasa (Tabla 6.2.5). Respecto a las bebidas de almendra, los contenidos más bajos de

tocoferoles se encontraron en las bebidas de almendra líquidas, y también se mantuvieron al normalizar los datos por gramos de grasa. El mayor contenido se encontró en la bebida de almendra sin azúcar añadido (AM D), debido a su mayor proporción de grasa. Se sabe que los tocoferoles son inestables bajo tratamientos térmicos convencionales, tales como la pasteurización o esterilización UHT (Lešková, et al., 2006). No se puede establecer una correlación entre el porcentaje de materia prima y niveles de tocoferoles, por lo que esta variabilidad podría explicarse por la intensidad del tratamiento térmico aplicada durante la elaboración de las diferentes bebidas de soja y de almendra comerciales. Sin embargo, estos contenidos en ambas bebidas de soja y de almendra fueron más altos que los 0,7 mg/L descritos en la leche de vaca (Base de datos Susi).

Aminas biógenas y poliaminas

El contenido de aminas biógenas y de poliaminas (mg/L) en las bebidas comerciales de soja y de almendra se muestran en la Tabla 7.2.6. Las aminas biógenas OC, TY, PU, CA, AGM y PHE solamente se encontraron en algunas muestras de bebida de soja en concentraciones muy bajas de menos de 2 mg/L. Las aminas biógenas han sido propuestas como marcadores químicos termoestables de las condiciones higiénicas de la materia prima y/o del proceso de elaboración, ya que su acumulación está asociada a la actividad de numerosas bacterias contaminantes (Latorre-Moratalla et al, 2008; Linares, et al., 2011). Los bajos contenidos de aminas biogénicas que se encuentran en las bebidas de soja y almendra comerciales sugieren una correcta práctica higiénica durante la manipulación de la materia prima y el proceso de fabricación en los productos analizados.

Respecto a las poliaminas, se encontraron contenidos variables en las bebidas de soja y de almendra, mostrando un mayor contenido de SPD que de SPM, como era de esperar ya que el nivel de SPD es habitualmente superior al de SPM en los alimentos vegetales (Kalac y Krausova, 2005). La SPD se encontró en todas las muestras, con contenidos similares entre las bebidas de soja comerciales, y cantidades variables entre las bebidas de almendra. Mientras tanto, la espermina SPM se detectó en todas las bebidas de soja pero sólo en las bebidas de almendra AM D y AM F, probablemente debido a un bajo contenido en la almendra utilizada para su elaboración. El hecho que las poliaminas sean estables a los tratamientos térmicos hay que atribuirlos al contenido de la materia prima y, eventualmente, a diferencias originales entre las semillas de soja y almendra. Así, por ejemplo en las bebidas de almendra, la muestra AM D, que no contenía azúcares añadidos, presentaba el mayor contenido de poliaminas.

Aunque las bebidas de soja y de almendra no son alimentos ricos en poliaminas, estos productos contienen cantidades más elevadas que las reportadas para la leche de vaca, en la que se han señalado niveles desde no detectable hasta menos de 1 mg/L (Rigueira, et al., 2011).

Tabla 7.2.6. Aminas biógenas y poliaminas (mg/L) en las bebidas comerciales de soja y de almendra.

	OC	TY	PU	CA	AG	PHE	SPD	SPM
SM A	nd	nd	0.78 ± 0.05	0.62 ± 0.04	0.76 ± 0.01	0.34 ± 0.02	9.90 ± 0.11	2.04 ± 0.12
SM B	0.17 ± 0.03	0.24 ± 0.01	1.00 ± 0.04	nd	0.58 ± 0.02	nd	10.02 ± 0.17	2.53 ± 0.34
SM C	0.17 ± 0.05	nd	1.86 ± 0.12	nd	0.70 ± 0.04	nd	10.27 ± 0.35	1.52 ± 0.31
SM D	0.27 ± 0.02	nd	0.82 ± 0.06	0.40 ± 0.01	1.01 ± 0.04	nd	10.34 ± 0.15	2.22 ± 0.05
SM E	0.24 ± 0.01	nd	0.38 ± 0.02	0.42 ± 0.01	0.96 ± 0.05	nd	9.73 ± 0.07	1.71 ± 0.19
SM F	nd	nd	1.49 ± 0.01	1.25 ± 0.02	1.07 ± 0.07	nd	9.09 ± 0.08	1.68 ± 0.11
SM G	nd	nd	1.00 ± 0.05	0.71 ± 0.06	1.21 ± 0.06	nd	9.94 ± 0.15	1.84 ± 0.38
SM H	nd	nd	1.27 ± 0.03	0.56 ± 0.01	1.75 ± 0.03	nd	10.97 ± 0.46	2.86 ± 0.15
AM A	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.46 ± 0.01	nd
AM B	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.33 ± 0.18	nd
AM C	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.78 ± 0.19	nd
AM D¹	nd	nd	nd	nd	nd	nd	8.30 ± 0.02	2.34 ± 0.01
AM E¹	nd	nd	nd	nd	nd	nd	2.21 ± 0.10	nd
AM F¹	nd	nd	nd	nd	nd	nd	1.83 ± 0.01	nd
AM G¹	nd	nd	nd	nd	nd	nd	4.14 ± 0.03	1.15 ± 0.01

¹ Contenidos en bebidas de almendra reconstituidas.

Isoflavonas

El contenido de las isoflavonas (mg/L) en las bebidas comerciales de soja se muestra en la Tabla 7.2.7. Las isoflavonas están presentes en grandes cantidades en la soja y sus derivados, y en menores cantidades en otros alimentos, como la alfalfa y otras leguminosas (Mazur, 1998). El contenido total de isoflavonas fue muy variable entre las bebidas de soja, con 180-325 mg/L ($p < 0,05$). Esta variabilidad no deriva de diferencias del contenido de proteína porque se mantiene cuando se normaliza por gramo de proteína. Esta variabilidad podría ser debida a la variedad de la semilla de soja utilizada en la elaboración de la bebida de soja, así como a otros factores. El tipo de cultivo, la procedencia geográfica, la época de la cosecha, las condiciones de crecimiento y también los factores genéticos podrían influir en el contenido total de isoflavonas (Tsukamoto et al., 1995). Chen y Wei (2008) encontraron contenidos similares de isoflavonas en bebidas de soja comerciales.

Respecto al perfil de las isoflavonas, los β -glucósidos fueron la forma química predominante en todas las muestras, con un rango del 71,15% a 93,66% del contenido total de isoflavonas. En la semilla de soja, la forma predominante es el malonil- β -glucósido, el cual constituye el 70-

80% de isoflavonas totales (Charron, et al., 2005). El tratamiento térmico a temperatura elevada hidroliza los conjugados malonil y acetil de los β -glucósidos (Vacek et al., 2008), lo que explica el predominio de los β -glucósidos en las bebidas de soja comerciales analizadas.

Tabla 7.2.7. Contenido de isoflavonas (mg/L) en las bebidas comerciales de soja.

	Agliconas	β -glucósidos	Acetil- β -glucósidos	Malonil- β -glucósidos	Total	mg/g proteína
SM A	28.33 \pm 0.35	257.74 \pm 6.41	7.99 \pm 0.17	37.44 \pm 1.57	331.50 \pm 8.50 ^a	94.44 \pm 3.42 ^a
SM B	21.80 \pm 0.88	239.69 \pm 7.04	10.09 \pm 0.11	48.10 \pm 1.47	319.56 \pm 9.20 ^a	95.42 \pm 3.88 ^a
SM C	11.42 \pm 0.41	127.81 \pm 2.97	5.64 \pm 0.21	34.81 \pm 2.84	179.62 \pm 6.17 ^b	52.42 \pm 2.56 ^b
SM D	31.14 \pm 0.78	194.78 \pm 5.12	nd	4.06 \pm 0.16	229.98 \pm 6.35 ^c	65.71 \pm 2.57 ^c
SM E	15.06 \pm 0.16	233.88 \pm 8.20	4.41 \pm 0.03	5.60 \pm 0.28	258.97 \pm 6.11 ^d	69.80 \pm 2.33 ^d
SM F	10.47 \pm 0.31	227.90 \pm 2.47	4.96 \pm 0.08	nd	243.33 \pm 2.49 ^c	66.48 \pm 0.96 ^c
SM G	10.52 \pm 0.59	210.31 \pm 10.11	5.43 \pm 0.54	13.12 \pm 1.67	239.42 \pm 9.03 ^c	70.41 \pm 3.76 ^c
SM H	17.28 \pm 0.13	222.45 \pm 2.38	5.14 \pm 0.01	5.60 \pm 0.03	250.47 \pm 2.53 ^c	68.81 \pm 0.98 ^c

^{a-d} Letras indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) en los contenidos totales de isoflavonas.

7.2.3. Aportaciones más relevantes

- ✓ Se aportan datos sobre el valor nutritivo y biofuncional de las bebidas de almendra que hasta donde llega nuestro conocimiento no se habían publicado anteriormente.
- ✓ Las bebidas de soja presentan más proteínas y poliaminas y contenidos comparables de grasa, fibra y fitoesteroles que las bebidas de almendra.
- ✓ Las isoflavonas son componentes específicos de las legumbres y especialmente de la soja que no se encuentran en la bebida de almendra ni en la leche de vaca.
- ✓ El porcentaje de grasa es superior en la bebida de almendra, en la que su perfil destaca el ácido oleico, mientras que la bebida de soja presenta el ácido linoleico y linolénico.
- ✓ Las bebidas de soja y de almendra son útiles como sustitutivos de la leche de vaca para rebajar la ingesta de grasa saturada en el marco de una dieta adecuada para la protección de enfermedades cardiovasculares.
- ✓ Las bebidas de soja y almendra presentan contenidos variables de % de lisina bloqueada y tocoferoles debido a diferencias del tratamiento.
- ✓ En comparación con la leche de vaca, ambas bebidas aportan fibra y fitoesteroles y una mayor cantidad de tocoferoles y poliaminas.

Artículo II.

N. Toro-Funes, M.T. Veciana-Nogues, M.C. Vidal-Carou. Nutritional and Biofunctional composition of soymilk and almond milk available from the Spanish market. En preparación para Journal of food composition and analysis.

EFFECTO DE LA ULTRA ALTA PRESIÓN DE HOMOGENEIZACIÓN SOBRE LOS COMPUESTOS BIOACTIVOS DE LAS BEBIDAS DE SOJA Y ALMENDRA

Las bebidas de soja y de almendra comerciales están sometidas a tratamientos térmicos, como el de pasteurización o UHT, que pueden afectar a sus componentes nutritivos y compuestos bioactivos. La ultra alta presión de homogeneización (UHPH) es una tecnología emergente que se puede aplicar como alternativa a los tratamientos térmicos convencionales. En el marco del proyecto nacional “AGL2008-05430-C02-02” se plantea la aplicación del tratamiento UHPH para producir bebidas de soja y de almendra de alta calidad. Este capítulo recoge los trabajos que pretenden evaluar el efecto de la UHPH sobre los componentes nutritivos y bioactivos de las bebidas de soja y almendra y su estabilidad durante el almacenamiento. Para ello:

- En el primer apartado se estudia el efecto de la UHPH a diferentes combinaciones de presión y temperatura sobre los compuestos nutritivos y bioactivos de la bebida de soja y de almendra con el fin de comparar esta tecnología con los tratamientos térmicos convencionales de pasteurización y esterilización.
- Posteriormente, una vez que el grupo del CERPTA de la Universidad Autónoma de Barcelona haya seleccionado las condiciones de UHPH equivalentes a las de pasteurización y esterilización, en un segundo apartado se estudia la estabilidad de los componentes nutritivos y bioactivos más relevantes de la bebida de soja¹ tratada por UHPH durante el almacenamiento en refrigeración y a temperatura ambiente.

¹El estudio en las bebidas de almendra no se pudo realizar debido a problemas técnicos en los equipos de UHPH.

8.1. Efecto de la Ultra Alta Presión de Homogeneización sobre los compuestos bioactivos de las bebidas de soja y de almendra

Artículo III.

N. Toro-Funes, J. Bosch-Fusté, M.T. Veciana-Nogues, M.C. Vidal-Carou (2014). Effect of ultra high pressure homogenization treatment on the bioactive compounds of soya milk. *Food Chemistry*, 152, 597-602.

Índice de impacto (JCR 2012): 3.334

Posición en área "Food and Science Technology": 10/124

Artículo IV.

N. Toro-Funes, J. Bosch-Fusté, M.T. Veciana-Nogues, M.C. Vidal-Carou (2014). Effect of ultra high pressure homogenization treatment on the phytosterols and some antioxidant compounds of almond milk. En preparación para *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Enviado.

Artículo V.

N. Toro-Funes, J. Bosch-Fusté, M.T. Veciana-Nogues, M.C. Vidal-Carou (2014). Comparison of the effects of ultra high pressure homogenization and heat treatments on the bioactive compounds of soymilk and almond milk. En preparación.

8.1.1. Planteamiento y objetivo del estudio

Las bebidas de soja y de almendra comerciales están convencionalmente procesadas por tratamientos térmicos, especialmente UHT, el cual es útil y necesario para estabilizar y mejorar la palatabilidad y la digestibilidad (Barros-Dourado, et al., 2011) ya que entre otros efectos destruyen los componentes indeseables, tales como los inhibidores de tripsina (Kwok, et al., 2002; Wang, et al., 2001). Pero los tratamientos térmicos pueden modificar el contenido de nutrientes, como las vitaminas, y afectar negativamente a los compuestos bioactivos. La industria alimentaria está cada vez más interesada en el desarrollo de nuevos productos mediante la aplicación de tecnologías emergentes con un procesamiento mínimo que aumente o, al menos, mantenga ciertos compuestos bioactivos beneficiosos para la salud. El concepto de procesamiento mínimo se está convirtiendo en una realidad con algunas tecnologías no térmicas, tales como los campos eléctricos pulsantes, ultrasonidos, procesos de alta presión hidroestática y UHPH (Plaza et al, 2011; Valero et al, 2007; Velázquez-Estrada et al., 2013). La aplicación de los tratamientos de UHPH en la industria alimentaria podría resultar beneficiosa, ya que puede reunir los aspectos exigibles a una buena tecnología: conservación higiénica del producto, excelente estabilidad física y mantenimiento de una buena calidad nutricional y sensorial. Además presenta la ventaja de ser una operación continua. Por otro lado, la UHPH también puede producir una mejora en la capacidad de extracción de compuestos beneficiosos para la salud (Dumay et al., 2013).

En el marco del proyecto "La aplicación de ultra alta presión homogeneización (UHPH) para producir leches vegetales de alta calidad (de soja y almendra)" (AGL 2008-05430-C02-02), Poliselí-Scopel et al. (2012) y Valencia-Flores et al. (2013), ambos del CERPTA-UAB, estudiaron diferentes condiciones de UHPH (combinación de presión y de temperatura de entrada) para obtener emulsiones finas y estables de alta calidad desde un punto de vista microbiológico, físico-químico y sensorial, al menos como los tratamientos térmicos convencionales de pasteurización (PA) y esterilización UHT. Por lo tanto, el objetivo de este apartado de tesis fue estudiar los efectos de estas condiciones de UHPH propuestas por Poliselí et al. (2012) y Valencia-Flores et al. (2013) sobre los componentes nutricionales y biofuncionales de la bebida de soja y de almendra en comparación con los tratamientos térmicos convencionales.

8.1.2. Diseño experimental

Las bebidas de soja y de almendra fueron elaboradas en la Planta piloto de la Universidad Autónoma de Barcelona, y proporcionadas por el Centre Especial Planta de Tecnología dels Aliments (CERPTA).

Se realizaron tres producciones diferentes de cada bebida de soja y de almendra. Al producto base de la bebida de soja (PBS) y de almendra (PBA) se les aplicaron 6 tratamientos diferentes de UHPH y 2 tratamientos térmicos. Estos consistieron en:

UHPH:

- a) 200 MPa a 55, 65 y 75 °C de temperatura de entrada (BS 1, BS 2 y BS 3 para la bebida de soja, y BA 1, BA 2 y BA 3 para bebida de almendra, respectivamente),
- b) 300 MPa a 55, 65 y 75 °C (BS 4, BS 5 y BS 6 para la bebida de soja, y BA 4, BA 5 y BA 6, para la bebida de almendra, respectivamente).

Térmicos:

- c) 95 °C durante 30 s para el tratamiento de PA,
- d) 142 °C durante 6 s para el tratamiento de UHT.

De cada muestra de bebida de soja y de almendra tratada térmicamente y por UHPH, se realizó el análisis por triplicado de los compuestos nutritivos (composición básica nutricional, perfil de amino ácidos, porcentaje de digestibilidad de las proteínas y perfil de ácidos grasos) y los compuestos bioactivos (fitosteroles, tocoferoles, poliaminas e isoflavonas).

8.1.3. Resultados y discusión

8.1.3.1. Efecto del tratamiento de UHPH sobre los compuestos nutricionales

La composición básica nutricional se realizó con el fin de caracterizar las muestras de la bebida de soja y de almendra, ya que se producen a partir de diferentes producciones. De esta manera, se podrán estandarizar los resultados experimentales obtenidos de los análisis de los parámetros nutritivos y biofuncionales y su posterior comparación entre los distintos tipos de tratamientos.

No se encontraron diferencias en la composición básica nutricional entre las diferentes producciones de soja y almendra, de igual manera tampoco se encontraron entre las bebidas de soja y de almendra sin tratar (PBS y PBA) y las tratadas térmicamente y por UHPH (Tabla 8.1.1). Todas las muestras de bebida de soja y de almendra elaboradas en la planta piloto mostraron un contenido de agua superior al de la media de las muestras de las bebidas del mercado y un menor contenido en nutrientes con independencia del tipo de tratamiento de estabilización aplicado y de la producción considerada.

Tabla 8.1.1. Composición nutricional básica del producto base, pasteurizada (PA), UHT y las muestras de bebida de soja y de almendra tratadas por UHPH.

		Contenido acuoso	Proteína	Grasa	Fibra	Cenizas	Carbohidratos**
Bebida de soja	PBS	94.3 ± 0.0	2.60 ± 0.2	1.50 ± 0.1	0.50 ± 0.1	0.31 ± 0.0	0.79 ± 0.1
	PA	94.3 ± 0.3	2.60 ± 0.2	1.52 ± 0.1	0.53 ± 0.0	0.30 ± 0.0	0.75 ± 0.2
	UHPH*	94.3 ± 0.1	2.63 ± 0.1	1.53 ± 0.1	0.50 ± 0.0	0.28 ± 0.0	0.76 ± 0.1
	UHT	94.6 ± 0.1	2.40 ± 0.2	1.41 ± 0.1	0.50 ± 0.0	0.27 ± 0.0	0.82 ± 0.3
Bebida de almendra	PBA	96.3 ± 0.0	0.97 ± 0.03	1.29 ± 0.1	0.41 ± 0.04	0.31 ± 0.1	0.72 ± 0.1
	PA	96.1 ± 0.2	1.00 ± 0.03	1.31 ± 0.1	0.43 ± 0.02	0.30 ± 0.0	0.86 ± 0.2
	UHPH*	96.2 ± 0.2	1.06 ± 0.02	1.34 ± 0.1	0.39 ± 0.02	0.30 ± 0.1	0.71 ± 0.2
	UHT	96.0 ± 0.1	0.99 ± 0.00	1.32 ± 0.1	0.40 ± 0.03	0.28 ± 0.0	1.01 ± 0.1

* Para simplificar los resultados, se ha indicado el valor medio de la composición nutricional de las bebidas de soja y de almendra tratadas por las 6 diferentes combinaciones de UHPH.

** Hidratos de carbono (CH) han sido calculados mediante: $CH = 100 - (Agua + Proteínas + Grasa + Fibra + Cenizas)$.

Perfil de aminoácidos

No se observaron diferencias en el perfil de aminoácidos de las bebidas de soja y de almendra tratadas por los diferentes tratamientos UHPH respecto a sus correspondientes productos base (Datos no mostrados; $p > 0,05$). Tampoco se encontraron diferencias significativas entre las muestras tratadas térmicamente y por UHPH. La composición aminoacídica de las bebidas de soja y de almendra se corresponden con la reportada en las bebidas comerciales de soja y de almendra descritas en el apartado 7.2 de esta memoria, en la

que la glutamina + ácido glutámico son los aminoácidos mayoritarios, y la metionina el aminoácido limitante, seguido de la cisteína y del triptófano.

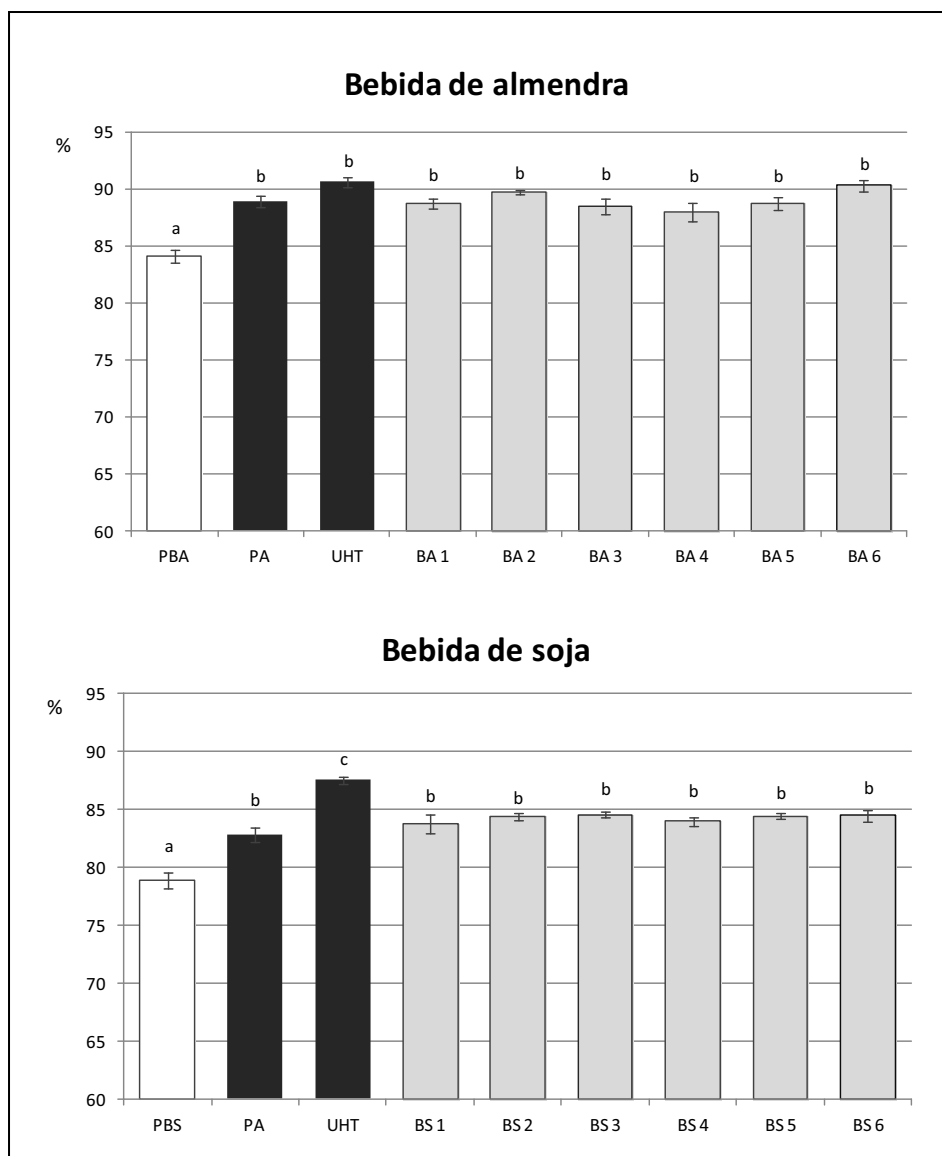
No hay datos disponibles en la literatura que informe del efecto de la UHPH sobre el perfil aminoacídico de las bebidas de soja y de almendra. Se sabe que elevadas temperaturas (sobrecalentamiento) pueden destruir importantes aminoácidos tales como la cisteína, arginina y lisina (Friedman y Brandon, 2001; Kwok y Niranjana, 1995). Sin embargo, nuestros resultados sugieren que las combinaciones de presión y de temperatura aplicadas, igual que los tratamientos térmicos convencionales, no afectaron el perfil de aminoácidos de la bebida de soja y de almendras, por lo que este parámetro no resulta relevante para comparar los tratamientos.

Porcentaje de digestibilidad y formación de furosina

En la figura 8.1.1 se muestra el porcentaje de digestibilidad de las bebidas de soja y almendra con tratamientos térmicos y UHPH. Se observa que ambos tratamientos producen un aumento de la digestibilidad respecto a sus correspondientes productos base, que no han sufrido ningún tratamiento de estabilización.

No se encontraron diferencias en el porcentaje de digestibilidad entre las bebidas de almendra tratadas por UHPH a las diferentes combinaciones de presión y temperatura ($p < 0,05$; Figura 8.1.1). Igualmente, tampoco se han visto diferencias significativas entre las bebidas de almendra tratadas por UHPH y las muestras tratadas térmicamente por PA y UHT, lo que sugiere que la combinación de presión/temperatura aplicada a la bebida de almendra fue igual de eficaz en la mejora de la digestibilidad de la proteína que sus respectivos tratamientos térmicos. No hay datos disponibles en la literatura sobre el efecto de la UHPH sobre la digestibilidad de las proteínas de las bebidas de almendra, ni tampoco de la bebida de soja. El tratamiento térmico aumenta la digestibilidad debido a la desnaturalización de proteínas y al despliegue de la molécula de proteína, lo que aumenta la accesibilidad de la enzima proteasa (Liu, 2004).

Figura 8.1.1. Porcentaje de digestibilidad de las proteínas en muestras de bebida de soja y de almendra.



En las muestras de bebida de soja, tampoco se encontraron diferencias en el porcentaje de digestibilidad entre las muestras tratadas por UHPH a las diferentes combinaciones de presión y temperatura estudiadas ($p < 0,05$; Figura 8.1.1), ni con las muestras tratadas por PA. Sin embargo, el porcentaje de digestibilidad fue mayor en muestras tratadas por UHT ($p < 0,05$). La digestibilidad no sólo depende de la desnaturalización de las proteínas, sino que también está relacionada con la presencia de factores antinutritivos. La soja tiene inhibidores de la tripsina, que son sustancias con propiedades antinutricionales que bloquean la tripsina, disminuyendo la digestibilidad de las proteínas y su valor nutritivo (Yuan et al., 2008). La presencia de estos

compuestos podría explicar la menor digestibilidad en la bebida de soja que en la bebida de almendra. Polisel-Scopel et al. (2012) reportaron que se mantenía una cierta actividad residual antitripsina en la bebida de soja después de ser tratada por PA, UHT y UHPH a 200 MPa y 300 MPa, siendo menor en las muestras tratadas por UHT. Esta menor actividad residual explica la mayor digestibilidad de la proteína en la bebida de soja tratada por UHT. La constatación de que permanece una cierta actividad residual antitripsina en las muestras tratadas por UHPH, hace necesario estudiar cómo evoluciona la digestibilidad a largo de la vida útil de estos productos.

Los tratamientos térmicos aplicados en la producción de bebida de soja proporcionan una vida útil más larga, mejoran el valor nutritivo mediante la destrucción de factores antinutricionales (inhibidores de la tripsina Kunitz y Bowman-Birk), y aumentan la digestibilidad de las proteínas (Kwok y Niranjana, 1995; Debruyne y Riaz, 2006). Por el contrario, el tratamiento térmico favorece la reacción de Maillard, causando pérdidas en la calidad nutricional y en la digestibilidad de las proteínas (Nursten, 2005; Seiquer et al., 2006). La furosina se utiliza comúnmente para la evaluación de las primeras etapas de la reacción de Maillard y también permite estimar el porcentaje de lisina bloqueada (no biodisponible) e indirectamente, la calidad proteica. Además, la furosina se utiliza como indicador del daño térmico, y permite distinguir entre UHT y PA.

En ninguna de las muestras estudiadas se detectó furosina, lo que indica que ambos, los tratamientos térmicos y de UHPH, no favorecieron la formación de la reacción de Maillard. Por otro lado, este compuesto fue detectado en todas las muestra de bebida de soja del mercado estudiadas y en algunas de las de almendra. Estas diferencias podría atribuirse a dos posibles causas: a) al hecho de que los tratamientos de estabilización aplicados en la planta piloto fueran menos intensos que los aplicados en las muestras comercializadas o b) a que la reacción de Maillard avanza durante el tiempo de almacenamiento y los productos elaborados en la planta piloto fueron analizados casi inmediatamente después de su obtención no habiendo transcurrido el tiempo suficiente para que se formara furosina en cantidades suficiente para ser detectadas.

La relativamente elevada cantidad de furosina detectada en algunas muestras comerciales hace que sea un parámetro susceptible de ser monitorizado durante el almacenamiento de las

bebidas de soja tratadas por UHPH a pesar de que no se detectara en ninguna de las muestras justo después del tratamiento.

Perfil de ácidos grasos

No se observaron diferencias en el perfil de ácidos grasos en todas las bebidas de soja y de almendra tratadas por UHPH respecto a sus correspondientes productos base ($p > 0,05$). De igual manera tampoco se encontraron diferencias significativas con las muestras tratadas térmicamente. En las bebidas de soja, los ácidos grasos mayoritarios fueron:

- el ácido cis-cis linoleico (50,8-54,3%),
- seguido del ácido cis-oleico (20,4-23,5%),
- del palmítico (12,3-13,7%),
- α -linolénico (5,9 a 7,4%),
- y del ácido esteárico (2,6 a 3,2%).

Mientras que la composición de ácidos grasos en la bebida de almendra fue:

- el ácido oleico (54,6 a 56,1%),
- seguido del linoleico (19,9 a 22,2%),
- del palmítico (10,8 a 11,6%),
- y del esteárico (8,1 a 9,0%).

Estos resultados están en consonancia con el perfil de ácidos grasos de las bebidas comerciales comentados en el apartado 7.2.

Los ácidos grasos poliinsaturados de estas bebidas vegetales, principalmente el linoleico, oleico y linolénico, son susceptibles a la oxidación por la presencia de oxígeno, luz, enzimas y elevada temperatura (Brownsell et al., 1993). Sin embargo, los tratamientos UHPH y los térmicos convencionales aplicados a las muestras de bebida de soja y de almendra no promovieron su oxidación durante el tratamiento ya que no se observaron diferencias en el perfil de los ácidos grasos.

Por otra parte, no se produjo un aumento de ácidos grasos *trans* en las bebidas de soja y almendra tratadas tanto térmicamente como por UHPH respecto a sus correspondientes productos base, siendo menor del 0,2% del total de grasa. Con excepción de las bebidas de

almendra tratadas por UHT, las que mostraron tres veces más de éstos ácidos grasos *trans* (ácidos elaídico y linoleaídico), lo que sugiere que la combinación de presión/temperatura aplicada a la bebida de almendra en el tratamiento de UHPH es menos agresivo que el tratamiento UHT.

8.1.3.2. Efectos del tratamiento de UHPH sobre los compuestos bioactivos

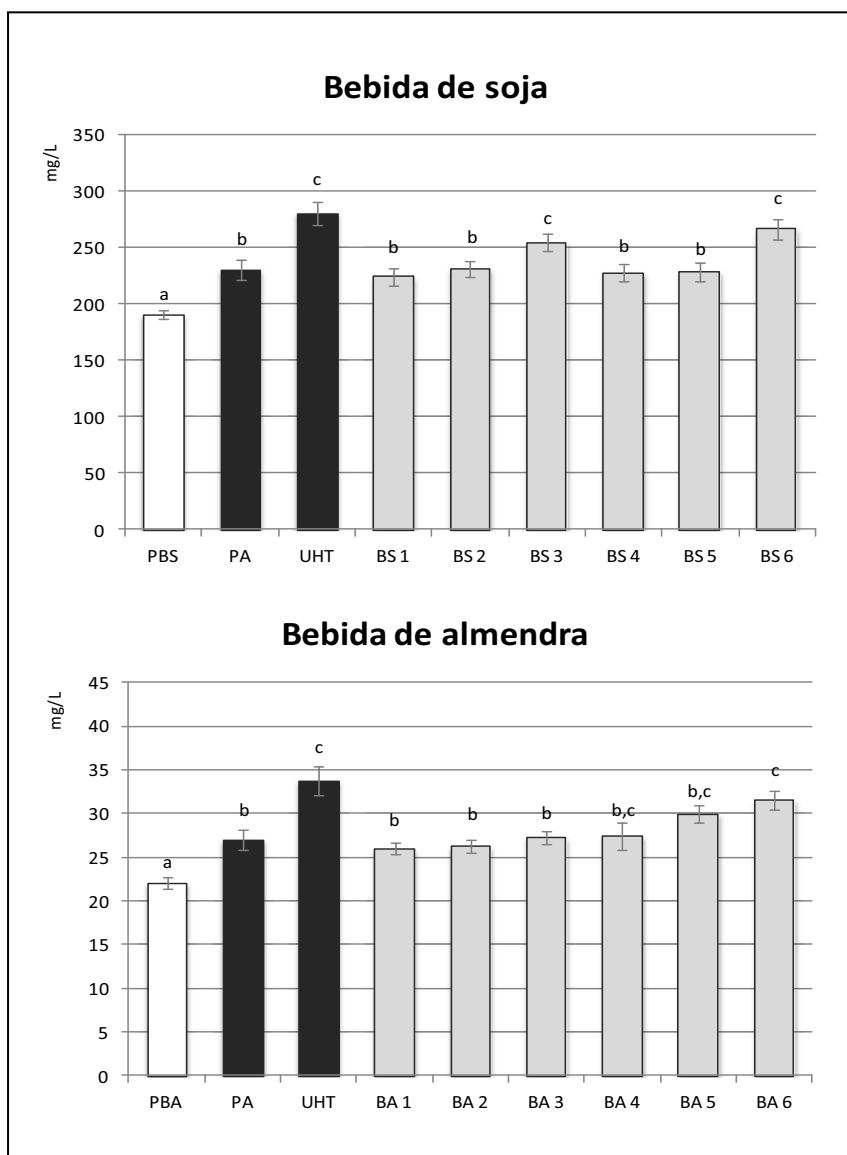
Fitoesteroles

El contenido total de fitosteroles en la bebida de soja fue de 191 mg/L en el producto base y entre 225 y 281 mg/L en las tratadas térmicamente y por UHPH. En la bebida de almendra, el total de fitosteroles en el producto base fue de 22 mg/L y entre 26 y 34 mg/L en las tratadas por UHPH (Figura 8.1.2). Por tanto, el contenido total de fitosteroles fue estadísticamente mayor en las muestras de bebida de soja y de almendra tratadas por UHPH o térmicamente que en sus correspondientes productos base en ambos tipos de muestras. El mayor contenido de fitosteroles en las bebidas de soja se observó en las tratadas a mayor temperatura, independientemente de la presión aplicada, con un aumento del 40-45% respecto a su producto base. Mientras que en la bebida de almendra, se observó un aumento del 25-35% en las muestras tratadas a 300 MPa, junto con la temperatura. Los tratamientos UHPH someten a las bebidas de soja y almendra por de su paso por la válvula de alta presión a diferentes fuerzas de cizalla, de cavitación, turbulencia y coalescencia que producen un gran impacto sobre el tamaño y la distribución de los glóbulos grasos en la fase continua de la emulsión (Poliseli-Scopel, et al., 2012). Los resultados indican que la combinación de presión y temperatura en el tratamiento de UHPH produce un aumento en la extracción de los fitosteroles a partir de los glóbulos grasos en ambos tipos de muestras, siendo mayor en las condiciones más fuertes de UHPH.

Aunque hubo un aumento en la extracción de fitoesteroles en la bebida de soja y de almendra tratadas por UHPH respecto a su producto base, no se observó una mayor extracción que en los productos tratados térmicamente ($p < 0,05$). Así, el contenido total de fitoesteroles fue similar en las muestras UHT que en las muestras tratadas por UHPH a las condiciones más fuertes, las muestras BS 6 y BA 6. Por otro lado, el contenido total de fitoesteroles fue similar

en las muestras PA que el de las muestras tratadas por UHPH con las condiciones más suaves, las muestras BS 1 y BA 1.

Figura 8.1.2. Contenido total de fitosteroles (mg/L) en las bebidas de bebidas de soja y de almendra.



Tanto los tratamientos térmicos como los de UHPH tienen una etapa de homogeneización, que reduce el tamaño de los glóbulos de grasa para obtener una emulsión con un alto grado de estabilidad. El efecto de la homogeneización, junto con las altas temperaturas aplicadas,

podría explicar el mismo grado de extracción de los fitosteroles observado en las muestras de bebidas de soja y de almendra tratadas térmicamente, PA y UHT, y las tratadas por UHPH.

Respecto a la especiación de los fitoesteroles, en las bebidas de soja, el β -sitosterol fue el fitosterol principal (casi el 50% en todas las muestras), seguido del estigmasterol y del campesterol, con un 25% y 23%, respectivamente. Mientras tanto, en las bebidas de almendra, el β -sitosterol fue también el fitoesterol mayoritario con un 60%, seguido del Δ^5 -avenasterol, el cual representó casi el 30%.

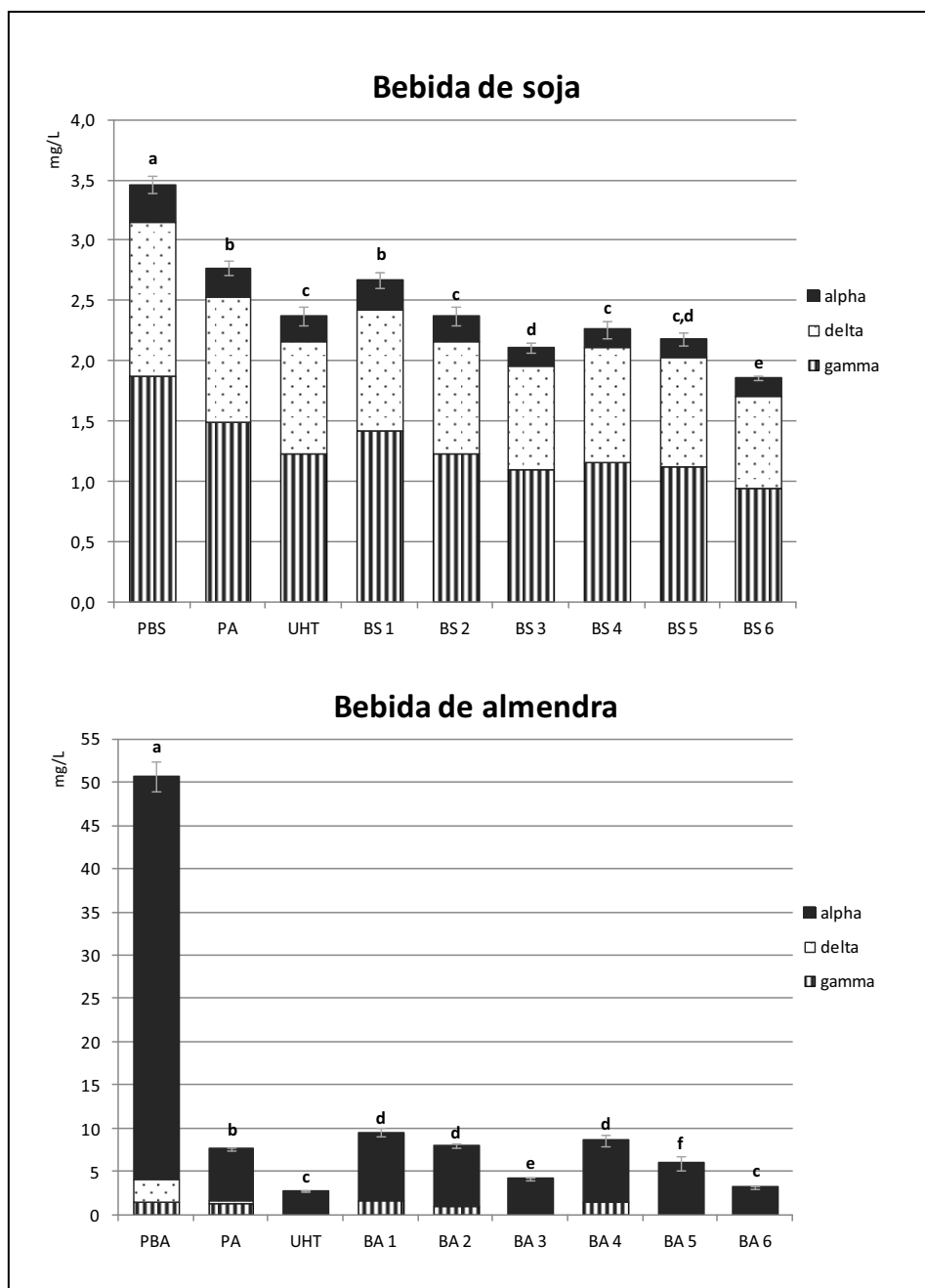
Efecto de UHPH sobre los tocoferoles

El contenido total de tocoferoles en la bebida de soja fue de 3,5 mg/L en el producto base y entre 1,9 y 2,8 mg/L en las tratadas térmicamente y por UHPH. En la bebida de almendra, el total de tocoferoles en el producto base fue de 50,6 mg/L y entre 2,8 y 9,5 mg/L en las tratadas térmicamente y por UHPH (Figura 8.1.3).

El contenido total de tocoferoles fue estadísticamente mayor en los productos base que en las bebidas de soja y de almendra tratadas térmicamente y por UHPH ($p < 0,05$), siendo las pérdidas de vitamina provocados por los tratamientos mucho más alta en la bebida de almendra. Los tocoferoles totales en ambas bebidas de soja y de almendra disminuyeron a medida que aumentaba la temperatura al mismo nivel de presión. Y también disminuyeron a medida que aumentaba la presión a la misma temperatura, lo que sugiere que tanto la temperatura como la presión aplicada afectan los tocoferoles en ambos tipos de muestras.

En comparación con los tratamientos térmicos, no se observaron diferencias en los contenidos totales de tocoferoles entre las bebidas de soja y de almendra tratadas por UHPH y las muestras tratadas térmicamente ($p < 0,05$). Así se observa que las condiciones más suaves de UHPH tendrían un efecto análogo al que provoca la pasteurización y las condiciones más intensas el efecto es comparable al del UHT.

Figura 8.1.3. Contenido total de tocoferoles (mg/L) en las bebidas de soja y de almendra.



En la bebida de soja, los tres α -, γ - y δ -tocoferol fueron detectados en todas las muestras, mostrando el mismo perfil entre el PBS y las muestras tratadas tanto térmicamente como por UHPH. La forma predominante fue el γ -tocoferol, con el 51-53% del total de tocoferoles, seguido del δ -tocoferol (40-42%) y del α -tocoferol (7-8%). En lo que respecta a las bebidas de

almendra, los tres α -, γ - y δ -tocoferol fueron detectados solamente en el PBA, siendo el α -tocoferol el mayoritario con más del 90% del total de tocoferoles. En las muestras tratadas térmicamente y por UHPH, el δ -tocoferol sólo se encontró en las muestras de PA (con un 12% del contenido de PBA).

No hay datos disponibles en la literatura del efecto de la UHPH sobre los tocoferoles de las bebidas de soja, ni tampoco de la bebida de almendra. Los resultados muestran que los tratamientos de UHPH aplicados tanto a la bebida de soja como a la de almendra afectan al menos de igual manera a la degradación de los tocoferoles que los tratamientos térmicos. Y en el caso de la bebida de almendra los tocoferoles son menos estables que en bebida de soja. Por el contrario, los tratamientos UHPH no protegen los tocoferoles en las bebidas de soja y de almendra.

Efecto de UHPH sobre las aminas biógenas y las poliaminas

Las aminas biógenas no se detectaron en ninguna de las bebidas de soja y de almendra analizadas, lo que indicaría una correcta práctica higiénica durante la manipulación de la materia prima y el proceso de elaboración, ya que su acumulación está asociada a la actividad de las bacterias contaminantes (Latorre-Moratalla et al, 2008; Linares, et al., 2011). Por otro lado, las poliaminas, SPD y SPM, fueron encontradas en todas las muestras de soja, mientras que en las bebidas de almendra solamente se detectó la SPD.

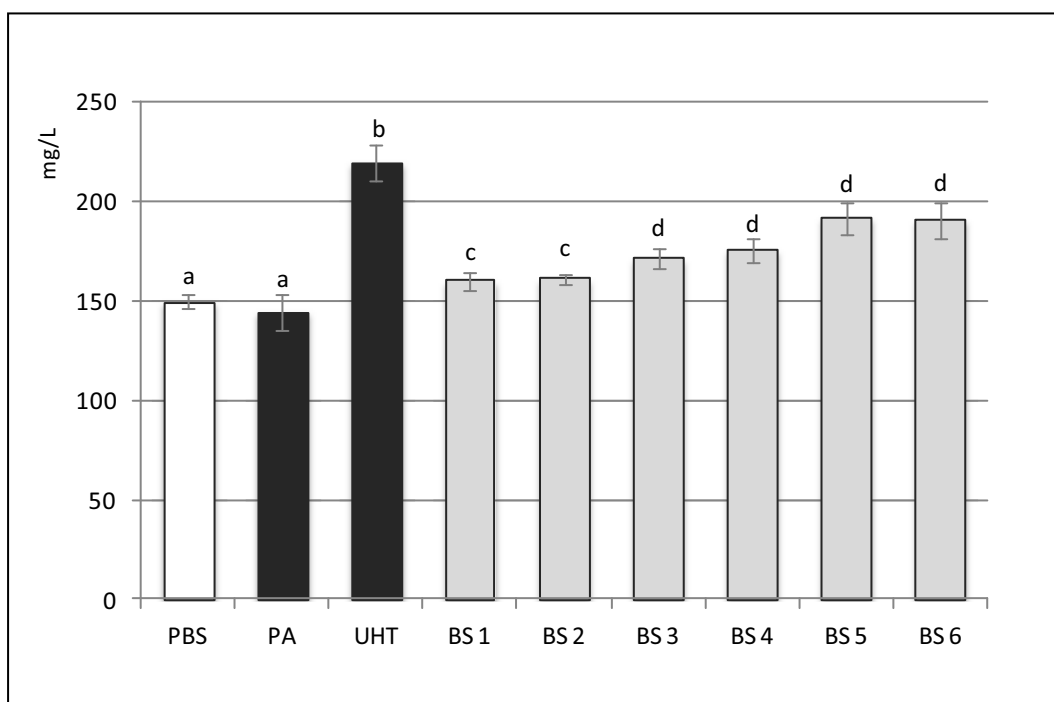
El contenido medio de poliaminas en las bebidas de soja fue de $8,07 \pm 0,26$ y $1,97 \pm 0,06$ mg/L de SPD y SPM, respectivamente, y el contenido medio de SPD en las bebidas de almendra de $0,79 \pm 0,04$ mg/L. No se encontraron diferencias significativas en el contenido de poliaminas en las bebidas de soja y de almendra entre las muestras sin tratar y las tratadas térmicamente y por UHPH, por lo que se concluye que los tratamientos de UHPH, como los térmicos, no afectan a la estabilidad de las poliaminas.

Efecto de la UHPH sobre las isoflavonas de la bebida de soja

El contenido total de isoflavonas en las bebidas de soja fue de 150 mg/L en el producto base y en PA y entre 160-220 mg/L en las tratadas por UHT y UHPH (Figura 8.1.4). Por tanto, el tratamiento UHT (pero no la pasteurización) y todas las muestras UHPH provocaron un aumento de la extracción de las isoflavonas a partir de las proteínas, siendo mayor la extracción por UHT ($p < 0,05$). Entre las muestras tratadas por UHPH, aunque no siempre hay diferencias significativas, se pudo observar una correlación directa entre el total de isoflavonas y la intensidad del tratamiento aplicado (presión y temperatura).

Las isoflavonas están asociadas a las proteínas solubles de la soja y pueden ser liberadas cuando las proteínas son desnaturadas bajo presión y temperatura (Rickert et al., 2004). No hay información disponible del efecto del UHPH sobre las isoflavonas en bebida de soja. Sin embargo, los resultados indican que los tratamientos UHPH mejoran la extracción en comparación con la pasteurización pero no igualan la que se produce en el tratamiento de UHT.

Figura 8.1.4. Contenido total de isoflavonas (mg/L) en las bebidas de soja.



En cuanto al perfil de las formas químicas de las isoflavonas, éste fue el mismo tanto en el producto base de la bebida de soja como en todas las muestras tratadas por UHPH y en las tratadas térmicamente, siendo los conjugados β -glucósidos la forma predominante con más del 50% de las isoflavonas totales, seguido de las agliconas. La suma de ambos representa más de 80% de las isoflavonas totales. Se sabe que el tratamiento térmico hidroliza los conjugados maloniles y acetiles a β -glucósidos (Vacek et al., 2008) y en este estudio se comprueba que sucede lo mismo en los tratamientos UHPH.

8.1.3. Aportaciones más relevantes

- ✓ Los tratamientos UHPH permiten una mejora de la extracción de algunos compuestos bioactivos, tales como fitosteroles o las isoflavonas, siendo mayor el grado de extracción a medida que aumenta la presión y la temperatura aplicada.
- ✓ Por el contrario, los tratamientos UHPH son igual de agresivos con los tocoferoles como los tratamientos térmicos, siendo las pérdidas de tocoferoles más elevada en las bebidas de almendra que en las de soja. Las condiciones más leves de presión y temperatura son las que provocan menos pérdidas de estos nutrientes.
- ✓ Aunque las bebidas de soja y de almendra no son productos ricos en poliaminas, los tratamientos UHPH no afectan su estabilidad.

Artículo III.

N. Toro-Funes, J. Bosch-Fusté, M.T. Veciana-Nogues, M.C. Vidal-Carou (2014). Effect of ultra high pressure homogenization treatment on the bioactive compounds of soya milk. *Food Chemistry*, 152, 597-602.

Índice de impacto (JCR 2012): 3.334

Posición en área "Food and Science Technology": 10/124



Effect of ultra high pressure homogenization treatment on the bioactive compounds of soya milk



N. Toro-Funes, J. Bosch-Fusté, M.T. Veciana-Nogués, M.C. Vidal-Carou*

Department of Nutrition and Food Science-XaRTA, INSA, Faculty of Pharmacy, Campus de l'Alimentació Torribera, University of Barcelona, Avda. Prat de la Riba 171, 08921 Santa Coloma de Gramenet, Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 September 2013

Received in revised form 9 November 2013

Accepted 3 December 2013

Available online 9 December 2013

Keywords:

Soy milk
UHPH
Phytosterols
Tocopherols
Polyamines
Isoflavones

ABSTRACT

Ultra high pressure homogenization (UHPH) is a useful novel technology to obtain safe and high-quality liquid foods. The effect of UHPH at 200 and 300 MPa in combination with different inlet temperatures (T_{in}) (55, 65 and 75 °C) on the bioactive compounds of soya milk was studied. Total phytosterols increased with the higher combination of pressure and temperature. The main phytosterol was β -sitosterol, followed by stigmasterol and campesterol. Total tocopherols in UHPH-treated soya milks decreased as the temperature and pressure increased. UHPH treatment also affected the different chemical forms of tocopherols. No biogenic amines were detected in any of the analyzed soya milks. Meanwhile, the polyamines SPD and SPM were found in all soya milks, being stable to the UHPH treatment. Total isoflavones increased with the higher combination of pressure and temperature. No differences in the isoflavone profile were found, with β -glucoside conjugates being the predominant form.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Soya bean (*Glycine max*) is a legume originally from China and has been used as one of the main protein sources in Eastern countries since ancient times. Recently, in Western countries there has been interest in the health benefits of soya beans and soya products due to the presence of physiologically beneficial phytochemicals (Jooyandeh, 2011). Most of the research on soya products is to elucidate the potential protective activity of isoflavones against cardiovascular diseases, some types of cancer and osteoporosis (Patisaul & Jefferson, 2010). Moreover, soya bean and soya products are an important source of other naturally bioactive compounds such as phytosterols, polyamines and tocopherols. Phytosterols play an important role in the control of cholesterol serum levels by lowering total and LDL-cholesterol (Marangoni & Poli, 2010). Polyamines are involved in growth and differentiation of cells, and have a recognised role as antioxidant compounds especially against cellular oxidative stress (Das & Misra, 2004; Toro-Funes, Bosch-Fusté, Veciana-Nogués, Izquierdo-Pulido, & Vidal-Carou, 2013a). Tocopherols have been extensively studied for their strong antioxidant activity (Niki & Noguchi, 2004).

Soya milk is the highest soya-based product consumed in the world, not only because of its potential health benefits, but also as an alternative to cow's milk for lactose-intolerant individuals,

those allergic to milk proteins, or those avoiding milk for other reasons (Reilly, Lanou, Barnard, Seidl, & Green, 2006). Commercial soya milks are conventionally processed by heat treatment, especially UHT. Thermal treatments could modify the nutrient contents, such as vitamins, and destroy undesirable components, such as trypsin inhibitors (Kwok, Liang, & Niranjana, 2002). Moreover, heat treatment of soya milk is useful and necessary to make nutrients more accessible or to improve palatability and digestibility (Barros-Dourado, Fonseca-Pascoal, Kazue-Sakomura, Perazzo-Costa, & Biagiotti, 2011).

Ultra high pressure homogenization (UHPH) is a novel technology recently studied in food, cosmetic and pharmaceutical areas (Dumay et al., 2012). UHPH is based on the same principle as conventional homogenization, but it works at significantly higher pressures (up to 400 MPa). UHPH is useful to obtain safe and high-quality liquid foods, like soya milk, because it reduces the size of fat globules and other disperse particles to produce fine and stable emulsions (Poliseli-Scopel, Hernández-Herrero, Guamis, & Ferragut, 2012) and improves soya bean protein stabilizing properties (Floury, Desrumaux, & Legrand, 2002). UHPH also destroys microorganisms and inactivates enzymes responsible for food quality losses. Indeed, UHPH is a continuous process that in soya milk could reduce the microbial load to a level equivalent at least to pasteurization (Poliseli-Scopel et al., 2012). UHPH may also produce an improvement in the extraction of potentially health-related compounds (Dumay et al., 2012).

* Corresponding author. Tel.: +34 934033785; fax: +34 934035931.

E-mail address: mcvidal@ub.edu (M.C. Vidal-Carou).

To our knowledge, there are no previous studies evaluating the effect of UHPH upon the bioactive compounds in soya bean products. The aim of this work is to assess the effect of UHPH on the health-related bioactive compounds phytosterols, tocopherols, polyamines and isoflavones in soya milk.

2. Materials and methods

2.1. Sample treatments

2.1.1. Soya milk elaboration

Soya bean (*Glycine max* var *Majesta*) was provided by Liquats Vegetals, S. A. (Girona, Spain). Soya milk samples were produced in the pilot plant of the Autonomous University of Barcelona (Centre Especial Planta de Tecnologia dels Aliments (CERPTA)).

Three productions of soya milk were performed. For each production, whole soya beans were hydrated (1:3 water:soya bean) during 15 h at room temperature and then ground with heat control at 80 °C (adapted from Frigomat, Milan, Italy) for 20 min with recirculation in a colloidal mill (E. Bachiller B. S.A., Barcelona, Spain). The pulp was separated by filtration (model: CE98, Mejisa e Mectufry, Jijona, Spain) to collect the soya milk base product (BP) (2.61 ± 0.04 g/100 mL protein; 1.29 ± 0.08 g/100 mL carbohydrates; 1.78 ± 0.08 g/100 mL fat; 5.56 ± 0.12 g/100 mL dry matter; 0.28 ± 0.02 g/100 mL ash; pH value was 6.72 ± 0.02) for further processing by UHPH.

2.1.2. Soya milk treatments

UHPH treatments were conducted at CERPTA with a high pressure homogenizer (Model FPG11300, Stansted Fluid Powder Ltd., Essex, UK). The UHPH system consisted of a feeding tank connected to a heat exchanger with a residence time of 3 s (Garvia, S.A., Barcelona, Spain) to set the inlet temperature of the product (T_{in}). The UHPH device (Model FPG11300, Stansted Fluid Powder Ltd., Essex, UK) consisted of two hydraulic positive pumps with intensifying effect (relationship 10:1; Stansted Series FPG 9085) which kept a constant flow to the UHPH valve (Stansted Series FPG 9080). The flow rate of the soya milk in the homogeniser was approximately 120 L/h. The ceramic UHPH valve was able to support 400 MPa. Two serial heat exchangers (Garvia, S.A., Barcelona, Spain) were connected to the line for instantaneous cooling of the soya milk with a residence time of 3 s for each exchanger, followed by a laminar flow cabin for aseptic sampling (adapted from model Mini-V, Telstar Technologies, S.L. Terrassa, Spain). The inlet temperature (T_{in}), the temperature at the exit of the UHPH valve (T_{press}) and the final temperature after cooling of the food (T_{out}), were monitored throughout the experiment.

To study the effect of the UHPH in soya milks, six different treatments were conducted. BP was treated at 200 MPa at 55, 65 and 75 °C of T_{in} (UHPH 1, UHPH 2 y UHPH 3, respectively) and 300 MPa at 55, 65 and 75 °C of T_{in} (UHPH 4, UHPH 5 y UHPH 6, respectively).

During the pressurization operation, the soya milk experienced an adiabatic heating in the high pressure valve during approximately 0.7 s, equivalent to about 20 °C per 100 MPa. Then, the T_{press} was 105.7 ± 0.58 °C, 111.7 ± 1.15 °C, or 117.0 ± 2.00 °C in the case of UHPH 1, UHPH 2 and UHPH 3, respectively, and 128.3 ± 1.53 °C, 130.7 ± 1.15 °C, or 135.7 ± 1.53 °C in the case of UHPH 4, UHPH 5 and UHPH 6, respectively. The T_{out} measured was between 25 °C and 27 °C for all treatments. Three productions of each UHPH treatment were performed. Samples of BP and UHPH-treated soya milk were stored at -80 °C until analysis.

2.2. Methods

2.2.1. Phytosterol determination

Samples were lyophilized with a freeze dryer (Telstar, Cryodos, Terrassa, Spain). Then, fat was extracted from soya milk powders with 3×10 mL of a chloroform-methanol mixture (2:1 v/v) with 5% acetic acid. The extracts were combined and evaporated to dryness under vacuum at room temperature with a rotary evaporator. Phytosterols were determined from 100 mg of the extracted fat according to the European Pharmacopoeia (01/2008:20423). As internal standard, 20 μ L of 5- α -colestane (1000 mg/L) was added. Campesterol, stigmasterol, stigmastanol, fucosterol, Δ^5 -avenasterol and β -sitosterol (Sigma S.A.) were determined by gas chromatography using a Thermo Trace GC Ultra system (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) equipped with a BD-5 MS (30 m \times 0.25 mm i.d. \times 0.25 m film thickness) operating with helium as carrier gas, coupled to a Thermo ITQ 900 mass spectrometer (MS). The GC injector was operated in a pulsed splitless mode. The volume of injection was 1 μ L. Injector temperature was 270 °C and the GC oven was programmed to hold 70 °C for 0.5 min, then raise the temperature at 20 °C/min to 210 °C, which was held for 0.5 min and raise the temperature at 3 °C/min to 300 °C, held for 10 min. The MS was operated with the ion source at 200 °C, scanning from m/z 50 to 550 at 3 scans s^{-1} . Analysis was made by triplicate.

2.2.2. Tocopherol analysis

Sample preparation was carried out following the method described by Alves, Casal, and Oliveira (2009), with slight modifications. Briefly, samples were lyophilized with a freeze dryer (Telstar, Cryodos, Terrassa, Spain). Soya milk powder (0.2 g) was dissolved in 1.25 mL of deionized water and spiked with 20 μ L of α -tocopherol acetate (1000 mg/L) as internal standard, 0.125 mL of ascorbic acid (100 mg/L) as an antioxidant for prevention of tocopherol oxidation during the extraction procedure, and 2.5 mL of methanol. After homogenization, the extraction was performed three times with 1.5 mL of n-hexane:ethyl acetate (90:10). The organic phase was collected and taken to dryness under a nitrogen stream. The residue was re-suspended in 750 μ L of dichloromethane:methanol (2:1) for chromatographic analysis. All operations were performed in the absence of light and using amber glassware.

Chromatographic separation of α -, γ - and δ -tocopherol was performed on a Waters Acquity Ultra Liquid Chromatographic System (UPLC™) (Milford, MA, USA). Samples were filtered through a 0.22 μ m filter (GHP, Waters Corp, Milford, MA) and 1 μ L was injected onto a reversed phase Acquity UPLC™ EH C18 1.7 μ m column (2.1 \times 50 mm) (Waters corp., Milford, MA, USA), which was placed into an oven at a constant temperature (30 °C). The UPLC™ system consisted of a binary pump, an auto-sampler and a diode array detector (Waters 2996, Milford, MA), which was set at 292 nm. Optimum separation was achieved with a binary mobile solvent that consisted of acetonitrile and methanol (60:40) under isocratic conditions at a constant flow rate of 0.6 mL/min. Analysis was made by triplicate.

2.2.3. Biogenic amines and polyamines analysis

An aliquot of 5–10 g of sample was extracted twice with 10 mL of perchloric acid 0.6 M on a magnetic stirring plate for 20 min. Thereafter, the two phases were separated by centrifugation at 5600g at 4 °C for 20 min. The supernatants collected were combined and the final volume was adjusted to 25 mL with 0.6 M perchloric acid. Twelve amines, octopamine (OC), dopamine (DO), tyramine (TY), putrescine (PU), cadaverine (CA), histamine (HI), agmatine (AGM), serotonin (SE), β -phenylethylamine (PHE), spermidine (SPM), tryptamine (TR) and spermine (SPD), were determined by a ultra high performance liquid chromatography with

fluorescence detection system (UPLC™) (Waters Acquity System, Milford, MA, USA) following the method described by Latorre-Moratalla et al. (2009). Analysis was made by triplicate.

2.2.4. Isoflavones analysis

Samples were lyophilized with a freeze dryer (Telstar, Cryodos, Terrassa, Spain). An aliquot of 0.5 g of soya milk powder was mixed with 5 mL acetone-hydrochloric acid 0.1 N (5:1 v/v) for 2 h at room temperature. The solution was then centrifuged at 6000 rpm at 25 °C for 20 min. The supernatant was evaporated to dryness under vacuum at 35 °C with a rotary evaporator, and re-suspended with 5 mL of methanol for chromatographic analysis.

Determination of twelve isoflavones (the aglycones daidzein, genistein and glycitein, and their β -glucosides, acetyl- β -glucosides and malonyl- β -glucosides), was performed by UPLC™ (Waters Acquity System, Milford, MA, USA) with a diode array detector (Waters 2996, Milford, MA) following the method described by Toro-Funes et al. (2012). Analysis was made by triplicate.

2.3. Statistical analysis

Non-parametrical Kruskal–Wallis analysis was performed. The least significant difference test was employed to determine differences between means at a 5% significance level. Results were analyzed using the Statistical Software Package for Windows PASW Statistic 20.0 (SPSS, Chicago, IL, USA).

3. Results and discussion

3.1. UHPH effect on soya milk phytosterols

Total phytosterols (mg/L) and their composition in BP and UHPH-treated soya milk samples are shown in Table 1. In all the samples, the main phytosterol was β -sitosterol, which represents almost 50% of phytosterols in all samples, followed by stigmasterol and campesterol, which represent 25% and 23%, respectively. No data regarding the phytosterol composition in soya milk was found in the literature. However, a similar profile was reported for the phytosterol composition in soya beans by Shi, Nam, and Ma (2010) and Isanga and Zhang (2008).

Total phytosterols were 190.77 ± 7.34 mg/L in BP and ranged from 224.53 ± 6.32 to 266.80 ± 12.07 mg/L in UHPH-treated soya milks. The total phytosterols determined in BP was statistically lower than UHPH-treated samples; therefore, the combination of pressure/temperature in UHPH treatment increased the total phytosterol extractability. The highest phytosterols were found at the highest T_{in} (75 °C), regardless of the applied pressure conditions. Very little information about the effect of pressure on the phytosterol extractability in foods is available.

Some authors have suggested that micronutrients and bioactive compounds in certain fruits and vegetables may be more extractable by high pressure treatments (Barba, Esteve, & Frijola, 2012).

During UHPH treatment several mechanical forces, such as cavitation, turbulence, impact and shear forces, reduce the size of fat globules and others dispersed particles to afford emulsions with a high degree of stability (Desrumaux & Marcand, 2002; Hayes & Kelly, 2003). The effect of these mechanical forces on soya milk can release the phytosterols from the fat globules, which could explain the increase in phytosterol extractability observed in UHPH-treated soya milks.

It is known that not only the temperature but also the processing time in heat treatments affect the amount of phytosterols in a food matrix, because it enhances their oxidation process. Menéndez-Carreño, Ansorena, and Astiasarán (2008) reported a 60% decrease in total phytosterol content after heating treatments of 15 min at 90 °C or 2 min of microwave heating at 900 W. Oehrl, Hansen, Rohrer, Fenner, and Boyd (2001) analyzed the stability of phytosterols in vegetable oils and found that heating at 100, 150 and 180 °C for 20 h led to a decrease in 30%, 90% and 98% of the total phytosterol content, respectively. Temperatures between 105.7 °C and 135.7 °C reached in the high pressure valve during the UHPH treatments were close to those reported to phytosterol degradation. However, in the current work the combination of pressure, temperature and processing time did not significantly affect the phytosterol compounds.

3.2. UHPH effect on soya milk tocopherols

Total tocopherols (mg/L) in BP and UHPH-treated soymilk samples are shown in Fig. 1. α -, γ - and δ -tocopherol chemical forms were found in all samples showing the same profile between BP and UHPH-treated samples. The predominant form was γ -tocopherol, which corresponds to the 51–53% of total tocopherols in all treatments, followed by δ -tocopherol (40–42%) and α -tocopherol (7–8%).

BP showed the highest total tocopherols determined (3.46 ± 0.08 mg/L). Among the UHPH-treated samples, the highest total tocopherols was found in the UHPH 1 sample with 2.67 ± 0.07 mg/L, which corresponds the 80% of the BP. The lowest was found in UHPH 6 sample with 1.86 ± 0.04 mg/L, which corresponds the 50% of the BP. Total tocopherols decreased as the temperature increased at the same pressure level, and it also decreased as the pressure increased at the same temperature, suggesting that both the temperature and pressure applied in this study affect the tocopherol concentrations.

There are no studies about the effect of UHPH treatment on the stability of the tocopherols in any food matrix, not even information about the effect of high pressure processing on tocopherols in soya milk. However, there are some controversial results about their stability upon high pressure processing in different food matrices. Barba et al. (2012) reported a significant increase in the total tocopherol content in orange juice milk treated by isostatic high pressure conditions applied of 100–400 MPa/15–30 °C/9 min, mainly due to an increase in α -tocopherol content, reaching

Table 1

Mean of total β -sitosterol, stigmasterol, campesterol, Δ^5 -avenasterol and stigmastanol (mg/L) in base product (BP) and UHPH-treated soymilk samples. Three productions of all soya milk samples were performed. Analysis was made by triplicate.

	BP	UHPH 1	UHPH 2	UHPH 3	UHPH 4	UHPH 5	UHPH 6
β -sitosterol	94.09 \pm 3.66	106.61 \pm 5.98	107.07 \pm 6.41	120.09 \pm 3.95	111.00 \pm 7.21	106.45 \pm 7.85	120.93 \pm 7.88
Stigmasterol	52.00 \pm 2.71	58.77 \pm 3.21	60.31 \pm 4.44	64.67 \pm 4.55	60.60 \pm 1.41	58.39 \pm 3.52	68.86 \pm 3.41
Campesterol	38.58 \pm 1.44	51.78 \pm 2.74	53.71 \pm 1.25	58.90 \pm 1.41	50.77 \pm 2.55	53.99 \pm 3.63	64.10 \pm 2.05
Δ^5 -avenasterol	3.48 \pm 0.15	3.84 \pm 0.14	7.38 \pm 0.41	8.04 \pm 0.22	2.88 \pm 0.03	6.32 \pm 0.16	8.69 \pm 0.14
Stigmastanol	2.63 \pm 0.14	3.53 \pm 0.08	2.65 \pm 0.06	3.26 \pm 0.05	3.60 \pm 0.05	3.47 \pm 0.15	4.23 \pm 0.21
Total	190.77 \pm 7.34 ^a	224.53 \pm 6.32 ^b	231.12 \pm 10.08 ^b	254.87 \pm 9.68 ^c	228.25 \pm 10.94 ^b	228.62 \pm 11.08 ^b	266.80 \pm 12.07 ^c

Letters indicate statistically significant differences ($p < 0.05$) in the total phytosterol contents between treatments obtained by applying an ANOVA test. Fucosterol was not detected.

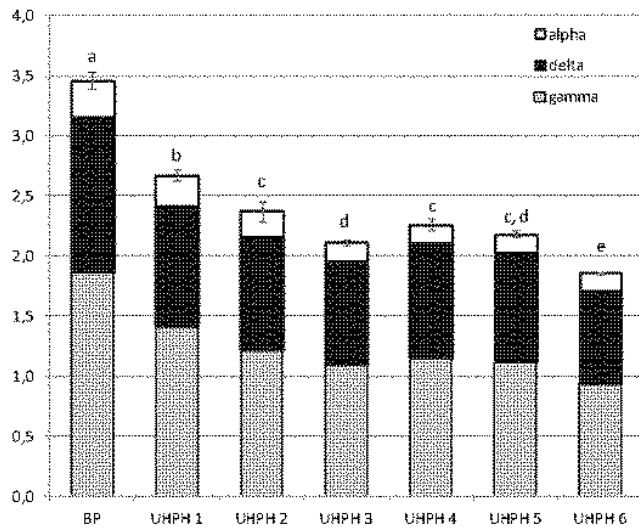


Fig. 1. Total tocopherols determined (mg/L) in base product (BP) and UHPH treated soya milk samples. Three productions of all soya milk samples were performed. Analysis was performed in triplicate. Letters indicate the existence of statistically significant differences ($p < 0.05$) obtained by applying an ANOVA test.

Table 2

Spermidine and spermine (mg/L) in base product (BP) and UHPH-treated soya milk samples. Three productions of all soya milk samples were performed. Analysis was performed in triplicate.

	Spermidine	Spermine
BP	8.18 ± 0.1	1.98 ± 0.07
UHPH 1	8.37 ± 0.3	1.92 ± 0.08
UHPH 2	8.22 ± 0.1	2.02 ± 0.05
UHPH 3	7.77 ± 0.2	1.91 ± 0.04
UHPH 4	8.09 ± 0.1	1.98 ± 0.11
UHPH 5	7.94 ± 0.1	2.04 ± 0.18
UHPH 6	7.97 ± 0.4	1.96 ± 0.15

a maximum at 200–300 MPa. On the other hand, in a vegetable beverage, a significant decrease in total tocopherol content was observed when 100 MPa was applied, whereas a significant increase after the application of 200–400 MPa was found. Moreover, Moltó-Puigmartí, Permanyer, Castellote, and López-Sabater (2011) did not find significant changes in the total content and δ -, γ -, and α -tocopherols levels when they applied isostatic high pressure (400–600 MPa/22–27 °C/5 min) in mature human milk.

The instability of tocopherols to temperature is well documented. Evans, Kodali, and Addis (2002) reported the instability of α -tocopherol at 40–60 °C in soya bean oil. Our results showed that the best combination of pressure and temperature in the UHPH treatment to avoid the degradation of tocopherols are the mildest conditions of UHPH 1.

3.3. UHPH effect on soya milk biogenic amines and polyamines

No biogenic amines (OC, DO, TY, PU, CA, HI, AGM, SE, PHE or TR) were detected in any analyzed soya milks, as expected for a non-fermented soya bean product. On the other hand, polyamines, SPD and SPM, were found in all samples. The presence of SPD and SPM were expected since both are naturally occurring polyamines in plants and animal tissues. Polyamine contents (mg/l) in UHPH-treated soya milk samples are shown in Table 2. There were no differences in the polyamine contents between the BP and UHPH treatments ($p < 0.05$); therefore UHPH treatment did not affect the stability of polyamines. SPD and SPM mean contents were 8.07 ± 0.26 and 1.97 ± 0.06 mg/L, respectively, which

Table 3 Isoflavones (mg/L) in base product (BP) and UHPH-treated soya milks. Three productions of all soya milk samples were performed. Analysis was performed in triplicate.

	Aghicones						Malonyl- β -glucosides						Total Isoflavones																								
	Ge	De	Gle	Gli	Di	Da	AGI	AGL	AGLY	MDI	MGI	MGLY	MDI	MGI	MGLY	MDI	MGI	MGLY																			
BP	24.50 ± 0.47	16.80 ± 0.33	1.20 ± 0.02	31.24 ± 1.19	32.61 ± 1.80	14.79 ± 0.66	1.98 ± 0.06	0.14 ± 0.01	nd	17.19 ± 0.77	7.57 ± 0.22	1.39 ± 0.02	149.42 ± 3.41 ^a	18.28 ± 0.44	8.01 ± 0.47	1.35 ± 0.02	159.83 ± 4.77 ^a	19.01 ± 1.00	8.05 ± 0.07	1.39 ± 0.01	160.83 ± 2.26 ^b	21.45 ± 1.13	10.45 ± 0.27	1.53 ± 0.08	170.95 ± 8.71 ^b	19.93 ± 0.50	9.10 ± 0.60	1.54 ± 0.04	175.39 ± 5.82 ^b	22.29 ± 1.38	10.01 ± 0.06	1.70 ± 0.10	191.62 ± 9.60 ^b	22.88 ± 1.14	10.29 ± 0.72	1.71 ± 0.02	190.63 ± 9.33 ^b
UHPH 1	27.08 ± 1.45	18.91 ± 0.80	1.27 ± 0.09	33.39 ± 1.31	33.68 ± 1.00	15.68 ± 0.26	2.05 ± 0.05	0.18 ± 0.01	nd	18.28 ± 0.44	8.01 ± 0.47	1.35 ± 0.02	159.83 ± 4.77 ^a	19.01 ± 1.00	8.05 ± 0.07	1.39 ± 0.01	160.83 ± 2.26 ^b	21.45 ± 1.13	10.45 ± 0.27	1.53 ± 0.08	170.95 ± 8.71 ^b	19.93 ± 0.50	9.10 ± 0.60	1.54 ± 0.04	175.39 ± 5.82 ^b	22.29 ± 1.38	10.01 ± 0.06	1.70 ± 0.10	191.62 ± 9.60 ^b	22.88 ± 1.14	10.29 ± 0.72	1.71 ± 0.02	190.63 ± 9.33 ^b				
UHPH 2	26.29 ± 1.43	19.20 ± 0.35	1.20 ± 0.01	33.64 ± 1.63	33.81 ± 1.14	15.99 ± 0.38	2.10 ± 0.08	0.14 ± 0.01	nd	19.01 ± 1.00	8.05 ± 0.07	1.39 ± 0.01	160.83 ± 2.26 ^b	21.45 ± 1.13	10.45 ± 0.27	1.53 ± 0.08	170.95 ± 8.71 ^b	19.93 ± 0.50	9.10 ± 0.60	1.54 ± 0.04	175.39 ± 5.82 ^b	22.29 ± 1.38	10.01 ± 0.06	1.70 ± 0.10	191.62 ± 9.60 ^b	22.88 ± 1.14	10.29 ± 0.72	1.71 ± 0.02	190.63 ± 9.33 ^b	22.88 ± 1.14	10.29 ± 0.72	1.71 ± 0.02	190.63 ± 9.33 ^b				
UHPH 3	25.52 ± 1.48	20.80 ± 0.49	1.39 ± 0.04	35.11 ± 2.00	35.44 ± 2.63	16.98 ± 0.51	2.13 ± 0.12	0.15 ± 0.01	nd	21.45 ± 1.13	10.45 ± 0.27	1.53 ± 0.08	170.95 ± 8.71 ^b	19.93 ± 0.50	9.10 ± 0.60	1.54 ± 0.04	175.39 ± 5.82 ^b	22.29 ± 1.38	10.01 ± 0.06	1.70 ± 0.10	191.62 ± 9.60 ^b	22.88 ± 1.14	10.29 ± 0.72	1.71 ± 0.02	190.63 ± 9.33 ^b	22.88 ± 1.14	10.29 ± 0.72	1.71 ± 0.02	190.63 ± 9.33 ^b	22.88 ± 1.14	10.29 ± 0.72	1.71 ± 0.02	190.63 ± 9.33 ^b				
UHPH 4	26.21 ± 0.89	19.32 ± 0.80	1.19 ± 0.09	39.10 ± 1.70	38.57 ± 1.29	18.06 ± 0.24	2.19 ± 0.06	0.17 ± 0.01	nd	19.93 ± 0.50	9.10 ± 0.60	1.54 ± 0.04	175.39 ± 5.82 ^b	22.29 ± 1.38	10.01 ± 0.06	1.70 ± 0.10	191.62 ± 9.60 ^b	22.88 ± 1.14	10.29 ± 0.72	1.71 ± 0.02	190.63 ± 9.33 ^b	22.88 ± 1.14	10.29 ± 0.72	1.71 ± 0.02	190.63 ± 9.33 ^b	22.88 ± 1.14	10.29 ± 0.72	1.71 ± 0.02	190.63 ± 9.33 ^b	22.88 ± 1.14	10.29 ± 0.72	1.71 ± 0.02	190.63 ± 9.33 ^b				
UHPH 5	28.41 ± 0.07	21.07 ± 0.48	1.36 ± 0.06	42.67 ± 1.10	42.38 ± 2.52	19.41 ± 0.80	2.12 ± 0.02	0.20 ± 0.01	nd	22.29 ± 1.38	10.01 ± 0.06	1.70 ± 0.10	191.62 ± 9.60 ^b	22.88 ± 1.14	10.29 ± 0.72	1.71 ± 0.02	190.63 ± 9.33 ^b	22.88 ± 1.14	10.29 ± 0.72	1.71 ± 0.02	190.63 ± 9.33 ^b	22.88 ± 1.14	10.29 ± 0.72	1.71 ± 0.02	190.63 ± 9.33 ^b	22.88 ± 1.14	10.29 ± 0.72	1.71 ± 0.02	190.63 ± 9.33 ^b	22.88 ± 1.14	10.29 ± 0.72	1.71 ± 0.02	190.63 ± 9.33 ^b				
UHPH 6	30.23 ± 1.63	21.75 ± 1.09	1.40 ± 0.05	39.87 ± 1.82	40.89 ± 0.82	19.22 ± 0.56	2.21 ± 0.16	0.20 ± 0.01	nd	22.88 ± 1.14	10.29 ± 0.72	1.71 ± 0.02	190.63 ± 9.33 ^b	22.88 ± 1.14	10.29 ± 0.72	1.71 ± 0.02	190.63 ± 9.33 ^b	22.88 ± 1.14	10.29 ± 0.72	1.71 ± 0.02	190.63 ± 9.33 ^b	22.88 ± 1.14	10.29 ± 0.72	1.71 ± 0.02	190.63 ± 9.33 ^b	22.88 ± 1.14	10.29 ± 0.72	1.71 ± 0.02	190.63 ± 9.33 ^b	22.88 ± 1.14	10.29 ± 0.72	1.71 ± 0.02	190.63 ± 9.33 ^b				

Abbreviations: Ge: genistein; De: daidzein; Gle: glycitein; Gli: glycitin; Di: daidzin; Da: daidzin; AGI: acetyl- β -genistein; AGL: acetyl- β -genistin; AGLY: acetyl- β -genistin; MDI: malonyl- β -daidzin; MGI: malonyl- β -genistin; MGLY: malonyl- β -glycitin.

a–c Values in the same column with different letters were significant differences ($p < 0.05$).

are in agreement with values reported in commercial soya milk by Toro-Funes, Bosch-Fusté, Latorre-Moratalla, Veciana-Nogués, and Vidal-Carou (2013b).

Polyamines are known to be stable to heat treatment and cooking or prolonged exposure to heat does not degrade them (Naila, Flint, Fletcher, Bremer, & Meerdink, 2010). However, some authors have reported an important decrease in the polyamines after a high heat treatment with temperatures of 300 °C during 6–12 min (Cirilo et al., 2003). The highest temperature associated with the UHPH process in the current work (135.7 °C in the UHPH 6) is lower than those reported to degrade polyamine. On the other hand, it has been reported that SPD and SPM were stable under isostatic high pressure processing at 400 MPa/30 °C/10 min in frankfurter samples (Ruiz-Capillas, Carballo, & Jiménez-Colmenero, 2007). Our results also suggest that the combination of pressure and the temperatures applied in the dynamic UHPH treatments did not affect the stability of polyamines.

3.4. UHPH effect on soya milk isoflavones

The content and composition of isoflavones in the UHPH-treated soya milks (mg/L) are shown in Table 3. Total isoflavones determined varied among samples from 149.42 mg/L in BP to 159.83–191.62 mg/L in UHPH-treated soya milks. Isoflavone content can vary depending on the variety of the soya bean and also of the obtaining process. Similar total isoflavone contents were found in soya milk by Prabhakaran and Perera (2006) in a pilot plant scale soya milks and by Chen and Wei (2008) in commercial soya milks. The total isoflavones in UHPH-treated samples was statistically higher than BP samples. A direct correlation between the total isoflavone determined and the intensity of the treatment applied (pressure and temperature) can be observed. Isoflavones are associated to soluble proteins and could be released when soya proteins are denatured, which occurs under pressure and temperature (Rickert, Meyer, Hu, & Murphy, 2004). This fact could explain why the total isoflavone content was higher when higher temperatures and pressures were applied to the UHPH-treated soya milk (Table 3).

The profile of isoflavone chemical forms was the same in all UHPH-treated and BP samples. All soya milk samples showed the β -glucosides conjugates of isoflavones as the predominant form at more than 50% of the total isoflavones (Table 3), following by the aglycones, being the sum of both more than 80% of the total isoflavones determined. Heat treatment hydrolyses malonyl and acetyl conjugates to β -glucosides, which explains the predominance of β -glucoside forms in soya milk (Vacek, Klejdus, Lojkova, & Kuban, 2008). Jung, Murphy, and Sala (2008) found low levels of malonyl- β -glucosides in soya milk treated by isostatic high pressure processing from 400 to 700 MPa and 75 °C; but, at 400–700 MPa and 25 °C, these compounds were the major forms. This fact suggests that the conversion from malonyl- β -glucosides to β -glucosides was related to the temperature applied to the soya milk and not the pressure.

4. Conclusions

In the present study, we report that UHPH treatment significantly increased the total phytosterol and isoflavone extractability in soya milk. The degree of extraction of phytosterols and isoflavones was higher as pressure and temperature increased. On the contrary, a significant decrease in the total tocopherols was found after UHPH treatment. Both pressure and temperature affected the occurrence of tocopherols in soya milk. Finally, polyamines SPD and SPM were not affected during UHPH treatment.

Acknowledgements

The authors would like to thank the *Direcció General de Recerca of the Generalitat de Catalunya* (2008-00668 SGR) for their support and for a grant from the *Ministerio de Educación y Ciencia (Spain)* to the PhD student Natalia Toro-Funes. This work was also supported by the Interministerial Commission for Science and Technology (CICYT) of the *Ministerio de Educación y Ciencia (Spain)* through the Project AGL-2008-05430-C02-02.

References

- Alves, R. T., Casal, S., & Oliveira, P. P. (2009). Tocopherols in espresso coffee: Analytical method development and validation. *Food Chemistry*, 115, 1549–1555.
- Barba, F. J., Esteve, M. J., & Frijola, A. (2012). Impact of High-Pressure processing on vitamin E (α -, γ -, and δ -tocopherol), vitamin D (Cholecalciferol and Ergocalciferol), and fatty acid profiles in liquid foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 3763–3768.
- Barros-Dourado, L.R., Fonseca-Pascoal, L.A., Kazue-Sakomura, N., Perazzo-Costa, F.G., & Biagiotti, D. (2011). Soybeans (Glycine max) and Soybean Products in Poultry and Swine Nutrition. Recent Trends for Enhancing the Diversity and Quality of Soybean Products. Ed. Dora Krezhova.
- Chen, T. R., & Wei, Q. H. (2008). Analysis of bioactive aglycone isoflavones in soy bean and soybean products. *Nutrition and Food Science*, 38, 540–547.
- Cirilo, M. P. G., Coelho, A. F. S., Araújo, C. M., Gonçalves, F. R. B., Nogueira, F. D., & Glória, M. B. A. (2003). Profile and levels of bioactive amines in green and roasted coffee. *Food Chemistry*, 82(3), 397–402.
- Das, K. C., & Misra, H. P. (2004). Hydroxyl radical scavenging and singlet oxygen quenching properties of polyamines. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 262, 127–133.
- Desrumaux, A., & Marcand, J. (2002). Formation of sunflower oil emulsions stabilized by whey proteins with high-pressure homogenization (up to 350 MPa): effect of pressure on emulsion characteristics. *International Journal of Food Science and Technology*, 37, 263–269.
- Dumay, E., Chevalier-Lucia, D., Picart-Palmade, L., Benzaria, A., Gràcia-Julà, A., & Blayo, C. (2012). Technological aspects and potential applications of (ultra) high-pressure homogenisation. *Trends in Food Science & Technology*, XX, 1–14. European Pharmacopoeia. (2008), 8th ed, Council of Europe, Strasbourg.
- Evans, J. C., Kodali, D. R., & Addis, P. B. (2002). Optimal tocopherol concentrations to inhibit soybean oil oxidation. *Journal of the American Oil Chemical Society*, 79, 47–51.
- Floury, J., Desrumaux, A., & Legrand, A. (2002). Effect of ultra-high-pressure homogenization on structure and on rheological properties of Soy protein-stabilized emulsions. *Journal of Food Science*, 67(9), 3388–3395.
- Hayes, M. G., & Kelly, A. (2003). High pressure homogenization of whole bovine milk (a) affects on fat globule size and others properties. *Journal of Dairy Research*, 70, 297–305.
- Isanga, J., & Zhang, G. N. (2008). Soybean bioactive compounds and their implications to health – A review. *Food Reviews International*, 24, 252–276.
- Jooyandeh, H. (2011). Soy products as healthy and functional foods. *Middle-East Journal of Scientific Research*, 7(1), 71–80.
- Jung, S., Murphy, P. A., & Sala, I. (2008). Isoflavone profiles of soya milk as affected by high-pressure treatments of soya milk and soya beans. *Food Chemistry*, 111(3), 592–598.
- Kwok, K. C., Liang, H. H., & Niranjana, K. (2002). Optimizing conditions for thermal processes of Soy milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(17), 4834–4838.
- Latorre-Moratalla, M. L., Bosch-Fusté, J., Lavizzari, T., Bover-Cid, S., Veciana-Nogués, M. T., & Vidal-carou, M. C. (2009). Validation of an ultrahigh pressure liquid chromatographic method for the determination of biologically active amines in food. *Journal of chromatography A*, 1216, 7715–7720.
- Marangoni, F., & Poli, A. (2010). Phytosterols and cardiovascular health. *Pharmacological Research*, 61(3), 191–199.
- Menéndez-Carreño, M., Ansorena, D., & Astiasarán, I. (2008). Stability of sterols in phytosterol-enriched milk under different heating conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(21), 9997–10002.
- Moltó-Puigmartí, C., Permanyer, M., Castellote, A. I., & López-Sabater, M. C. (2011). Effects of pasteurisation and high-pressure processing on vitamin C, tocopherols and fatty acids in mature human milk. *Food Chemistry*, 124, 697–702.
- Naila, A., Flint, S., Fletcher, G., Bremer, P., & Meerdink, G. (2010). Control of biogenic amines in food – Existing and emerging approaches. *Journal of Food Science*, 75(7), R139–R150.
- Niki, E., & Noguchi, N. (2004). Dynamics of antioxidant action of Vitamin E. *Account of Chemical Research*, 37(1), 45–51.
- Oehrl, L.L., Hansen, A. P., Rohrer, C. A., Fenner, G. P., & Boyd, L. C. (2001). Oxidation of phytosterols in a test food system. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 78(11), 1073–1078.
- Patisaul, H. B., & Jefferson, W. (2010). The pros and cons of phytoestrogens. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 31(4), 400–419.

- Poliseli-Scopel, F. H., Hernández-Herrero, M., Guamis, B., & Ferragut, V. (2012). Comparison of ultra high pressure homogenization and conventional thermal treatments on the microbiological, physical and chemical quality of soya milk. *LWT – Food Science and Technology*, 46(1), 42–48.
- Prabhakaran, M. P., & Perera, C. O. (2006). Effect of extraction methods and UHT treatment conditions on the level of isoflavones during soya milk manufacture. *Food Chemistry*, 99(2), 231–237.
- Reilly, J. K., Lanou, A. J., Barnard, N. D., Seidl, K., & Green, A. A. (2006). Acceptability of Soymilk as a calcium-rich beverage in elementary school children. *Journal of the American Dietetic Association*, 106(4), 590–593.
- Rickert, D. A., Meyer, M. A., Hu, J., & Murphy, P. A. (2004). Effect of extraction pH and temperature on isoflavone and saponin partitioning and profile during soy protein isolate production. *Journal of Food Science*, 69, 623–631.
- Ruiz-Capillas, C., Carballo, J., & Jiménez-Colmenero, F. (2007). Consequences of high-pressure processing of vacuum-packaged frankfurters on the formation of polyamines: Effect of chilled storage. *Food Chemistry*, 104, 202–208.
- Shi, H., Nam, P. K., & Ma, Y. (2010). Comprehensive profiling of isoflavones, phytosterols, tocopherols, minerals, crude protein, lipid, and sugar during soybean (*Glycine max*) germination. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(8), 4970–4976.
- Toro-Funes, N., Bosch-Fusté, J., Veciana-Nogués, M. T., Izquierdo-Pulido, M., & Vidal-Carou, M. C. (2013a). *In vitro* antioxidant activity of dietary polyamines. *Food Research International*, 51, 141–147.
- Toro-Funes, N., Bosch-Fusté, J., Latorre-Moratalla, M.L., Veciana-Nogués, M.T., & Vidal-Carou, M.C. (2013b). Biologically active amines in commercial soybean products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Under revision.
- Toro-Funes, N., Odriozola-Serrano, I., Bosch-Fusté, J., Latorre-Moratalla, M. L., Veciana-Nogués, M. T., Izquierdo-Pulido, M., et al. (2012). Fast simultaneous determination of free and conjugated isoflavones in soy milk by UHPLC–UV. *Food Chemistry*, 135(4), 2832–2838.
- Vacek, J., Klejdus, B., Lojkova, L., & Kuban, V. (2008). Current trends in isolation, separation, determination and identification of isoflavones: A review. *Journal of Separation Science*, 31, 2054–2067.

Artículo IV.

N. Toro-Funes, J. Bosch-Fusté, M.T. Veciana-Nogues, M.C. Vidal-Carou (2014). Effect of ultra high pressure homogenization treatment on the phytosterols and some antioxidant compounds of almond milk. En preparación para Journal of Agricultural and Food Science.

Artículo V.

N. Toro-Funes, J. Bosch-Fusté, M.T. Veciana-Nogues, M.C. Vidal-Carou (2014). Comparison of the effects of ultra high pressure homogenization and heat treatments on the bioactive compounds of soymilk and almond milk. En preparación.

8.2. Estabilidad de los compuestos nutritivos y bioactivos de la bebida de soja tratada por UHPH durante el almacenamiento en refrigeración y a temperatura ambiente.

Artículo VI.

N. Toro-Funes, J. Bosch-Fusté, M.T. Veciana-Nogues, M.C. Vidal-Carou (2014). Changes of isoflavones and protein quality in soymilk pasteurized by ultra high pressure homogenization throughout storage. Food Chemistry, In Press.

Índice de impacto (JCR 2012): 3.334

Posición en área "Food and Science Technology": 10/124

Artículo VII.

N. Toro-Funes, J. Bosch-Fusté, M.T. Veciana-Nogues, M.C. Vidal-Carou (2014). Isoflavone profile and protein quality in sterilized soymilk treated by Ultra High Pressure Homogenization during storage. Food Chemistry, Under Revision.

Índice de impacto (JCR 2012): 3.334

Posición en área "Food and Science Technology": 10/124

Comunicación escrita I.

N. Toro-Funes, J. Bosch-Fusté, M. L. Latorre-Moratalla, M.T. Veciana-Nogues, M.C. Vidal-Carou. Efecto de la Ultra Alta Presión de Homogeneización sobre la estabilidad de las isoflavonas en la bebida de soja durante el almacenamiento en refrigeración. "VII Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (CyTA)". Córdoba (España). 12-14 Junio del 2013.

8.2.1. Planteamiento y objetivo del estudio

En el marco del proyecto nacional "AGL2008-05430-C02-02", el grupo de investigación del CERPTA seleccionó las condiciones de presión y de temperatura de entrada que permitían obtener bebidas de soja de buena calidad desde un punto de vista microbiológico, físico-químico y sensorial. Se seleccionaron las condiciones de UHPH que permiten obtener bebidas de soja equiparables en cuanto a vida útil a productos pasteurizados y esterilizados térmicamente (Poliseli-Scopel et al., 2013; Poliseli-Scopel et al., 2014). Así, como equiparable a la pasteurización, se seleccionaron dos condiciones: a 200 MPa y 55 °C de temperatura de entrada y a 200 MPa y 75 °C. Y una condición de UHPH equiparable a la esterilización: 300 MPa y 75 °C de temperatura de entrada.

Una vez conocido el efecto del UHPH sobre los componentes nutricionales y bioactivos de la bebida de soja. El objetivo de este apartado es valorar su estabilidad durante el almacenamiento. En concreto, se pretende estudiar en las bebidas de soja tratadas por UHPH si hay cambios en las isoflavonas, los fitosteroles y los tocoferoles, así como en la digestibilidad proteica "in vitro" y la lisina bloqueada. A su vez, se comparan los cambios observables con los que se producen durante el almacenamiento en la bebida de soja pasteurizada y esterilizada térmicamente.

8.2.2. Diseño experimental

En los productos pasteurizados de almacenamiento en refrigeración, se realizaron tres producciones diferentes de cada bebida de soja. A cada una de ellas, se aplicaron tres tratamientos sobre el producto base: uno de PA (95 °C, 30 s) y dos de UHPH, a 200 MPa a 55 y 75 °C de temperatura de entrada (UHPH T₁ y UHPH T₂). Las muestras fueron almacenadas en frascos estériles de 50 mL a 4 °C durante un máximo de 21 días. La toma de muestra se realizó cada siete días (tiempo 0, 7, 14 y 21) y se almacenaron a -30 °C hasta su análisis.

En los productos de larga duración almacenados a temperatura ambiente, se realizaron también tres producciones diferentes de cada bebida de soja. A cada producción, se le aplicaron dos tratamientos sobre el producto base: uno de UHT (142 °C, 6 s) y uno de UHPH, a 300 MPa y 75 °C de temperatura de entrada (UHPH T₃). Las muestras fueron envasadas

asépticamente en contenedores Tetra Brick de 200 mL y posteriormente fueron almacenadas a temperatura ambiente en un lugar seco y oscuro durante 4 meses. Se tomaron muestras mensualmente (tiempo 0, 1, 2, 3 y 4 meses) y se almacenaron a -30 °C hasta su análisis.

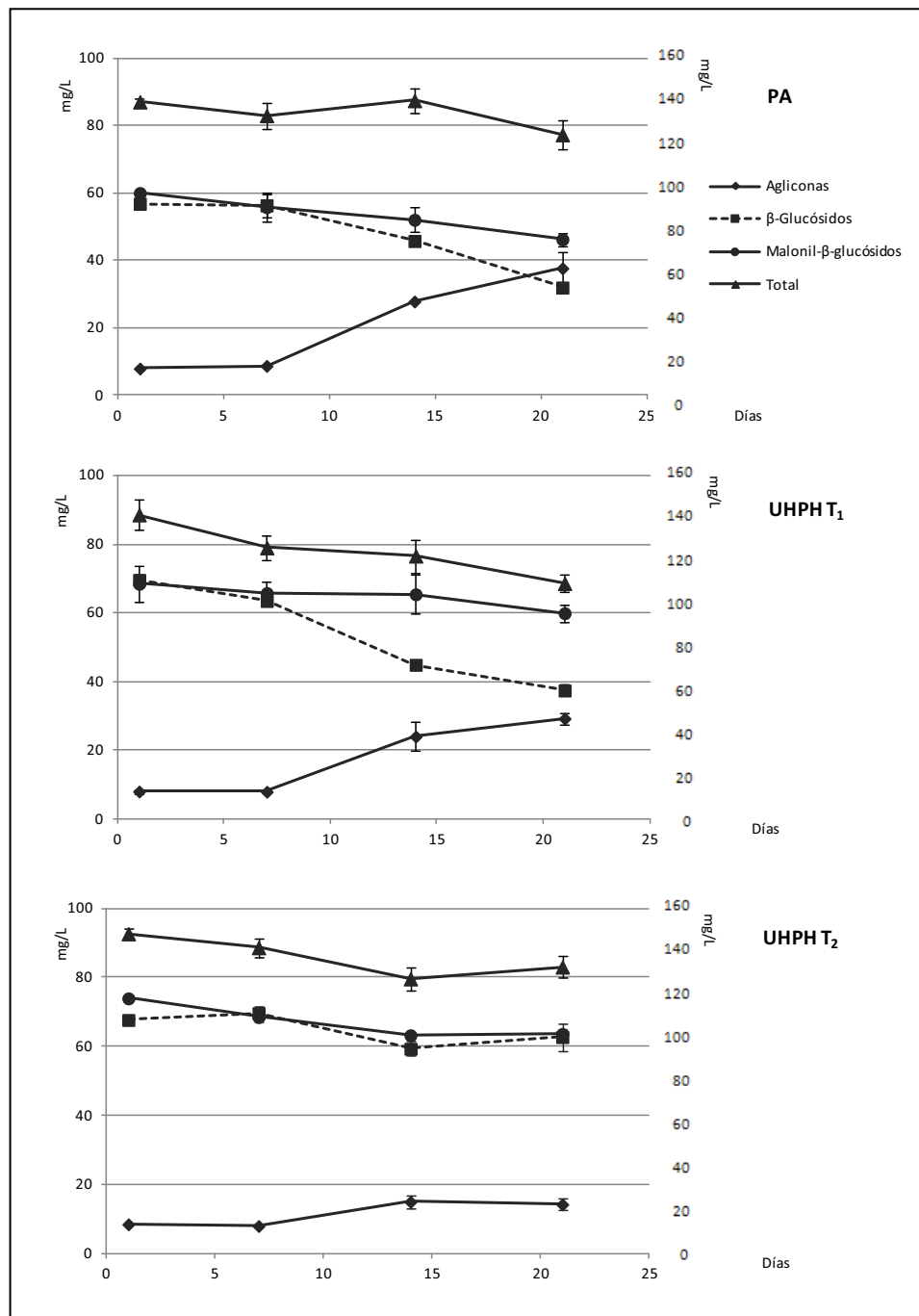
8.2.3. Resultados y discusión

Estabilidad de las isoflavonas durante el almacenamiento en refrigeración

No se ha encontrado información previa en la literatura sobre la estabilidad de las isoflavonas el almacenamiento en refrigeración de bebida de soja pasteurizada por UHPH o térmicamente. No obstante, Eisen et al. (2003) estudiaron por separado la estabilidad “*in vitro*” de las isoflavonas durante el almacenamiento a diferentes temperaturas y concluyeron que la degradación de isoflavonas en condiciones de almacenamiento sigue una cinética de primer orden y está influenciada por la temperatura de almacenamiento y las formas químicas de los compuestos. En el presente trabajo se observó que el contenido total de isoflavonas mostró una ligera disminución en todas las muestras, aproximadamente del 8-13%, durante el almacenamiento en refrigeración de las bebidas de soja (Figura 8.2.1).

Como se aprecia en la figura 8.2.1 a lo largo del almacenamiento se produjeron cambios en los contenidos de las formas químicas de las isoflavonas. En el punto cero las formas malonil- β -glucósidos y β -glucósidos fueron las mayoritarias, con más del 90% del total de isoflavonas. A lo largo del almacenamiento, se observa una interconversión de las formas químicas de las isoflavonas, observándose un descenso de los malonil- β -glucósidos y β -glucósidos, y un aumento de las agliconas. En todos los casos, este efecto empieza a apreciarse a partir del séptimo día de almacenamiento, y fue más intenso en las muestras pasteurizadas térmicamente que en las tratadas por UHPH. Comparando las dos condiciones de UHPH, se observa que los cambios son menores en las muestras UHPH T₂ que corresponden a las condiciones más intensas.

Figura 8.2.1. Contenido total de isoflavonas (mg/L) en las bebidas de soja pasteurizadas durante el almacenamiento en refrigeración.



La interconversión de las isoflavonas está dictada por su estructura química, y por otros parámetros tales como el pH, la temperatura, la humedad y la actividad de β -glucosidasas

endógenas y bacterianas (Ismail y Hayes, 2005). La acción de los microorganismos supervivientes en las muestras pasteurizadas podría ser responsable de estos cambios debido a que modifican el pH, las propiedades físico-químicas, y proporcionan actividad β -glucosidasa. Las muestras PA y UHPH T₁ mostraron una mayor disminución en los valores de pH durante el almacenamiento (alrededor de 0,5-0,6) que la muestra UHPH T₂ (alrededor de 0,2). Poliselis-Scopel, et al. (2012) reportaron un aumento en los recuentos de bacterias mesófilas en muestras de PA y UHPH T₁, pero no en UHPH T₂, durante el almacenamiento a 4 °C. Estas diferencias de recuentos bacterianos estarían en concordancia con la evolución de las isoflavonas en las diferentes muestras.

Las agliconas en cantidades elevadas imparten gustos astringentes y amargos en la bebida de soja (Okubo et al. 1992). Por tanto, su acumulación a lo largo del almacenamiento implica una pérdida de calidad sensorial del producto. Las condiciones de UHPH estudiadas, especialmente a 200 MPa y 75 °C, dieron lugar a una menor formación de agliconas que el tratamiento térmico convencional.

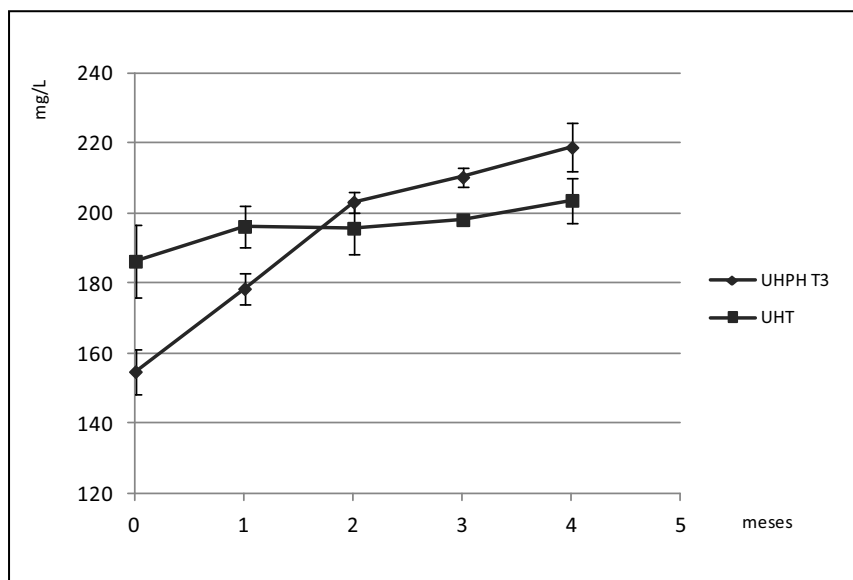
Estabilidad de las isoflavonas durante el almacenamiento a temperatura ambiente

A lo largo de almacenamiento a temperatura ambiente, se produjo un aumento en el contenido de isoflavonas totales en ambos tipos de muestras tanto tratadas térmicamente como las tratadas por UHPH (Figura 8.2.2). En las muestras UHT, el aumento fue aproximadamente del 5% al primer mes, permaneciendo constante durante el almacenamiento ($p>0,05$). En las muestras UHPH T₃, el aumento fue de un 30% hasta el segundo mes de almacenamiento ($r=0,997$), aumentando un 7% más hasta el final del almacenamiento.

Las interacciones de las isoflavonas con las proteínas implican puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas, que se cree que dependen del grado de desnaturalización de la proteína (Malaypally y Ismail, 2010). La desnaturalización de las proteínas debido a la alta presión difiere de la desnaturalización inducida por el calor. La desnaturalización por calor es principalmente irreversible debido a la ruptura de los enlaces covalentes y a la agregación de la proteína desplegada (Tedford et al., 1999). Por el contrario, bajo presión las proteínas tienden

a desplegarse hasta su estado secundario o terciario, y los enlaces de hidrógeno no se ven afectados, mientras que sí que se ven afectadas las interacciones electrostáticas e hidrofóbicas causando disociaciones reversibles y agregaciones (Floury et al., 2002). Como el contenido de proteína es el mismo en todas las muestras, la desnaturalización de las proteínas de soja debido a la temperatura y a la presión aplicadas en este estudio sería el responsable de las diferencias en la extracción de las isoflavonas en las muestras UHT y UHPH T₃ durante el almacenamiento. Las proteínas de soja mayoritarias, β -conglucina y glicina, son desnaturalizadas térmicamente a, aproximadamente, 70 y 90 °C durante 5 min, respectivamente (Liu y Chang, 2007). Sin embargo, para alcanzar la desnaturalización proteica debido a la presión se requieren niveles más altos y durante más tiempo que las aplicadas en el trabajo actual (>400 MPa, 10 min) (Puppo et al., 2004). El grado de desnaturalización inducido por calor podría explicar la mayor extracción de las isoflavonas en las muestras UHT justo después del tratamiento (tiempo cero), con sólo un pequeño aumento durante el almacenamiento.

Figura 8.2.2. Contenido total de isoflavonas (mg/L) en las bebidas de soja esterilizadas durante el almacenamiento a temperatura ambiente.



No hay información en la literatura sobre las posibles razones para explicar por qué se produjo un aumento en las isoflavonas totales durante el almacenamiento de la bebida de soja tratada por UHPH y probablemente se deba a las disociaciones y agregaciones reversibles y al azar entre las proteínas de soja (Floury et al., 2002).

Los β -glucósidos y los conjugados malonil- β -glucósidos fueron las formas predominantes en las muestras, siendo la suma de ambos de más del 90% de las isoflavonas totales. El % de los β -glucósidos fue mayor en las muestras UHT que en las muestras UHPH, con alrededor del 63 % y 55%, respectivamente. Este perfil no cambió a lo largo de todo el almacenamiento, pero hubo una reducción significativa en los malonil- β -glucósidos paralela a un aumento de los β -glucósidos, siendo más lenta en la muestra UHPH que en las UHT (Figura 8.2.2). Las agliconas no sufrieron cambios significativos en ambas bebidas de soja a lo largo del almacenamiento.

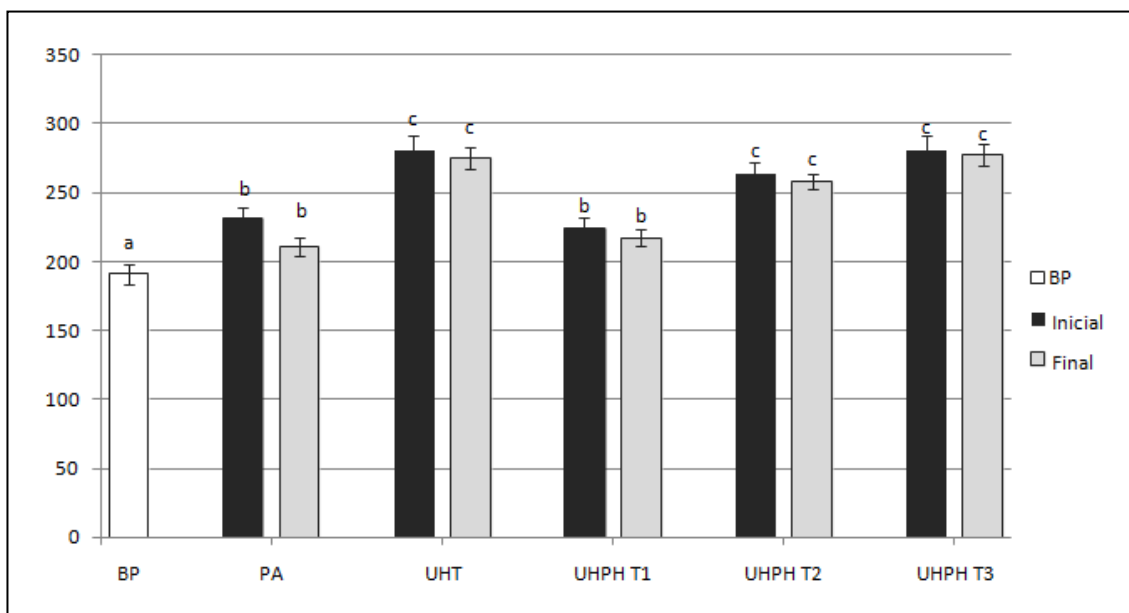
Se sabe que el tratamiento térmico UHT inactiva las β -glucosidasas (Márquez y Waliszewski 2008) lo que explica que no se formen agliconas a lo largo del almacenamiento en las muestras UHT. No hay información en la literatura del efecto del UHPH sobre la inactivación de las β -glucosidasas en la soja o en productos de soja. Sin embargo, la baja cantidad de aglicona hidrolizada en las muestras UHPH a lo largo del almacenamiento sugiere que estas enzimas también fueron inactivadas por el tratamiento de UHPH.

Estabilidad de los fitoesteroides durante el almacenamiento en refrigeración y a temperatura ambiente

Se sabe que los fitoesteroides son compuestos estables en los alimentos. Por ejemplo, Soupas et al. (2006) no encontraron diferencias en el total de fitoesteroides en leche de vaca enriquecida durante 12 meses en almacenamiento a 4 °C. Sin embargo, no hay información sobre la liberación de fitoesteroides durante el almacenamiento en bebidas de soja tratadas por UHPH. Como previamente se ha mostrado en la sección 8.1, hay una liberación de fitoesteroides en función de la presión y la temperatura en los tratamientos UHPH. La hipótesis a estudiar es, dado que no se liberan todos, si hay una liberación de fitoesteroides durante el almacenamiento igual que ocurre con las isoflavonas. Las muestras PA y UHPH T₁ mostraron un contenido similar de fitoesteroides totales, pero ambas concentraciones fueron más bajas que las de

UHPH T₂ (p<0,05). Como se puede apreciar en la figura 8.2.3 los contenidos de fitoesteroles se mantienen constantes durante 21 días de almacenamiento en las bebidas de soja pasteurizada tanto térmicamente como por UHPH. De igual manera tampoco se han observado cambios en los niveles de fitoesteroles durante cuatro meses de almacenamiento en las bebidas de soja esterilizadas. Cabe recordar que, en este caso, a tiempo cero en los tratamientos aplicados (térmicos y UHPH) liberan el mismo contenido de fitoesteroles. Nuestros resultados muestran que los fitoesteroles son estables durante el almacenamiento en refrigeración en bebida de soja pasteurizada por UHPH y por calor.

Figura 8.2.3. Contenido total de fitoesteroles (mg/L) en las bebidas de soja pasteurizadas durante el almacenamiento en refrigeración.

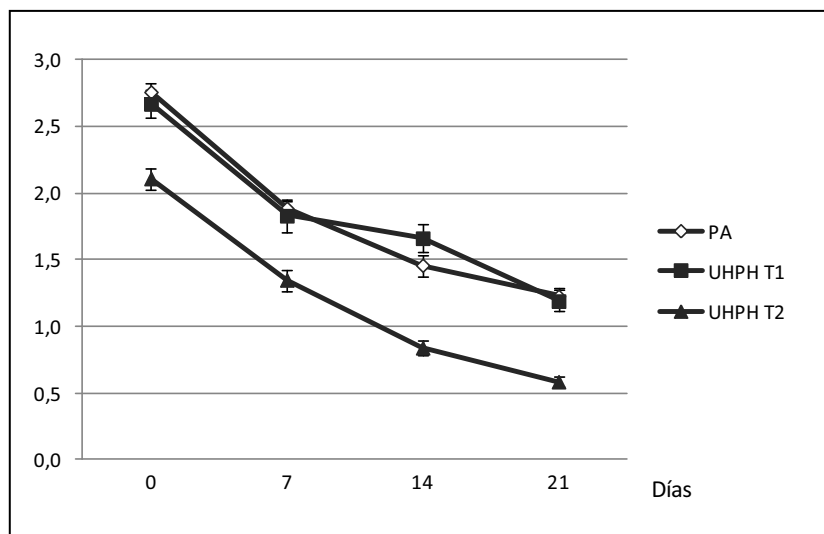


Estabilidad de los tocoferoles durante el almacenamiento en refrigeración

Como previamente se ha mostrado en la sección 8.1 de esta memoria, las muestras tratadas a las condiciones más suaves de temperatura de UHPH mostraron un contenido de tocoferoles superior al de las muestras tratadas a condiciones más intensas (p<0,05). Durante el almacenamiento, el contenido total de tocoferoles mostró una disminución significativa en todas las bebidas de soja, siendo del 55% en las muestras PA y UHPH T₁, y del 72% en las

muestras UHPH T₂ (Figura 8.2.4). El grado de degradación de fue comparable en las diferentes formas de la vitamina E. Por tanto, aunque las condiciones de almacenamiento fueron las mismas hubo más degradación de los tocoferoles en las muestras que habían estado sometidas al tratamiento de UHPH más intenso.

Figura 8.2.4. Contenido total de tocoferoles (mg/L) en las bebidas de soja pasteurizadas durante el almacenamiento en refrigeración.

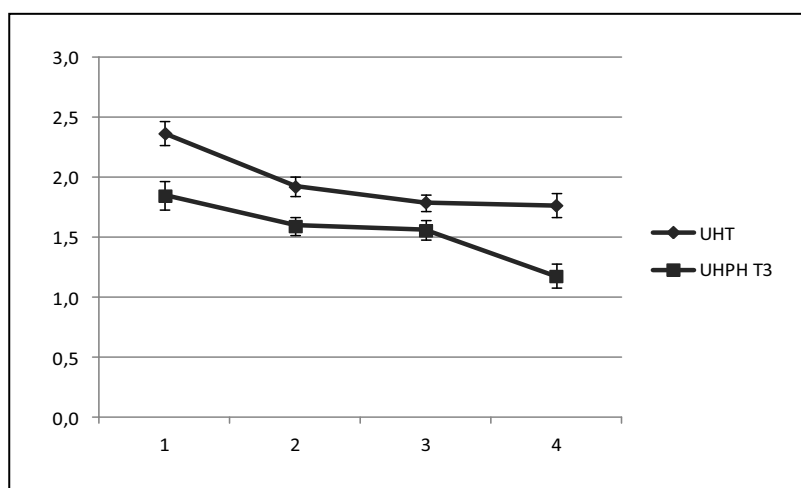


Estabilidad de los tocoferoles durante el almacenamiento a temperatura ambiente

En la sección 8.1 se indicó que las muestras de soja tratadas por UHPH a 300 MPa y 75 °C de temperatura de entrada mostraron un contenido más bajo de tocoferoles que las muestras tratadas por UHT ($p < 0,05$). Este hecho indica que el tratamiento de UHPH aplicado fue más agresivo para los tocoferoles que el tratamiento UHT. Durante el almacenamiento, ambas muestras mostraron un descenso del contenido total de tocoferoles, siendo éste más acusado en las muestras UHPH T₃, con un 36% mientras que en las muestras UHT con un descenso del 25% (Figura 8.3.4). El grado de degradación de fue comparable en las diferentes formas de la vitamina E. Por tanto, al igual que sucede con las muestras pasteurizadas se puede concluir que el tratamiento más agresivo no solo provoca más pérdidas durante el tratamiento que también sino que provoca una mayor degradación durante el almacenamiento. Es conocido que estos compuestos no son estables tanto al tratamiento térmico como al almacenamiento.

Por ejemplo, Vidal-Valverde y Ruíz (1993) encontraron pérdidas significativas en los tocoferoles de la leche de vaca tratada por UHT durante un mes en almacenamiento a temperatura ambiente, aumentando estas pérdidas a medida que aumentaba el tiempo de almacenamiento.

Figura 8.2.5. Contenido total de tocoferoles (mg/L) en las bebidas de soja esterilizadas durante el almacenamiento a temperatura ambiente.

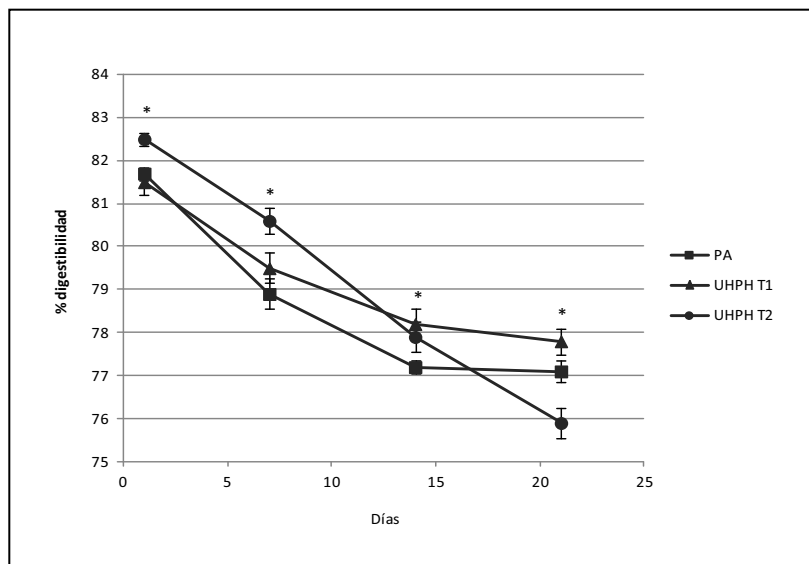


Sorprende que hubiera una menor degradación de los tocoferoles durante el almacenamiento a temperatura ambiente que durante el almacenamiento en refrigeración. La posible causa podría ser debida a que tal como se ha explicado en el diseño experimental, las muestras pasteurizadas tanto térmicamente como por UHPH fueron transferidas del envase original a frascos estériles de 50 ml antes de ser almacenadas. Esto puede haber supuesto para las muestras un enriquecimiento de O₂ que podría haber causado la degradación de tocoferoles. En cualquier caso, dado que el procedimiento por transferencia se aplicó por igual a todas las muestras pasteurizadas, las conclusiones de las diferencias en las muestras sometidas a tratamientos térmicos como UHPH durante el almacenamiento siguen siendo válidas.

Digestibilidad proteica "in vitro" durante el almacenamiento en refrigeración y a temperatura ambiente

El producto base mostró un % de digestibilidad significativamente más bajo ($75,80 \pm 0,64\%$), que las muestras tratadas por calor y por UHPH (más del 80%, sin diferencias en función del tipo de pasteurización; $p < 0,05$). A lo largo de almacenamiento en refrigeración, todas las muestras tratadas mostraron una evolución similar en su digestibilidad proteica, sufriendo una disminución de alrededor del 5-8% al final del almacenamiento (Figura 8.2.6).

Figura 8.2.6. Evolución del porcentaje de digestibilidad en las bebidas de soja pasteurizadas durante el almacenamiento en refrigeración.

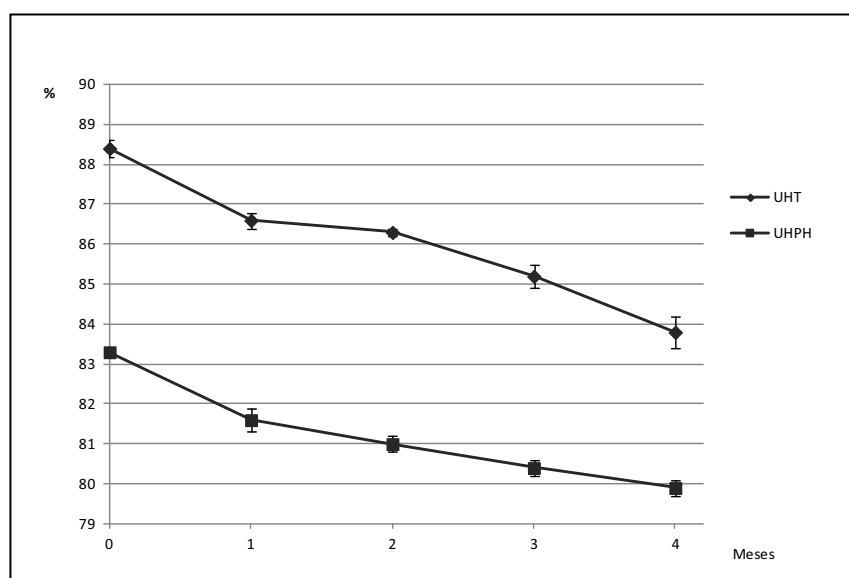


* indican que no hay diferencias significativas ($p < 0,05$).

Ambas bebidas de soja, tanto las UHT como las UHPH T₃, mostraron una evolución similar en el porcentaje de digestibilidad a lo largo del almacenamiento, con una disminución del 5% durante los 4 meses (Figura 8.2.7). Sin embargo, el % de digestibilidad en las muestras iniciales fue diferente, siendo estadísticamente superior en las muestras UHT que en la muestra UHPH T₃ ($p < 0,05$). Estas diferencias en el % de digestibilidad cabe atribuir las al tratamiento de estabilización aplicado.

La soja tiene inhibidores de proteasas que pueden ser destruidos bajo altas presiones y temperaturas. Sin embargo, Polisel-Scopel et al. (2012) reportaron que se mantenía una cierta actividad residual antitripsina en la bebida de soja tratada por PA, UHT y UHPH. La digestibilidad no sólo depende de la presencia de factores antinutritivos, sino que también está relacionada con la desnaturalización de las proteínas. A la vista de los resultados de la digestibilidad de las proteínas, se puede concluir que el UHPH no aporta una ventaja respecto al tratamiento térmico convencional. El hecho de que durante el almacenamiento la pérdida de digestibilidad fuera muy similar en todas las muestras, independientemente del tratamiento al que habían sido sometidos y la distinta actividad antitripsina remanente (señalada por Polisel-Scopel et al., 2012) durante el almacenamiento, sugiere que la pérdida de digestibilidad durante el almacenamiento no es atribuible a los inhibidores de tripsina sino que probablemente a las formaciones de agregados proteicos menos digeribles, por ejemplo por reacción de Maillard.

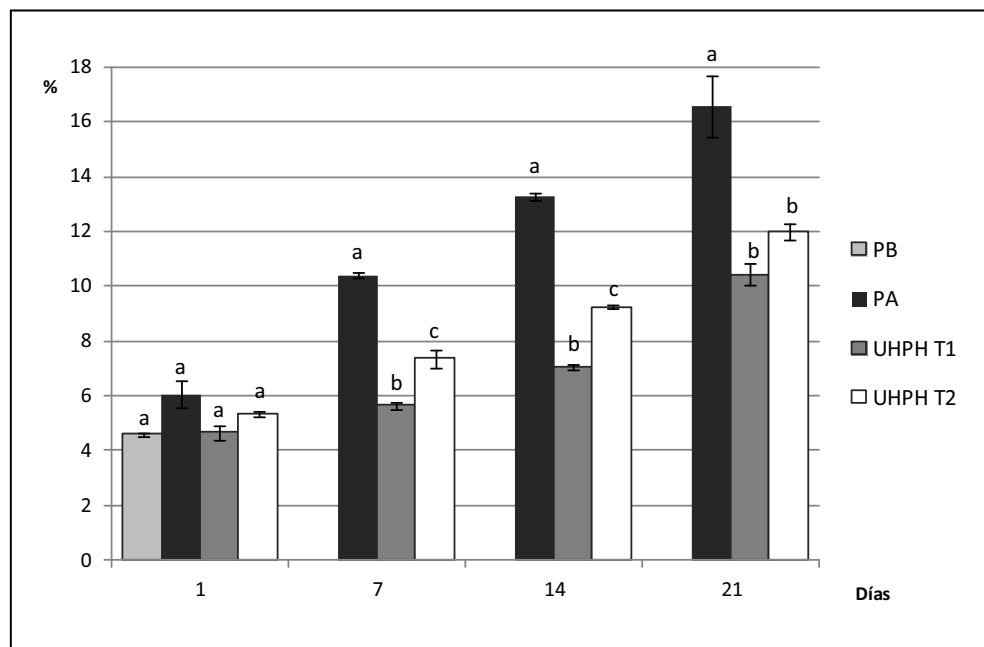
Figura 8.2.7. Evolución del porcentaje de digestibilidad en las bebidas de soja esterilizadas durante el almacenamiento a temperatura ambiente.



Lisina bloqueada durante el almacenamiento en refrigeración

Inicialmente no hubo diferencias en el porcentaje de lisina bloqueada entre las muestras PA, UHPH T₁ y UHPH T₂ en comparación con su producto base. Durante el almacenamiento en refrigeración, hubo un aumento en el porcentaje de lisina bloqueada en todas las muestras tanto las tratadas por PA como por UHPH, siendo mayor en las muestras PA que en las UHPH (Figura 8.2.8). Así, a los 21 días, la muestra PA alcanzó un 17% de lisina bloqueada, mientras que las UHPH T₁ y UHPH T₂ mostraron un 11% y 12%, respectivamente.

Figura 8.2.8. Evolución del porcentaje de lisina bloqueada durante el almacenamiento en refrigeración en las muestras de soja pasteurizadas.

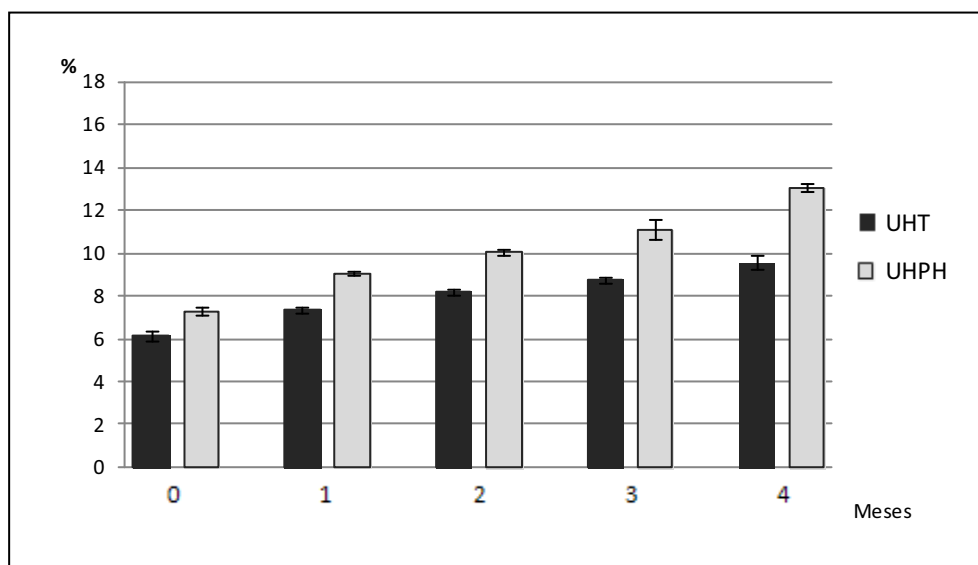


Lisina bloqueada durante el almacenamiento a temperatura ambiente

En el caso de las bebidas esterilizadas, inicialmente no hubo diferencias significativas en el porcentaje de lisina bloqueada entre las muestras UHPH T₃ y la UHT ($p < 0,05$), y tampoco era diferente a las pasteurizadas y al producto base. En todos los casos el porcentaje de lisina bloqueada fue de alrededor del 5-7%, entre 30 y 54 mg/L de furosina (Figura 8.2.9). Por tanto, en el punto inicial no se observaron diferencias en cuanto a la lisina bloqueada en los niveles

indiferentemente del tratamiento aplicado. Durante el almacenamiento a temperatura ambiente, se produjo un aumento en el porcentaje de lisina bloqueada en ambos tipos de muestras, siendo del 7 al 13% en la bebida de soja UHPH T₃ y del 6 al 10% en la bebida de soja UHT.

Figura 8.2.9. Evolución del porcentaje de lisina bloqueada durante el almacenamiento a temperatura ambiente en las muestras de soja esterilizadas.



En todas las muestras, independientemente del tratamiento, hubo un aumento de la lisina bloqueada durante el almacenamiento, si bien con un perfil distinto. Así, en las muestras pasteurizadas por tratamiento térmico hubo un mayor incremento de lisina bloqueada que las muestras pasteurizadas por UHPH. Por el contrario, entre las muestras esterilizadas el incremento de lisina bloqueada fue mayor en las muestras esterilizadas por UHPH que por UHT. Comparativamente, se aprecia que hubo una mayor formación de lisina bloqueada a los 21 días en la muestra pasteurizada térmicamente que en las muestras esterilizadas.

La lisina disponible de la bebida de soja se ve afectada no sólo por la cantidad de grupos amino libres de lisina sino también por la presencia de grupos carbonilo que pueden aparecer de diferente origen. De acuerdo con Davies et al., (1998) las agliconas son donadores de grupos carbonilos que podrían reaccionar con la lisina disponible y otros aminoácidos libres

presentes en la bebida de soja y formar compuestos involucrados en la pérdida de la calidad de la proteína. Las bebidas de soja pasteurizadas térmicamente, tal como se ha indicado anteriormente, mostraron una concentración de agliconas libres más elevada al final de almacenamiento en refrigeración que las muestras pasteurizadas por UHPH. Y esta podría ser la causa de que en esta muestra haya también más bloqueo de la lisina durante el almacenamiento. En el caso de las muestras esterilizadas no hubo diferencias en las agliconas en función del tratamiento, y por tanto, las diferencias en la disponibilidad de la lisina bloqueada a lo largo del almacenamiento no puede ser atribuido a estos compuestos.

7.2.3. Aportaciones más relevantes

- ✓ Hasta nuestro conocimiento, no existen datos sobre la estabilidad de los compuestos bioactivos y los cambios de la calidad proteica durante el almacenamiento en refrigeración y a temperatura ambiente de bebida de soja pasteurizada y esterilizada por UHPH.
- ✓ Los fitoesteroles fueron los compuestos bioactivos más estables durante el almacenamiento en ambas bebidas de soja pasteurizadas y esterilizadas por UHPH.
- ✓ Las isoflavonas fueron más estables en las bebidas de soja durante el almacenamiento a temperatura ambiente que durante el almacenamiento en refrigeración, mostrando una mayor formación de agliconas en este último, lo cual supone un efecto negativo desde un punto de vista sensorial.
- ✓ Los tocoferoles se degradaron durante el almacenamiento en todas las muestras, siendo el % de degradación similar en cada tipo de muestra.
- ✓ Las diferencias en el porcentaje de digestibilidad proteica en el punto inicial y final del almacenamiento se corresponden con las diferencias del porcentaje inducidas por el tratamiento.
- ✓ La disponibilidad de la lisina disminuyó en todas las muestras pasteurizadas y esterilizadas a lo largo del almacenamiento, siendo más pronunciado en las bebidas de soja pasteurizadas térmicamente.

Artículo VI.

N. Toro-Funes, J. Bosch-Fusté, M.T. Veciana-Nogues, M.C. Vidal-Carou (2014). Changes of isoflavones and protein quality in soymilk pasteurized by ultra high pressure homogenization throughout storage. Food Chemistry, In Press.

Índice de impacto (JCR 2012): 3.334

Posición en área "Food and Science Technology": 10/124

Accepted Manuscript

Changes of isoflavones and protein quality in soymilk pasteurised by ultra-high-pressure homogenisation throughout storage

N. Toro-Funes, J. Bosch-Fusté, M.T. Veciana-Nogués, M.C. Vidal-Carou

PII: S0308-8146(14)00564-0

DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.04.019>

Reference: FOCH 15680

To appear in: *Food Chemistry*

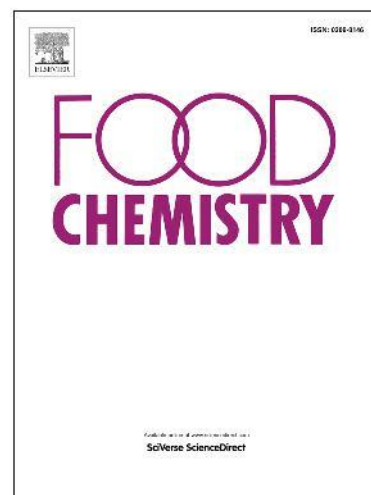
Received Date: 26 December 2013

Revised Date: 1 April 2014

Accepted Date: 4 April 2014

Please cite this article as: Toro-Funes, N., Bosch-Fusté, J., Veciana-Nogués, M.T., Vidal-Carou, M.C., Changes of isoflavones and protein quality in soymilk pasteurised by ultra-high-pressure homogenisation throughout storage, *Food Chemistry* (2014), doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.04.019>

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.



1 **CHANGES OF ISOFLAVONES AND PROTEIN QUALITY IN SOYMILK**
2 **PASTEURISED BY ULTRA-HIGH-PRESSURE HOMOGENISATION**
3 **THROUGHOUT STORAGE**

4

5 N. Toro-Funes / J. Bosch-Fusté / M.T. Veciana-Nogués / M.C. Vidal-Carou*

6

7 Department of Nutrition and Food Science-XaRTA, INSA, Faculty of Pharmacy.

8 Campus de l'Alimentació de Torribera, University of Barcelona, Avda. Prat de la Riba

9 171, 08921-Santa Coloma de Gramenet, Barcelona, Spain. Tel: +34 934033785, Fax:

10 +34 934035931, e-mail: mcvidal@ub.edu

11 *Author to whom correspondence should be addressed.

12

13

14 **ABSTRACT**

15 Ultra high pressure homogenisation (UHPH) is an emerging technology to obtain fine
16 and stable soymilk emulsions. Very little information is available about the stability of
17 this kind of product during storage. Changes of isoflavone profile, protein digestibility
18 and lysine availability in pasteurised-UHPH soymilks were studied for 21 days at 4 °C
19 in comparison to heat-pasteurised soymilks. Neither heat nor UHPH treatments affected
20 the isoflavone profile, as the percentage of each chemical form, in comparison with
21 unprocessed-soymilk. During storage, there was a conversion of isoflavone forms to
22 aglycones, being higher in heat-processed samples. In addition, UHPH samples showed
23 a lesser percentage of blocked lysine during storage. No differences were observed in
24 the evolution of protein digestibility among samples. Therefore, UHPH treatment seems
25 to produce a better product, due to lower amounts of aglycones, and higher protein
26 nutritional quality than heat treatment.

27

28

29 **Key words:** isoflavones; protein digestibility; blocked lysine; soymilk; ultra high
30 pressure homogenisation (UHPH); pasteurisation (PA); storage.

31

32

33

34

35

36

37 1. INTRODUCTION

38 Soybean foods have been consumed for centuries in Asian countries. Recently, an
39 interest in introducing soybean and soybean products has been increasing in the
40 Western countries because of their high-quality proteins (rich in lysine and other
41 essential amino acids; Friedman & Brandon, 2001) and their potential health benefits.
42 Animal and clinical studies have also shown that consumption of soybean protein
43 and/or isoflavones has beneficial impacts on the risk factors for cardiovascular disease
44 (Moriyama, et al., 2004; Anderson, Johnstone & Cook, 1995).

45 In 1999, the US Food and Drug Administration (U.S. FDA, 1999) approved a health
46 claim for the cholesterol-lowering effects of soy protein, which are associated with
47 isoflavones (Anderson, et al., 1995). The main isoflavone compounds, genistein (Ge),
48 daidzein (De) and glycitein (Gle), exist in 4 chemical forms as: aglycone, β -glucoside,
49 acetyl- β -glucoside, and malonyl- β -glucoside. Isoflavones are associated with soybean
50 proteins and their interactions involve hydrogen bonding, ionic, and hydrophobic
51 interactions (Boye, 1996). The raw soybean and processing operations and conditions
52 applied for the production of soymilk determine the final content and profile of
53 isoflavones (Huang, Liang & Kwok, 2006). Soymilk manufacturing involves thermal
54 processes, which provide longer shelf-life by reduction or elimination of
55 microorganisms, improve the nutritional value by destroying antinutritional factors
56 (Kunitz and Bowman–Birk trypsin inhibitors), and increase protein digestibility (Kwok,
57 Liang & Niranjana, 2002; Debruyne, 2006). On the contrary, thermal processing favours
58 the Maillard reaction, causing losses in nutritional quality and digestibility of proteins
59 (Nursten, 2005; Seiquer, Díaz-Alguacil, Delgado-Andrade & López-Frías, 2006).

60 Ultra-high-pressure homogenisation (UHPH) is an emerging technology the purpose of
61 which is to obtain fine and stable emulsions, to fragment particles in dispersions or

62 emulsions, and to modify the viscous properties of fluids by particle size reduction
63 (Dumay, Chevalier-Lucia, Picart-Palmade, Benzaria, Gracia-Julia & Blayo, 2012).
64 UHPH is based on the same principle as conventional homogenisation, but it works at
65 significantly higher pressures (up to 400 MPa). The combination of high pressure and
66 temperature applied in UHPH treatments produces high quality liquid food better than
67 their equivalents obtained by conventional heat treatments (Poliseli-Scopel, Henández-
68 Herrero, Guamis & Ferragut, 2012; Valencia-Flores, Hernández-Herrero, Guamis &
69 Ferragut, 2013). In a previous work, we reported that selected UHPH conditions
70 allowed an improvement of the extractability of potentially health-related compounds,
71 such as phytosterols from fat globules or isoflavones from proteins (Toro-Funes, Bosch-
72 Fusté, Veciana-Nogués & Vidal-Carou, 2014).
73 In the frame of the project “The application of ultra-high-pressure homogenisation
74 (UHPH) to produce high quality vegetable milks (soy and almond)” (AGL 2008-05430-
75 C02-02), the aim of this work is to assess the stability of isoflavones throughout
76 refrigerated storage in UHPH-processed soymilk compared to a conventional thermal
77 pasteurization (PA) treatment. In addition, the *in-vitro* protein digestibility and the
78 blocked lysine were also studied throughout storage. According to our knowledge, there
79 are no previous studies in this area.

80

81 **2. MATERIALS AND METHODS**

82 **2.1. Samples**

83 Soymilk samples were provided by the pilot plant of the Autonomous University of
84 Barcelona (Centre Especial Planta de Tecnologia dels Aliments (CERPTA)). The
85 elaboration process and the technological conditions applied for their production are
86 described in the work of Poliseli-Scopel et al. (2012).

87 Three batches of soymilk were prepared. For each batch, whole soybeans (*Glycine max*
88 var Majesta) were hydrated (1:3 water:soybean) for 15 h at room temperature and then
89 ground for 20 min at 80 °C. The pulp obtained was filtrated to obtain the soymilk base
90 product (BP) (2.61 ± 0.04 g protein/100 ml; 1.78 ± 0.08 g fat/100 ml; 1.29 ± 0.08 g
91 carbohydrates/ 100 ml; 5.56 ± 0.12 g dry matter/100 ml; 0.28 ± 0.02 g ash/100 ml. pH
92 value was 6.72 ± 0.02) for further processed by UHPH or PA.

93 From each soymilk batch, BP was separated in three fractions. Then, two fractions of
94 BP were processed by two UHPH treatments, one at 200 MPa and 55 °C of inlet
95 temperature (UHPH T₁), and the other at 200 MPa and 75 °C of inlet temperature
96 (UHPH T₂). The third fraction of BP was homogenised at 18 MPa and subsequently
97 pasteurised at 95 °C for 30 s. UHPH treatments were conducted with a high pressure
98 homogeniser (Model FPG11300, Stansted Fluid Powder Ltd, Harlow, UK).

99 During the pressurisation operation, soymilk experienced a temperature jump due to
100 adiabatic heating in the high pressure valve (HP-valve) of approximately 0.7 s,
101 corresponding to $105.7 \text{ °C} \pm 0.58$ and $117.0 \text{ °C} \pm 2.00$ in the case of UHPH T₁ and
102 UHPH T₂, respectively. The temperature after cooling the liquid was between 25 and 27
103 °C for all treatments.

104 PA and UHPH-processed samples (UHPH T₁ and UHPH T₂) were stored in sterile
105 bottles at 4 °C for up to 21 days. One bottle was taken every seven days (time 0, 7, 14
106 and 21) and stored at -30 °C until analysis, except for the analysis of *in vitro* protein
107 digestibility which was made the same day of sampling.

108

109 2.2 Isoflavone analysis

110 Isoflavone determination was performed by UHPLC (Acquity System; Waters
111 Corporation, Milford, MA) with a diode array detector (Model 2996; Waters), following
112 the method described by Toro-Funes et al. (2012).

113

114 **2.3 *In-vitro* protein digestibility**

115 The *in-vitro* digestibility was carried out following the 3-enzyme method described by
116 Hsu, Vavak, Satterlee and Miller (1977) that involves the use of pancreatic trypsin
117 (Type IX), bovine pancreatic chymotrypsin (Type II), and porcine intestinal peptidase
118 (Type III). Briefly, a multienzyme solution (1.6 mg trypsin, 3.1 mg chymotrypsin and
119 1.3 mg peptidase/mL) was maintained in an ice bath and adjusted to pH 8.0. Fifty
120 millilitres of an aqueous suspension of 1 mg N/mL of soymilk samples were adjusted to
121 pH 8.0 while stirring in a 37 °C water bath. Five millilitres of the multienzyme solution
122 were added to the protein suspension and then the pH was measured after 10 min.

123 The digestibility of each sample was calculated using the following regression equation:

$$124 \quad y = 210.464 - 18.103x$$

125 where y = % protein digestibility and x = pH of the protein suspension after 10 min of
126 digestion with the enzyme solution.

127

128 **2.4 Furosine and blocked lysine determination**

129 Furosine was determined according to the method of Delgado, Corzo, Santa-María,
130 Jimeno and Olano (1992). An aliquot of soymilk sample containing 40–50 mg of
131 protein was hydrolysed with 8 mL of 8 M HCl at 110 °C for 23 h under anaerobic
132 conditions. The hydrolysates were filtered and 0.5 mL of the filtrates were cleaned up
133 employing a Sep-pak C₁₈ cartridge (Waters Corporation), pre-treated with 5 mL of
134 methanol and 10 mL of deionised water. Furosine content was quantified by ion-pair

135 reversed-phase HPLC using UV detection (Waters). The mobile phase consisted of a
136 solution of 5 mM sodium heptane sulfonate with 20% acetonitrile and 0.2% formic acid.
137 The elution was isocratic and the flow rate was 1.2 mL/min. The UV detector was set at
138 280 nm.

139 Lysine content was determined by cation exchange chromatography and post-column
140 derivatisation with ninhydrin, and UV detection using a Biochrom 30 (Biochrom Ltd.,
141 Cambridge, UK) amino acid analyser, following the method of Moore, Spackman and
142 Stein (1958). Results were expressed as the percentage of blockage of lysine, as
143 reported by Bosch, Alegría, Farré and Clemente (2008), according to the formula:

$$144 \quad \% \text{ Blocked lysine} = (3.1 \times \text{furosine} \times 100) / (\text{chromatographed lysine} + 1.86 \text{ furosine})$$

145

146 **2.5 pH measurement**

147 The pH of the soymilk samples was determined with a pH meter (model Xerolyt,
148 Crison, Spain).

149

150 **2.6 Statistical analysis**

151 For each treatment (PA, UHPH T₁ and UHPH T₂), three batches of soymilk were
152 performed. For each analytical parameter, determinations were made in triplicate. All
153 statistical tests were performed by means of the Statistical Software Package for
154 Windows PASW Statistic 18.0 (SPSS, Chicago, IL).

155

156 **3. RESULTS AND DISCUSSION**

157 **3.1. Isoflavones in processed soymilks throughout storage**

158 Isoflavone content (mg/L) in the BP, PA and UHPH-processed soymilks are shown in
159 Table 1. Total isoflavone content varied among samples from 125 ± 1.12 to 153 ± 1.40

160 mg/L, which corresponded to 2248 ± 20.1 to 2746 ± 25.1 mg/kg of dry weight. These
161 concentrations are consistent with those of 1600–3400 mg/kg dry weight reported
162 previously in UHT-processed soymilk by Prabhakaran and Perera (2006) and in
163 commercial soymilks by Chen and Wei (2008). UHPH T₁ and UHPH T₂ samples
164 showed a similar total isoflavone content, but both concentrations were higher than PA
165 and BP soymilks ($p < 0.05$). This is consistent with a previous work in which an
166 increase in the total isoflavone compounds was reported in soymilk processed by UHPH
167 at conditions up to 300 MPa (Toro-Funes, et al., 2014). Isoflavones are associated to
168 proteins and their interactions involve hydrogen bonding, ionic, and hydrophobic
169 interactions (Boye, 1996). Hydrogen bonds are not affected by pressure while the
170 electrostatic and hydrophobic interactions between proteins are affected causing
171 reversible dissociations and aggregations (Floury, Desrumaux, & Legrand 2002). An
172 increase in the release of total isoflavones could be seen in UHPH-processed soymilk.
173 Due to pressure-induced effects and the high mechanical forces generated by the
174 pressure drop through the HP-valve, the unfolding and denaturation of soy protein
175 and/or changes in the isoflavones interactions could modify their extractability in water.
176 Rickert, Meyer, Hu and Murphy (2004) reported that isoflavones in soybean protein
177 isolates have a better extractability when proteins are denatured. Our results show that
178 UHPH treatment produces an improvement of the extraction of isoflavones in soymilk
179 compared to PA treatment. The high release of isoflavones enhances the availability of
180 these health-related compounds.

181 The isoflavone profile refers to the percentage of each chemical form. In this sense, all
182 processed soymilks, and BP too, showed the malonyl- β -glucosides and the β -glucosides
183 as the predominant forms, being the sum of both more than 90% of the total isoflavones.
184 These results confirmed that UHPH treatments had no effect on the interconversion of

185 isoflavones in accordance with our previous results obtained by UHPH up to 300 MPa
186 (Toro-Funes, et al., 2014). When soybean products are processed under boiling
187 conditions, malonyl- β -glucosides will gradually convert to the β -glucoside forms (Wang
188 & Murphy, 1996; Murphy et al, 1999). Jung, Murphy and Sala (2008) reported that
189 isostatic high pressure (up to 700 MPa) combined with mild temperature also promoted
190 the interconversion of the malonyl forms to β -glucosides, while the total isoflavones
191 remained constant, attributing this conversion to the effect of adiabatic heating during
192 the isostatic high pressure processing. On the contrary, our results show that there is an
193 increase in all chemical forms of isoflavones attributed to UHPH treatments but these
194 treatments had no effect on the interconversion of the isoflavone chemical forms.

195

196 In order to elucidate the stability of isoflavones through storage under refrigeration, the
197 evolution of the chemical forms of isoflavones in the PA and UHPH-processed samples
198 throughout 21 days was monitored and the results are shown in Figure 1. Along the
199 refrigerated storage, total isoflavone contents showed a slight decrease in all soymilks
200 (8–13%), probably due to a degradation of isoflavones. It has been reported that the rate
201 of isoflavone degradation under storage follows first order kinetics and is influenced by
202 the storage temperature and the chemical forms of the compounds (Eisen Ungar &
203 Shimoni, 2003; Otieno, Ashton & Shah, 2007). No data were found in the literature
204 about the stability of isoflavones in pasteurised soymilks during storage. In another kind
205 of soy product, Otieno et al. (2007) reported a reduction of 20% in the total isoflavones
206 in a fermented soymilk obtained from autoclaved soymilk (142 °C, 15 min) during
207 storage at 4 °C for 8 weeks. Rau de Almeida Callou, Sadigov, Lajolo and Genovese
208 (2010) observed a significant reduction (more than 30%) in total isoflavones of UHT-
209 processed soymilk under room temperature storage for 9 months.

210 During storage, changes in the isoflavone profile were observed (Figure 1). Throughout
211 the storage, malonyl- β -glucoside and β -glucoside forms were predominant in all
212 samples, followed by aglycones, with the only exception being on the 21st day in PA
213 samples. Acetyl- β -glucosides were detected in low contents, less than 2% of the total,
214 and their changes were considered insignificant (data not shown). After the 7th day, an
215 interconversion of isoflavones was observed. In all samples there was an increase in the
216 aglycone content parallel to a decrease in both malonyl- β -glucosides and β -glucosides.
217 The interconversion to the aglycones was higher in PA soymilk than in UHPH-
218 processed samples, and higher in UHPH T₁ than UHPH T₂ samples (Figure 1).

219 The interconversion of isoflavones forms is dictated by their chemical structure, and
220 other parameters, such as pH, temperature, moisture and activity of endogenous and
221 bacterial β -glucosidases (Ismail & Hayes, 2005). There are no reports studying the
222 effect of UHPH on the inactivation of the β -glucosidases of soybean or soybean
223 products. There is only one study on HPP, where Jung et al. (2008) found that this
224 enzyme in soymilk was stable up to 400 MPa and gradually decreased its activity when
225 pressure increased to reach 60% inactivation after 700 MPa treatments. Moreover, it has
226 been reported that thermal treatment (>60 °C) inactivates the β -glucosidases from the
227 soybean (Lopes-Barbosa, Lajolo & Genovese, 2006; Jung et al., 2008).

228 The action of microorganisms surviving in the pasteurised samples could modify the
229 pH, and the physicochemical properties, and also could increase the β -glucosidase
230 activities. Polisel-Scopel, et al. (2013) reported an increase in the mesophilic bacterial
231 counts in PA and UHPH T₁ samples, but not in UHPH T₂, during storage at 4 °C of the
232 same samples studied here. The high mesophilic bacterial counts in PA and UHPH T₁
233 soymilks could be related to the greater aglycone amounts in these samples compared to
234 UHPH T₂ soymilk.

235 In our work, PA and UHPH T₁ soymilks showed a higher decrease in pH values
236 (~0.5–0.6) than UHPH T₂ sample throughout storage (~0.2), which is in accordance
237 with the higher interconversion of the chemical forms of isoflavones in those samples.
238 Other authors also reported a decrease in pH during storage of soymilk processed by
239 thermal treatments and isostatic high pressure processing (Achouri, Boye & Zamani,
240 2007; Smith, Mendoca & Jung, 2009).

241

242 **3.2. *In vitro* protein digestibility in processed soymilks throughout storage**

243 The changes in the digestibility of soymilks at 4 °C during 21 days of storage are shown
244 in Figure 2. BP was not stabilised with any treatment and its shelf life at 4 °C does not
245 allow it to be included in the storage study. BP sample was only considered to compare
246 the effect of the different treatments on the protein digestibility. All treatments (PA,
247 UHPH T₁ and UHPH T₂) improved the protein digestibility with respect to BP (82–83%
248 compared to 75% in BP, $p < 0.05$). Throughout refrigerated storage, all processed
249 samples showed a similar evolution of the protein digestibility, decreasing 5–8% at the
250 21st day of storage (Figure 2). Although there was a decrease in the protein digestibility
251 in all processed-soymilks after storage, protein digestibility in all samples was higher
252 than in BP samples. Besides, it has been reported that *in vitro* protein digestibility of
253 soybean ranged from 62.7 to 71.6% (Chitra, Vimala, Singh & Geervani, 1995). The
254 higher digestibility in BP samples in comparison with soybeans could be explained
255 because BP has been soaked in hot water during soymilk elaboration.

256 Soybean has protease inhibitors, both trypsin and chymotrypsin inhibitors, which could
257 be inactivated under high temperatures and high pressures. However, Poliseli-Scopel et
258 al. (2012) reported that a certain antitrypsin residual activity remained after PA and
259 UHPH at 200 MPa soymilk treatments. These authors reported that to reach a

260 significant reduction of protease inhibitors, it was necessary to combine higher
261 temperatures and longer holding time than those applied in UHT treatments. Moreover,
262 Van der Ven, Matser and Van den Berg (2005) reported a 90% inactivation of trypsin
263 inhibitors under high pressure processing with longer processing time and higher
264 pressures and temperatures than in the current work (750 MPa/77 °C and 525 MPa/90
265 °C during 2 min, reaching real temperatures of 110 °C).

266 Digestibility not only depends on the presence of antinutritive factors but also is related
267 with protein denaturation. It is recognised that heat treatment increases digestibility by
268 itself, due to protein denaturation and the unfolding of protein molecular structure,
269 which increase the accessibility of the protease enzyme (Liu, 1999). The similar
270 behaviour between heat and UHPH-processed samples in digestibility profile during 4
271 °C storage indicates that UHPH treatment does not improve the digestibility in
272 comparison with conventional pasteurisation.

273

274 **3.3. Blocked lysine content in processed soymilks throughout storage**

275 The Maillard reaction causes losses in nutritional and protein quality, and thermal
276 processing favours its development (Seiquer, Díaz-Alguacil, Delgado-Andrade &
277 López-Frías, 2006). Furosine is generated by acid hydrolysis of the Amadori compound
278 fructosyllsine, which is an early Maillard reaction product formed from lysine.
279 Furosine is extensively used as an indicator of food quality and heat damage in many
280 types of food. The analysis of the Amadori compound is considered as an indirect
281 measure of lysine availability and, as a consequence, an index of protein quality
282 (Feinberg, Dupont, Efstathiou, Louapre & Guyonnet, 2006). In this sense, Figure 3
283 shows the percentage of blocked lysine of BP at the first day and also the evolution of
284 this parameter in PA and UHPH-processed samples during storage. At the first day,

285 there were no differences between the PA and the UHPH-processed samples compared
286 to BP, with about 4–6 % of blocked lysine ($p < 0.05$), which corresponds to 28–40 mg/L
287 of furosine. These results are in accordance with the furosine contents reported in
288 commercial soy beverages by Amigo-Benavent, Villamiel and Del Castillo (2007). The
289 available lysine in soymilk protein is affected not only by the amount of free amino
290 groups of lysine but also by the extent of protein denaturation. Our results are consistent
291 with those reported for cow's milk processed by UHPH and PA under the same
292 conditions as in this work (Perera, Ferragut, Quevedo, Guamis & Trujillo, 2009).

293 During refrigerated storage, there was an increase in the percentage of blocked lysine in
294 all thermal and UHPH-processed samples. After 21 days, PA soymilk reached 17%
295 blocked lysine, meanwhile UHPH T₁ and UHPH T₂ reached 11% and 12%,
296 respectively. As Figure 3 shows, the thermal treatment affected the availability of this
297 essential amino acid more than the UHPH treatments. Therefore, UHPH maintains the
298 protein quality in soymilk under refrigerated storage better than the heat treatment.

299 PA and UHPH T₁ showed a higher aglycone concentration at the end of storage than
300 UHPH T₂ samples (Figure 1). These high amounts of aglycones not only impart
301 astringent, bitter, and chalky aftertastes to soymilk (Okubo, Iijima, Kobayashi,
302 Yoshikoshi, Uchida & Kudou, 1992) but also could react with available lysine and other
303 free amino acids presents in soymilk and form compounds involved in the loss of the
304 protein quality (Davies, Netto, Glassenap, Gallaher, Labuza & Gallaher, 1998). It
305 should be noted that these products are similar to those of the Maillard reaction, which
306 have been reported to be potential carcinogens (Skog, Johansson & Jägerstad, 1998;
307 Knice & Felton, 2005). Therefore, the lower occurrence of aglycones in UHPH
308 treatment better maintains the quality of proteins in comparison with heat processed
309 samples.

310

311 **4. CONCLUSIONS**

312 This is the first study reporting the changes produced on isoflavone interconversion,
313 protein digestibility and blocked lysine of UHPH-pasteurised processed soymilk during
314 storage at 4 °C. According to our results, UHPH samples showed lower interconversion
315 to aglycones during refrigerated storage in comparison to heat processed samples. This
316 had a positive effect on the sensory properties of the soymilk. In addition, the lesser
317 formation of aglycones in UHPH-processed samples yielded lower percentage of
318 blocked lysine, which is also positive from both nutritional and toxicological point of
319 view. With respect to digestibility, no differences were observed between heat and
320 UHPH pasteurised samples.

321

322 **ACKNOWLEDGEMENTS**

323 Authors would like to thank the Centre Especial Planta de Tecnologia dels Aliments
324 (CERPTA) for providing the soymilk samples and especially to the Dr. Victoria
325 Ferragut for her technological support. The authors would also like to thank the
326 *Direcció General de Recerca* of the *Generalitat de Catalunya* (2008-00668 SGR) for
327 their support and for a grant from the *Ministerio de Educación y Ciencia* (Spain) to the
328 PhD student Natalia Toro-Funes. This work was also supported by the Interministerial
329 Commission for Science and Technology (CICYT) of the *Ministerio de Educación y*
330 *Ciencia (Spain)* through the Project AGL-2008-05430-C02-02.

331

332 **REFERENCES**

333 Achouri, A., Boye, J. I., & Zamani, Y. (2007). Changes in soymilk quality as a function

- 334 of composition and storage. *Journal of Food Quality*, 30(5), 731-744.
- 335 Amigo-Benavent, M., Villamiel, M., & del Castillo, M. D. (2007). Chromatographic
336 and electrophoretic approaches for the analysis of protein quality of soy beverages.
337 *Journal Separation Science*, 30, 502-507.
- 338 Anderson, J. W., Johnstone, B. M., & Cook-Newell, M. E. (1995). Meta-analysis of the
339 effects of soy protein intake on serum lipids. *The New England Journal of Medicine*,
340 333, 276-282.
- 341 Bosch, L., Alegría, A., Farré, R., & Clemente, C. (2008). Effect of storage conditions on
342 furosine formation in milk–cereal based baby foods. *Food Chemistry*, 107, 1681-1686.
- 343 Boye, J. I. (1996). Protein-polyphenol interaction in fruit juices. *Recent Research*
344 *Developments in Agricultural and Food Chemistry*, 3, 85-107.
- 345 Chitra, U., Vimala, V., Singh, U., & Geervani, P. (1995). Variability in phytic acid
346 content and protein digestibility of grain legumes. *Plant Foods for Human Nutrition*,
347 47, 163-172.
- 348 Chen, T. R., & Wei, Q. H. (2008). Analysis of bioactive aglycone isoflavones in
349 soybean and soybean products. *Nutrition and Food Science*, 38, 540-547.
- 350 Davies, C. G. A., Netto, F. M., Glassenap, N., Gallaher, C. M., Labuza, T. B., &
351 Gallaher, D. D. (1998). Indication of the Maillard Reaction during Storage of Protein
352 Isolates. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 46, 2485–2489.
- 353 Debruyne, I. (2006). *Soy Applications in Food*. in: Riaz, M. N. (Ed.). pp. 111-
354 133. Taylor and Francis, Boca Ratón.
- 355 Delgado, T., Corzo, N., Santa-María, G., Jimeno, M. L., & Olano, A. (1992).
356 Determination of furosine in milk samples by ion-pair reversed phase liquid
357 chromatography. *Chromatographia*, 33, 374-376.

- 358 Dumay, E., Chevalier-Lucia, D., Picart-Palmade, L., Benzaria, A., Gràcia-Julià, A., &
359 Blayo, C. (2012). Technological aspects and potential applications of (ultra) high-
360 pressure homogenisation. *Trends in Food Science & Technology*, XX, 1-14.
- 361 Eisen, B., Ungar, Y., & Shimoni, E. (2003). Stability of isoflavones in soy milk stored
362 at elevated and ambient temperatures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51,
363 2212-2215.
- 364 Feinberg, M., Dupont, D., Efstathiou, T., Louapre, V., & Guyonnet, J. P. (2006).
365 Evaluation of tracers for the authentication of thermal treatments of milks. *Food*
366 *Chemistry*, 98, 188-194.
- 367 Floury, J., Desrumaux, A., & Legrand, J. (2002). Effect of ultra high-pressure
368 homogenisation on structure and on rheological properties of soy protein-stabilized
369 emulsions. *Journal of Food Science*, 67(9), 3388-3395.
- 370 Friedman, M. & Brandon, D. L. (2001). Nutritional and Health Benefits of Soy proteins.
371 *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 1069–1086.
- 372 Hsu, H. W., Vavak, D. L., Satterlee, L. D., & Miller, G. A. J. (1977). A multienzyme
373 technique for estimating protein digestibility. *Journal of Food Science*, 42(5), 1269-
374 1273.
- 375 Huang, H., Liang H., & Kwok, K. (2006). Effect of thermal processing on genistein,
376 daidzein and glycitein content in soymilk. *Journal of Science Food and Agriculture*, 86,
377 1110–1114.
- 378 Ismail, B., & Hayes, K. (2005). β -Glycosidase Activity toward Different Glycosidic
379 Forms of Isoflavones. *Journal Agriculture and Food Chemistry*, 53(12), 4918–4924.
- 380 Jung, S., Murphy, P. A., & Sala, I. (2008). Isoflavone profiles of soymilk as affected by
381 high-pressure treatments of soymilk and soybeans. *Food Chemistry*, 111, 592-598.

- 382 Knize, M. G., & Felton, J. S. (2005). Formation and Human Risk of Carcinogenic
383 Heterocyclic Amines Formed from Natural Precursors in Meat. *Nutrition Reviews*, 53,
384 158-165.
- 385 Kwok, K. C., Liang, H. H., Niranjan, K., J. (2002). Optimizing Conditions for Thermal
386 Processes of Soy Milk. *Journal Agriculture and Food Chemistry*, 50, 4834 – 4838.
- 387 Liu, K. S. (1999). Soybeans Chemistry, Technology, and Utilization. Aspen. Publishing,
388 Gaithersburg, MD.
- 389 Lopes-Barbosa, A. C., Lajolo, L. M. & Genovese, A. I. (2006). Influence of
390 temperature, pH and ionic strength on the production of isoflavone-rich soy protein
391 isolates. *Food Chemistry*, 98, 757-766.
- 392 Moore, S., Spackman, D. H., Stein, W. H. (1958). Chromatography of Amino Acids on
393 Sulfonated Polystyrene Resins. An Improved System. *Analytical Chemistry*, 30(7),
394 1185–1190.
- 395 Moriyama, T., Kishimoto, K., Nagai, K., Urade, R., Ogawa, T., Utsumi, S., Maruyama,
396 N., & Maebuchi, M. (2004). Soybean β -Conglycinin Diet Suppresses Serum
397 Triglyceride Levels in Normal and Genetically Obese Mice by Induction of β -
398 Oxidation, Downregulation of Fatty Acid Synthase, and Inhibition of Triglyceride
399 Absorption. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 64, 352-359.
- 400 Murphy, P. A., Song, T. T., Buseman, G., Barua, K., Beecher, G. R., Trainer, D., &
401 Holden, J. (1999). Isoflavones in retail and institutional soy foods. *Journal Agriculture
402 and Food Chemistry*, 47, 2697–704.
- 403 Nursten, H. (2005). in: The Maillard Reaction: Chemistry, Biochemistry and
404 Implications, RSC, Cambridge, pp. 1- 30.

- 405 Okubo, K., Iijima, M., Kobayashi, Y., Yoshikoshi, M., Uchida, T., & Kudou, S. (1992).
406 Components responsible for the undesirable taste of soybean seeds. *Bioscience,*
407 *Biotechnology, and Biochemistry*, 56, 99-103.
- 408 Otieno, D. O., Ashton, J. F., & Shah, N. P. (2007). Isoflavone phytoestrogen
409 degradation in fermented soymilk with selected β -glucosidase producing *L. acidophilus*
410 strains during storage at different temperatures. *International Journal of Food*
411 *Microbiology*, 115, 79-88.
- 412 Perera, J., Ferragut, V., Quevedo, J. M., Guamis, B., & Trujillo, A. J. (2009). Heat
413 damage evaluation in ultra-high pressure homogenized milk. *Food Hydrocoloids*, 23
414 1974-1979.
- 415 Polisel-Scopel, F. H., Hernández-Herrero, M., Guamis, B., & Ferragut, V. (2012).
416 Comparison of ultra pressure homogenisation and conventional thermal treatments on
417 the microbiological, physical and chemical quality of soymilk. *Food Science and*
418 *Technology*, 46, 42-48.
- 419 Polisel-Scopel, F. H., Hernández-Herrero, M., Guamis, B., & Ferragut, V. (2013).
420 Characteristics of soymilk pasteurised by ultra high pressure homogenisation (UHPH).
421 *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 20, 73-80.
- 422 Prabhakaran, M. P., & Perera, C. O. (2006). Effect of extraction methods and UHT
423 treatment conditions on the level of isoflavones during soymilk manufacture. *Food*
424 *Chemistry*, 99(2), 231-237.
- 425 Rau De Almeida Callou, K., Sadigov, S., Lajolo, F. M., & Genovese, M. I. (2010).
426 Isoflavones and antioxidant capacity of commercial soy-based beverages: effect of
427 storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 4284-4291.

- 428 Rickert, D. A., Meyer, M. A., Hu, J., & Murphy, P. A. (2004). Effect of extraction pH
429 and temperature on isoflavone and saponin partitioning and profile during soy protein
430 isolate production. *Journal of Food Science*, 69, 623-631.
- 431 Seiquer, I., Díaz-Alguacil, J., Delgado-Andrade, C., López-Frías, M., et al., (2006).
432 Diets rich in Maillard reaction products affect protein digestibility in adolescent males
433 aged 11–14 y. *American Journal of Clinical Nutrition*, 83, 1082- 1088.
- 434 Skog, K. I., Johansson, M. A. E., & Jägerstad, M. I. (1998). Carcinogenic Heterocyclic
435 Amines in Model Systems and Cooked Foods: A Review on Formation, Occurrence and
436 Intake. *Journal of Food and Chemical Toxicology*, 36, 879-896.
- 437 Smith, K., Mendonca, A., & Jung, S. (2009). Impact of high-pressure processing on
438 microbial shelf-life and protein stability of refrigerated soymilk. *Food Microbiology*,
439 26(8), 794-800.
- 440 Toro-Funes, N., Odriozola-Serrano, I., Bosch-Fusté, J., Latorre-Moratalla, M. L.,
441 Veciana-Nogués, M. T., Izquierdo-Pulido, M., & Vidal-Carou, M. C. (2012). Fast
442 simultaneous determination of free and conjugated isoflavones in soy milk by UHPLC–
443 UV. *Food Chemistry*, 135(4), 2832–2838.
- 444 Toro-Funes, N., Bosch-Fusté, J., Veciana-Nogués, M. T. & Vidal-Carou, M. C. (2014).
445 Effect of ultra high pressure homogenisation treatment on the bioactive compounds of
446 soya milk. *Food Chemistry*, In Press.
- 447 U.S. Food and Drug Administration (1999). Food labeling health claims: soy protein
448 and coronary heart disease. Food and Drug Administration, HHS. Final rule. Federal
449 Register: 64, 57700–33.
- 450 Valencia-Flores, D. C., Hernández-Herrero, M., Guamis, B., & Ferragut, V. (2013).
451 Comparing the Effects of Ultra-High-Pressure Homogenisation and Conventional

- 452 Thermal Treatments on the Microbiological, Physical, and Chemical Quality of Almond
453 Beverages. *Journal of Food Science*, 78, E199-E205.
- 454 Van der Ven, C., Matser, A. M., & Van den Berg, R. W. (2005). Inactivation of soybean
455 trypsin inhibitors and lipoxygenase by high pressure processing. *Journal Agriculture
456 and Food Chemistry*, 53, 1087–1092.
- 457 Wang, H. J., & Murphy, P. A. (1996). Mass balance study of isoflavones during
458 soybean processing. *Journal Agriculture and Food Chemistry*, 44, 2377–83.

459

460 **Figure captions**

461 Figure 1: Evolution of the isoflavone profile (mg/L) in treated PA (a), UHPH T1 (b) and
462 UHPH T2 (c) soymilks at 4 °C during 21 days of storage. Total isoflavones (mg/L) are
463 also shown on a secondary scale.

464

465 Figure 2: Evolution of the percentage of *in-vitro* protein digestibility (%) in treated PA,
466 UHPH T1 and UHPH T2 soymilks at 4 °C during 21 days of storage. PA and UHPH T1
467 samples were not determined at the last point of the period.

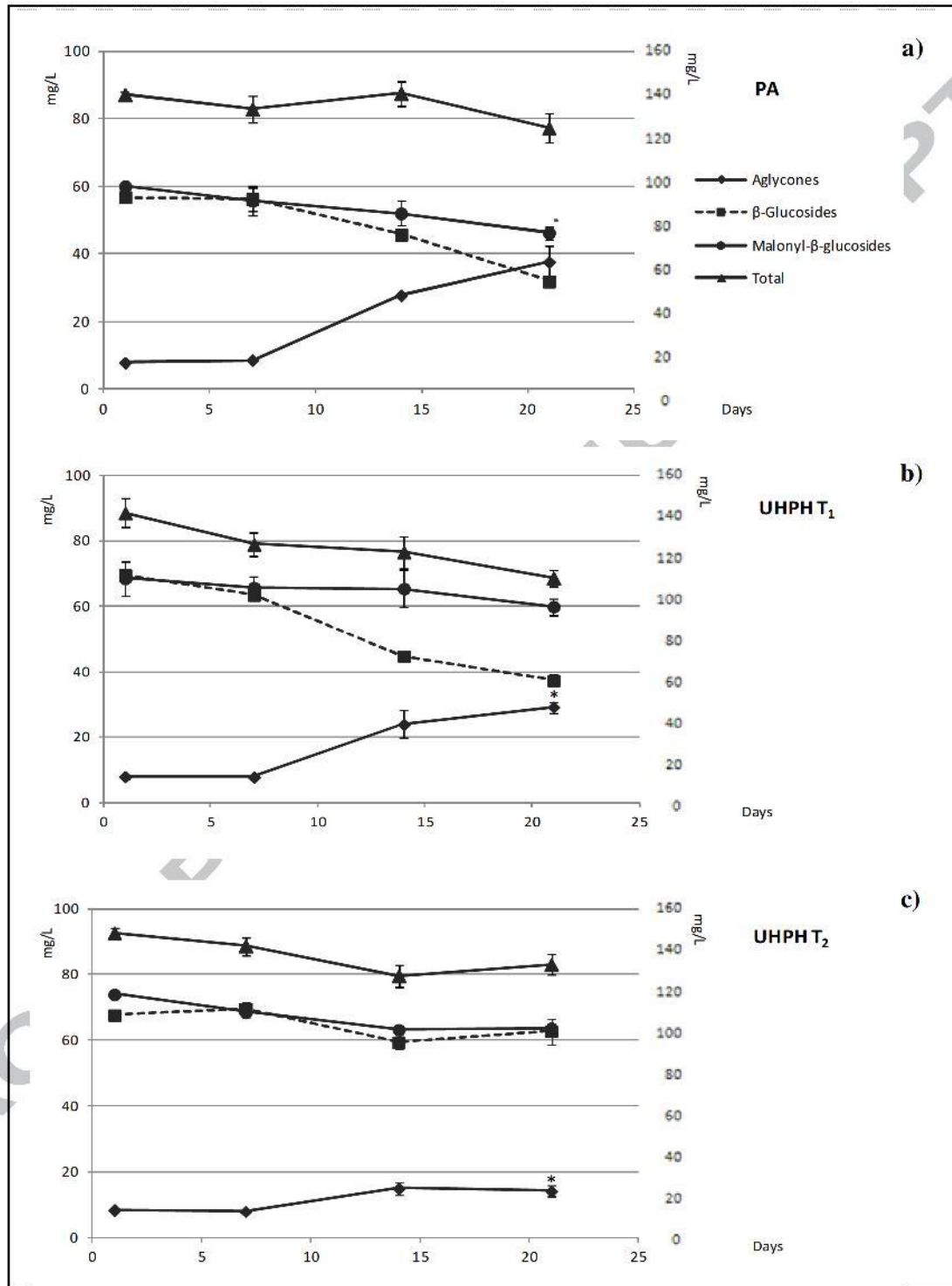
468

469 Figure 3: Evolution of the percentage of blocked lysine (%) in the base product (BP),
470 and treated PA, UHPH T1 and UHPH T2 soymilks at 4 °C during 21 days of storage.

471
472
473
474

Figure 1.

475



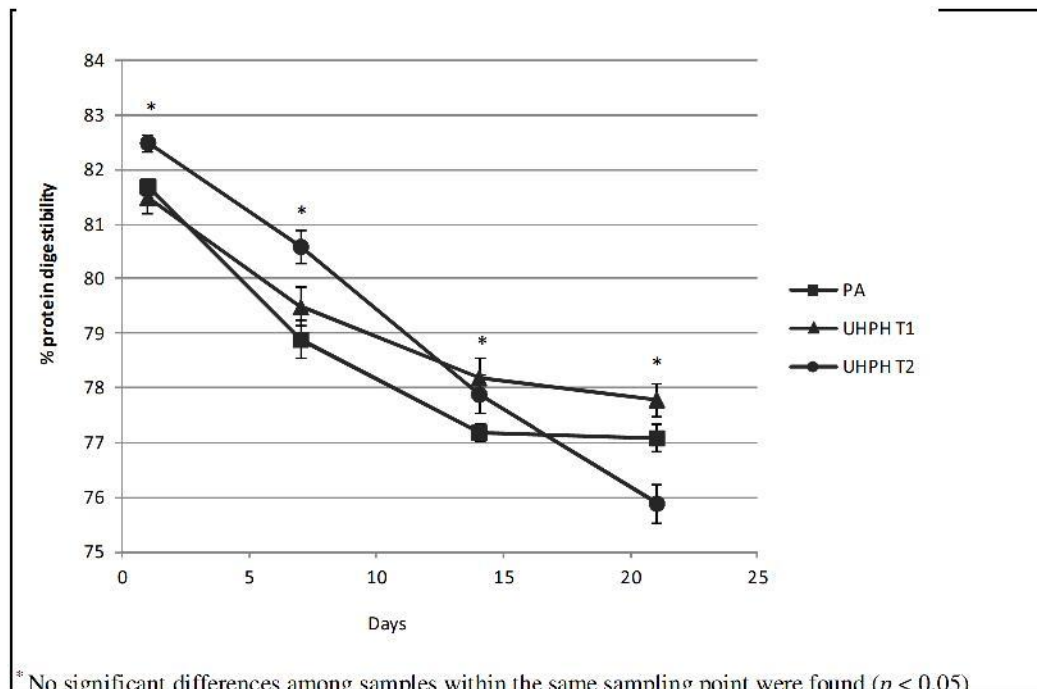
477

478 *Aglycone contents in the samples at 21 days of storage were statistically different ($p < 0.05$).

479 Values were the mean of nine determinations (Analyses in triplicate of three batches for each treatment)

480 Figure 2.

481



482

483

484

485

486

487

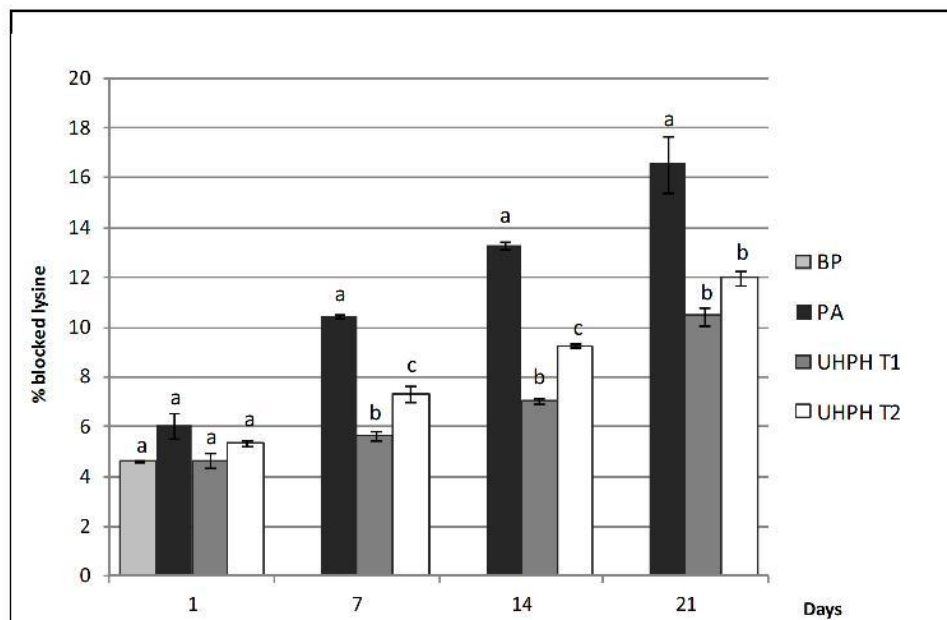
*No significant differences among samples within the same sampling point were found ($p < 0.05$)

Values were the mean of nine determinations (Analyses in triplicate of three batches for each treatment)

488

489 Figure 3.

490



491

492 ^{a-c} Values within the same sampling point bearing different letters were significantly different ($p < 0.05$)

493

494

495

ACCEPTED MANUSCRIPT

1 Table 1. Isoflavone content in base product (BP), pasteurized (PA) and UHPH-treated
 2 soymilks (mg/L).

3

4

	Malonyl- β -glucosides			β -Glucosides			Acetyl- β -glucosides			Aglycones			Total
	MDI	MGLY	MGI	DI	GLY	GI	ADI	AGLY	AGI	DE	GLE	GE	Isoflavones
BP	16.44 \pm 0.42 ^a	5.45 \pm 0.13 ^a	41.54 \pm 0.90 ^a	18.74 \pm 0.40 ^a	3.05 \pm 0.02 ^a	38.14 \pm 1.23 ^a	0.75 \pm 0.05 ^a	0.29 \pm 0.02 ^a	1.46 \pm 0.06 ^a	2.80 \pm 0.25 ^a	0.50 \pm 0.03 ^a	5.19 \pm 0.24 ^a	134.37 \pm 0.55 ^a
PA	15.67 \pm 0.14 ^a	5.07 \pm 0.01 ^a	39.26 \pm 0.15 ^a	18.19 \pm 0.30 ^a	2.79 \pm 0.12 ^a	35.86 \pm 0.28 ^a	0.63 \pm 0.01 ^b	0.58 \pm 0.35 ^a	1.25 \pm 0.07 ^b	2.41 \pm 0.12 ^b	0.51 \pm 0.02 ^a	4.89 \pm 0.10 ^a	124.59 \pm 1.12 ^b
UHPH T₁	18.92 \pm 1.56 ^b	5.69 \pm 0.44 ^a	46.87 \pm 1.13 ^b	20.87 \pm 1.01 ^b	2.95 \pm 0.11 ^a	42.90 \pm 1.37 ^b	0.84 \pm 0.04 ^a	0.35 \pm 0.02 ^a	1.53 \pm 0.01 ^a	2.72 \pm 0.07 ^a	0.71 \pm 0.03 ^b	4.87 \pm 0.20 ^a	149.23 \pm 8.25 ^c
UHPH T₂	19.44 \pm 0.29 ^b	5.79 \pm 0.03 ^a	48.68 \pm 1.52 ^b	21.22 \pm 0.34 ^b	2.78 \pm 0.09 ^a	43.66 \pm 0.24 ^b	0.82 \pm 0.02 ^a	0.38 \pm 0.02 ^a	1.48 \pm 0.01 ^a	2.75 \pm 0.01 ^a	0.70 \pm 0.02 ^b	4.97 \pm 0.15 ^a	152.65 \pm 1.40 ^c

5

6

^{a-c} Values in the same column with different letters are significantly different ($p < 0.05$)

7

Values were the mean of nine determinations (Analyses were made in triplicate of three treatment batches)

8

9

Abbreviations: DI: daidzin; GLY: glycitin; GI: genistin; MDI: malonyl- β -daidzin; MGLY: malonyl- β -glycitin; MGI: malonyl- β -genistin; ADI: acetyl- β -daidzin; AGLY: acetyl- β -glycitin; AGI: acetyl- β -genistin; DE: daidzein; GLE: glycitein; GE: genistein.

10

11

12

13

14

15

16

508 HIGHLIGHTS

509 ► Changes of isoflavones in ultra-high-pressure homogenised (UHPH) soymilks under

510 refrigerated storage

511 ► Aglycone formation was lower in UHPH than in heat-processed samples

512 ► *In-vitro* protein digestibility was similar during storage in heat-pasteurised and

513 UHPH soymilks

514 ► Blocked lysine was higher during storage in heat-pasteurised than in UHPH soymilks

515

516

Artículo VII.

N. Toro-Funes, J. Bosch-Fusté, M.T. Veciana-Nogues, M.C. Vidal-Carou (2014). Isoflavone profile and protein quality in sterilized soymilk treated by Ultra High Pressure Homogenization during storage. Food Chemistry, Under Revision.

Índice de impacto (JCR 2012): 3.334

Posición en área "Food and Science Technology": 10/124

Manuscript Number: FOODCHEM-D-14-01195

Title: ISOFLAVONE PROFILE AND PROTEIN QUALITY IN STERILIZED SOYMILK TREATED BY ULTRA HIGH PRESSURE HOMOGENIZATION DURING STORAGE

Article Type: Research Article (max 7,500 words)

Keywords: isoflavones; protein digestibility; blocked lysine; soymilk; ultra high pressure homogenization; storage.

Corresponding Author: Dr M-Carmen Vidal-Carou, PhD

Corresponding Author's Institution: University of Barcelona

First Author: Natalia Toro-Funes

Order of Authors: Natalia Toro-Funes; Joan Bosch-Fusté; M. Teresa Veciana-Nogués; M-Carmen Vidal-Carou, PhD

Abstract: The application of ultra high pressure homogenization (UHPH) treatments is useful to obtain fine and stable soymilk emulsions. Changes of isoflavones and protein quality, in terms of digestibility and lysine availability, in soymilk-treated by UHPH were studied during 4 months of storage at room temperature in comparison to heat-sterilized soymilks. Results indicate that although there was a higher extractability of isoflavones in UHT than in UHPH-treated samples, similar total isoflavone contents were found at the end of storage. The interconversion of isoflavones into β -glucosides was faster in UHT-treated samples than in UHPH-treated ones. In addition, similar evolution of protein digestibility in both UHPH and UHT soymilks was found, being slightly higher in the initial UHT samples with 88.4% than in UHPH samples with 83.3%. No great differences were observed in the % of blocked lysine among samples after treatments, and neither in their evolution throughout storage at room temperature.

1 **ISOFLAVONE PROFILE AND PROTEIN QUALITY IN STERILIZED**
2 **SOYMILK TREATED BY ULTRA HIGH PRESSURE HOMOGENIZATION**
3 **DURING STORAGE**

4

5 N. Toro-Funes / J. Bosch-Fusté / M.T. Veciana-Nogués / M.C. Vidal-Carou*

6

7 Department of Nutrition and Food Science-XaRTA, INSA, Faculty of Pharmacy.

8 Campus de l'Alimentació de Torribera, University of Barcelona. Avda. Prat de la Riba

9 171, 08921-Santa Coloma de Gramenet, Barcelona, Spain. Tel: +34 934033785, Fax:

10 +34 934035931, e-mail: mcvidal@ub.edu

11 *Author to whom correspondence should be addressed.

12

13

14 **ABSTRACT**

15 The application of ultra high pressure homogenization (UHPH) treatments is useful to
16 obtain fine and stable soymilk emulsions. Changes of isoflavones and protein quality, in
17 terms of digestibility and lysine availability, in soymilk-treated by UHPH were studied
18 during 4 months of storage at room temperature in comparison to heat-sterilized
19 soymilks. Results indicate that although there was a higher extractability of isoflavones
20 in UHT than in UHPH-treated samples, similar total isoflavone contents were found at
21 the end of storage. The interconversion of isoflavones into β -glucosides was faster in
22 UHT-treated samples than in UHPH-treated ones. In addition, similar evolution of
23 protein digestibility in both UHPH and UHT soymilks was found, being slightly higher
24 in the initial UHT samples with 88.4% than in UHPH samples with 83.3%. No great
25 differences were observed in the % of blocked lysine among samples after treatments,
26 and neither in their evolution throughout storage at room temperature.

27

28

29 **Key words:** isoflavones; protein digestibility; blocked lysine; soymilk; ultra high
30 pressure homogenization; storage.

31

32 1. INTRODUCTION

33 The consumption of soybean and soybean products are increasing because they are a
34 good source of high-quality proteins and also of some bioactive compounds, like
35 isoflavones. Accumulating evidence from dietary intervention studies support the health
36 benefits of soybean proteins and isoflavones, such as reduction of serum levels of total
37 cholesterol, low-density lipoprotein, and triglycerides (Zhan & Ho, 2005; Torres, Torre-
38 Villalvazo, & Tovar, 2006). The 60-70% of the changes observed in blood lipids has
39 been attributed to the isoflavones (Anderson, Johnstone, & Cook-Newell, 1995).
40 Soymilk is the highest soy-based product consumed over the world because it could be
41 an alternative to cow's milk for lactose-intolerant and allergic to milk proteins
42 individuals, or for those who avoid milk for other reasons (Reilly, Lanou, Barnard,
43 Seidl, & Green, 2006). Soymilk manufacturing involves thermal processes, which
44 provide longer shelf-life by reduction of microorganisms, improve the nutritional value
45 by destroying antinutritional factors (Kunitz and Bowman–Birk trypsin inhibitors), and
46 increase protein digestibility (Kwok & Niranjana, 1995; Debruyne & Riaz, 2006). On the
47 contrary, thermal processing favours the Maillard reaction, causing losses in nutritional
48 quality and digestibility of proteins (Nursten, 2005; Seiquer et al. 2006). Furosine,
49 which is an early Maillard reaction product, is generated by acid hydrolysis of the
50 Amadori compound fructosyllysine, and used as an indicator of food quality and heat
51 damage in lots of types of food. Since lysine is a precursor of fructosyllysine, the
52 measure of lysine availability could be considered an index of protein quality (Feinberg,
53 Dupont, Efstathiou, Louapre, & Guyonnet, 2006).

54 Alternative technologies to heat treatments have been extensively tested due to the
55 increased interest in achieving high levels of food safety and nutritive quality. Ultra
56 high pressure homogenization (UHPH) is an emerging technology based on the

57 dynamic application of high pressure (up to 400 MPa) allowing the continuous
58 processing of fluid foods. Cavitation, turbulence, impact and shear forces are physical
59 phenomena taking place during UHPH treatment (Floury, Legrand, & Desrumaux,
60 2004). These mechanical forces acting on the liquid food product cause fine and stable
61 emulsions (Thiebaud, Dumay, Picart, Guiraud, & Cheftel, 2003) and microbial and
62 enzymatic inactivation (Hayes, Fox, & Kelly, 2005). The application of UHPH
63 treatments not only favours the food safety (Poliseli-Scopel, Hernández-Herrero,
64 Guamis, & Ferragut, 2012; Valencia-Flores, Hernández-Herrero, Guamis, & Ferragut,
65 2013) but also allows an improvement of the extractability of potentially health-related
66 compounds, such as phytosterols from the fat globules or isoflavones from proteins
67 (Toro-Funes, Bosch-Fusté, Veciana-Nogués, & Vidal-Carou, 2014a). Isoflavones
68 interactions with proteins involve hydrogen bonding and hydrophobic interactions,
69 which are believed to be a function of the protein denaturation degree (Malaypally &
70 Ismail, 2010). Denaturation of proteins by high pressure differs from heat-induced
71 denaturation. Protein denaturation by heat is mainly irreversible because of the breakage
72 of covalent bonds and aggregation of the unfolded protein (Tedford, Smith, &
73 Schaschke, 1999). On the contrary, protein under high pressure tend to unfold till their
74 secondary or terciary state, and the hydrogen bonds are not affected by pressure while
75 the electrostatic and hydrophobic interactions between proteins are affected causing
76 reversible dissociations and aggregations (Floury, Desrumaux, & Legrand 2002). In a
77 previous work, it has been studied the changes of isoflavones and nutritive quality of
78 proteins in terms of digestibility and available lysine in pasteurized UHPH-treated
79 soymilk during refrigerated storage at 4 °C (Toro-Funes, Bosch-Fusté, Veciana-Nogués
80 & Vidal-Carou, 2014b). Therefore, the aim of this work is to monitor the changes of the
81 isoflavones, the “*in vitro*” protein digestibility and the blocked lysine throughout 4

82 months of storage at room temperature in sterilized UHPH-treated soymilk compared to
83 conventional UHT-treated samples in order to observe if there are differences with the
84 pasteurized UHPH-treated samples.

85

86 **2. MATERIALS AND METHODS**

87 **2.1. Methods**

88 *2.1.1. Isoflavones*

89 Isoflavone determination was performed by UHPLC (Waters Acquity System, Milford,
90 MA, USA) with a diode array detector (Waters 2996, Milford, MA) following the
91 method described by Toro-Funes et al. (2012).

92 The non-treated soymilk (the base product) showed 134.37 ± 0.55 of total isoflavone
93 contents (mg/L).

94

95 *2.1.2. "In vitro" protein digestibility*

96 The *in vitro* digestibility was carried out following the 3-enzyme method described by
97 Hsu, Vavak, Satterlee and Miller (1977) that involves the use of pancreatic trypsin
98 (Type IX), bovine pancreatic chymotrypsin (Type II), and porcine intestinal peptidase
99 (Type III). The digestibility of each sample was calculated using the following
100 regression equation:

$$101 \quad Y=210.464 - 18.103(X),$$

102 where Y = % protein digestibility and X = pH of the protein suspension after 10 min of
103 digestion with the enzyme solution.

104 The base product showed a $75.80 \pm 0.64\%$ of protein digestibility.

105

106 *2.1.3. Blocked lysine*

107 To calculate the % of blocked lysine, furosine was quantified by ion-pair liquid
108 chromatographic procedure using UV detection (Delgado, Corzo, Santa-María, Jimeno,
109 & Olano, 1992) and total lysine content was determined by cation exchange
110 chromatography and post-column derivatization with ninhydrin, and UV detection using
111 a Biochrom 30 (Biochrom Ltd., Cambridge, UK) amino acid analyzer following the
112 method of Moore, Spackman, and Stein (1958). Results were expressed as the
113 percentage of blockage of lysine, as reported by Bosch, Alegría, Farré, and Clemente
114 (2008), according to the formula:

$$115 \quad \% \text{ Blocked lysine} = (3.1 \times \text{furosine} \times 100) / (\text{total lysine} + 1.86 \text{ furosine})$$

116 The base product showed 26.81 ± 1.02 mg/L of furosine and $46.18 \pm 1.35\%$ of blocked
117 lysine.

118

119 **2.2. Samples**

120 Soymilk samples were provided by the pilot plant of the Autonomous University of
121 Barcelona (Centre Especial Planta de Tecnologia dels Aliments (CERPTA). The
122 elaboration process and the technological conditions applied for their production are
123 described in the work reported by Poliselí-Scopel et al. (2012).

124 Three productions of soymilk were performed. For each production, whole soybeans
125 (*Glycine max* var Majesta) were hydrated (1:3 water:soybean) during 15 h at room
126 temperature and then grinded for 20 min at 80 °C. The pulp obtained was filtrated to
127 obtain the soymilk base product (2.61 ± 0.04 g protein/100 ml; 1.78 ± 0.08 g fat/100 ml;
128 1.29 ± 0.08 g carbohydrates/ 100 ml; 5.56 ± 0.12 g dry matter/100 ml; 0.28 ± 0.02 g
129 ash/100 ml. pH value was 6.72 ± 0.02) for further processing by UHPH, or UHT.

130 For each soymilk production, two treatments were applied on the base product: one by
131 UHPH and the other by UHT. UHPH treatments were conducted with a high pressure

132 homogenizer (Model FPG11300, Stansted Fluid Powder Ltd., Essex. UK). The UHPH
133 conditions were 300 MPa at 75 °C of inlet temperature (UHPH). And, the UHT
134 treatment was done in a two step homogenization at 18 MPa and 4 MPa previous to a
135 heat treatment at 142 °C for 6 s.

136 During the pressurization operation, soymilk experienced an adiabatic heating in the
137 high pressure valve during approximately 0.7 s reaching a temperature of 135.7 °C ±
138 1.5. And, the temperature after cooling the liquid was 26.2 °C ± 2.2. Soymilk was
139 packaged in a coater paperboard cartons (200 mL Tetra Brick containers) by using a
140 Tetra Pak (TBA9 slim line, Switzerland) aseptic technology.

141 UHT and UHPH samples were stored at room temperature in a dry and dark place up to
142 4 months. Samples were taken monthly (time 0, 1, 2, 3 and 4 month) and stored at -80
143 °C until analysis.

144

145 **2.3. Statistical analysis**

146 All analyses were made in triplicate. All statistical tests were performed by means of the
147 Statistical Software Package for Windows PASW Statistic 18.0 (SPSS, Chicago, IL,
148 USA).

149

150 **3. RESULTS AND DISCUSSION**

151 **3.1. Isoflavones**

152 The initial isoflavone contents (mg/L) in the UHT and UHPH soymilks are shown in
153 Table 1. Total isoflavones was 154.67 and 186.20 mg/L in UHPH and UHT-treated
154 samples, respectively. The UHT soymilk showed higher isoflavone amounts than the
155 UHPH-treated ($p < 0.05$), both samples obtained from the same base product. These
156 results were slightly higher than the isoflavone contents in the pasteurized UHPH and

157 heat-treated soymilk reported in a previous work (Toro-Funes, et al., 2014b), which is in
158 accordance to the increased extractability of isoflavones as higher is the pressure in the
159 UHPH treatments (Toro-Funes, et al., 2014a).

160 Throughout storage total isoflavone content in the UHT and UHPH-treated soymilks at
161 room temperature are shown in Figure 1. In both kinds of samples there was an increase
162 in total isoflavones throughout storage. In the UHT samples, the increase was about the
163 5% within the first month, remaining constant after this time ($p>0.05$). In the UHPH
164 samples, total isoflavone content increased a 30% till the 2nd month of storage
165 ($r=0.997$), followed by an increase of 7% in the last month of storage. These results are
166 in contrast to the 8-13% of isoflavone degradation found in the pasteurized UHPH and
167 heat-treated soymilk during 21 days of refrigerated storage at 4 °C (Toro-Funes et al.,
168 2014b). Isoflavones are associated to the soybean proteins, and their interactions depend
169 on the protein content and the protein denaturation degree (Malaypally & Ismail, 2010).

170 As total protein content in all samples was the same because they were obtained from
171 the same base product, the unfolding and denaturation of soybean protein provoked by
172 the temperature and pressure used in the current work would be the responsible of the
173 different extractability of isoflavones. Rickert, Meyer, Hu, and Murphy (2004) reported
174 that isoflavones have a better extractability when soybean proteins were denatured.

175 Soybean proteins, mainly β -conglycinin and glycinin, were reported to be thermally
176 denatured at approximately 70 and 90 °C for 5 min, respectively (Liu & Chang, 2007).

177 On the other hand, Puppo et al. (2004) reported a total soybean protein denaturation at
178 higher pressure levels and longer time than in the current work (>400 MPa for 10 min).

179 The degree of denaturation of the soybean protein induced by heat could explain the
180 higher extractability of isoflavones in the heat-treated samples just after the treatment,
181 with only a little increase during storage. Previously, it was shown that the total

182 isoflavone concentration remained unchanged in UHT-treated soy beverages within the
183 range of 2 and 12 months of storage at room temperature (Setchell & Cole, 2003). Rau
184 De Almeida Callou, Sadigov, Lajolo, and Genovese (2010) reported a constant total
185 isoflavones in UHT-treated soymilk up to 6 months of storage at room temperature.

186 No previous information has been found about the possible reasons to explain why there
187 was an increase in isoflavones during storage of UHPH-treated soymilk. However, it is
188 known that high pressure affect the electrostatic and hydrophobic interactions that cause
189 reversible and random dissociations and aggregations between soybean proteins (Floury
190 et al. 2002). So, the release of isoflavones during the first two months of storage of the
191 UHPH-treated soymilk could be related to these reversible protein structural changes.

192

193 In order to know if there is an interconversion of isoflavones in the treated soymilks
194 under room temperature storage, the chemical forms were determined in samples
195 corresponding to every month in both UHT and UHPH-treated samples (Figure 2). In
196 the soybean seeds, the most predominant form was the malonyl- β -glucoside which
197 constitutes 70–80% of total isoflavones (Charron, Allen, Johnson, Pantalone, & Sams
198 2005). The processing operations and storage of soymilk could affect the rate of
199 conversion of their different chemical form (Eisen, Ungar, & Shimoni, 2003; Huang,
200 Liang, & Kwok, 2006). In this work, the β -glucosides and the malonyl- β -glucosides
201 were the predominant forms, being the sum of both more than 90% of the total
202 isoflavones. The β -glucosides were in a higher proportion in the UHT than in the UHPH
203 samples, with about 63% and 55%, respectively. Heat treatment accelerates the
204 hydrolysis of malonyl and acetyl conjugates, which go on to form β -glucosides
205 (Prabhakaran, Perera, & Valiyaveettil, 2005; Vacek, Klejdus, Lojková, & Kubán, 2008).
206 Moreover, Jung, Murohy, and Sala (2008) reported that pressure (up to 700 MPa)

207 combined with mild temperature (25 and 75 °C) also promotes the interconversion of
208 the malonyl forms to β -glucosides. This profile did not change throughout all the
209 storage but there was a significant reduction on the malonyl- β -glucosides with a parallel
210 increase of β -glucosides, being slower in the UHPH sample than in the UHT sample.
211 The aglycone form did not undergo any significant change in both treated soymilks
212 throughout storage.

213 The conversion of isoflavones is dictated by their chemical structure, and other
214 parameters such as pH, temperature, moisture and activity of endogenous and bacterial
215 β -glucosidases (Ismail & Hayes, 2007). It is known that thermal treatments, such as
216 UHT, inactivate the β -glucosidases (Márquez & Waliszewski, 2008). This fact explains
217 the no aglycone formation throughout storage, which is also confirmed in the UHT-
218 treated soymilk in Figure 2a. There is not any report studying the effect of the UHPH on
219 the inactivation of the β -glucosides of soybean or soybean products. However, a higher
220 aglycone conversion in the pasteurized UHPH and heat-treated soymilk were found
221 during refrigerated storage at 4 °C for 21 days, probably due to the action of microbial
222 β -glucosidases (Toro-Funes, et al., 2014b). The low aglycone hydrolysed from the β -
223 glucosides in the UHPH-treated samples in the current work along 4 months of storage
224 (Figure 2b) suggests that these enzymes were also inactivated by the UHPH treatment.

225

226 **3.2. “*In vitro*” protein digestibility**

227 The evolution of the percentage of the digestibility of soymilks at room temperature
228 during 4 months of storage is shown in Figure 3. A similar evolution of the protein
229 digestibility in both UHT and UHPH-treated soymilks was observed throughout the
230 storage, with a decrease of 5% of protein digestibility at the 4 month of storage.
231 However, the percentage of digestibility in the initial samples was different, being

232 statistically higher in the UHT-treated sample ($88.4 \pm 0.29\%$, which corresponds to a
233 13% increase from the % of the base product), than in the UHPH sample ($83.3 \pm 0.27\%$,
234 which corresponds to a 8% increase) (Figure 3; $p < 0.05$). These differences in the % of
235 digestibility could be attributed to the treatment applied. However, no differences in the
236 protein digestibility were found between the pasteurized UHPH and heat-treated
237 soymilks at initial and during refrigerated storage at 4 °C for 21 days (Toro-Funes, et al.
238 2014b).

239 Although soybean has protease inhibitors, trypsin and chymotrypsin inhibitors, which
240 could be destroyed under high temperatures and high pressure, Poliseli-Scopel et al.
241 (2012) reported that there was a higher antitrypsin residual activity in soymilk treated
242 by UHPH at 300 MPa at 75 °C than in soymilk treated by UHT. However, Van der Ven,
243 Matser, and Van den Berg (2005) reported a 90% inactivation of trypsin inhibitors
244 under high pressure processing with a combination of pressure and temperature of 750
245 MPa/77 °C and 525 MPa/90 °C during 2 min, reaching real temperatures of 110 °C.
246 Digestibility not only depends on the presence of antinutritive factors but it is also
247 related with protein denaturation. It is recognized that heat treatment increases
248 digestibility by itself, due to protein denaturalization and unfolding the structure of the
249 protein molecule, which increase the accessibility of the protease enzyme (Liu, 2004).
250 The different degree of protein denaturation mentioned above, altogether with the
251 higher antitrypsin residual activity in UHPH-treated soymilk, could explain the lower
252 protein digestibility in UHPH samples than in UHT-treated samples.

253

254 **3.3. Blocked lysine**

255 Figure 4 shows the percentage of blocked lysine in UHPH and UHT-treated samples
256 during storage. At the first day, there were no statistically differences among the UHPH

257 and the UHT-treated samples ($p < 0.05$). The blocked lysine was about 6-7%, which
258 corresponds to 36-54 mg/L of furosine. These results are in accordance with the
259 furosine contents reported in commercial soy beverages by Amigo-Benavent, Villamiel,
260 and del Castillo (2007). Moreover, our results are consistent with the effect of the
261 similar UHPH treatments reported for cow's milk in comparison to the UHT treatment
262 (Pereda Ferragut, Quevedo, Guamis, & Trujillo, 2009). During room temperature
263 storage, there was an increase in the percentage of blocked lysine in both thermal and
264 UHPH-treated samples, being from 7 to 13% in the UHPH soymilk and from 6 to 10%
265 in the UHT soymilk (Figure 4). These results are in accordance to the low increase in
266 the percentage of blocked lysine in the pasteurized UHPH-treated soymilk in contrast to
267 the higher increase in the heat pasteurized soymilks, reaching a 17% of the percentage
268 of blocked lysine (Toro-Funes, et al., 2014b). The reversible and random dissociations
269 and aggregations between soybean proteins induced by pressure in the UHPH treated-
270 soymilk in this work seems not significantly to affect more the availability of this
271 essential amino acid throughout storage in comparison to the UHT-treated soymilks.

272

273 **4. CONCLUSIONS**

274 The treatments applied UHT or UHPH did not affect the total isoflavone content at the
275 end of the storage, despite of there were little differences in samples just after the
276 treatments. The interconversion of isoflavones into β -glucosides was faster in UHT-
277 treated samples than UHPH-treated ones. In addition, similar evolution of protein
278 digestibility in both UHPH and UHT soymilks was found. Likewise, the availability of
279 lysine in samples throughout storage was similar in both UHPH and UHT-treated
280 samples. In summary, UHPH treatment in the conditions applied in this work allows to
281 obtain soymilk emulsions with the same percentage of digestibility, available lysine and

282 isoflavone profile as heat treatments and with similar changes during storage. In
283 comparison with pasteurized-UHPH soymilk, there was a lower isoflavone degradation
284 and slower interconversion in the sterilized-UHPH soymilks. However, similar
285 evolution of protein digestibility and blocked lysine was found in the sterilized-UHPH
286 soymilks as in the pasteurized-UHPH ones. According to our knowledge, this is the first
287 study assessing the stability of isoflavones and protein quality parameters during storage
288 on sterilized UHPH-treated soymilk.

289

290 **ACKNOWLEDGEMENTS**

291 Authors would like to thank the Centre Especial Planta de Tecnologia dels Aliments
292 (CERPTA) for providing the soymilk samples and especially to the Dr. Victoria
293 Ferragut for her technological support. The authors would also like to thank the
294 *Direcció General de Recerca* of the *Generalitat de Catalunya* (2008-00668 SGR) for
295 their support and for a grant from the *Ministerio de Educación y Ciencia* (Spain) to the
296 PhD student Natalia Toro-Funes. This work was also supported by the Interministerial
297 Commission for Science and Technology (CICYT) of the *Ministerio de Educación y*
298 *Ciencia (Spain)* through the Project AGL-2008-05430-C02-02.

299

300 **REFERENCES**

301 Amigo-Benavent, M., Villamiel, M., & del Castillo, M. D. (2007). Chromatographic
302 and electrophoretic approaches for the analysis of protein quality of soy beverages.
303 *Journal Separation Science*, 30, 502-507.

304 Anderson, J. W., Johnstone, B. M., & Cook-Newell, M. E. (1995). Meta-analysis of the
305 effects of soy protein intake on serum lipids. *The New England Journal of Medicine*,

- 306 333(5), 276-282.
- 307 Bosch, L., Alegría, A., Farré, R., & Clemente, C. (2008). Effect of storage conditions on
308 furosine formation in milk–cereal based baby foods. *Food Chemistry*, 107(4), 1681-
309 1686.
- 310 Charron, C. S., Allen, F. L., Johnson, R. D., Pantalone, V. R., & Sams, C. E. (2005).
311 Correlations of oil and protein with isoflavone concentration in soybean [*Glycine max*
312 (L.) Merr.]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(18), 7128–7135.
- 313 Debruyne, I. (2006). *Soy Applications in Food*. in: Riaz, M. N. (Ed.). pp. 111-
314 133. Taylor and Francis, Boca Raton.
- 315 Delgado, T., Corzo, N., Santa-María, G., Jimeno, M. L., & Olano, A. (1992).
316 Determination of furosine in milk samples by ion-pair reversed phase liquid
317 chromatography. *Chromatographia*, 33(7), 374-376.
- 318 Eisen, B., Ungar, Y., & Shimoni, E. (2003). Stability of Isoflavones in Soy Milk Stored
319 at Elevated and Ambient Temperatures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*,
320 51(8), 2212–2215.
- 321 Feinberg, M., Dupont, D., Efstathiou, T., Louapre, V., & Guyonnet, J. P. (2006).
322 Evaluation of tracers for the authentication of thermal treatments of milks. *Food*
323 *Chemistry*, 98(1), 188-194.
- 324 Flourey, J., Desrumaux, A., & Legrand, J. (2002). Effect of ultra high-pressure
325 homogenization on structure and on rheological properties of soy protein-stabilized
326 emulsions. *Journal of Food Science*, 67(9), 3388-3395.
- 327 Flourey, J., Legrand, J., & Desrumaux, A. (2004). Study of a new type of high pressure
328 homogeniser. Part B. Study of droplet break-up and recalescence phenomena.
329 *Chemical Engineering Science*, 59(6), 1285-1294.

- 330 Hayes, M. G., Fox, P. F., & Kelly, A. L. (2005). Potential applications of high-pressure
331 homogenization in processing of liquid milk. *Journal of Dairy Research*, 72(1), 25-33.
- 332 Hsu, H. W., Vavak, D. L., Satterlee, L. D., & Miller, G. A. J. (1977). A multienzyme
333 technique for estimating protein digestibility. *Journal of Food Science*, 42(5), 1269-
334 1273.
- 335 Huang, H., Liang, H., & Kwok, K. C. (2006). Effect of thermal processing on genistein,
336 daidzein and glycitein content in soymilk. *Journal of the Science of Food and*
337 *Agriculture*, 86(7), 1110-1114.
- 338 Ismail, B., & Hayes, K. (2005). β -Glycosidase Activity toward Different Glycosidic
339 Forms of Isoflavones. *Journal Agriculture and Food Chemistry*, 53(12), 4918–4924.
- 340 Jung, S., Murohy, P. A., & Sala, I. (2008). Isoflavone profiles of soymilk as affected by
341 high-pressure treatments of soymilk and soybeans. *Food Chemistry*, 111(3), 592-598.
- 342 Kwok, K., & Niranjana, K. (1995). Review: Effect of thermal processing on soymilk.
343 *International Journal of Food Science & Technology*, 30(3), 263-295.
- 344 Liu, K. (2004). Soy isoflavones: Chemistry, processing effects, health benefits, and
345 commercial production. In K. Liu (Ed.), *Soybeans as functional foods and ingredients*
346 (pp. 52–72). Champaign, IL: AOCS Press.
- 347 Liu, Z. S., & Chang, S. K. C. (2007). Soymilk viscosity as influenced by heating
348 methods and soybean varieties. *Journal of Food Processing and Preservation*, 31(3),
349 320–333.
- 350 Malaypally, S., & Ismail, B. (2010). Effect of Protein Content and Denaturation on the
351 Extractability and Stability of Isoflavones in Different Soy Systems. *Journal of*
352 *Agricultural and Food Science*, 58(16), 8958-8965.

- 353 Márquez, O., & Waliszewski, K. N. (2008). The effect of thermal treatment on β -
354 glucosidase inactivation in vanilla bean (*Vanilla planifolia* Andrews). *International*
355 *Journal of Food Science and Technology*, 43(11), 1993-1999.
- 356 Moore, S., Spackman, D. H., & Stein, W. H. (1958). Chromatography of Amino Acids
357 on Sulfonated Polystyrene Resins. An Improved System. *Analytical Chemistry*, 30(7),
358 1185–1190.
- 359 Nursten, H. (2005). in: *The Maillard Reaction: Chemistry, Biochemistry and*
360 *Implications*, RSC, Cambridge, pp. 1- 30.
- 361 Pereda, J., Ferragut, V., Quevedo, J. M., Guamis, B., & Trujillo, A. J. (2009). Heat
362 damage evaluation in ultra-high pressure homogenized milk. *Food Hydrocolloids*, 23(7),
363 1974-1979.
- 364 Poliseli-Scopel, F. H., Hernández-Herrero, M., Guamis, B., & Ferragut, V. (2012).
365 Comparison of ultra pressure homogenization and conventional thermal treatments on
366 the microbiological, physical and chemical quality of soymilk. *Food Science and*
367 *Technology*, 46(1), 42-48.
- 368 Prabhakaran, M. P., Perera, C. O., & Valiyaveetil, S. (2005). Quantification of
369 isoflavones in soymilk and tofu from south East Asia. *International Journal of Food*
370 *Properties*, 8(1), 113-123.
- 371 Puppo, C., Chapleau, N., Speroni, F., Lamballerie-Anton, M., Michel, F., Añón, C., &
372 Anton, M. (2004). Physicochemical Modifications of High-Pressure-Treated Soybean
373 Protein Isolates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(6), 1564–1571.
- 374 Rau De Almeida Callou, K., Sadigov, S., Lajolo, F. M., & Genovese, M. I. (2010).
375 Isoflavones and antioxidant capacity of commercial soy-based beverages: effect of
376 storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(7), 4284-4291.

- 377 Reilly, J. K., Lanou, A. J., Barnard, N. D., Seidl, K., & Green, A. A. (2006).
378 Acceptability of Soymilk as a Calcium-Rich Beverage in Elementary School Children.
379 *Journal of the American Dietetic Association*, 106(4), 590-593.
- 380 Rickert, D. A., Meyer, M. A., Hu, J., & Murphy, P. A. (2004). Effect of extraction pH
381 and temperature on isoflavone and saponin partitioning and profile during soy protein
382 isolate production. *Journal of food science*, 69(8), C623-C631.
- 383 Seiquer, I., Díaz-Alguacil, J., Delgado-Andrade, C., López-Frías, M., et al., (2006).
384 Diets rich in Maillard reaction products affect protein digestibility in adolescent males
385 aged 11–14 y. *American Journal of Clinical Nutrition*, 83(5), 1082- 1088.
- 386 Setchell, K. D. R., & Cole, S. J (2003). Variations in Isoflavone Levels in Soy Foods
387 and Soy Protein Isolates and Issues Related to Isoflavone Databases and Food Labeling.
388 *Journal of Agricultural and Food Science*, 51(14), 4146-4155.
- 389 Tedford, L. A., Smith, D., & Schaschke, C. J. (1999). High pressure processing effects
390 on the molecular structure of ovalbumin, lysozyme and β -lactoglobulin. *Food Research*
391 *International*, 32(2), 101-106.
- 392 Thiebaud, M., Dumay, E., Picart, L., Guiraud, J. P., & Cheftel, J. C. (2003). High-
393 pressure homogenization of raw bovine milk. Effects on fat globule size distribution and
394 microbial inactivation. *International Dairy Journal*, 13(6), 427-439.
- 395 Toro-Funes, N., Odriozola-Serrano, I., Bosch-Fusté, J., Latorre-Moratalla, M. L.,
396 Veciana-Nogués, M. T., Izquierdo-Pulido, M., & Vidal-Carou, M. C. (2012). Fast
397 simultaneous determination of free and conjugated isoflavones in soy milk by UHPLC–
398 UV. *Food Chemistry*, 135(4), 2832–2838.
- 399 Toro-Funes, N., Bosch-Fusté, J., Veciana-Nogués, M. T., & Vidal-Carou, M. C.
400 (2014a). Effect of ultra high pressure homogenization treatment on the bioactive
401 compounds of soya milk. *Food Chemistry*, 152, 597-602.

- 402 Toro-Funes, N., Bosch-Fusté, J., Veciana-Nogués, M. T., & Vidal-Carou, M. C.
403 (2014b). Changes of isoflavones and protein quality in soymilk pasteurized by ultra
404 high pressure homogenization throughout storage. *Food Chemistry*, Under revision.
- 405 Torres, N., Torre-Villalvazo, I., & Tovar, A. R. (2006). Regulation of lipid metabolism
406 by soy protein and its implication in diseases mediated by lipid disorders. *The Journal*
407 *of nutritional biochemistry*, 17(6), 365-373.
- 408 Vacek, J., Klejdus, B., Lojková, L., & Kubán, V. (2008). Current trends in isolation,
409 separation, determination and identification of isoflavones: A review. *Journal of*
410 *Separation Science*, 31(11), 2054-2067.
- 411 Valencia-Flores, D., Hernández-Herrero, M., Guamis, B., & Ferragut, V. (2013).
412 Comparing the Effects of Ultra-High-Pressure Homogenization and Conventional
413 Thermal Treatments on the Microbiological, Physical, and Chemical Quality of Almond
414 Beverages. *Journal of Food Science*, 78(2), 199-205.
- 415 Van der Ven, C. Matser, A. M., & Van den Berg, R. W. (2005). Inactivation of soybean
416 trypsin inhibitors and lipoxygenase by high-pressure processing. *Journal of Agricultural*
417 *and Food Chemistry*, 53(4), 1087–1092.
- 418 Zhan, S., & Ho, S. C. (2005). Meta-analysis of the effects of soy protein containing
419 isoflavones on the lipid profile. *American Journal Of Clinical Nutrition*, 81(2), 397-
420 408.

Table 1: Isoflavone content (mg/L) in UHPH and UHT-treated soymilks. Three productions of all soymilks were made. For each production, analyses were made by triplicate.

	Malonyl- β -glucosides				β -Glucosides				Acetyl- β -glucosides				Aglycones				Total Isoflavones
	MDI	MGLY	MGI	DI	GLY	DI	GI	ADI	AGLY	AGI	DE	GLE	GE				
UHPH	14.74 \pm 1.92 ^a	4.81 \pm 0.39 ^a	37.34 \pm 2.23 ^a	25.39 \pm 1.08 ^a	3.05 \pm 0.83 ^a	58.24 \pm 3.45 ^a	0.70 \pm 0.01 ^a	nd	1.11 \pm 0.06 ^a	3.08 \pm 0.07 ^a	0.68 \pm 0.05 ^a	5.53 \pm 0.43 ^a	154.67 \pm 6.26 ^a				
UHT	13.25 \pm 0.57 ^a	4.04 \pm 0.30 ^a	36.45 \pm 1.59 ^a	36.46 \pm 0.63 ^b	3.67 \pm 0.07 ^a	78.93 \pm 2.42 ^b	1.56 \pm 0.04 ^b	0.41 \pm 0.01	2.73 \pm 0.19 ^b	2.90 \pm 0.04 ^a	0.69 \pm 0.04 ^a	5.29 \pm 0.20 ^a	186.20 \pm 9.40 ^b				

^{a-b} Values in the same column with different letters were significant different ($p < 0.05$)

Abbreviations: DI: daidzin; GLY: glycitin; MDI: malonyl- β -daidzin; MGLY: malonyl- β -glycitin; MGI: malonyl- β -genistin; ADI: acetyl- β -daidzin; AGLY: acetyl- β -glycitin; AGI: acetyl- β -genistin; DE: daidzein; GLE: glycitein; GE: genistein.

Figure captions

Figure 1: Evolution of the isoflavone total content (mg/L) in UHPH and UHT-treated soymilks at room temperature during 4 months of storage.

Figure 2: Evolution of the isoflavone profile (mg/L) in UHT (a) and UHPH (b) treated soymilks at room temperature during 4 months of storage.

Figure 3: Evolution of the percentage of "in vitro" protein digestibility (%) in UHT and UHPH-treated soymilks at room temperature during 4 months of storage.

Figure 4: Evolution of the percentage of blocked lysine (%) in UHT and UHPH-treated soymilks at room temperature during 4 months of storage.

Figure 1.

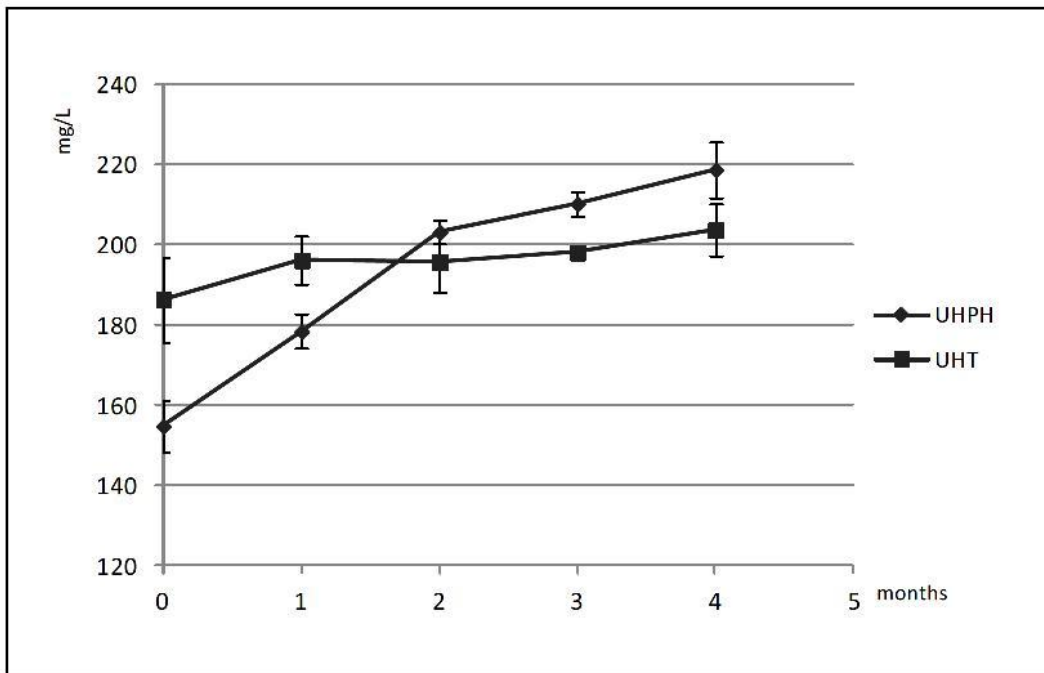


Figure 2.

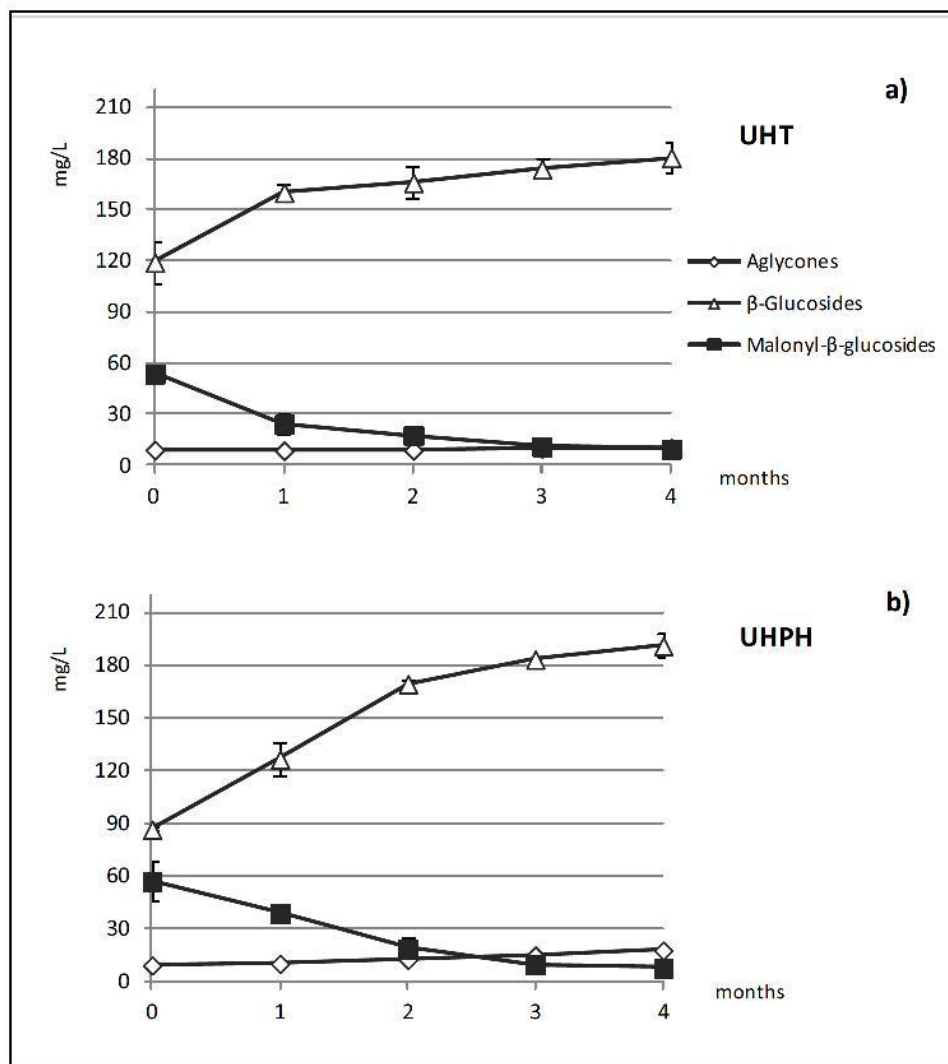
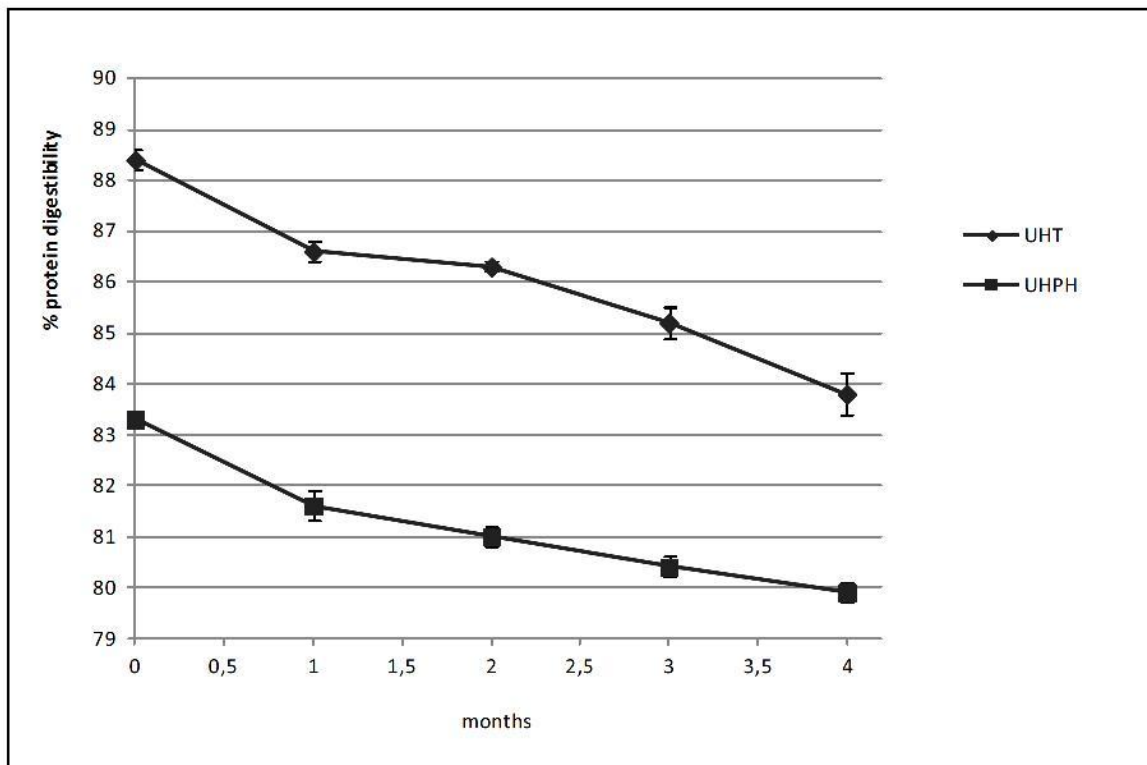


Figure 3.



Comunicación escrita I.

N. Toro-Funes, J. Bosch-Fusté, M. L. Latorre-Moratalla, M.T. Veciana-Nogues, M.C. Vidal-Carou. Efecto de la Ultra Alta Presión de Homogeneización sobre la estabilidad de las isoflavonas en la bebida de soja durante el almacenamiento en refrigeración. "VII Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (CyTA)". Córdoba (España). 12-14 Junio del 2013.

Efecto de la Ultra Alta Presión de Homogeneización sobre la estabilidad de las isoflavonas en la bebida de soja durante el almacenamiento en refrigeración



Toro-Funes, N.; Bosch-Fusté, J.; Latorre-Moratalla, M.L.; Veciana-Nogués, M.T.; Vidal-Carou, M.C.

Departament de Nutrició i Bromatologia, Campus de l'Alimentació Torribera, Universitat de Barcelona. Avda. Prat de la Riba 171, 08921 Santa Coloma de Gramenet, España. Email: mcvidal@ub.edu



INTRODUCCIÓN

Las isoflavonas de la soja han recibido una gran atención en la última década debido a su potencial efecto protector frente a numerosas enfermedades, como las cardiovasculares, osteoporosis o diversos tipos de cáncer (Patisaul y Fejjerson, 2010). Las principales isoflavonas de la soja son la Genisteína, Daidzeína y Gliciteína, cada una de las cuales puede estar presente en cuatro formas químicas (Figura 1). La producción de bebida de soja implica diferentes tratamientos térmicos que pueden afectar tanto al contenido final como al perfil de isoflavonas (Huang y col., 2006). Las isoflavonas están asociadas a las proteínas solubles mediante interacciones sensibles al calor y la presión (Boye, 1996; Rickert et al., 2004). La ultra alta presión de homogeneización (UHPH) es una tecnología emergente que puede ser una alternativa a la pasteurización (PA) convencional para la estabilización de la bebida de soja. El efecto de esta tecnología se debe tanto a la ruptura de partículas y glóbulos grasos para la obtención de una emulsión fina y estable como para la inactivación de microorganismos y enzimas.

El objetivo de este trabajo consiste en evaluar el efecto del tratamiento UHPH en comparación con un tratamiento térmico convencional en la estabilidad de las isoflavonas inmediatamente después del tratamiento y durante el almacenamiento en refrigeración a lo largo de su vida útil.

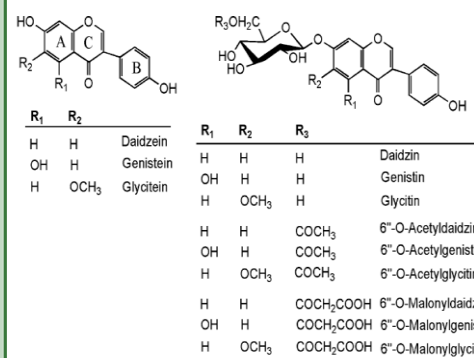


Figura 1: Estructura química de las principales isoflavonas: agliconas (a) y sus conjugados β-glucosilados (b).

MATERIAL Y MÉTODOS

Las muestras fueron elaboradas en la planta piloto de la Universidad Autónoma de Barcelona (CERPTA) mediante el homogeneizador de alta presión (Modelo FPG11300, Stansted Fluid Powder Ltd., Essex. UK). Se llevaron a cabo tres producciones diferentes. Para cada producción, a partir del producto base (PB) se realizaron tres tratamientos: a) 200 MPa 55°C (UHPH T₁), b) 200 MPa 75°C (UHPH T₂) y c) pasteurización a 95°C 30 s.

Las muestras se almacenaron de manera aseptica a 4 °C durante 28 días, con toma de muestra cada 7 días (t=0, 7, 14, 21 y 28).

Las isoflavonas se determinaron por cromatografía líquida de ultra alta resolución y detección UV (UPLCTM) mediante el método descrito por Toro-Funes y col. (2012).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El contenido total de isoflavonas en el PB y en las bebidas de soja tratadas por UHPH y por pasteurización (PA) (μg/g peso seco) se muestra en la figura 2. Se observa que ambas bebidas de soja tratadas por UHPH mostraron un contenido total de isoflavonas superior al del PB y al PA (p<0.05), debido a una mayor eficacia en la liberación de las isoflavonas al medio acuoso, pero no se observaron diferencias en el perfil de las formas químicas de las isoflavonas inmediatamente después de los tratamientos (Tabla 1).

Sin embargo, durante el almacenamiento en refrigeración, el perfil de las formas químicas de las isoflavonas cambió entre las muestras sometidas a diferentes tratamientos (Figura 3). Las UHPH mostraron una mayor estabilidad en la conversión de las formas conjugadas de las isoflavonas a sus formas libres que las tratadas por PA. Además, la UHPH T₂ fue más estable a la interconversión de las isoflavonas que la UHPH T₁. Al final del almacenamiento, el contenido de agliconas fue casi el doble en las muestras tratadas por PA que las tratadas por UHPH. Este aumento de agliconas en la bebida de soja puede suponer un efecto negativo en la calidad sensorial puesto que estas formas libres producen retrogustos astringentes y amargos (Okubo et al., 1992).

Tabla 1. Contenido de isoflavonas en el producto base y en las bebidas de soja tratadas por pasteurización (PA) y UHPH (μg/g peso seco). Los análisis se realizaron por triplicado.

	β-Glucósidos			Malonil-β-glucósidos		
	DI	GLY	GI	MDI	MGLY	MGI
PB	337.09 ± 7.20 ^a	54.89 ± 0.28 ^a	686.05 ± 22.13 ^a	295.75 ± 7.52 ^a	98.01 ± 2.37 ^a	747.12 ± 16.12 ^a
PA	327.08 ± 12.52 ^a	50.09 ± 2.15 ^a	645.04 ± 5.09 ^a	281.85 ± 2.54 ^a	91.17 ± 0.03 ^a	706.14 ± 2.69 ^a
UHPH T ₁	375.41 ± 25.11 ^b	53.14 ± 1.93 ^a	771.54 ± 45.83 ^b	340.33 ± 22.10 ^b	102.34 ± 5.95 ^a	843.06 ± 47.96 ^b
UHPH T ₂	381.57 ± 6.16 ^b	49.97 ± 1.66 ^a	785.21 ± 4.39 ^b	349.65 ± 5.20 ^b	104.19 ± 0.99 ^a	875.46 ± 9.33 ^b
	Acetil-β-glucósidos			Agliconas		
	ADI	AGLY	AGI	DE	GLE	GE
PB	13.51 ± 1.13 ^a	5.29 ± 0.28 ^a	26.24 ± 1.13 ^a	50.31 ± 4.49 ^a	8.99 ± 0.55 ^a	93.41 ± 4.29 ^a
PA	11.31 ± 0.03 ^a	10.51 ± 8.94 ^a	22.56 ± 1.24 ^a	43.29 ± 0.37 ^a	9.15 ± 0.40 ^a	88.01 ± 1.71 ^a
UHPH T ₁	15.09 ± 0.74 ^a	6.36 ± 0.26 ^b	27.46 ± 0.01 ^b	48.97 ± 2.57 ^a	12.69 ± 0.33 ^b	87.64 ± 2.59 ^a
UHPH T ₂	14.71 ± 0.39 ^a	6.87 ± 0.05 ^b	26.56 ± 0.08 ^b	49.42 ± 0.11 ^a	12.56 ± 0.52 ^b	89.42 ± 2.76 ^a

* Los valores en la misma columna con diferentes letras fueron significativamente diferentes (p<0.05)

Abreviaciones: DI: daidzina; GLY: glicitina; GI: genisteína; MDI: malonil-β-daidzina; MGLY: malonil-β-glicitina; MGI: malonil-β-genisteína; ADI: acetil-β-daidzina; AGLY: acetil-β-glicitina; AGI: acetil-β-genisteína; DE: daidzeína; GLE: gliciteína; GE: genisteína.

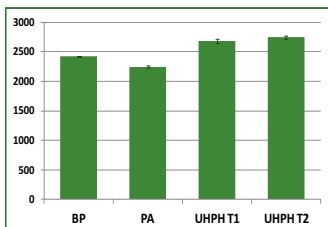


Figura 2. Contenido total de isoflavonas en el producto base (PB) y en las bebidas de soja tratadas por PA y por UHPH.

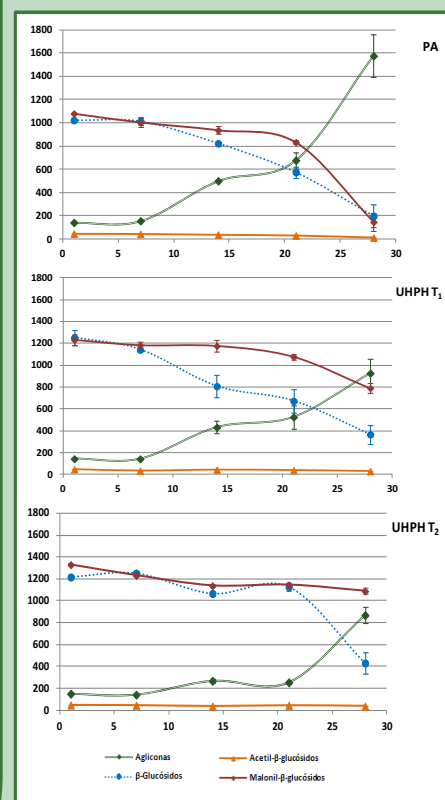


Figura 3. Evolución de las isoflavonas en las bebidas de soja tratadas por PA, por UHPH T₁ y UHPH T₂ durante el almacenamiento en refrigeración. Los análisis se realizaron por triplicado.

CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos demuestran que el tratamiento UHPH favorece la liberación de isoflavonas a partir de la materia prima. Durante el almacenamiento, las isoflavonas se mantienen más estables en las bebidas de soja tratadas por UHPH que las tratadas por PA. Esto supone una ventaja ya que un exceso de agliconas disminuye la calidad sensorial debido a la aparición de retrogustos astringentes y amargos.

ESTIMACIÓN DE LA EXPOSICIÓN Y DEL RIESGO DE ALGUNOS COMPUESTOS BIOACTIVOS DE LA SOJA

En este capítulo se realiza una estimación de la exposición y del riesgo de las aminas biológicamente activas y de las isoflavonas en productos derivados de la soja. Las bebidas de soja son el producto derivado de la soja más consumido pero evidentemente no es el único. Por tanto, para hacer esta estimación de la exposición y del riesgo se han incorporado los derivados de la soja más populares: tofu, tempeh, miso, etc. En el primer apartado se exponen los contenidos de aminas biógenas en productos derivados de la soja comercializados y, a partir de estos datos, y asumiendo que las aminas biógenas pueden representar un riesgo para la salud, se realiza una primera aproximación a la estimación del riesgo que pueden representar estos compuestos en este tipo de alimentos. En el segundo apartado se realiza una estimación de la ingesta de isoflavonas a partir de los contenidos de estas sustancias en productos derivados de la soja de mayor consumo. El objetivo es comparar la ingesta de isoflavonas con las recomendaciones de ingesta para alcanzar los efectos beneficiosos que se le atribuyen, particularmente en mujeres menopáusicas y en pacientes hipercolesterolémicos. Por otra parte, a partir de los datos de contenidos de isoflavonas en fórmulas infantiles que contienen proteína de soja, se realiza una estimación del riesgo que puede significar el consumo de estos productos para lactantes.

9.1. Aminas biológicamente activas en productos derivados de la soja. Aproximación a la evaluación del riesgo de las aminas biógenas

Artículo VIII.

N. Toro-Funes, J. Bosch-Fusté, M. L. Latorre-Moratalla, M.T. Veciana-Nogues, M.C. Vidal-Carou. Biologically active amines in soybean products from the Spanish market. Food Chemistry, Under revision.

Índice de impacto (JCR 2012): 3.334

Posición en área "Food and Science Technology": 10/124

Comunicación Oral.

N. Toro-Funes, J. Bosch-Fusté, M. L. Latorre-Moratalla, M.T. Veciana-Nogues, M.C. Vidal-Carou. Aminas biógenas en productos derivados de soja de mercado español. "V Congreso Internacional de Autocontrol y Seguridad Alimentaria (KAUSAL)". Barcelona (España). 17-19 Octubre del 2012.

http://www.kausal.cat/docs_CO/natalia_toro.pdf

9.1.1. Planteamiento y objetivo del estudio

La presencia de elevadas cantidades de aminas biógenas en los alimentos, sobretodo de histamina (HI) y tiramina (TY), constituye un potencial problema de salud pública. En individuos sanos, las aminas biógenas de los alimentos ingeridos se metabolizan a conjugados inactivos por sistemas enzimáticos intestinales y hepáticos fundamentalmente. Las HI y TY dietéticas se metabolizan principalmente por la enzima monoamina oxidasa (MAO), la diamino oxidasa (DAO) y la histamina-N-metiltransferasa. Sin embargo, la ingestión de grandes cantidades de HI y TY pueden saturar estos sistemas enzimáticos y causar efectos adversos, incluyendo subidas

de la presión arterial y síntomas de alergia (histamina) (Jarisch, 2004; Maintz y Novak, 2007). Por otro lado, la intolerancia a la histamina está provocada por una baja actividad de la DAO, predisposición genética, enfermedades inflamatorias intestinales, o medicación con inhibidores de DAO (DAOI). Los signos de la intolerancia a la histamina se podrían dar incluso después de la ingestión de pequeñas cantidades de HI toleradas por individuos sanos, ya que aparecen por acumulación de esta amina en plasma (Maintz y Novak, 2007).

La determinación del umbral de toxicidad de las aminas biógenas en los seres humanos es difícil. La dosis tóxica está fuertemente ligada a la eficiencia de los mecanismos de detoxificación de cada individuo y a la presencia de otros factores, tales como otras aminas, alcohol o ciertos medicamentos inhibidores de la MAO (IMAO) e inhibidores de la DAO (IDAO). A pesar de estas limitaciones, la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) publicó, en 2011, un dictamen científico en el que realizó una evaluación cualitativa del riesgo de aminas biogénicas en alimentos fermentados, utilizando datos de contenido de aminas biógenas publicadas en la literatura científica, así como también de encuestas, informes y datos de consumo procedentes de la Unión Europea. En este dictamen se proponían unos niveles seguros de HI y TY por persona y por comida, y se reconocía que no hay datos suficientes para proponer niveles de ingesta segura de putrescina y cadaverina. Los límites de seguridad para la HI y TY propuestos son:

Histamina:

- a) 50 mg para individuos sanos
- b) Por debajo de los límites detectables para las personas con intolerancia a la histamina (<0,1 mg/kg).

Tiramina:

- a) 600 mg para los individuos sanos
- b) 50 mg para los individuos que tomen fármacos IMAO de tercera generación
- c) 6 mg para los individuos que tomen fármacos IMAO clásicos.

En este dictamen científico no se incluyeron los productos de soja porque, tal como se indica en el propio documento, es muy escasa la información acerca del contenido de aminas biógenas (EFSA, 2011), a pesar de reconocer que hay un aumento creciente del consumo de

estos productos. Por esta razón, el objetivo de este apartado consiste en aportar datos sobre la presencia de aminas biógenas en los productos derivados de soja comercializados. Y, a partir de estos datos, realizar una primera valoración del riesgo derivado de la presencia de HI y TY en este tipo de alimentos.

9.1.2. Diseño experimental

Los productos derivados de soja seleccionados para este estudio fueron clasificados como fermentados: miso, tamari, salsa de soja, natto, tempeh, paté de soja y sufu, y no fermentados: tofu fresco, tofu duro, bebida de soja y brotes de soja. De cada tipo de producto se seleccionó una marca (cuando había más de una), y se estudiaron tres lotes de cada marca y se analizaron por duplicado. Todos ellos son comercializados en España. Para la evaluación del riesgo, se han considerado dos escenarios de cada producto de soja: a) considerando los valores medios de contenido de HI y TY y b) considerando los valores máximos de contenido de estas aminas. Debido a que no hay disponibilidad de datos de consumo de algunos productos derivados de la soja, se han tomado las raciones de sus productos homólogos tomados de la Tabla de Alimentos del CESNID (2005).

Los tamaños de las raciones de cada producto se obtuvieron a partir de la Tabla de Composición de Alimentos (CESNID, 2005). En el caso de los productos de soja que no estaban incluidos en la tabla de alimentos, se consideró la ración de su producto equivalente. Así, se tomaron 15 g como tamaño de ración del miso, tamari, salsa de soja y paté de soja (ración común como condimento), 30 g para el natto (ración común como guarnición), 50 g para los brotes de soja, 60 g para el sufu (ración común del queso madurado), 120 g para el tempeh, tofu fresco y tofu firme (utilizado como sustituto de los productos cárnicos) y 250 g para la bebida de soja (CESNID, 2005).

9.1.3. Resultados y discusión

Aminas biógenas en productos derivados de soja

Las aminas biógenas octopamina, dopamina y serotonina no se detectaron en ninguna muestra. Tampoco se detectaron en los productos no fermentados TY, HI, triptamina (TR) y feniletilamina (PHE), todas estas son también aminas escasas o ausentes en otros alimentos.

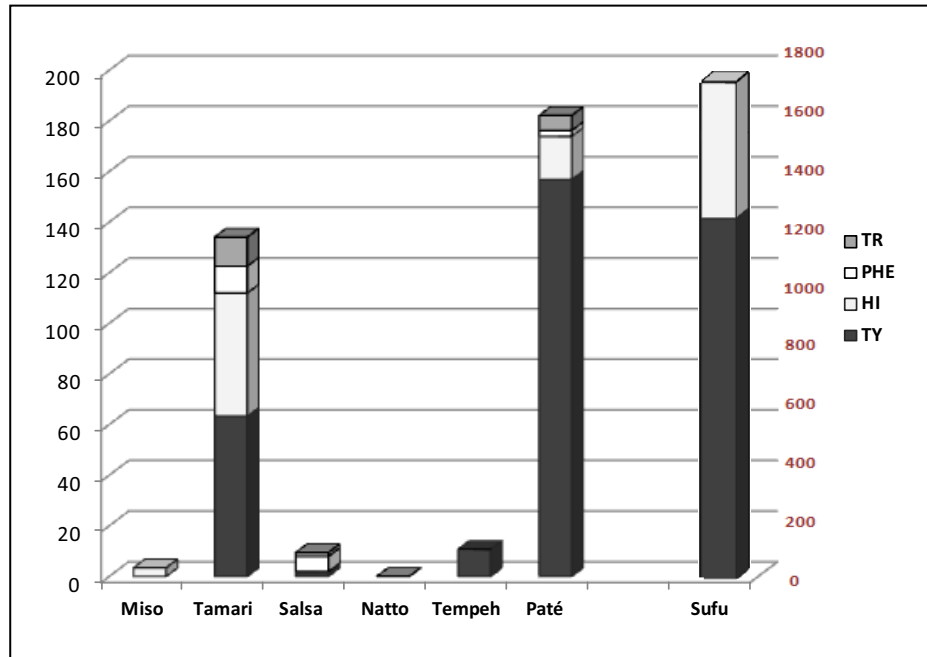
Las pequeñas cantidades de HI, PU y CA encontradas en estos productos se corresponderían a niveles naturales o fisiológicos, como también han indicado previamente Gloria et al. (2005) y Righetti et al. (2008) en bebida de soja, tofu y brotes de soja.

El contenido de aminas biógenas entre los productos fermentados fue muy variable estadísticamente, aunque solo se encontraron altos contenidos (>50 mg/Kg) en sufu, tamari y paté de soja (Figura 8.1.1; $p < 0,05$). A su vez, también los diferentes lotes de un mismo producto mostraron diferencias en el contenido de aminas biógenas. En general, estas diferencias del contenido de aminas pueden ser explicadas por:

- 1) la diferente proporción de soja como materia prima,
- 2) las condiciones tecnológicas utilizadas,
- 3) la duración de la fermentación específica de cada producto,
- 4) la disponibilidad de los aminoácidos libres,
- 5) los cultivos iniciadores añadidos,
- 6) la presencia de microorganismos potenciales contaminantes con actividad aminogénica, y
- 7) la actividad proteolítica bacteriana.

La TY fue la amina mayoritaria en los productos fermentados de soja, seguida de la HI, ambas presentes en elevadas cantidades en el sufu, tamari y paté de soja (Figura 9.1.1). Concretamente, un paté de soja presentaba valores de TY e HI de 157 mg/kg y 51 mg/kg, respectivamente, mientras que no se encontraron en los otros lotes. En el sufu se alcanzaron niveles de TY e HI de más de 1700 y 700 mg/kg, respectivamente. El sufu es un fermentado de soja que es producido en un ambiente abierto y almacenado a temperatura ambiente, donde podría haber algunos factores incontrolables que explicarían los altos contenidos de las aminas biógenas (Guan et al., 2013). De acuerdo con Guan et al. (2013), reducir al mínimo el contenido de aminas biógenas en el sufu aumentaría su aceptación en todo el mundo, especialmente en los países occidentales, en el que podría ser consumido por ejemplo como sustituto del queso o como una fuente alternativa de proteínas para los vegetarianos y veganos.

Figura 9.1.1. Contenido de aminas biógenas (mg/kg) en productos fermentados de soja. El contenido de aminas biógenas en el sufu se muestra en una escala secundaria.



Evaluación del riesgo de la histamina y tiramina

Los resultados de la evaluación de la exposición de HI de productos de soja fermentados (Tabla 9.1.1) muestran que, en todos los casos, la cantidad de HI estimada por ración se encuentra por debajo de los 50 mg propuestos para la población sana. Sin embargo, menos de dos porciones de sufu serían suficientes para superar el nivel de seguridad teniendo en cuenta el contenido medio de HI. En el resto de los productos de soja, este nivel de 50 mg de HI solamente se alcanzaría con consumos totalmente inusuales. Hay que destacar, no obstante, que el consumo de cualquiera de estos productos fermentados de soja podría causar efectos adversos en las personas intolerantes a la histamina.

En definitiva, de todos los productos estudiados de soja el que aporta mayores niveles de HI por ración es el sufu y es, por tanto, al que debe prestarse una mayor atención cuando deba seguirse una dieta baja en HI. Cabe recordar que los productos de soja no son las únicas fuentes que aportan HI.

Tabla 9.1.1. Contenido medio y máximo de histamina (mg) por ración de producto fermentado de soja y consumo necesario para alcanzar el límite seleccionado por la EFSA.

	mg HI por ración ** (medio/máximo)	Consumo necesario para alcanzar el límite de seguridad
Miso (15g)*	0,05 / 0,07	≈ 15 kg ≈ 11 kg
Soy sauce (15 g)*	0,01 / 0,02	≈ 83 kg ≈ 50 kg
Tamari (15 g)*	0,73 / 0,83	≈ 1 kg ≈ 850 g
Soy paste (15 g)*	0,26 / 0,78	≈ 3000 kg ≈ 1 kg
Sufu (60 g)*	26,88 / 44,29	≈ 100 g ≈ 67 g

* ración de consumo estimado

** Se refiere a la ingesta de HI por ración considerando los valores medios y máximos de esta amina en los productos de soja.

En cuanto a la evaluación de la exposición de TY, los resultados también muestran que la TY estimada por porción se encuentra muy lejos de los 600 mg propuestos como seguros para la población sana (Tabla 9.1.2). Para alcanzar los 50 mg de TY marcados con límite de seguridad para pacientes que toman IMAOs de tercera generación, sería necesario consumir 42 g de sufu (menos de una ración), tomando el valor medio de TY. Sin embargo, se podría llegar fácilmente a la dosis de 6 mg de TY para individuos bajo tratamiento con IMAOs clásicos mediante el consumo de una décima parte de una porción normal de sufu o incluso con una vigésima parte de una ración de sufu con el mayor contenido de TY (1740 mg/kg).

Tabla 9.1.2. Contenido de TY (mg) por ración de cada producto fermentado de soja y consumo necesario para alcanzar los valores establecidos por la EFSA.

	mg TY / ración	Consumo necesario para alcanzar		
		600 mg ^a	50 mg ^b	6 mg ^c
Salsa soja (15 g)	0,02	≈ 450 kg	≈ 40 kg	≈ 4700 g
Tempeh (200 g)	0,72	≈ 58 kg	≈ 4,6 kg	≈ 560 g
Tamari (15 g)	0,95	≈ 10 kg	≈ 800 g	≈ 95 g 6 raciones
Paté (15 g)	2,35	≈ 4 kg	≈ 320 g	≈ 40 g > 2 raciones
Sufu* (60 g)	71,5 / 103,81	≈ 500 g ≈ 350 g	≈ 40 g ≈ 30 g	≈ 5 g ≈ 3 g

* en el caso del sufu se indica la ingesta de TY por ración considerando los valores medios y máximos de esta amina

- a) Límite de seguridad para la población sana
- b) Límite de seguridad para pacientes bajo tratamientos con IMAO de tercera generación
- c) Límite de seguridad para pacientes bajo tratamientos con IMAO clásicos.

9.1.4. Aportaciones más relevantes

- ✓ Algunos productos fermentados de soja, como el sufu, el tamari o el paté de soja, contienen un alto contenido de aminas biógenas, especialmente de histamina y tiramina.
- ✓ Desde el punto de vista de la evaluación del riesgo, teniendo en cuenta la ración de consumo habitual, solo la ingesta de sufu puede suponer un riesgo de la aparición de efectos adversos de estas aminas, especialmente cuando hay un tratamiento con fármacos que inhiben la DAO y la MAO.

Artículo VIII.

N. Toro-Funes, J. Bosch-Fusté, M. L. Latorre-Moratalla, M.T. Veciana-Nogues, M.C. Vidal-Carou. Biologically active amines in soybean products from the Spanish market. Food Chemistry, Under revision.

Índice de impacto (JCR 2012): 3.334

Posición en área "Food and Science Technology": 10/124

Elsevier Editorial System(tm) for Food Chemistry
Manuscript Draft

Manuscript Number: FOODCHEM-D-13-04759

Title: BIOLOGICALLY ACTIVE AMINES IN SOYBEAN PRODUCTS FROM THE SPANISH MARKET

Article Type: Research Article (max 7,500 words)

Keywords: Histamine; tyramine; polyamines; risk assessment; soybean products

Corresponding Author: Dr M-Carmen Vidal-Carou, PhD

Corresponding Author's Institution: University of Barcelona

First Author: Natalia Toro-Funes

Order of Authors: Natalia Toro-Funes; Joan Bosch-Fusté; Mariluz Latorre-Moratalla; M. Teresa Veciana-Nogués; M-Carmen Vidal-Carou, PhD

Abstract: Biologically active amines were determined in commercial soybean products from the Spanish market. Polyamines were found in both non-fermented and fermented soybean products. Natto and tempeh samples were the products with the highest content of polyamines. On the other hand, the bacterial-related biogenic amines constitute a potential public health concern. Tyramine, histamine, tryptamine and β -phenylethylamine, were not detected in non-fermented soybean products. Meanwhile, in fermented products these biogenic amines were detected in practically all samples with a high variability, although high contents were found in sufu, tamari and soybean paste. Although, the extremely high tyramine and histamine contents found in some sufu samples could be a risk, biogenic amines observed in the most of soybean products should not be a risk for healthy consumers. However, individuals who take MAOI and DAOI's drugs should be strongly recommended to avoid this kind of product in order to suffer no adverse health effects.

1 **BIOLOGICALLY ACTIVE AMINES IN SOYBEAN PRODUCTS FROM THE**
2 **SPANISH MARKET**

3

4 N. Toro-Funes / J. Bosch-Fuste / M.L. Latorre-Moratalla / M.T. Veciana-Nogués / M.C.
5 Vidal-Carou*

6

7 Department of Nutrition and Food Science-XaRTA, INSA, Faculty of Pharmacy.

8 Campus de l'Alimentació Torribera. University of Barcelona. Avda. Prat de la Riba

9 171, 08921-Santa Coloma de Gramenet. Barcelona, Spain. Tel: +34 934033785, Fax:

10 +34 934035931, e-mail: mcvidal@ub.edu

11 *Author to whom correspondence should be addressed.

12

13

14 **ABSTRACT**

15 Biologically active amines were determined in commercial soybean products from the
16 Spanish market. Polyamines were found in both non-fermented and fermented soybean
17 products. Natto and tempeh samples were the products with the highest content of
18 polyamines. On the other hand, the bacterial-related biogenic amines constitute a
19 potential public health concern. Tyramine, histamine, tryptamine and β -
20 phenylethylamine, were not detected in non-fermented soybean products. Meanwhile, in
21 fermented products these biogenic amines were detected in practically all samples with
22 a high variability, although high contents were found in sufu, tamari and soybean paste.
23 Although, the extremely high tyramine and histamine contents found in some sufu
24 samples could be a risk, biogenic amines observed in the most of soybean products
25 should not be a risk for healthy consumers. However, individuals who take MAOI and
26 DAOI's drugs should be strongly recommended to avoid this kind of product in order to
27 suffer no adverse health effects.

28

29 **KEY WORDS:** Histamine, tyramine, polyamines; risk assessment, soybean products

30

31

32 HIGHLIGHTS

33 ► Biogenic and polyamines in non-fermented and fermented soybean products sold in
34 the Spanish market were determined.

35 ► Natto and tempeh showed to be an important source of polyamines.

36 ► Some fermented soybean products, particularly sufu, showed high histamine and
37 tyramine contents.

38 ► Individuals taking MAOI and DAOI drugs may have adverse effects due to the
39 consumption of these products.

40

41 1. INTRODUCTION

42 Soybean has been used as one of the main protein sources in Eastern countries since
43 ancient times to produce a variety of traditional non-fermented and fermented products.
44 The consumption of soybean foods could have potential health benefits, particularly to
45 prevent different types of cancers, osteoporosis and cardiovascular diseases (Omoni &
46 Aluko, 2005). Due to these potential benefits, soybean products have been progressively
47 introduced in the European market in the last 20 years, being first only distributed in
48 specific dietetic shops, but now available in most food stores and supermarkets.

49 Biologically active amines are organic bases with an aliphatic, aromatic, or heterocyclic
50 structure which take part of normal metabolism of animals, plants and microorganisms.
51 They can be classified in two groups depending on their origin. The physiological
52 polyamines spermidine (SPD) and spermine (SPM) are present in all animal and vegetal
53 tissues and their origin is not related to microbial activity. On the contrary, the called
54 biogenic amines, mainly including tyramine (TY), histamine (HI), tryptamine (TR), β -
55 phenylethylamine (PHE), putrescine (PU) and cadaverine (CA), are present in food as a
56 consequence of bacterial enzymatic decarboxylation of their precursor amino acids. In
57 spite of their recognized bacterial origin, PU and CA could be considered also as
58 naturally occurring amines in some foods since they can be synthesized at low amounts
59 in both vegetal and animal organisms.

60 Polyamines are naturally occurring amines involved in growth and differentiation of
61 cells and in the stabilization of membranes and nucleic acids. They have a recognized
62 role as antioxidant compounds against the cellular oxidative stress (Das & Misra, 2004;
63 Kalac & Krausová, 2005).

64 Usually, biogenic amines are known to be found in many foods, such as fish and meat
65 products, cheese, wine, beer (Spano et al., 2010; Vidal-Carou, Veciana-Nogués,

66 Latorre-Moratalla & Bover-Cid, 2007). Biogenic amines have been proposed as
67 chemical markers of the hygienic conditions of raw material and/or manufacturing
68 practices since their accumulation is associated with the activity of contaminant bacteria
69 (Latorre-Moratalla et al., 2008; Linares, Martín, Ladero, Alvarez & Fernández, 2011).
70 However, only legal limits for HI have been established in fish and fish products by
71 Food and Drug Administration (FDA) and by European Union (EU).

72 The presence of high amounts of biogenic amines in food constitutes a potential public
73 health concern. In healthy individuals, biogenic amines ingested from foods are
74 detoxified by intestinal and hepatic enzymatic systems. Thus, dietary TY is mainly
75 metabolized by monoamine oxidase enzyme (MAO) and HI by diamino oxidase (DAO)
76 and histamine-N-methyltransferase. The ingestion of high amounts of TY and HI might
77 saturate these enzymatic systems and cause clinical symptoms of intoxication, including
78 hypertensive crisis and allergic effects on blood vessels and smooth muscles (Jarisch,
79 2004; Maintz & Novak, 2007). Besides, impairment of DAO activity due to genetic
80 predisposition, gastrointestinal diseases, or medication with DAO inhibitors (DAOI's)
81 could lead to the disorder called histamine intolerance causing migraine, skin and
82 gastrointestinal problems, even after the ingestion of small amounts of HI tolerated by
83 healthy individuals (Maintz & Novak, 2007). PU, CA, SPM, and SPD do not seem to
84 have adverse health effects by themselves, but, they may reduce the catabolism of TY
85 and HI, blocking the enzymatic systems and, thus, enhancing their toxicity (Vidal-
86 Carou et al., 2007).

87 The European Food Safety Authority (EFSA) published, in 2011, a scientific opinion on
88 the risk of biogenic amine formation in fermented foods. Although it is not possible to
89 make a quantitative risk assessment for HI and TY due to insufficient available
90 information, the proposed safety HI and TY levels per person per meal that is not

91 associated with adverse health effects are: a) 50 mg HI for healthy individuals, but
92 below detectable limits for those with histamine intolerance; b) 600 mg TY for healthy
93 individuals, 50 mg for those taking third generation MAOI drugs or 6 mg for those
94 taking classical MAOI drugs (EFSA, 2011). In this scientific opinion, soybean products
95 were not included due to limited data and the small number of available samples
96 (EFSA, 2011).

97 Several authors have reported the occurrence of biogenic amines in non-fermented and
98 fermented soybean products with a wide variability, such as soymilk, tofu, soybean
99 sprouts, sufu tempeh, miso, natto and soy sauce (Yen, 1986; Ibe, Nishima & Kasai,
100 1992; Nout, Ruiker & Bouwmeester, 1993; Kung, Lee, Chang & Wei, 2007a; Kung,
101 Tsa, & Wei, 2007b; Tsai, Chang & Kung, 2007; Yongmei et al., 2009; Liu et al., 2011;
102 Bai, Byun & Mah, 2013; Byun, Bai & Mah, 2013; Guan et al., 2013). However, the
103 information about their content in soybean products of the European countries is scarce.
104 The lack of tradition in the soybean products consumption and the lack of consumer's
105 information about the use of this type of products in terms of storage conditions and size
106 of servings, may increase the risk arising from the presence of biogenic amines in them.
107 For this reason, the following study was addressed to provide data of the presence of
108 biogenic amines in soybean products from the Spanish market. Moreover, from this
109 data, a first approach to risk assessment of HI and TY of these soybean products has
110 been carried out. In addition, the content of the health-related polyamines was also
111 studied to contribute to the knowledge of the potential health benefits of soybean.

112

113 **2. MATERIALS AND METHODS**

114 **2.1. Samples**

115 Different soybean products, classified as non-fermented products (fresh tofu, hard tofu,
116 soy milk and soybean sprouts) and fermented products (miso, tamari, soy sauce, natto,
117 tempeh, soybean paste and sufu), were purchased from Spanish local stores. Three
118 batches from one brand for each type of product were studied and examined by
119 duplicate for biogenic amine and polyamine contents.

120 Although several brands of fresh tofu, hard tofu, soy milk and soybean sprouts are
121 nowadays available in the Spanish market, for this work the most popular and
122 representative brand of each product are chosen. These products were produced in Spain
123 and they are subjected to quality standards required by the European regulation.

124 On the contrary, miso, tamari, soy sauce, natto, tempeh, soybean paste and sufu are
125 fermented products, most of them imported from Asian countries. So, the specific
126 conditions used for their fermentation and manufacturing processes are unknown. With
127 the exception of soy sauce, the other products are scarcely distributed in the Spanish
128 market, mainly found in specific shops.

129 Samples were kept at -30 °C until their analysis.

130

131 **2.2. Biogenic amine and Polyamine determination**

132 An aliquot of 5-10 g of sample were extracted two times with 10 mL of perchloric acid
133 0.6 M in a magnetic stirring plate for 20 min. Thereafter, the two phases were separated
134 by centrifugation at 5600 g at 4 °C for 20 min. The supernatants collected were
135 combined and the final volume was adjusted to 25 mL with 0.6 M perchloric acid.
136 Before chromatographic analysis, perchloric extracts were passed through a 0.22 µm
137 filter (GHP, Waters Corp, Milford, MA).

138 Twelve biogenic amines and polyamines, namely octopamine, dopamine, TY, PU, CA,
139 HI, AG, serotonin, PHE, SPD, TR and SPM, were determined following the method

140 described by Latorre-Moratalla et al. (2009). Amine separation was performed through
141 a Acquity UPLC BEH C-18 reverse phase column (Waters corp., Milford, MA, USA),
142 followed by a post-column derivatization with *o*-phthalaldehyde and spectrofluorimetric
143 detection (ex: 340 nm and em: 445 nm). The detection limit of the method was lower
144 than 0.2 mg/L and the determination limit was below 0.3 mg/L for all amines. The
145 precision, in terms of relative standard deviation, was lower than 5% and the accuracy,
146 as mean recovery, was between 93% and 98%.

147

148 **2.3. Statistical analysis**

149 The content of biogenic amines and polyamines were compared among batches by
150 using the Kruskal-Wallis test. Statistical tests were performed by means of the
151 Statistical Software Package for Windows SPSS Statistic 20.0 (SPSS, Chicago, IL,
152 USA).

153

154 **3. RESULTS AND DISCUSSION**

155 **3.1. Polyamines in soybean products**

156 Polyamine contents in all batches of non-fermented and fermented soybean products are
157 shown in Table 1. SPD levels were higher than SPM, as it was expected since SPD level
158 is commonly higher than SPM in vegetable foods (Kalac & Krausová, 2005).
159 Polyamines were found in all samples, with the exception of Sufu samples, in which
160 SPD was not detected. Liu et al. (2011) and Tang et al. (2011) reported an important
161 decrease of SPD level during fermentation of sufu due to microorganisms consumed the
162 SPD as an alternative source of nitrogen. This fact suggests that not only raw material
163 but also microbiota could also affect the polyamine content. Significant statistically
164 differences in SPD and SPM contents between batches in non-fermented and fermented

165 soybean products were observed, except in soymilk, soy sprouts and tamari. Moreover,
166 the content of both polyamines also varied in a wide range between non-fermented and
167 fermented soybean products.

168 SPD and SPM levels were less than 50 mg/kg in non-fermented and fermented
169 products, except in tempeh, natto and, in a lesser extent, tamari samples. Tempeh
170 showed the highest contents of SPD and SPM with 124 and 21 mg/kg, respectively,
171 followed by natto samples which contained 75 and 11 mg/kg of SPD and SPM,
172 respectively. These results are consistent with the ones by Nishimura, Shiina,
173 Kashiwagi and Igarashi (2006), who reported similar concentrations of these
174 polyamines in tempeh and natto samples. Thus, tamari, which is a special long
175 fermented soy sauce, showed also high contents of polyamines (38 and 7 mg/kg of SPD
176 and SPM, respectively) probably because it contains other ingredients in its formulation,
177 such as wheat which it is known to be a source of polyamines (Ali, Poortvliet,
178 Strömberg & Yngve, 2011). The relationship between polyamines and age-associated
179 conditions should be more investigated. However, some authors recommended an
180 ingestion of polyamine-rich foods, such as fermented soybean as natto and tempeh, for
181 maintenance health especially in seniors, because it is known their synthesis decreases
182 with age (Nishimura et al., 2006; Hunter & Burrit, 2012). Likewise, a diet rich in
183 polyamines has been also recommended for the prevention of age-associated chronic
184 diseases, especially cardiovascular diseases, an effect in part mediated by the anti-
185 inflammatory properties of polyamines (Soda, 2010; Minois, Carmona-Gutierrez &
186 Madeo, 2011). However, in carcinogenic processes, a polyamine-reduced diet is
187 recommended due to they are involved in growth and differentiation of cells (Wallace &
188 Caslake, 2001; Cipolla, Guillí & Moulinoux, 2003; Gerner & Meyskens, 2004). In
189 addition, it should be considered that some authors have recently linked for the first

190 time, the high polyamines intake with the development of tumors in the gastrointestinal
191 tract. The same authors recognized the limitation of their study and indicate the need of
192 future studies to confirm their findings (Vargas et al., 2012).

193 Sometimes, PU is considered as a polyamine and reported together with SPD and SPM
194 since PU is the precursor of the formation of SPD and SPM in both plants and animals
195 (Ali et al., 2011; Kalač & Krausová, 2005). In the current work, PU were found in
196 practically all soybean products, both non-fermented and fermented products, and for its
197 low concentration, it was considered as naturally occurring amine. Although it has been
198 reported large variations in PU contents among non-fermented vegetable foods, the
199 level of <80-100 mg/kg has been usually attributed to naturally occurring amine in
200 vegetables (Ali et al., 2001; Kalač & Krausová, 2005; Nishibori et al., 2007). PU
201 content, in general, was higher in fermented soybean products than in non-fermented
202 products. However, the highest amount of PU were found in soybean sprouts, but it
203 cannot be attributed to bacterial amino acid decarboxylating activity since soybean
204 sprouts results from the germination of the bean and PU is present at high levels
205 because acts as a plant growth factor (Kusano, Berberic, Tateda & Takahashi, 2008;
206 Takahashi & Kakehi, 2010).

207

208 **3.2. Biogenic amines in soybean products**

209 Biogenic amine contents from all batches of non-fermented and fermented soybean
210 products are shown in Table 1, which did not include octopamine, dopamine and
211 serotonin since they were not detected in any sample. As it can be seen, biogenic
212 amine contents differed quite markedly between fermented and non-fermented soybean
213 products.

214 In non-fermented products, the bacterial-related biogenic amines (TY, HI, TR and PHE)
215 were not detected in any sample. The little amounts of PU and CA found in these
216 products could be considered as naturally occurring amines. These results are in
217 agreement with those reported previously in soymilk, tofu and soybean sprouts by
218 Gloria, Tavares-Neto and Labanca (2005) and Righetti, Tassoni and Bagni (2008), who
219 also found low amounts of these compounds.

220 In fermented soybean products, biogenic amines were detected in many samples with a
221 high variability, although only high contents (>50 mg/Kg) were found in sufu, tamari
222 and soy paste (Table 1). The variability of the biogenic amine contents found in these
223 products could be attributed to the different processes and hygienic conditions used for
224 their manufacture. Thus, the differences of the biogenic amine contents could be
225 explained by: 1) the different proportion of soybean used as the raw material (which
226 contains considerable amounts of proteins), 2) technological processing conditions, 3)
227 duration of fermentation specific of each soybean product, 4) the availability of free
228 amino acids, 5) starter cultures, 6) the occurrence of potential contaminant
229 microorganisms with aminogenic activity, and 7) proteolytic activity from bacteria.

230 In the fermented soybean products, TY was the main amine, continued by HI. Then, in
231 lower amounts, the following amine was PU, and finally, CA, PHE and TR. However,
232 the amounts of PU and CA observed in practically all fermented soybean samples were
233 in the range of those found in the non-fermented products suggesting that they could
234 have a physiological origin coming from the raw materials, soybean and other
235 ingredients. Certain varieties of lactic acid bacteria involved in the fermentation
236 processes of soybean could be the responsible of the formation of the biogenic amines
237 (Shalaby, 1996). However, their presence could not be only related to these

238 technological bacteria but also could be formed by contaminant bacteria, especially by
239 enterobacteriaceae (Ibe et al., 1992; Kung et al., 2007a).

240 Sufu, tamari and soy paste were the fermented soybean products with the highest
241 amounts of TY and HI (Table 1). Sufu concretely showed extremely high TY and HI
242 levels achieving in one sample more than 1700 and 700 mg/kg, respectively. It should
243 be notice that although there is a wide range of contents of TY and HI reported in the
244 literature, some of the samples of this work showed highest amounts of them. Thus, the
245 contents previously reported for TY ranged from not detected to 485 mg/kg for TY, and
246 not detected to 197 mg/kg for HI (Yen, 1986; Kung et al., 2007a; Liu et al., 2011; Tang
247 et al., 2011; Guan et al., 2013). Sufu is a fermented soybean curd that is produced in an
248 open-type environment and stored at room temperature, where there could be some
249 uncontrolled factors that explain the high contents of the biogenic amines (Guan et al.,
250 2013). Moreover, all batches of sufu showed the highest amounts of CA (>30mg/kg).
251 Other studies also reported high amounts of PU and CA related to fermentation of sufu
252 when high amounts of TY and HI were formed (Yen, 1986; Kung et al., 2007a; Tang et
253 al., 2011; Guan et al., 2013). However, Liu et al. (2011) detected very high contents of
254 PU (1776 mg/kg) and CA (883 mg/kg) although did not found TY and HI formation in
255 stinky tofu, a product similar to sufu.

256 Among batches, significant statistically differences were also found in TY and HI
257 contents in sufu, tamari and soy paste ($p < 0.05$). In soy paste, for example, TY and HI,
258 that achieved 157 mg/kg and 51 mg/kg respectively in one batch, were not found in the
259 others. Likewise, among batches, the relative standard deviations (RSD) of HI contents
260 achieved 16% and 55% in tamari and sufu respectively, whereas for TY was 25% and
261 32%. The variability among batches of these products could be explained by the
262 uncontrolled fermentation conditions applied during the manufacturing of these soybean

263 fermented products. Keep in mind that the microorganisms involved in the fermentation
264 process cannot be solely responsible for the amine formation but high amounts of TY
265 and HI could be also produced by a contamination with microorganisms owing histidine
266 and tyrosine decarboxylase activity originated from deficient hygienic manufacturing
267 practices. Different species isolated from fermented soybean products of genera of
268 *Clostridium*, *Bacillus*, *Enterococci*, *Enterobacteria* and *Pseudomonas* has been reported
269 as TY and HI producers (Nout et al., 1993; Han, Beumer, Rombouts & Nout, 2001; Tsai
270 et al., 2007; Moon et al., 2010; Bai et al., 2013). According to Guan et al. (2013), to
271 minimize the biogenic amine contents, sufu would be produced under strict hygienic
272 conditions. In this sense, it would be necessary to investigate the evolution of biogenic
273 amines throughout the production and storage of sufu, including the effects of
274 temperature, NaCl concentration and herbal extracts, in order to proceed the good
275 manufacturing practice guide (GMP) and hazard analysis critical control point system
276 (HACCP).

277

278 **3.3. Risk Assessment of histamine and tyramine**

279 The objective of this study was to assess whether the consumption of the soybean
280 products available in the Spanish market could imply a health risk for their HI and TY
281 contents. The determination of the toxicity threshold for biogenic amines in humans is
282 extremely difficult since the toxic dose is strongly dependent on the efficiency of the
283 detoxification mechanisms of each individual and the presence of other factors such as
284 other amines, alcohol or some MAOI's and DAOI's drugs, being some of them usually
285 taken. Although it is not possible to make a quantitative risk assessment for HI and TY
286 due to insufficient available information, the EFSA proposed safety levels for HI and
287 TY per person per meal which are: a) 50 mg HI for healthy individuals, but below

288 detectable limits for those with histamine intolerance; b) 600 mg TY for healthy
289 individuals, 50 mg for those taking third generation MAOI drugs or 6 mg for those
290 taking classical MAOI drugs (EFSA, 2011).

291 Soybean products were not included in the scientific opinion of the EFSA (EFSA,
292 2011), due to the lack of suitable data. On the other hand, there is an increase of the
293 consumption of this kind of products in Europe. In this sense, a preliminary risk
294 assessment of HI and TY for fermented soybean products was made. To estimate the HI
295 and TY consumption, two scenarios of each soybean product were considered: a) the
296 mean HI and TY values and b) the maximum HI and TY values. A serving size of 15 g
297 for miso, soy sauce and soy paste, 60 g for sufu (common size serving as hard cheese),
298 and 200 g for tempeh (used as meat products substitute) were taken (CESNID, 2005).
299 The results of exposure assessment of HI contents in fermented soy products (Table 2)
300 shows that, in all cases, HI amount per serving were below of the 50 mg proposed
301 maximum ingestion by meal for healthy population. However, less than two servings of
302 sufu would be enough to exceed the safety level by considering the average HI content
303 (448 mg/kg). Taking the maximum HI value (738 mg/kg), this level would be reached
304 with almost one serving. In the other soybean products, the safety level of HI for
305 healthy individuals would only be reached with unusual consumptions. It is important to
306 notice that it would be easier to surpass the safety level in a meal because the fermented
307 soybean products are not the only contributors of HI. Likewise, the consumption of any
308 of these fermented soybean products could cause adverse effects in histamine intolerant
309 individuals.

310 Results of the exposure assessment of TY contents are shown in Table 3. For all
311 soybean fermented products, the estimated TY per serving is far away of the 600 mg per
312 meal proposed as safe consumption for healthy population. To reach the 50 mg of TY

313 marked for patients taking third generation MAOI, it would be necessary to eat 42 g of
314 sufu (less than one serving) containing the mean value of TY. However, the maximum
315 dose of 6 mg of TY reported for patients under classical MAOI therapy could be easily
316 reached by consuming a tenth part of an usual serving of sufu or even with a twentieth
317 part of sufu with highest TY content (with a content of 1740 mg/kg). Based on these
318 results, it should take into account that patients who receive a treatment with classic and
319 third generation MAOI drugs should be strongly recommended to avoid fermented
320 soybean products in order to avoid adverse health effects.

321 In summary, adverse effects of TY and HI as a result of the consumption of these
322 soybean fermented products in general would be unlikely, except for individuals under
323 MAOI and DAOI drugs therapies. It is important to remark that other foods in the same
324 meal, such as cheese, wine, fish and meat products, could be additional sources of TY
325 and HI, enhancing their adverse effects. Moreover, an increase in the intake of soybean
326 products, such as those of the Asian people, could considerably enhance the risk of
327 suffering biogenic amine health-related disorders.

328

329 **4. CONCLUSIONS**

330 To our knowledge, this is the first report to determine the occurrence of biogenic amines
331 and polyamines in soybean products from the Spanish market. The fermented soybean
332 products, such as sufu, tamari and soy paste, showed high biogenic amine contents,
333 especially TY and HI. In agreement with Guan et al. (2013), minimizing the biogenic
334 amine content of sufu would increase its acceptability worldwide, especially in Western
335 countries, where it could be consumed as healthy cholesterol-free condiment or as an
336 alternative protein source for vegetarians and vegans. Adverse effects of biogenic
337 amines as a result of consumption of the analyzed soybean products would be unlikely

338 in healthy population, but it should be taken into account in individuals taking MAOI
339 and DAOI drugs. On the other hand, some fermented soybean products, such as tempeh
340 and natto, showed to be an important source of polyamines, which appears to have a
341 positive effect on health.

342

343 **ACKNOWLEDGEMENTS**

344 The authors would like to thank the *Direcció General de Recerca* of the *Generalitat de*
345 *Catalunya* (2008-00668 SGR) for their support and for a grant from the *Ministerio de*
346 *Educación y Ciencia* (Spain) to the PhD student Natalia Toro-Funes. This work was
347 also supported by the Interministerial Commission for Science and Technology
348 (CICYT) of the *Ministerio de Educación y Ciencia (Spain)* through the Project AGL-
349 2008-05430-C02-02.

350

351 **REFERENCES**

- 352 Ali, M. A., Poortvliet, E., Strömberg, R., & Yngve, A. (2011). Polyamines in foods:
353 development of a food database. *Journal of Food & Nutrition Research*, 55, 5572.
- 354 Bai, X., Byun, B. Y., & Mah, J. H. (2013). Formation and destruction of biogenic
355 amines in Chunjang (a black soybean paste) and Jajang (a black soybean sauce). *Food*
356 *Chemistry*, 141, 1026–1031.
- 357 Byun, B. Y., Bai, X., & Mah, J. H. (2013). Occurrence of Biogenic Amines in
358 *Doubanjiang* and Tofu. *Food Science and Biotechnology*, 22, 55-62.
- 359 CESNID (2005). Tablas de composición de alimentos del CESNID. Ed. McGraw Hill
360 Americana.
- 361 Cipolla, B., Guillí, F., Moulinoux, J. P. (2003). Polyamine-reduced diet in metastatic
362 hormone-refractory prostate cancer (HRPC) patients. *Biochemical Society Transactions*,
363 31, 384-387.
- 364 Das, K. C., & Misra, H. P. (2004). Hydroxyl radical scavenging and singlet oxygen
365 quenching properties of polyamines. *Molecular Cell Biochemistry*, 262, 127-133.

- 366 EFSA Panel on Biological Hazards-BIOHAZ, 2011. Scientific Opinion on risk based
367 control of biogenic amine formation in fermented foods. *EFSA Journal* 9(10), 2393.
- 368 Glória, M. B. A., Tavares-Neto, J., & Labanca, R. A. (2005). Influence of Cultivar and
369 Germination on Bioactive Amines in Soybeans (*Glycine max* L. Merrill). *Journal of*
370 *Agriculture and Food Chemistry*, 53(19), 7480-7485.
- 371 Guan, R. F., Liu, Z. F., Zhang, J. J., Wei, Y. X., Wahab, S., Liu, D. H., & Ye, X. Q.
372 (2013). Investigation of biogenic amines in sufu (*furu*): A Chinese traditional fermented
373 soybean food product. *Food Control*, 31, 345-352.
- 374 Han, B. Z., Beumer, R. R., Rombouts, F. M., & Nout, M. J. R. (2001). Microbiological
375 safety and quality of commercial sufu – a Chinese fermented soybean food. *Food*
376 *Control*, 12, 541–547.
- 377 Hunter, D. C., & Barritt, D. J. (2012). Polyamines of Plant Origin – An Important
378 Dietary Consideration for Human Health, First ed. Venketeshwer Rao, Croatia.
- 379 Ibe, A., Nishima, T., & Kasai, N. (1992). Bacteriological properties of and amine-
380 production conditions for tyramine- and histamine-producing bacterial strains isolated
381 from soybean paste (miso) starting materials. *Japanese Journal of Toxicology and*
382 *Environmental Health*, 38, 403-409.
- 383 Jarisch, R. (2004). Histamin-Intoleranz, Histamin und Seekrankheit. 2nd ed. Thieme,
384 Stuttgart.
- 385 Kalač P., & Krausová P. (2005). A review of dietary polyamines: Formation,
386 implications for growth and health and occurrence in foods. *Food Chemistry*, 90, 219-
387 230.
- 388 Kung H. F., Lee Y. H., Chang S. H., & Wei C. I. (2007a). Histamine contents and
389 histamine-forming bacteria in sufu products in Taiwan. *Food Control*, 18, 381–386.

- 390 Kung H. F., Tsai Y. H., & Wei C. I. (2007b). Histamine and other biogenic amines and
391 histamine-forming bacteria in miso products. *Food Chemistry*, 101, 351–356.
- 392 Kusano T., Berberic T., Tateda C., & Takahashi Y. (2008). Polyamines: essential
393 factors for growth and survival. *Planta*, 228, 367–381.
- 394 Latorre-Moratalla, M. L., Veciana-Nogués, M. T., Bover-Cid, S., Garriga, M.,
395 Aymerich, T., Zanardi, E., Ianieri, A., Fraqueza, M.J., Patarata, L., Drosinos, E.H.,
396 Laukova, A., Talon, R., & Vidal-Carou, M.C. (2008). Biogenic amines in traditional
397 fermented sausages produced in selected European countries. *Food Chemistry*, 107,
398 912-921.
- 399 Latorre-Moratalla, M. L., Bosch-Fusté, J., Lavizzari, T., Bover-Cid, S., Veciana-
400 Nogués, M. T., & Vidal-carou, M. C. (2009). Validation of an ultrahigh pressure liquid
401 chromatographic method for the determination of biologically active amines in food.
402 *Journal of chromatography A*, 1216, 7715-7720.
- 403 Linares, D. M., Martín, M. C., Ladero, V., Alvarez, M. A., & Fernández, M. (2011).
404 Biogenic amines in dairy products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51,
405 691-703.
- 406 Liu, Z. F., Wei, Y. X., Zhang, J. J., Liu, D. H., Hu, Y. Q., & Ye, X. Q. (2011). Changes
407 in biogenic amines during the conventional production of stinky tofu. *International*
408 *Journal of Food Science & Technology*, 46, 687–694.
- 409 Maintz, L., & Novak, N. (2007). Histamine and histamine intolerance. *American*
410 *Journal of Clinical Nutrition*, 85, 1185-1196.
- 411 Minois, N., Carmona-Gutierrez, D., & Madeo, F. (2011). Polyamines in aging and
412 disease. *Aging*, 3, 716–732.

- 413 Moon, J. S., Cho, S. K., Choi, H. I., Kim, J. E., Kim, S. Y., Cho, K. J., & Han, N. S.
414 (2010). Isolation and characterization of biogenic amine-producing bacteria in
415 fermented soybean pastes. *Journal of Microbiology*, 48, 257-261.
- 416 Nishibori, N., Fujihara, S., & Akatuki, T. (2007). Amounts of polyamines in foods in
417 Japan and intake by Japanese. *Food Chemistry*, 100, 491-497.
- 418 Nishimura, K., Shiina, R., Kashiwagi, K., & Igarashi, K. (2006). Decrease in
419 polyamines with aging and their ingestion from food and drink. *Journal of*
420 *Biochemistry*, 139, 81-90.
- 421 Nout, M. K. R., Ruiker, M. M. W., & Bouwmeester, H. M. (1993). Effect of processing
422 conditions on the formation of biogenic amines and ethyl carbamate in soybean tempe.
423 *Journal of Food Safety*, 33, 293–303.
- 424 Omoni, A. O., & Aluko, R. E. (2005). Soybean Foods and Their Benefits: Potential
425 Mechanisms of Action. *Nutrition Reviews*, 63(8), 272-283.
- 426 Righetti, L., Tassoni, A., & Bagni, N. (2008). Polyamines content in plant derived food:
427 A comparison between soybean and Jerusalem artichoke. *Food Chemistry*, 111, 852-
428 856.
- 429 Shalaby, A. R. (1996). Significance of biogenic amines to food safety and human
430 health. *Food Research International*, 29, 675–690.
- 431 Soda, K. (2010). Polyamine intake, dietary pattern, and cardiovascular disease. *Medical*
432 *Hypotheses*, 75, 299-301.
- 433 Spano, G., Russo, P., Lonvaud-Funel, A., Lucas, P., Alexandre, H., Grandvalet C., et al.
434 (2010). Biogenic amines in fermented foods. *European Journal of Clinical Nutrition*,
435 64, S95–S100.

- 436 Takahashi, T., & Kakehi, J. I. (2010). Polyamines: ubiquitous polycations with unique
437 roles in growth and stress responses. *Annals Botany*, 105(1), 1-6.
- 438 Tang, T., Qian, K., Shi, T, Wang, F., Li, J., Cao, Y., & Hu, Q. (2011). Monitoring the
439 contents of biogenic amines in sufu by HPLC with SPE and pre-column derivatization.
440 *Food Control*, 22, 1203-1208.
- 441 Tsai, Y. H., Chang, S. C., & Kung, H. F. (2007). Histamine contents and histamine-
442 forming bacteria in natto products in Taiwan. *Food Control*, 18, 1026-1030.
- 443 Vargas, A. J., Wertheim, B. C., Gerner, E. W., Thomson, C. A., Rock, C. L., &
444 Thompson, P. A. (2012). Dietary polyamine intake and risk of colorectal adenomatous
445 polyps. *American Journal of Clinical Nutrition*, 96, 133-141
- 446 Vidal-Carou, M. C., Veciana-Nogués, M. T., Latorre-Moratalla, M. L., & Bover-Cid, S.
447 (2007). Biogenic amines: Risks and control. Handbook of fermented meat and poultry,
448 Blackwell Publishing.
- 449 Wallace, H. M., & Caslake, R. (2001). Polyamines and colon cancer. *European Journal*
450 *of Gastroenterology & Hepatology*, 13, 1033-1039.
- 451 Yen, G. C. (1986). Determination of biogenic amines in fermented soybean foods by
452 HPLC. *Journal of the Chinese Agricultural and Chemical Society*, 24, 211–227.
- 453 Yongmei, L., Xiaohong, C., Mei, J., Xin, L., Rahman, N., Mingsheng, D., & Yan, G.
454 (2009). Biogenic amines in Chinese soy sauce. *Food Control*, 20, 593-597.

Table 1: Biogenic amine and polyamine contents (mean \pm SD) in commercial non-fermented and fermented soybean products (mg/kg).

		Biogenic amine content (mg kg ⁻¹)							
		TY	HI	TR	PHE	CA	PU	SPD	SPM
Non-Fermented products									
	Batch No								
Soft tofu	1	nd	nd	nd	nd	0.85 \pm 0.01 ^a	0.74 \pm 0.05 ^a	18.91 \pm 0.19 ^a	4.47 \pm 0.04 ^a
	2	nd	nd	nd	nd	1.16 \pm 0.02 ^b	1.12 \pm 0.02 ^b	22.72 \pm 0.36 ^b	5.91 \pm 0.16 ^b
	3	nd	nd	nd	nd	1.43 \pm 0.04 ^c	1.28 \pm 0.03 ^b	24.75 \pm 0.01 ^b	7.16 \pm 0.04 ^b
Madure tofu	1	nd	nd	nd	nd	0.81 \pm 0.06 ^a	1.49 \pm 0.05 ^a	30.16 \pm 0.67 ^a	9.27 \pm 0.22 ^a
	2	nd	nd	nd	nd	0.62 \pm 0.01 ^a	0.66 \pm 0.01 ^b	17.16 \pm 0.31 ^b	5.14 \pm 0.18 ^b
	3	nd	nd	nd	nd	nd	0.77 \pm 0.02 ^b	26.37 \pm 0.17 ^c	8.09 \pm 0.20 ^a
Soy milk	1	nd	nd	nd	nd	0.41 \pm 0.01 ^a	0.84 \pm 0.06 ^a	10.39 \pm 0.18 ^a	2.11 \pm 0.20 ^a
	2	nd	nd	nd	nd	0.42 \pm 0.02 ^a	0.41 \pm 0.02 ^a	9.76 \pm 0.07 ^a	1.79 \pm 0.20 ^a
	3	nd	nd	nd	nd	nd	1.82 \pm 0.12 ^a	10.07 \pm 0.08 ^a	1.49 \pm 0.43 ^a
Soy sprouts	1	nd	nd	nd	nd	0.33 \pm 0.01 ^a	41.13 \pm 0.07 ^a	10.51 \pm 0.13 ^a	0.94 \pm 0.01 ^a
	2	nd	nd	nd	nd	0.31 \pm 0.01 ^a	45.67 \pm 0.51 ^a	11.37 \pm 0.15 ^a	0.28 \pm 0.01 ^a
	3	nd	nd	nd	nd	nd	47.33 \pm 0.22 ^a	11.67 \pm 0.21 ^a	0.32 \pm 0.01 ^a
Fermented products									
	Batch No								
Natto	1	nd	nd	nd	nd	5.43 \pm 0.04 ^a	9.49 \pm 0.05 ^a	75.21 \pm 1.57 ^a	11.15 \pm 0.06 ^a
	2	nd	nd	nd	nd	2.79 \pm 0.04 ^b	5.81 \pm 0.04 ^b	56.91 \pm 0.01 ^b	9.17 \pm 0.03 ^b
	3	nd	nd	nd	nd	3.81 \pm 0.02 ^c	7.01 \pm 0.05 ^c	66.97 \pm 0.54 ^c	10.08 \pm 0.13 ^c
Tempeh	1	nd	nd	nd	nd	1.52 \pm 0.02 ^a	31.06 \pm 0.15 ^a	105.48 \pm 0.99 ^a	21.89 \pm 0.31 ^a
	2	nd	nd	nd	nd	1.99 \pm 0.02 ^b	20.91 \pm 0.82 ^b	97.31 \pm 1.54 ^b	6.06 \pm 0.11 ^b
	3	10.68 \pm 0.03	nd	nd	nd	7.21 \pm 0.07 ^c	17.53 \pm 0.11 ^c	124.04 \pm 4.06 ^c	9.74 \pm 0.07 ^c
Miso	1	nd	3.99 \pm 0.07 ^a	nd	nd	3.83 \pm 0.12 ^a	17.81 \pm 0.23 ^a	9.91 \pm 0.01 ^a	2.64 \pm 0.07 ^a
	2	nd	1.49 \pm 0.01 ^b	nd	nd	1.99 \pm 0.01 ^b	2.73 \pm 0.03 ^b	7.65 \pm 0.18 ^b	3.54 \pm 0.01 ^b
	3	nd	4.62 \pm 0.06 ^c	nd	nd	nd	13.54 \pm 0.11 ^a	7.54 \pm 0.03 ^b	2.54 \pm 0.05 ^a
Tamari	1	76.66 \pm 0.85 ^a	50.19 \pm 0.81 ^a	11.49 \pm 0.17 ^a	11.26 \pm 0.09 ^a	1.23 \pm 0.02 ^a	13.07 \pm 0.10 ^a	36.78 \pm 0.33 ^a	3.61 \pm 0.10 ^a
	2	73.11 \pm 0.53 ^a	57.65 \pm 0.28 ^a	12.57 \pm 0.21 ^a	10.69 \pm 0.01 ^a	1.81 \pm 0.02 ^a	17.08 \pm 0.18 ^b	38.02 \pm 0.36 ^a	6.77 \pm 0.22 ^a
	3	40.19 \pm 0.61 ^b	38.11 \pm 0.49 ^b	10.35 \pm 0.27 ^a	9.91 \pm 0.48 ^b	1.49 \pm 0.03 ^b	15.60 \pm 0.64 ^b	29.45 \pm 0.88 ^a	2.78 \pm 0.05 ^a
Soy sauce	1	0.93 \pm 0.03 ^a	0.99 \pm 0.03 ^a	2.57 \pm 0.14 ^a	5.51 \pm 0.01 ^a	0.18 \pm 0.01 ^a	7.01 \pm 0.18 ^a	22.89 \pm 0.21 ^a	2.06 \pm 0.02 ^a
	2	1.45 \pm 0.01 ^b	nd	nd	5.33 \pm 0.06 ^a	2.01 \pm 0.01 ^b	7.61 \pm 0.03 ^a	19.95 \pm 0.13 ^b	1.54 \pm 0.12 ^b
	3	1.53 \pm 0.05 ^b	0.81 \pm 0.01 ^b	2.05 \pm 0.01 ^b	7.07 \pm 0.10 ^b	2.21 \pm 0.03 ^b	6.98 \pm 0.09 ^a	22.71 \pm 0.46 ^a	2.14 \pm 0.02 ^a
Soy paste	1	nd	nd	5.38 \pm 0.10 ^a	nd	nd	10.29 \pm 0.07 ^a	4.25 \pm 0.08 ^a	1.11 \pm 0.04 ^a
	2	156.81 \pm 1.51	51.21 \pm 0.70	6.36 \pm 0.13 ^b	6.88 \pm 0.36	1.62 \pm 0.03	22.21 \pm 0.30 ^b	0.25 \pm 0.01 ^b	0.12 \pm 0.01 ^a
	3	nd	nd	6.04 \pm 0.05 ^b	nd	nd	14.81 \pm 0.34 ^c	4.98 \pm 0.06 ^a	1.23 \pm 0.06 ^a
Sufu	1	930.01 \pm 0.62 ^a	730.06 \pm 7.98 ^a	nd	4.27 \pm 0.08 ^a	33.39 \pm 0.05 ^a	14.46 \pm 0.17 ^a	1.36 \pm 0.03	2.21 \pm 0.09 ^a
	2	910.65 \pm 2.73 ^a	486.32 \pm 5.49 ^b	nd	2.51 \pm 0.09 ^b	36.96 \pm 0.61 ^b	18.76 \pm 0.06 ^b	nd	1.21 \pm 0.03 ^b
	3	1730.18 \pm 10.51 ^b	127.57 \pm 1.40 ^c	nd	1.69 \pm 0.01 ^c	35.09 \pm 0.16 ^b	9.33 \pm 0.04 ^c	nd	0.88 \pm 0.01 ^b

^{a-c} Values in the same product with different letters were significant different ($p < 0.05$)

Abbreviations: TY: tyramine, HI: histamine, TR: tryptamine, PHE: β -phenylethylamine, CA: cadaverine, PU: putrescine, SPD, spermidine, SPM: spermine.

Table 2: The mean (\pm SD) and the maximum content of histamine of all batches of soybean products (mg HI/kg), the histamine content per serving (mg HI) and the grams of the soybean product necessary to ingest 50 mg of histamine.

		HI content	mg HI per serving	Grams to achieve 50 mg HI
Miso	Mean (SD)	3.4 (1.7)	< 0.1	\approx 15000
	Max.	4.7	< 0.1	\approx 10000
Soy sauce	Mean (SD)	0.6 (0.5)	< 0.1	\approx 84000
	Max.	1.0	< 0.1	\approx 50000
Tamari	Mean (SD)	49 (10)	0.7	\approx 1000
	Max.	58	0.9	\approx 860
Soy paste	Mean (SD)	17 (30)	0.3	\approx 3000
	Max.	52	0.8	\approx 1000
Sufu	Mean (SD)	448 (303)	27	\approx 100
	Max.	738	44	\approx 67

Table 3:

The mean (\pm SD) and the maximum content of tyramine of all batches of soybean products (mg TY/kg), the tyramine content per serving (TY mg) and the grams of soybean product necessary to produce intoxication in healthy individuals (600 mg), in individuals taking third generation MAOI drugs (50 mg) and in individuals taking classical MAOI drugs (6 mg).

		TY content	TY per serving	Grams to achieve 600 mg TY	Grams to achieve 50 mg TY	Grams to achieve 6 mg TY
Tempeh	Mean (SD)	3.6 (6.1)	0.7	\approx 170000	\approx 14000	\approx 1600
	Max.	10.7	2.1	\approx 56000	\approx 4600	\approx 560
Soy sauce	Mean (SD)	1.3 (1.3)	< 0.1	\approx 470000	\approx 38500	\approx 4700
	Max.	1.6	< 0.1	\approx 370000	\approx 32000	\approx 4000
Tamari	Mean (SD)	63 (20)	0.9	\approx 10000	\approx 800	\approx 95
	Max.	78	1.1	\approx 7700	\approx 650	\approx 78
Soy paste	Mean (SD)	52 (89)	0.8	\approx 11000	\approx 1000	\approx 110
	Max.	158	2.4	\approx 3700	\approx 300	\approx 38
Sufu	Mean (SD)	1190 (468)	71	\approx 500	\approx 42	\approx 5
	Max.	1741	104	\approx 350	\approx 30	\approx 3

Comunicación Oral.

N. Toro-Funes, J. Bosch-Fusté, M. L. Latorre-Moratalla, M.T. Veciana-Nogues, M.C. Vidal-Carou (2014). **Aminas biógenas en productos derivados de soja de mercado español.** “V Congreso Internacional de Autocontrol y Seguridad Alimentaria (KAUSAL)”. Barcelona (España). 17-19 Octubre del 2012.

http://www.kausal.cat/docs_CO/natalia_toro.pdf

05 CONGRESO INTERNACIONAL
**AUTOCONTROL
Y SEGURIDAD
ALIMENTARIA**

Barcelona,
17 al 19 de octubre de 2012

KAUSAL 2012
www.kausal.cat

Aminas biógenas en productos de la soja del mercado español

Natalia Toro Funes
Joan Bosch Fusté
M. Luz Latorre Moratalla
M. Teresa Veciana Nogues
M. Carmen Vidal Carou

Dep Nutrició i Bromatologia
Campus de l'Alimentació
Av. Prat de la Riba 171
08921 Santa Coloma de Gramenet
Universitat de Barcelona

 **Universitat de Barcelona**

 **Campus
de l'Alimentació**
Universitat de Barcelona

INSA 

 **XaRTA**
Catalonian Reference
Network on Food
Technology

9.2. Isoflavonas en productos derivados de la soja. Aproximación a la evaluación de la exposición en adultos y del riesgo en lactantes.

Artículo IX.

N. Toro-Funes, M. L. Latorre-Moratalla, J. Bosch-Fusté, M.T. Veciana-Nogues, M.C. Vidal-Carou. Isoflavones in commercial soybean-based products. Approaches to the intake assessment in adults and to the risk assessment in infants. En preparación.

Comunicación escrita II.

N. Toro-Funes, M.T. Veciana-Nogues, J. Bosch-Fusté, O. Comas-Basté, M.C. Vidal-Carou (2014). Estimación del riesgo asociado al consumo de fórmulas infantiles a base de soja por lactantes de 0 a 6 meses. "XIV Congreso de la Sociedad Española de Nutrición (SEN)". Zaragoza, (España). 27-29 Septiembre del 2012.

9.2.1. Planteamiento y objetivo del estudio

La efecto beneficioso de las isoflavonas, conocidas como fitoestrógenos, reside en el alivio de los síntomas menopáusicos vasomotores, y en la prevención de la pérdida de la densidad mineral ósea en mujeres menopáusicas y en la protección frente a enfermedades cardiovasculares (Borrelli y Herst, 2010; Lagari y Levis, 2013; Patisaul y Jefferson, 2010). En este sentido, muchas mujeres premenopáusicas o menopáusicas y pacientes hipercolesterolémicos se han convertido en grandes consumidores de estos compuestos bioactivos, ya sea en complementos alimenticios o en alimentos derivados de la soja. Por el contrario, existen datos que indican que el consumo de isoflavonas en lactantes puede tener efectos endocrinos significativos negativos, en particular consecuencias en la salud reproductiva (Jefferson et al., 2012). El Programa del Centro Nacional de Toxicología para la

Evaluación de Riesgos para la Reproducción Humana (National Toxicology Program Center for the Evaluation of Risks to Human Reproduction (NTP-CERHR)) publicó un informe revisando la información actualizada sobre la toxicidad de las fórmulas infantiles a base de soja, concluyendo que, aunque no hay ensayos clínicos suficientes en humanos, los datos experimentales obtenidos con animales se pueden utilizar para evaluar el riesgo potencial de la genisteína en los humanos.

El consumo de productos derivados de la soja en la dieta europea no es tan significativo como en los países asiáticos. Sin embargo, hay poblaciones especiales, como los vegetarianos, mujeres premenopáusicas o menopáusicas, personas intolerantes a la lactosa o alérgicos a las proteínas de la leche, que tienen un elevado consumo de productos derivados de la soja. Estos últimos también incluyen lactantes con disfunciones fisiológicas, como alergias a la proteína de la leche, intolerancia a la lactosa o galactosemia. Hoy en día, existe una escasa disponibilidad de datos sobre el consumo de isoflavonas en países europeos, aunque su consumo es creciente. El objetivo de este apartado es determinar el contenido de isoflavonas en una amplia variedad de productos de soja disponibles en el mercado español y realizar una primera estimación de su ingesta en la población en general, así como una estimación del riesgo en los lactantes alimentados con fórmulas infantiles a base de soja.

9.2.2. Diseño experimental

Los productos derivados de la soja analizados incluyen: miso, tamari, salsa de soja, "yogurt", natto, tempeh, paté de soja, sufu, edamame, tofu fresco, tofu firme, bebida de soja y brotes de soja. Se adquirieron 3 lotes del mismo producto de los diferentes tipos derivados de la soja en supermercados locales. Además, se obtuvieron seis fórmulas infantiles a base de soja de diferentes marcas disponibles de farmacias españolas (SFI de 1 a 6). Se estudiaron y analizaron por triplicado tres lotes de cada marca.

Los tamaños de las raciones de cada producto se obtuvieron a partir de la Tabla de Composición de Alimentos (CESNID, 2005). En el caso de los productos de soja que no estaban incluidos en la tabla de alimentos, se consideró la ración de su producto equivalente. Así, se tomaron 15 g como tamaño de ración del miso, tamari, salsa de soja y paté de soja (ración común como condimento), 30 g para el natto (ración común como guarnición), 50 g para los

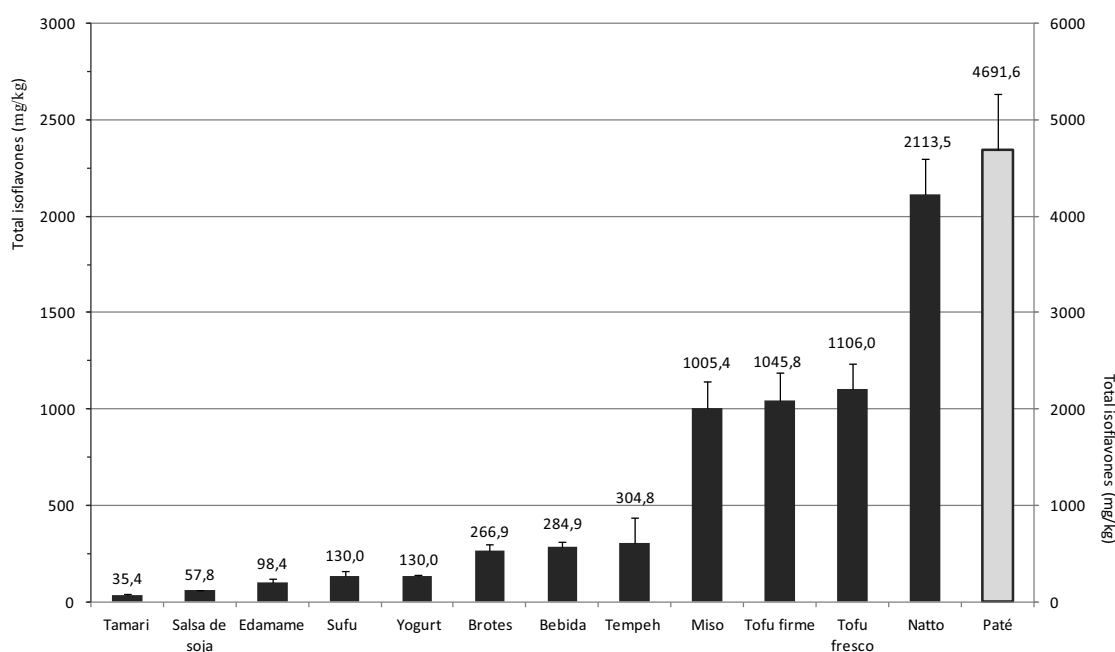
brotos de soja, 60 g para el sufu (ración común del queso madurado), 80 g para el edamame (ración común para las legumbres), 120 g para el tempeh, tofu fresco y tofu firme (utilizado como sustituto de los productos cárnicos), 250 g para el yogurt de soja y 250 g para la bebida de soja (CESNID, 2005).

9.2.3. Resultados y discusión

Isoflavonas en productos derivados de la soja

El contenido medio de isoflavonas (mg/kg) en los productos derivados de la soja se muestra en la Figura 9.2.1. Este contenido varió de 35 a 4692 mg/kg entre los diferentes productos. Además, se observaron diferencias significativas entre los lotes de algunas muestras, como el natto, tempeh, miso, tofu fresco o paté de soja ($p < 0,05$).

Figura 9.2.1. Contenido de isoflavonas (mg/Kg) en los productos derivados de la soja.



En general, el contenido de isoflavonas en los productos derivados de la soja depende de:

- 1) Los "factores intrínsecos" de la semilla de soja, tales como la procedencia geográfica, las condiciones agrícolas (variedad y cultivo) y estado de madurez de las semillas (Hutabarat et al, 2001; Wang y Murphy, 1994; Lee et al., 2007);

2) la proporción de soja utilizada como ingrediente;

3) los procesos tecnológicos utilizados para su elaboración, ya que se sabe que el remojo, el tratamiento térmico, la coagulación y/o la fermentación que puede disminuir el contenido de isoflavonas (Wang y Murphy, 1996).

El producto que aporta el mayor contenido de isoflavonas fue el paté de soja, probablemente debido a la elevada proporción de soja y las suaves condiciones tecnológicas para su elaboración. Otros productos de soja, el miso, natto, tofu fresco y tofu firme también mostraron un alto contenido de isoflavonas. Por el contrario, la salsa de soja y el tamari (una salsa de soja con período de fermentación más largo) mostraron los contenidos más bajos de isoflavonas. La baja proporción de la materia prima en estas muestras líquidas, junto con otros ingredientes en su formulación, como el trigo, explican el bajo contenido de isoflavonas en comparación con los otros productos de soja analizados.

El perfil de isoflavonas (mg/kg) en productos derivados de soja se muestra en la Tabla 9.2.1. Las reacciones químicas y enzimáticas que se producen durante el procesamiento de la soja (cocción, remojo, coagulación y/o fermentación) pueden interconvertir las formas nativas presentes en la semilla (malonil- β -glucósidos y, en mucha menor medida β -glucósidos), por hidrólisis del éster o β -glucósido (hemicetal) en agliconas o acetil- β -glucósidos (Wang y Murphy, 1996; Otieno et al., 2005). En este sentido, la edamame, una semilla de soja inmadura blanqueada con vapor o agua, mostró una alta proporción de malonil- β -glucósidos. Los acetilglucósidos no se detectaron en ninguna muestra o se detectaron en niveles muy bajos. Los acetil- β -glucósidos solo se forman en cantidades elevadas durante el tostado de harina de soja o la extrusión para producir la proteína de soja texturada, comúnmente utilizada como ingrediente (Coward, et al., 1998).

Los productos fermentados de soja, salsa de soja, tamari, sufu y tempeh, mostraron proporciones más altas de agliconas y β -glucósidos. Villares et al. (2011) reportaron también una alta proporción de agliconas en productos fermentados de soja y también informaron que esta concentración puede variar durante la fermentación dependiendo de la diferente actividad β -glucosidásica de cada tipo de cepa microbiana. Sin embargo, la fermentación y la potencial actividad de las β -glucosidasas no son los únicos factores en que condicionan la interconversión de las isoflavonas a agliconas. Así, otros productos de soja fermentados, miso,

natto y yogurt de soja presentaron los β -glucósidos como la forma química mayoritaria. Para explicar estas diferencias se pueden formular dos hipótesis que habría que comprobar en el futuro: a) la baja presencia de agliconas en algunos productos fermentados derivados de la soja indicaría que esta actividad β -glucosidásica no es inherente a todos los organismos fermentativos, y b) la formación de agliconas por actividad β -glucosidásica en los productos fermentados de la soja puede ser resultado de la suma de la actividad enzimática de la flora fermentativa y una posible flora contaminante.

Tabla 9.2.1. Contenido de isoflavonas (mg/kg) en los productos derivados de la soja.

	Agliconas	β -glucósidos	Acetil- β -glucósidos	Malonil- β -glucósidos
Paté de soja	614.72 \pm 48.72	1689.49 \pm 270.01	27.67 \pm 4.48	2365.73 \pm 260.14
Salsa de soja	25.36 \pm 3.98	30.70 \pm 4.14	nd	1.75 \pm 0.73
Tamari	20.69 \pm 6.80	14.69 \pm 2.29	nd	nd
Yoghourt	1.96 \pm 0.08	98.83 \pm 7.71	0.74 \pm 0.18	28.44 \pm 3.76
Sufu	59.82 \pm 16.61	18.64 \pm 6.48	2.09 \pm 3.62	24.62 \pm 13.65
Miso	288.47 \pm 27.58	633.59 \pm 130.32	11.72 \pm 0.86	71.59 \pm 0.75
Natto	115.98 \pm 7.76	1980.36 \pm 465.12	13.06 \pm 11.08	4.15 \pm 2.06
Tempeh	234.94 \pm 100.38	48.67 \pm 23.29	1.87 \pm 0.86	19.35 \pm 8.09
Edamame	nd	48.12 \pm 10.58	4.83 \pm 0.57	45.57 \pm 9.24
Tofu fresco	42.46 \pm 5.63	398.26 \pm 59.34	3.28 \pm 0.29	601.75 \pm 165.34
Tofu firme	50.62 \pm 10.07	898.19 \pm 170.05	9.45 \pm 6.51	147.70 \pm 45.29
Bebida de soja	21.79 \pm 6.55	243.11 \pm 13.29	4.26 \pm 1.63	15.70 \pm 11.42
Brotos de soja	38.00 \pm 33.43	200.76 \pm 77.16	6.25 \pm 10.82	21.90 \pm 17.30

Los productos no fermentados, bebida de soja y tofu firme, también presentaron como mayoritarios, los β -glucósidos. En estos productos el remojo y el tratamiento térmico hidrolizan los conjugados maloniles produciendo la conversión a los β -glucósidos (Vacek, et al., 2008). Sorprendentemente en el paté de soja fermentado y el tofu fresco pasteurizado las formas mayoritarias fueron los malonil- β -glucósidos, sugiriendo que las condiciones tecnológicas de elaboración utilizadas para obtener estos productos fueron más suaves que las condiciones aplicadas a otros alimentos de soja comerciales.

No se dispone de datos reales de consumo de productos derivados de la soja, la estimación de la ingesta de isoflavonas solamente se puede realizar a partir de la información de las raciones de estos productos. Así, la Tabla 9.2.2 muestra el resumen de los niveles de isoflavonas por ración, considerando tres valores (medio, máximo y mínimo) de contenido de isoflavonas por cada tipo de producto.

Tabla 9.2.2. Contenido de isoflavonas (mg) por ración de los productos derivados de la soja.

	Tamaño ración (g)	Media (mg)	Máximo(mg)	Mínimo (mg)
Tofu Firme	120	132.7	142.8	112.8
Tofu Fresco	120	125.5	140.4	108.9
Bebida de soja	250	71.2	77.5	63.1
Paté de soja	15	63.4	79.5	62.2
Natto	30	63.4	77.7	48.7
Tempeh	120	36.6	41.2	18.9
Yogurt de soja	250	32.4	30.0	37.0
Miso	15	15.1	17.4	13.4
Brotos de soja	50	13.3	14.4	11.5
Edamame	80	7.9	9.0	6.0
Sufu	60	5.3	6.9	3.7
Salsa de soja	15	0.9	0.9	0.8
Tamari	15	0.5	0.6	0.4

Tal como se observa, las fuentes más elevadas de isoflavonas fueron ambos tipos de tofu, el fresco y el firme. Otros productos también proporcionaron un alto contenido de isoflavonas, como una ración habitual de bebida de soja, paté de soja, natto y tempeh. De hecho, la bebida de soja, a pesar de no ser la fuente más elevada de isoflavonas, contribuye notablemente a la ingesta por su frecuencia de consumo. Teniendo en cuenta que la salsa de soja y el tamari se consumen en cantidades muy bajas, su contribución a la ingesta de isoflavonas resulta insignificante. Genovese et al. (2002) también concluyeron la baja contribución de las salsas de soja al aporte isoflavonas.

Dado que no se disponen datos reales europeos de consumo de productos derivados de la soja, para la estimación de la ingesta de isoflavonas por la población adulta se ha calculado el aporte de estas sustancias derivado de tres diferentes escenarios:

- a) Un intolerante a la lactosa que incluye productos derivados de la soja como sustitutivos de lácteos
- b) Vegetariano con un consumo moderado de soja
- c) Vegetariano con un consumo elevado de soja

Se han buscado referencias fiables de recomendaciones diarias del consumo de soja. La Asociación Americana de Dietética (ADA) ha recomendado el consumo de soja junto con otras legumbres en la pirámide alimentario para la población vegetariana, en base a las Guías y Políticas de Orientación Alimentaria para Población Americana (Dietary Guidelines for Americans, USDA, 2010). El Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA) publicó, en 2010, unas guías de recomendaciones alimentarias para la población americana en las que incluye las adaptaciones para la población vegetariana, tanto para la ovoláctovegetariana como para la vegana. A efectos del cálculo se han tomado las raciones recomendadas en estas guías alimentarias. En estas guías los derivados de soja se incluyen dentro del grupo de los alimentos proteicos, y además en el grupo de los lácteos para la población vegana. Estas recomendaciones de consumo, en general, son de tres o cuatro raciones al día tanto para la población ovoláctovegetariana como para la vegana, en diferentes combinaciones de productos del de los lácteos y de los alimentos proteicos para los veganos.

Cabe señalar que en estas guías se incluyen como subgrupo dentro del grupo de los alimentos proteicos los productos de soja como la bebida de soja, el tofu, el yogurt de tofu y análogos cárnicos. En base a estas consideraciones, en la Tabla 9.2.3 se muestra la exposición diaria de isoflavonas en los tres escenarios propuestos. Se observa que los intolerantes a la lactosa están expuestos a niveles de isoflavonas más elevados que los vegetarianos.

La dosis de ingesta de isoflavonas necesaria para alcanzar los efectos fisiológicos previamente mencionados en el ser humano se ha sugerido que es de 30 a 50 mg/día (Lye, et al., 2009). Actualmente se encuentran disponibles en el mercado europeo muchos preparados comerciales a base de isoflavonas de soja para las mujeres premenopáusicas o menopáusicas

como suplementos alimenticios y preparados fitoterapéuticos, con una dosis recomendada de 40-80 mg/día. De acuerdo con la estimación de la ingesta de isoflavonas realizada en los tres escenarios señalados, alcanzan ampliamente estos niveles mencionados.

Tabla 9.2.3. Exposición diaria de isoflavonas en intolerantes a la lactosa, vegetarianos de consumo de soja moderado y de consumo de soja elevado.

	Intolerantes a la lactosa (3 raciones/día)*	Vegetarianos consumo de soja moderado (1 ración/día)**	Vegetarianos consumo de soja elevado (2 ración/día)**
Bebida de soja	71 mg	71 mg	71 mg
Tofu fresco	126 mg	126 mg	126 mg
Tofu Firme	133 mg	133 mg	133 mg
Yoghourt de soja	32 mg	32 mg	32 mg
Tempeh		37 mg	37 mg
Ingesta diaria***	229 -330 mg isoflavonas/día	32 -133 mg isoflavonas/día	64 -266 mg isoflavonas/día

* En la población en general, se recomienda el consumo de 3 raciones diarias de lácteos.

** Número y tamaño de las raciones según las recomendaciones de la USDA.

*** La ingesta diaria se ha calculado según las combinaciones posibles del número de raciones.

Además, una o dos porciones de casi todos los productos derivados de soja serían suficientes para alcanzar estos niveles saludables de isoflavonas. En concreto, una ración de paté de soja, natto, tempeh, yoghurt, tofu fresco, tofu firme y bebida de soja proporciona estos niveles de isoflavonas saludables. Estos resultados muestran que un consumo habitual de estos productos de soja comerciales alcanzan los niveles saludables de isoflavonas recomendados para las mujeres premenopáusicas y menopáusicas y pacientes hipercolesterolémicos.

No existen datos disponibles de toxicidad derivado del consumo de estos compuestos para la población en general, ni tampoco de que un consumo muy elevado de isoflavonas del señalado para conseguir los efectos beneficiosos (30-50 mg/día) tenga efectos beneficiosos adicionales.

Isoflavonas en fórmulas infantiles

El contenido de isoflavonas (mg/kg) en fórmulas infantiles a base de soja mostró valores entre 317 y 395 mg/kg, dependiendo de la marca (Tabla 9.2.4). Pese a que no hay diferencias entre productos, sí que se han observado en el contenido de isoflavonas entre los lotes de un mismo producto ($p < 0.05$).

Como las muestras mostraron un contenido de proteína similar (12-14%), las diferentes semillas de soja utilizadas en su elaboración podrían explicar esta variabilidad. Los resultados están en consonancia con los datos de isoflavonas en fórmulas infantiles a base de soja comerciales publicados anteriormente en la literatura, con valores máximos de 200 hasta 430 mg/kg (Murphy et al, 1997, Setchell et al, 1997; Knight et al, 1998; Irvine et al, 1998; Genovese y Lajolo, 2002; Morandi, et al., 2004; Fonseca et al, 2014).

Tabla 9.2.4. Contenido de isoflavonas (mg/kg) en las fórmulas infantiles a base de soja.

	Agliconas	β -glucósidos	Acetil- β -glucósidos	Malonil- β -glucósidos	Total
SFI 1	43.07 \pm 24.45	286.08 \pm 49.21	6.68 \pm 1.86	18.13 \pm 6.60	353.96 \pm 48.53
SFI 2	35.85 \pm 12.15	326.06 \pm 47.09	5.51 \pm 5.27	27.70 \pm 22.47	395.12 \pm 62.18
SFI 3	42.72 \pm 24.27	284.46 \pm 79.05	5.46 \pm 1.88	25.32 \pm 11.13	334.45 \pm 89.27
SFI 4	19.20 \pm 2.24	264.08 \pm 39.72	5.56 \pm 2.68	28.63 \pm 16.09	317.47 \pm 25.77
SFI 5	21.62 \pm 3.89	289.18 \pm 46.88	6.03 \pm 0.88	22.74 \pm 12.41	339.57 \pm 33.77
SFI 6	23.05 \pm 7.06	302.05 \pm 14.26	3.68 \pm 2.44	17.17 \pm 3.00	345.96 \pm 26.47

La distribución de las formas químicas de isoflavonas no varió significativamente entre las muestras analizadas, siendo los β -glucósidos los predominantes con más de un 75% de isoflavonas totales, seguido por los malonil- β -glucósidos y las agliconas (Tabla 9.2.4). Estos resultados están en consonancia con los reportados por Setchell et al. (1997), quienes observaron que los β -glucósidos eran las formas químicas más abundantes, ya que se forman como consecuencia de la degradación térmica de los malonil- β -glucósidos en la producción de las fórmulas infantiles a base de soja (Wang y Murphy, 1996). Los acetil- β -glucósidos se

detectaron en niveles bajos en las muestras analizadas. Estos compuestos no son las formas naturalmente presentes en la semilla de soja y su formación es debida a tratamientos intensos de calor excesivo. En definitiva, a la vista del perfil similar de las formas químicas de las isoflavonas entre las fórmulas infantiles cabe extrapolar que los tratamientos realizados para su obtención fuera de intensidad similar.

En los últimos años, se ha incrementado la preocupación por el posible riesgo relacionado con las isoflavonas en las fórmulas infantiles a base de soja (Bernbaum et al., 2008; Boucher et al., 2008). El panel de expertos de NTP-CERHR (National Toxicology Program – Center for the Evaluation of Risks to Human Reproduction) concluye que los datos experimentales obtenidos con animales se pueden utilizar para evaluar el riesgo potencial de la genisteína en los humanos. Este panel de expertos ha establecido en roedores un LOAEL (lowest observed adverse effect level) de 35 mg de genisteína/kg peso corporal/día para los machos y de 44 mg/kg peso corporal/día para las hembras. Por ello, determina que existe riesgo de padecer efectos adversos en neonatos e infantes que toman fórmulas infantiles de soja cuando la cantidad consumida de la aglicona se encuentre superior a los márgenes de 0,01-0,08 mg/Kg/día.

Por tanto, la estimación de la ingesta de isoflavonas a través del consumo de fórmulas infantiles a base de soja se ha realizado considerando el contenido total de isoflavonas, la cantidad de genisteína y la cantidad total de Ge (suma de la aglicona, el β -glucósido y los conjugados acetyl- y malonyl- β -glucósido). Se ha tomado también la suma de todas las formas químicas de la genisteína debido a que sus formas conjugadas sufren una hidrólisis intestinal previa a la absorción. La Tabla 9.2.5 muestra el consumo de isoflavonas en base a los tres niveles de isoflavonas y a los datos de consumo según lo especificado en la etiqueta en función de los pesos corporales de los infantes.

La ingesta media diaria del total de isoflavonas por kg de peso corporal al día fue de 8,3 mg, con un nivel máximo de exposición de estos compuestos de 12,6 mg. El valor medio de ingesta estimada de isoflavonas totales con las fórmulas analizadas fue veinte veces superior a la ingesta diaria estimada por la población adulta japonesa (0,4 mg/kg de peso corporal/día) (Nakamura, et al., 2000). En la literatura, se han referenciado previamente consumos de

isoflavonas totales de 1,6 a 14,1 mg/kg de peso corporal/día (Irvine et al, 1998; Setchell et al, 1997; Genovese y Lajolo, 2002; McCarver et al, 2011).

Tabla 9.2.5. Ingesta estimada diaria (mg/ kg de peso corporal/día) de isoflavonas totales (1), de genisteína (2) y de genisteína total (3) en lactantes alimentados con fórmulas infantiles a base de soja.

		SFI 1	SFI 2	SFI 3	SFI 4	SFI 5	SFI 6
0-2 semanas (≈ 3 kg)	g/día producto	-	60.2	68.8	84.6	-	81.0
	1	-	8.83	8.87	10.53	-	9.80
	2	-	0.47	0.56	0.32	-	0.27
	3	-	4.22	4.31	5.04	-	4.92
2-8 semanas (≈ 4 kg)	g/día producto	54	86.0	90.3	126.9	101.2	108.0
	1	5.08	9.46	8.73	11.85	9.50	9.80
	2	0.48	0.50	0.55	0.36	0.32	0.17
	3	2.65	4.52	4.25	6.05	4.25	4.92
2-3 meses (≈ 5 kg)	g/día producto	81	107.5	107.5	169.2	117.0	135.0
	1	6.09	9.46	8.31	12.64	8.78	9.80
	2	0.58	0.50	0.53	0.39	0.29	0.27
	3	3.18	4.52	4.04	6.05	4.25	4.92
3-6 meses (≈ 6.5 kg)	g/día producto	90	129.0	129.0	164.5	112.5	135.0
	1	5.21	8.73	7.67	9.45	6.49	7.54
	2	0.49	0.46	0.49	0.29	0.22	0.20
	3	2.72	4.17	3.73	4.53	3.14	3.79
>6 meses (≈ 7.5 kg)	g/día producto	90	103.2	137.6	188.0	108.0	157.5
	1	4.51	6.05	7.09	9.36	5.40	7.62
	2	0.43	0.32	0.45	0.29	0.18	0.21
	3	2.35	2.89	3.45	4.48	2.62	3.83

En cuanto a la ingesta de genisteína, los resultados indican que los lactantes se exponen a ingestas de la aglicona de manera individual de hasta 7 veces superior al margen establecido por el panel de expertos (de 0,17 a 0,58 mg/Kg/día). Además, suponiendo una hidrólisis intestinal del 100% de los conjugados de las isoflavonas y la máxima absorción del total de la genisteína, los lactantes estarían expuestos a una cantidad de genisteína entre 30 a 75 veces superior al margen establecido (de 2,35 a 6,05 mg/kg/día). A la vista de los resultados de consumo de isoflavonas por los lactantes, se concluye que efectivamente existe un riesgo

potencial de sufrir efectos adversos derivados del consumo de fórmulas infantiles a base de soja de manera exclusivo.

9.2.4. Aportaciones más relevantes

- ✓ El contenido total y el perfil de las formas químicas de las isoflavonas en los productos derivados de la soja es muy diferente en función del tipo de producto. En los productos fermentados abundan las agliconas, mientras que en los productos no fermentados β -glucósidos.
- ✓ Los productos derivados de la soja comerciales aportan cantidades elevadas de isoflavonas, que superan en muchos casos los niveles sugeridos para lograr los efectos beneficiosos que se le atribuyen.
- ✓ Una dieta que incluya una o dos raciones de productos derivados de la soja aportan contenidos de isoflavonas similares o más altos que los complementos alimenticios y preparaciones fitoterapéuticas.
- ✓ El consumo de isoflavonas por los lactantes alimentados con fórmulas infantiles a base de soja son mucho más elevadas que la población adulta.
- ✓ Teniendo en cuenta el nivel de seguridad establecida por el Panel de Expertos (NTP-CERHR) para neonatos e infantes que toman fórmulas infantiles a base de soja, existe un riesgo potencial para los lactantes de sufrir efectos adversos derivado del consumo de isoflavonas.

Artículo IX.

N. Toro-Funes, M. L. Latorre-Moratalla, J. Bosch-Fusté, M.T. Veciana-Nogues, M.C. Vidal-Carou. Isoflavones in commercial soybean-based products. Approaches to the intake assessment in adults and to the risk assessment in infants. En preparación.

Comunicación escrita II.

N. Toro-Funes, M.T. Veciana-Nogues, J. Bosch-Fusté, O. Comas-Basté, M.C. Vidal-Carou (2014). Estimación del riesgo asociado al consumo de fórmulas infantiles a base de soja por lactantes de 0 a 6 meses. "XIV Congreso de la Sociedad Española de Nutrición (SEN)". Zaragoza, (España). 27-29 Septiembre del 2012.

Toro-Funes, N.; Veciana-Nogués, MT.; Bosch-Fusté, J.; Comas-Basté, O; Vidal-Carou, MC.

Departament de Nutrició i Bromatologia, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona. Av. Joan XXIII s/n, E08028 Barcelona, Spain.

INTRODUCCIÓN

Las isoflavonas son una subclase de flavonoides con una estructura química similar a la del estradiol y una actividad estrogénica débil. Presentan efectos potenciales beneficiosos pero también cierto riesgo como disruptores endocrinos. Así podrían estar implicadas en la modificación de los niveles endógenos de hormonas y de los ciclos ovulares.

En la soja se encuentran tres isoflavonas, Daidzeína (De), Genisteína (Ge) y Gliciteína (Gle), en cuatro formas químicas: las agliconas, los β -glucósidos, y los conjugados acetil- y malonil- β -glucósidos (Fig. 1). Una vez consumidas, las isoflavonas son absorbidas como agliconas, debido a su alta hidrofobicidad y menor peso molecular. Esta absorción intestinal requiere una hidrólisis previa de las formas conjugadas.

La AESAN en su informe del Comité Científico (AESAN-2007-002) concluye que no existe información suficiente sobre el contenido de isoflavonas en los alimentos consumidos por los españoles, pero que la evidencia disponible indica que el consumo de isoflavonas en forma de alimentos derivados de la soja es seguro. Sin embargo, también destaca que no hay información suficiente como para concluir si el consumo de formulaciones a base de soja para lactantes produce efectos adversos. El panel de expertos de NTP-CERHR (National Toxicology Program – Center for the Evaluation of Risks to Human Reproduction) concluye que, aunque no hay ensayos clínicos en humanos, los datos experimentales obtenidos con animales se pueden utilizar para evaluar el riesgo potencial de la genisteína en los humanos. Este panel de expertos ha establecido en roedores un LOAEL (lowest observed adverse effect level) de 35 mg de genisteína/kg peso corporal/día para los machos y de 44 mg/kg peso corporal/día para las hembras. Por ello, determina que existe riesgo de padecer efectos adversos en neonatos e infantes que toman fórmulas infantiles de soja cuando la cantidad consumida de la aglicona se encuentre en los márgenes de 0,01-0,08 mg/Kg/día.

Las fórmulas infantiles a base de soja son productos adaptados a lactantes con intolerancia a la lactosa o alergia a las proteínas de la leche de vaca. Son el único o principal alimento consumido por estos niños durante la edad de 0 a 6 meses. Es por ello que se plantea que estos lactantes puedan ser un grupo de población expuesto a los riesgos asociados con la ingesta de altos niveles de isoflavonas.

OBJETIVO

El objetivo de este trabajo fue realizar una estimación del riesgo asociado a la ingesta de isoflavonas de fórmulas infantiles del mercado español por parte de lactantes (0-6 meses).

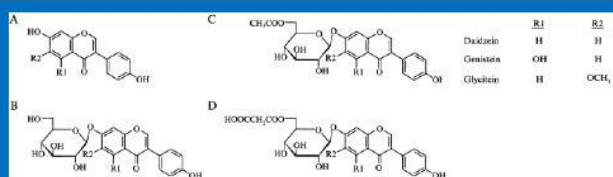


Figura 1: Estructura química de las isoflavonas presentes en soja. (A) Agliconas, (B) β -glucósidos, (C) acetil- β -glucósidos conjugados y (D) malonil- β -glucósidos conjugados.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se han analizado 6 fórmulas infantiles comerciales, de 3 lotes diferentes, analizadas por duplicado (n=18).

El contenido de isoflavonas se ha determinado por cromatografía líquida de ultra alta resolución y detección ultravioleta (UPLCTM-UV) mediante el método descrito por Toro-Funes y cols. (2012) que permite la cuantificación de las agliconas De, Ge, y Gle, a la vez que los β -glucósidos y los conjugados acetil- y malonil- β -glucósidos.

Se ha evaluado la ingesta de Ge, tanto la aglicona como la suma de sus formas conjugadas, en lactantes de 0 a 6 meses de acuerdo con las instrucciones de consumo señaladas en el etiquetado de los productos y tomando como referencia los datos antropométricos de los niños españoles publicados por Sobradillo y cols. (2004).

RESULTADOS

En todas las fórmulas infantiles se han encontrado las isoflavonas De, Ge y Gle en todas sus formas químicas: las agliconas o formas libres, sus respectivos β -glucósidos, Daidzina, Glicitina y Genistina, los conjugados acetil- de los β -glucósidos, 6''-O-acetildaidzina, 6''-O-acetilglicitina y 6''-O-acetilgenistina, y los conjugados malonil- de los β -glucósidos, 6''-O-malonildaidzina, 6''-O-malonilglicitina y 6''-O-malonilgenistina. El contenido total de isoflavonas en las fórmulas infantiles varía entre 373,51 y 541,18 mg/kg/día, siendo las formas glucosiladas las formas predominante (Fig. 2). Además, la genisteína como suma de las formas conjugadas es la isoflavona mayoritaria representando más del 50% del contenido total (Tabla 1).

La tabla 2 muestra la cantidad de Ge considerando tanto la aglicona como la cantidad total de Ge (suma de la aglicona, el β -glucósido y los conjugados acetil- y malonil- β -glucósido) a la que se exponen los niños y niñas lactantes de 0 a 6 meses, de edad cuya dieta se basa en fórmulas a base de soja. Los resultados indican que los lactantes se exponen a ingestas de la aglicona Ge sola de hasta 15 veces superior al margen establecido por el panel de expertos (de 0,21 a 1,13 mg/Kg/día) (Tabla 2). Además, suponiendo una hidrólisis intestinal del 100% de los conjugados de las isoflavonas y la máxima absorción del total de Ge, los lactantes estarían expuestos a una cantidad de Ge entre 50 a 100 veces superior al margen establecido (de 3,62 a 7,60 mg/kg/día) (Tabla 2).

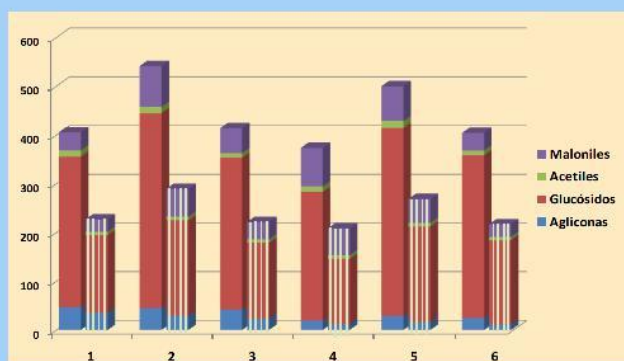


Figura 2: Contenido total (mg/kg) y distribución de las isoflavonas en las fórmulas infantiles. Las columnas rayadas corresponden a la cantidad de genisteína total y su distribución en las fórmulas infantiles.

Fórmula Infantil	Ge	Total Ge
1	35,38 ± 26,62	227,13 ± 42,92
2	29,43 18,99	289,52 68,09
3	23,62 10,13	221,44 80,59
4	11,46 0,48	208,35 12,60
5	16,73 2,35	268,69 15,75
6	10,77 ± 0,61	216,87 ± 28,11

Tabla 1: Contenido de la aglicona Genisteína (Ge) y del total de Ge (suma de la aglicona, el β -glucósido y las conjugadas acetil- y malonil- β -glucósidos) en las fórmulas infantiles (n=6); valor medio y su desviación estándar (μ g/g).

Fórmula Infantil (n=6)	Niño				Niña			
	Recién nacido (3,47 kg de peso)		6 meses (8,02 kg de peso)		Recién nacida (3,34 kg de peso)		6 meses (7,44 kg de peso)	
	Ge	Total Ge	Ge	Total Ge	Ge	Total Ge	Ge	Total Ge
1	1,09	6,97	0,78	5,03	1,13	7,24	0,84	5,42
2	0,66	6,46	0,38	3,73	0,68	6,71	0,41	4,02
3	0,47	4,39	0,41	3,80	0,49	4,56	0,44	4,10
4	0,28	5,08	0,27	4,88	0,29	5,28	0,29	5,26
5	0,46	7,32	0,23	3,62	0,47	7,60	0,24	3,90
6	0,25	5,06	0,21	4,26	0,26	5,26	0,23	4,59

Tabla 2: Cantidad de la aglicona Genisteína (Ge) y el total de Ge (suma de la aglicona, el β -glucósido y las conjugadas acetil- y malonil- β -glucósidos) ingerida diariamente por la población infantil alimentada con las fórmulas infantiles en mg/kg/día.

CONCLUSIONES

Considerando el habitual consumo de fórmulas infantiles por la población lactante de 0 a 6 meses, se concluye que efectivamente existe un riesgo potencial de sufrir efectos adversos derivados del consumo de fórmulas infantiles a base de soja de manera exclusiva.

10

**ALGUNOS EFECTOS BIOLÓGICOS DE LAS
POLIAMINAS E ISOFLAVONAS**

Este capítulo recoge dos apartados que estudian alguno de los efectos biológicos de las poliaminas y de las isoflavonas. El primer apartado evalúa por métodos *in vitro* la capacidad antioxidante de las poliaminas, compuestos naturales con un papel reconocido como antioxidantes frente al estrés oxidativo celular. En el segundo apartado, como resultado de una estancia en el grupo de investigación de Nutrición Molecular de la Universidad de Reading (UK) para el aprendizaje del manejo de cultivos celulares, se estudia el metabolismo intracelular de las isoflavonas en las células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC), usando hepatocitos HepG2 y células Caco-2 en monocapa como controles positivos.

10.1. Evaluación de la capacidad antioxidante de las poliaminas por métodos “*in vitro*”.

Artículo X.

N. Toro-Funes, J. Bosch-Fusté, M.T. Veciana-Nogues, M. Izquierdo-Pulido, M.C. Vidal-Carou. In vitro antioxidant activity of dietary polyamines. *Food Research International*, 51, 141-147.

Índice de impacto (JCR 2012): 3.003

Posición en area “Food and Science Technology”: 13/124

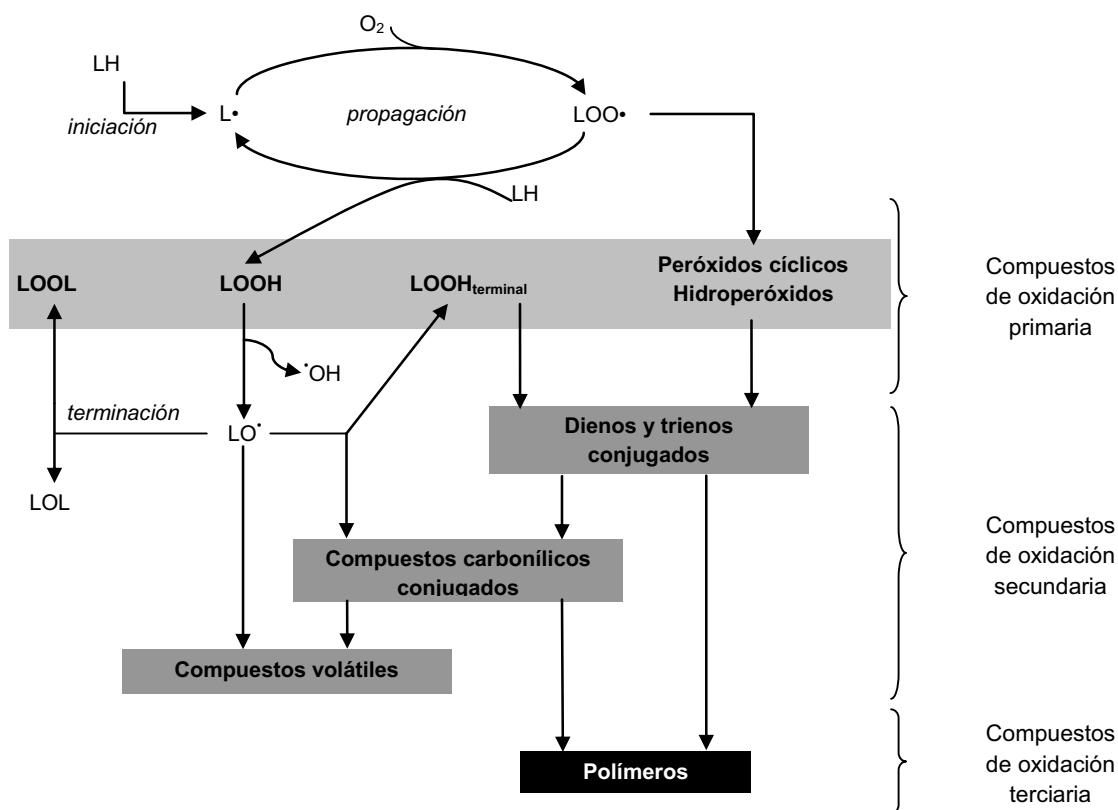
Comunicación escrita III.

M.T. Veciana-Nogues, M. Teruelo de Luis, **N. Toro-Funes**, M.C. Vidal-Carou. **Posible mecanismo de acción de las poliaminas como antioxidantes.** “V Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (CyTA)”. Murcia (España). 26-29 Mayo del 2009.

10.1.1. Planteamiento y objetivo del estudio

La oxidación lipídica es una de las principales causas de que los alimentos se deterioren, y puede ser un serio problema para la industria alimentaria, debido a las modificaciones sensoriales que van ligadas a este proceso. Esta oxidación además de disminuir la calidad sensorial de los alimentos puede reducir su valor nutritivo, y puede ser la causa de la aparición de productos potencialmente nocivos. La autooxidación es, en condiciones normales, la principal reacción involucrada en el daño oxidativo de los lípidos. Éstos reaccionan con el oxígeno molecular del aire mediante un mecanismo autocatalítico que genera radicales libres. Se inicia una reacción en cadena que produce peróxidos, hidrocarburos con dobles enlaces conjugados, compuestos carbonílicos, compuestos volátiles y/o polímeros (Halliwell y Chirico, 1993; Velasco y Dobarganes, 2002). En la figura 10.1.1 se muestra el esquema simplificado de las principales etapas del proceso de la oxidación lipídica.

Figura 10.1.1: Esquema simplificado de las principales etapas del proceso de la oxidación lipídica (Teruelo et al., 2008).



Se han descrito diversos métodos para evaluar la capacidad antioxidante de los antioxidantes naturales, cada uno con sus pros y sus contras (Frankel, 1993; Sánchez-Moreno y Larrauni, 1998; Frankel y Meyer, 2000; Sánchez-Moreno, 2002; Roginsky y Lissi, 2005; Prior et al., 2005), pero la mayoría de ellos cubren solo algunas partes del proceso. Además, los resultados obtenidos pueden ser inconsistentes y difíciles de comparar (Frankel, 1993; Frankel y Meyer 2000; Prior et al., 2005; Huang et al., 2005; Decker et al., 2005; Sun y Tanumihardjo, 2007; Frankel y Finley, 2008). Para evitar estos problemas se han propuesto unas directrices generales (Prior et al., 2005; Decker y cols., 2005; Sun y Tanumihardjo, 2007) que especifican que la actividad antioxidante debería medirse en diferentes puntos de la reacción en cadena, en lugar de la realización de una prueba puntual que mida la capacidad antioxidante global, tipo TEAC (Capacidad antioxidante equivalente TROLOX) u ORAC (Capacidad de absorber radicales de oxígeno). De esta manera es posible reducir falsos negativos, por ejemplo, al encontrar una baja actividad captadora de radicales (*scavengers*) en una muestra que contiene

un antioxidante que actúa principalmente evitando o dificultando la formación de radicales (Huang et al., 2005) o que usa una fuente de radicales inapropiada (Wu et al., 2004).

Las poliaminas, espermina (SPM) y espermidina (SPD), además de otras funciones, tienen también la capacidad de actuar de antioxidantes en los sistemas biológicos, principalmente en los constituyentes de la membrana, proteínas y ácidos nucleicos. Se han descrito diferentes mecanismos para explicar la función antioxidante, principalmente como captadores de radicales libres, como quelantes de metales de transición con capacidad de evitar la formación de especies reactivas de oxígeno, o una combinación de ambos mecanismos (Løvaas, 1997; Das y Misra, 2004; Douki et al., 2000; Groppa, et al., 2007). Otros mecanismos propuestos para explicar la actividad antioxidante de las poliaminas son la neutralización de la carga de la superficie de la membrana, la inhibición de enzimas o la protección del sustrato por adsorción de las poliaminas sobre el mismo, evitando que pueda entrar en contacto con el oxidante (Tadolini, 1988; Løvaas, 1997; Ha et al., 1998; Groppa et al., 2007). Aunque se reconoce ampliamente la capacidad antioxidante de las poliaminas, hay muy pocos trabajos en la que se estudie el mecanismo de acción antioxidante. Por lo tanto, el objetivo de este apartado de la tesis es evaluar la actividad antioxidante de SPM y SPD, en comparación con otros antioxidantes reconocidos, en modelos *in vitro* en diferentes etapas del proceso de la oxidación lipídica, según lo recomendado por las directrices generales.

10.1.2. Diseño experimental

Con el objeto de conocer el mecanismo por el que las poliaminas actúan como antioxidantes, se realizaron tres tipos de pruebas:

- a) Estudio del efecto de las poliaminas sobre la captación de radicales libres (método del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH)) a fin de conocer si el efecto antioxidante de las poliaminas se debe a su capacidad de captar radicales libres.
- b) Estudio del efecto de las poliaminas sobre la formación de compuestos primarios de oxidación (Índice de Peróxidos).
- c) Estudio del efecto de las poliaminas sobre la formación de compuestos de oxidación secundaria (dienos y trienos conjugados y compuestos volátiles) mediante las medidas de los coeficientes específicos de extinción K_{232} , K_{270} y K_{280} , y el TBARS. A fin de acelerar

el proceso oxidativo se utilizó el método del Rancimat que mide los compuestos volátiles oxidados. En todos los casos los estudios se realizaron comparando el efecto de las poliaminas con otros antioxidantes reconocidos.

Para el desarrollo de estos experimentos se ha utilizado aceite de soja de calidad farmacopea como sustrato oxidable, debido a su elevada proporción de ácidos grasos insaturados (alrededor de 58% de acuerdo con el USDA *Nutrient Database for Standard Reference*) y su disponibilidad comercial con una elevada pureza y estandarización en su composición. El aceite fue purificado de todos sus antioxidantes naturales antes de su uso, siguiendo el método de Kim et al. (2007).

10.1.3. Resultados y discusión

Capacidad de captación de radicales de las poliaminas

La capacidad de captación de radicales por parte de las poliaminas y los otros antioxidantes observada por el método de DPPH se muestra en la Tabla 10.1.1. Las poliaminas son compuestos anfifílicos y, por ello, para valorar su capacidad antioxidante se seleccionó el método DPPH como un procedimiento estandarizado, que permite evaluar la capacidad de captación de radicales libres en ambos medios hidrófilo y lipófilo. Las poliaminas, SPM y el SPD, mostraron diferente actividad antioxidante en función del medio. En el medio hidrofílico, la actividad antioxidante de las poliaminas fue casi cinco veces menor que la del ácido ascórbico (AA). Por el contrario, en medio lipofílico, la actividad antioxidante de las poliaminas fue ligeramente inferior a la del α -tocoferol (AT) y el palmitato de ascorbilo (PA), y aproximadamente la mitad del valor del galato de octilo (OG). Estos resultados muestran que la capacidad de captación de radicales de las poliaminas, en comparación con los otros antioxidantes, fue muy baja en condiciones hidrofílicas y también baja pero menos en condiciones lipofílicas.

Tabla 10.1.1. Actividad antioxidante expresada como mmol/L de TROLOX en metanol y acetato de etilo.

	Metanol	Acetato de etilo
Espermina	1.73 ± 0.13	0.55 ± 0.03
Espermidina	1.76 ± 0.04	0.63 ± 0.01
α-tocoferol	nm	0.75 ± 0.03
Palmitato de ascorbilo	nm	0.70 ± 0.01
Galato de octilo	nm	1.47 ± 0.05
Ácido ascórbico	7.93 ± 0.13	nm

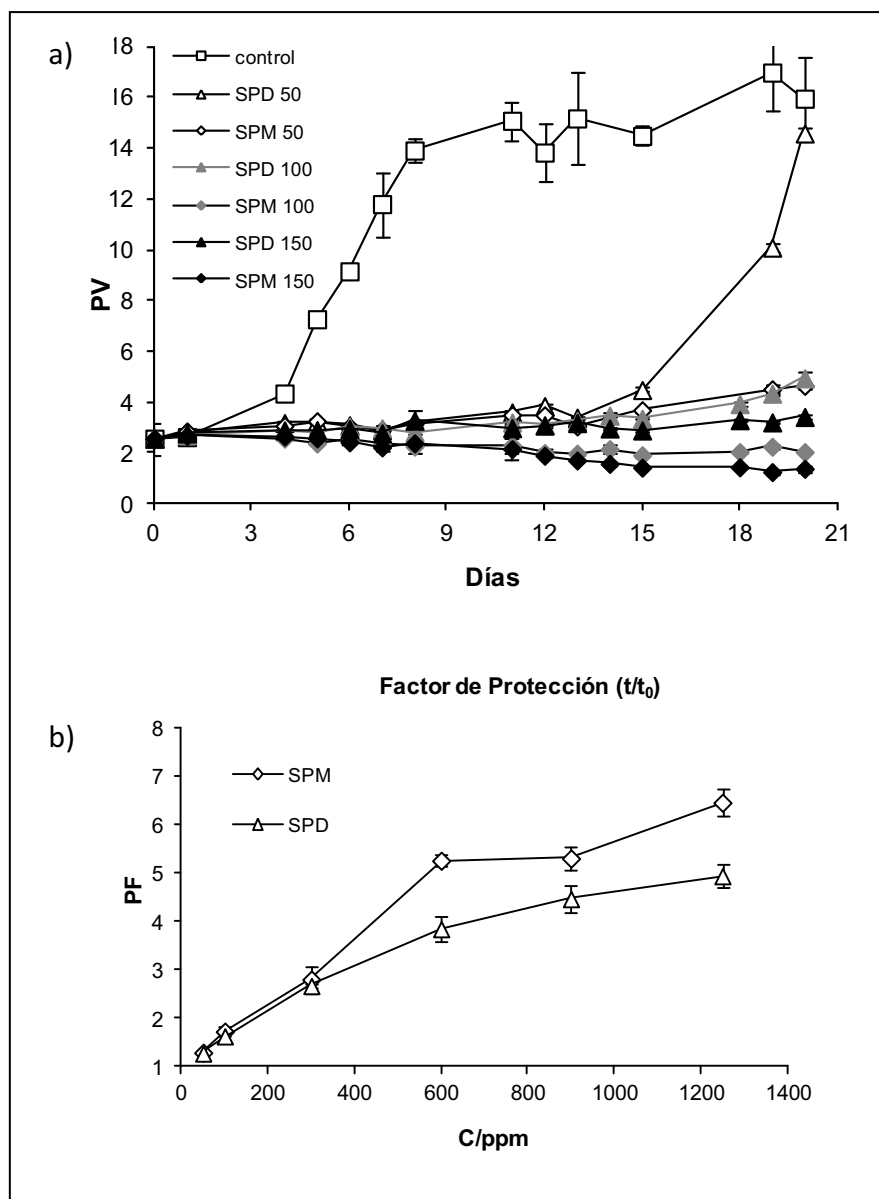
nm: no medido.

Capacidad antioxidante de las poliaminas en diferentes etapas de la oxidación lipídica

La Figura 10.1.2a muestra la evolución del IP del aceite enriquecido con tres concentraciones diferentes de SPM y SPD (50, 100 y 150 µg/mL) durante 21 días de oxidación a 50 °C. Tanto la SPM como la SPD mostraron una elevada actividad antioxidante, retardando la formación de peróxidos. La muestra de 50 mg/ml de SPD mostró el efecto menos protector. La SPM mostró ser un antioxidante más eficaz que la SPD, tal vez debido a que la actividad antioxidante de poliaminas se relaciona con el número de grupos amino (Lovaas, 1991). Por lo tanto, la SPM con cuatro grupos amino sería más eficaz que la SPD con tres. Las dosis empleadas de 100 y 150 µg/mL de las dos poliaminas fueron adecuadas para evitar la acumulación de peróxidos durante 21 días que duró el estudio mientras que en el control se detectó la formación de peróxidos a partir del día 3.

Para valorar si la capacidad antioxidante de las poliaminas era dosis dependiente, se realizó un estudio empleando el método Rancimat, utilizando concentraciones de poliaminas de 0,3 a 1250 µg/ml (Figura 10.1.2b). Como se aprecia en la figura, a las dosis más bajas de las poliaminas, hasta 300 µg/ml, su efecto antioxidante fue comparable mientras que a dosis superiores la SPM fue estadísticamente más eficaz ($p < 0,05$) que la adición de la misma cantidad de SPD. Se observa que a concentraciones más altas (ca. 600 µg/ml), el FP mostró una tendencia a la saturación.

Figura 10.1.2. Evolución del índice de peróxidos (IP) a tres concentraciones de poliaminas a 50, 100 y 150 mg/ml en las muestras de aceite a 50 °C (a), y las variaciones del factor de protección (FP) de aceite estabilizado con poliaminas a 0-1250 mg/ml (b).



Actividad antioxidante de las poliaminas en comparación con otra antioxidantes en las diferentes etapas del proceso de oxidación

La Figura 10.1.3 compara la capacidad antioxidante de las poliaminas frente a otros antioxidantes medida en diferentes etapas de la oxidación. La evolución del IP refleja que

todas las muestras adicionadas con antioxidantes producen un retraso en la acumulación de peróxidos en comparación con el control. Igualmente, también se observa que, de todos los antioxidantes considerados, la SPM es la que ofreció mayor protección frente a la oxidación, seguida de la SPD (Figura 10.1.3a). Por tanto, las poliaminas fueron más eficaces que los antioxidantes convencionales en la prevención de compuestos de oxidación primaria. Esta mayor protección frente a la formación de peróxidos mostrada por las poliaminas podría ser debido a su particular mecanismo de acción. OG, PA y AT son principalmente captadores de radicales libres mientras que las poliaminas pueden actuar como quelantes.

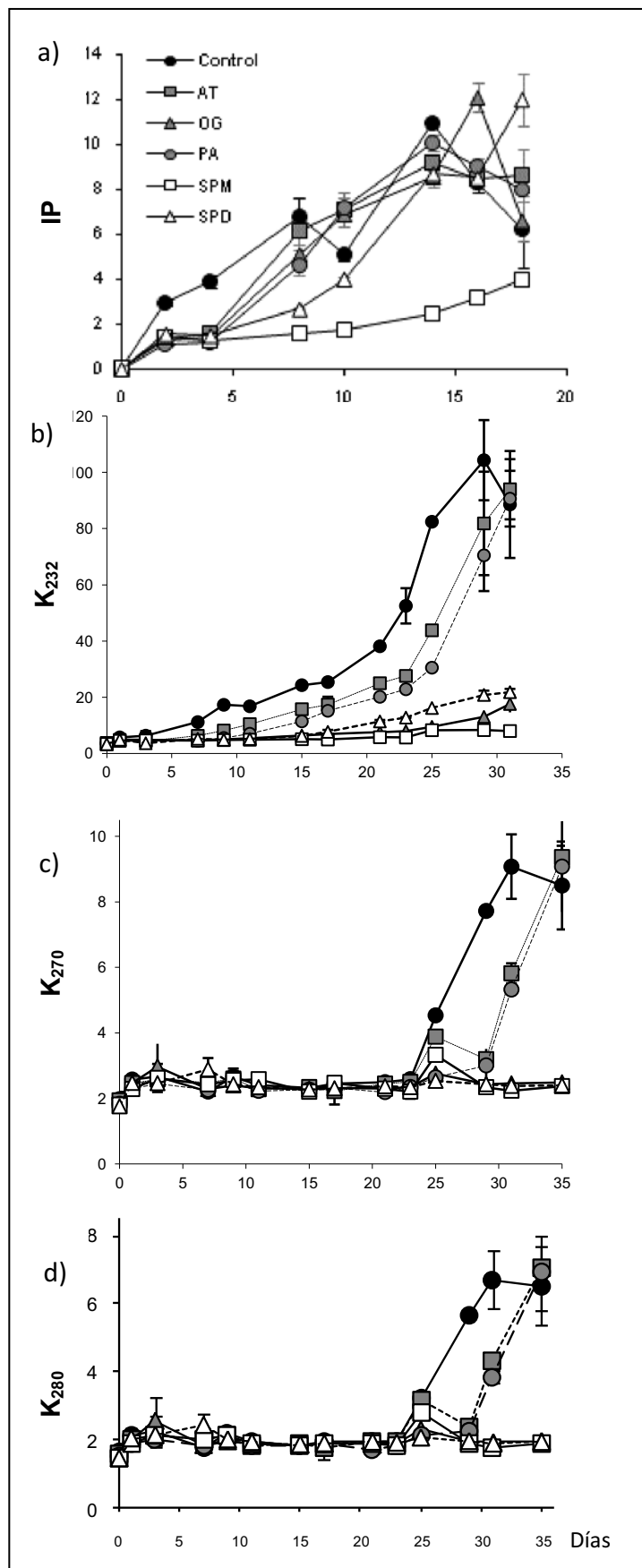
En la evolución de la formación de compuestos de oxidación secundaria (Figura 10.2.3b,c,d), se muestra que las poliaminas y OG fueron los antioxidantes más eficaces en retrasar la formación de estos compuestos. El efecto antioxidante de las poliaminas fue sorprendentemente mayor que el de PA y AT. Al igual que en caso de los peróxidos, la SPM fue más efectiva que la SPD también frente a la formación de compuestos de oxidación secundaria.

Finalmente, se estudió la formación de compuestos volátiles también productos secundarios medidos por el método del Rancimat. Los resultados muestran valores del FP de $1,45 \pm 0,06$, $1,48 \pm 0,06$, $1,40 \pm 0,06$, $1,34 \pm 0,06$ y $0,99 \pm 0,01$ para SPM, SPD, GO, PA y AT, respectivamente. Estos resultados muestran que, como se observa en las pruebas anteriores, las dos poliaminas tuvieron una capacidad antioxidante más eficaz que los otros antioxidantes PA y AT, e igual que OG ($p < 0,05$).

Los triglicéridos del aceite durante el calentamiento sufren una serie de reacciones de hidrolización y polimerización que afectan a la viscosidad de la muestra. Los componentes poliméricos no fueron analizados en este trabajo. Pero se observó al final de la prueba que la viscosidad de las muestras adicionadas con poliaminas fue claramente menor que la del control y las adicionadas con los otros antioxidantes.

La razón de que la SPM tenga una mayor capacidad antioxidante que la SPD probablemente reside en que la SPM tiene un mayor número de grupos amino y, por tanto, una mayor capacidad de quelar metales catalizadores de oxidación lipídica (Løvaas, 1997).

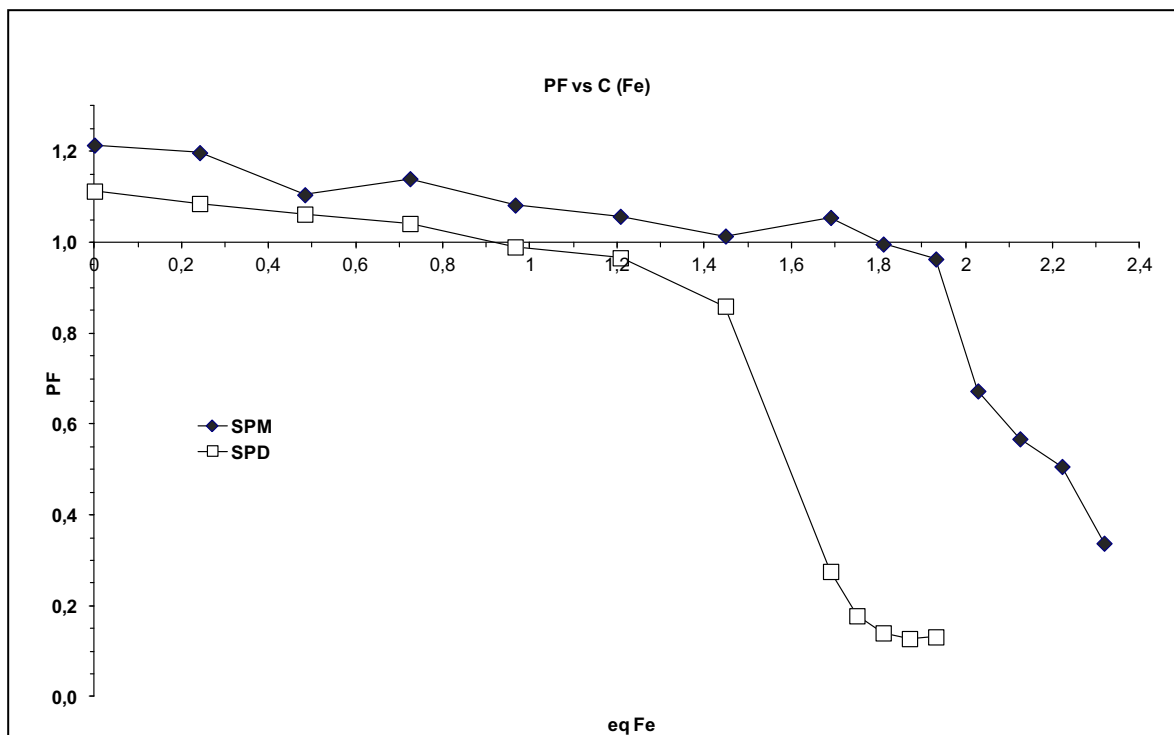
Figura 10.1.3. Evolución del Índice de peróxidos (IP) (a), coeficientes específicos de extinción a 232 (b), 270 (c) y 280 nm (d) en las muestras estabilizadas con los diferentes antioxidantes a 50°C.



Actividad antioxidante de las poliaminas en condiciones de oxidación extremas

Para confirmar que las poliaminas actúan como antioxidantes secundarios como quelantes de metales, se planteó un estudio en condiciones extremas de oxidación mediante el test de Rancimat (elevada temperatura, flujo de oxígeno y la adición de Fe^{2+}). En la Figura 10.1.4 se muestran la evolución de los valores del FP frente a la concentración hierro añadido expresado en equivalentes de hierro. Los resultados muestran que ambas poliaminas mantienen un efecto protector hasta que la concentración de hierro alcanzó 1,4 mM en las muestras con SPD, y 1,9 mM en las muestras con SPM. Estos resultados demuestran que las poliaminas ralentizaron el proceso de oxidación actuando como antioxidantes secundarios y quelantes del hierro hasta un punto de saturación de la formación de complejos con los iones Fe^{2+} presentes en el medio. De nuevo, la SPM mostró una protección antioxidante más efectiva que la SPD.

Figura 10.1.4. Evolución del FP frente a la concentración de hierro.



10.1.3. Aportaciones más relevantes

- ✓ Las poliaminas SPM y SPD presentan una capacidad antioxidante importante que se manifiesta en todas las etapas del proceso oxidativo, incluso a concentraciones muy bajas presentes de forma natural en los alimentos de origen animal y vegetal.
- ✓ Las poliaminas mostraron una mayor capacidad antioxidante que algunos antioxidantes naturales o análogos sintéticos, como el α -tocoferol, el palmitato de ascorbilo o el galato de octilo, sobre todo en las primeras etapas del proceso de oxidación lipídica.
- ✓ La actividad antioxidante de las poliaminas parece estar relacionada con su capacidad para quelar metales, y esto explica que la SPM (con cuatro grupos amino) tenga una mayor capacidad antioxidante que la SPD (con tres grupos amino). Además de este efecto, las poliaminas también tienen una cierta capacidad de captar radicales libres (aunque inferior que otros antioxidantes estudiados).
- ✓ La capacidad antioxidante de las poliaminas abre la puerta a la posibilidad de adicionar como antioxidantes naturales en alimentos y también para aumentar su aporte dietético.

Artículo X.

N. Toro-Funes, J. Bosch-Fusté, M.T. Veciana-Nogues, M. Izquierdo-Pulido, M.C. Vidal-Carou. In vitro antioxidant activity of dietary polyamines. *Food Research International*, 51, 141-147.

Índice de impacto (JCR 2012): 3.003

Posición en área "Food and Science Technology": 13/124



In vitro antioxidant activity of dietary polyamines

Natalia Toro-Funes, Joan Bosch-Fusté, M. Teresa Veciana-Nogués, Maria Izquierdo-Pulido, M. Carmen Vidal-Carou *

Department of Nutrition and Food Science-XaRTA, Campus de l'Alimentació Torribera, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, Av. Prat de la Riba 171, 08921, Santa Coloma de Gramenet, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 September 2012
Accepted 28 November 2012

Keywords:

Spermine
Spermidine
Antioxidant
Dietary polyamines
Radical scavenging
Metal chelating

ABSTRACT

The polyamines spermidine and spermine are molecules naturally present in food. The effect of polyamines on oxidative stability was studied by means of *in vitro* experimental models. The potential antioxidant activity of polyamines compared to other antioxidants was investigated in both lipophilic and hydrophilic media by the DPPH method. Although antioxidant capacity was observed in both media, it was stronger in the lipophilic matrix. Thus, soybean oil was used as an *in vitro* model to study the concentration-dependent response of polyamines, which showed a strong antioxidant capacity at a wide range of concentrations (from 30 to 1250 µg/mL). The antioxidant activity of polyamines was also studied in comparison with other antioxidants (octyl galate, α-tocopherol and palmitoyl ascorbate) at different points of the oxidation process: formation of peroxides, conjugated compounds, carbonylic and volatile compounds. Both spermidine and spermine were able to delay the oxidation at every step of the process, being as protective as octyl galate and more so than α-tocopherol and palmitoyl ascorbate. Finally, the antioxidant activity of polyamines was studied in extreme oxidation conditions of high temperature, oxygen and the addition of Fe²⁺ and was found to be related to their ability to chelate metals.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

N,N'-bis(3-aminopropyl)-1,4-diaminobutane or spermine (SPM) and N-(3-aminopropyl)-1,4-diaminobutane or spermidine (SPD) are natural polyamines formed during metabolic processes in every living cell, especially in tissues with a high cellular turnover, being essential to cell survival. Thus, polyamines are naturally present in not only tissues and physiological fluids but also in foods at variable concentrations (Nishibori, Fujihara, & Akatuki, 2007). The main source of exogenous polyamines is dietary, from food of both animal and vegetable origin, and human milk. They are rapidly and completely absorbed in the duodenum and first portions of the jejunum. The absorption mechanisms include carriers and paracellular absorption and the compounds undergo intensive metabolism before reaching the systemic circulation (Larqué, Sabater-Molina, & Zamora, 2007).

Polyamines are aliphatic molecules with amine groups distributed along their structure. They occur as free bases in native form but, due to their structure, can also be water-soluble. These compounds can establish hydrogen bridges with hydroxylic solvents such as water or alcohol (Larqué et al., 2007).

Polyamines have many biological functions and it is well known that they are involved in cellular replication and differentiation, metabolism

regulation, and stabilization of membranes and nucleic acids. They have also been reported to act as secondary messengers and growth factors, but their mode of action remains a matter of speculation (Larqué et al., 2007; Moinard, Cynober, & de Bandt, 2005).

Among their biological functions, SPM and SPD also have the ability to act as antioxidants not only in biological systems, mainly in their membrane constituents, but also in proteins and nucleic acids. Some authors have described different antioxidant mechanisms for polyamines in biological systems, such as free radical scavenging and/or transition metal chelation (Løvaas, 1997; Das & Misra, 2004; Groppa, Tomaro, & Benavides, 2007). Other mechanisms include the ability to modulate the membrane surface charges, to inhibit enzymes or to mechanically protect the substrate (Løvaas, 1997; Tadolini, 1988; Douki, Bretonniere, & Cadet, 2000). However, the specific chemical mechanism of the antioxidant effects of polyamines is still not established.

The oxidation of lipids plays a central role in the occurrence of numerous chronic diseases, such as atherogenesis, and contributes to the diverse vascular sequelae of diabetes and aging (Fang, Yang, & Wu, 2002). Moreover, it is known that an increased polyamine intake is involved in decreasing several chronic diseases (Bardocz, 1995). Lagishetty and Naik (2008) concluded that the antioxidant effect of polyamines could play a major role in the prevention of inflammatory chronic diseases. Both *in vitro* and *in vivo* studies have demonstrated that polyamines suppress inflammatory mediators, such as pro-inflammatory cytokines (Soda et al., 2005). This potential anti-inflammatory effect has led Soda (2010) to hypothesize that polyamine intake may help with cardiovascular

* Corresponding author. Tel.: +34 934033785; fax: +34 934035931.
E-mail address: mcvidal@ub.edu (M.C. Vidal-Carou).

diseases. It has also been reported that an increased polyamine intake may decrease *in vitro* age-associated pathology and promotes longevity (Minois, Carmona-Gutierrez, & Madeo, 2011).

In comparison with other antioxidants, polyamines have been scarcely studied (Løvaas, 1991). Several rapid screening methods can be used for their evaluation, such as the Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP), Total Radical-trapping Antioxidant Parameter (TRAP), Oxygen-Radical Absorbance Capacity (ORAC), 2,2-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid (ABTS), and 2,2-diphenyl-2-picrylhydrazyl hydrate (DPPH) methods, which all measure radical scavenging capacity (Frankel & Meyer, 2000; Sánchez-Moreno, 2002; Khanna et al., 2011). Each one has its *pros* and *cons* but most of them cover only some parts of the whole oxidation process, so the results obtained may be inconsistent and difficult to compare (Frankel & Meyer, 2000; Sun & Tanumihardjo, 2007; Frankel & Finley, 2008; Badarinath et al., 2010). To avoid these problems, several authors have proposed general guidelines to evaluate antioxidant capacity, advocating the measurement of antioxidant activity at different points of the chain reaction instead of employing a total antioxidant capacity test (Sun & Tanumihardjo, 2007; Huang, Ou, & Prior, 2005; Prior, Wu, & Schaich, 2005). Thus, it is possible to reduce false positives (e.g., measuring a low peroxide value in a reaction that instead of accumulating peroxides, decomposes them quickly in volatile oxidation products) and false negatives (e.g., finding a low radical scavenging capacity in a sample containing an antioxidant that acts mainly by preventing radical formation) (Huang et al., 2005).

Both SPD and SPM have been reported as efficient antioxidants in several experimental biological systems but there is no consensus on the mechanism by which polyamines act as antioxidants. Therefore, the aim of this work was to explore the antioxidant activity of SPM and SPD, in comparison with other well recognized antioxidants, in *in vitro* models of both lipophilic and hydrophilic media. The antioxidant capacity was measured by different tests and at different steps of the lipid oxidation process, as recommended by the general guidelines (Fig. 1) (Frankel & Finley, 2008).

2. Materials and methods

2.1. Samples

Soybean oil of European Pharmacopoeia grade was obtained from Roig Farma-Grupo Fagron (Barcelona, Spain). Soybean oil was chosen since it is an easily oxidized substrate due to its high proportion of unsaturated fatty acids (about 58% according to the USDA Nutrient Database for Standard Reference). The oil was stripped of all its natural antioxidants before use, following the method of Kim, Hamhm, and Min (2007). Briefly, the oil was bleached through a glass column packed with three layers: 1) silicic acid, 2) a mixture of activated silicic charcoal and Celite®, and 3) a mixture of powdered sugar and Celite®, kept under nitrogen and protected from light to avoid oxidation.

2.2. Chemicals

Spermine (SPM), spermidine (SPD), (±)-α-tocopherol (AT), 6-O-palmitoyl-L-ascorbic acid (PA), ascorbic acid (AA) and octyl gallate (OG) were obtained from Fluka/Riedel-de Haën (Buchs, Switzerland). Iron (II) sulfate heptahydrate, barium chloride-2-hydrate and Celite® 577 were obtained from Fluka/Riedel-de Haën (Buchs, Switzerland). Methanol, 1-butanol, ethyl acetate, trichloromethane, cyclohexane, hydrochloric acid 35%, ammonium thiocyanate, silicic charcoal and powdered sugar were from Panreac (Barcelona, Spain). 6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox, 97% purity) and silicic acid of 60 mesh (Davisil® grade 635) were purchased from Aldrich (Steinheim, Germany) and 2,2-diphenyl-2-picrylhydrazyl hydrate (DPPH) was obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). All reagents were of analytical grade.

2.3. Methods

2.3.1. DPPH radical scavenging activity

Radical scavenging capacity was determined using the DPPH method as described by Odriozola-Serrano, Soliva-Fortuny, and Martín-Belloso (2008). The absorbance of the mixture was measured at 515 nm in a UV-vis spectrophotometer UV-160A (Shimadzu, Kyoto, Japan), the results were expressed as mM of Trolox Equivalents (TE).

2.3.2. Peroxide value determination

A spectrophotometric method based on the ability of peroxides to oxidize ferrous ions to ferric ions was used to determine the peroxide value (PV) (Shantha & Decker, 1994). The absorbance was spectrophotometrically measured at 500 nm and the results were expressed as peroxide values (PV) (mEq of peroxide/kg of sample).

2.3.3. K₂₃₂, K₂₇₀ and K₂₈₀ specific extinction coefficients

Specific extinction coefficients to estimate the presence of conjugated dienes, trienes and carbonyls were determined by the official EU method EEC/2568/91 for olive oil adapted to soybean oil in our laboratory (European Commission Regulation EEC/2568/91). Briefly, an aliquot of 0.05–0.1 g of the oil was diluted to a final volume of 20 mL with cyclohexane. The absorbance was measured at 232 nm for conjugated dienes (K₂₃₂), 270 nm for conjugated trienes (K₂₇₀), and 280 nm for conjugated carbonyls (K₂₈₀).

2.3.4. TBARS value

The AOCS official method Cd 19-90 was used to measure thiobarbituric acid reactive species (TBARS) (AOCS, American Oil Chemists Society, 2009a). Briefly, an aliquot of 0.05–0.1 g of sample was diluted to 25 mL in 1-butanol. 5 mL of the diluted sample and 5 mL of the 2-thiobarbituric acid solution (200 mg in 100 mL of 1-butanol) were transferred to a screw-cap test tube, which was placed in a thermostatic bath at 95 °C for 120 min. Finally, the absorbance was

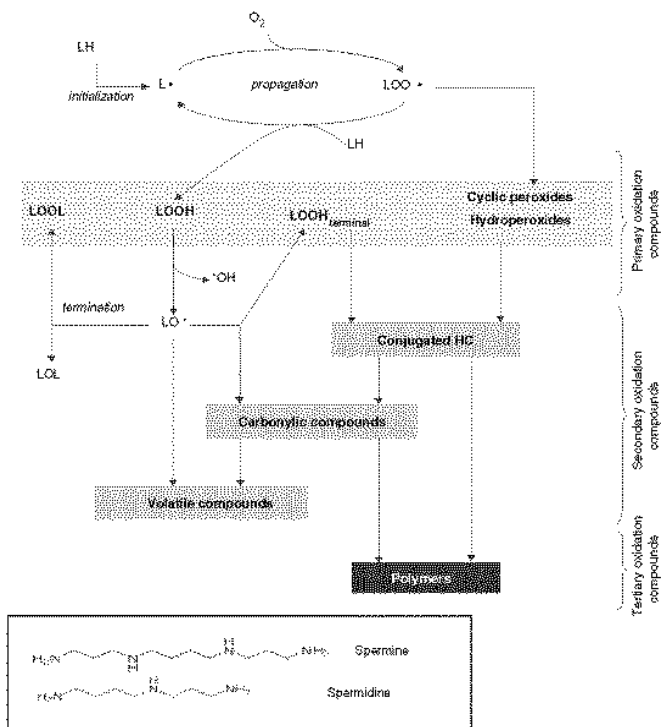


Fig. 1. Simplified scheme of the main steps involved in lipid oxidation process.

measured at 530 nm against ultrapure water and the results are expressed as malonaldehyde equivalents in $\mu\text{g/g}$ oil.

2.3.5. Volatile oxidation products (Rancimat test)

The formation of volatile compounds was evaluated by an accelerated automated test using Rancimat equipment, model 679 (Metrohm, Herisau, Switzerland), following the AOCS Official Method Cd 12b-92 (AOCS, American Oil Chemists Society, 2009b). The Rancimat test was performed on samples at 100 °C and exposed to an air stream of 15 L/h, and the Oil Stability Index (OSI) was obtained for each sample. The OSI is defined as the point of maximum change of the rate of oxidation and calculated as the second derivative of the conductivity with respect to time. The results of the experiment were finally expressed as protection factor (PF), which were calculated according to the following formula:

$$PF = OSI_s / OSI_0$$

where OSI_s and OSI_0 are the OSI of the sample (soybean oil spiked with antioxidants) and control (soybean oil), respectively. PF can be equal to or greater than 1, 1 being the PF of oil without any antioxidant added.

2.4. Experimental designs

First, the total antioxidant activity of polyamines was studied by a fast screening method that measures the radical scavenging capacity. Several experiments were then performed to check the polyamine antioxidant effect at different steps of the lipid oxidation process. Soybean oil spiked with butanolic solutions of SPM and SPD and/or other antioxidants were used. In all the experiments the controls were treated with the same amount of butanol as was added to the solutions of polyamines and other antioxidants tested.

2.4.1. Measurement of radical scavenging capacity

The radical scavenging capacity of SPM and SPD was studied and compared to other antioxidants at a concentration of 100 $\mu\text{g/mL}$ in two fractions (hydrophilic and lipophilic) by means of the DPPH method, using methanol and ethyl acetate as a solvent, respectively.

2.4.2. Study of the concentration-dependent response of SPM and SPD

The influence of polyamines on the antioxidant effect in the soybean oil was studied by two tests: measurement of the peroxide value (PV), which indicates the first oxidation stages, and calculation of the Oil Stability Index by the Rancimat test, which measures later steps of oxidation under extreme conditions.

- 1) Peroxide value: control and oil samples spiked to achieve final concentrations of 50, 100 and 150 $\mu\text{g/mL}$ of SPM or SPD were prepared and shaken vigorously. 10 mL of control and samples were placed in glass Petri plates (7 cm of diameter), kept at 50 °C in darkness and exposed to air, according to the AOCS Recommended Practice Cg 5–97 (AOCS, American Oil Chemists Society, 2009c). Aliquots of samples were taken regularly to measure the PV.
- 2) Oil Stability Index: was measured in a wider range of polyamine concentrations (15, 30, 50, 100, 300, 600, 900 and 1250 $\mu\text{g/mL}$ of SPM and SPD) than those used in PV measurements, since the conditions applied in the Rancimat test accelerate the oxidation process. Subsequently, less time is required to find differences between the control (soybean oil) and the samples (soybean oil spiked with polyamines).

2.4.3. Study of the antioxidant effect of SPM and SPD in comparison with other antioxidants at different points of the oxidation process

Controls and oil samples were spiked with each antioxidant to a concentration of 100 $\mu\text{g/mL}$, kept at 50 °C in darkness and exposed to air, as described above. Aliquots were taken regularly to measure

the PV, the specific extinction coefficients K_{232} , K_{270} and K_{280} , and the TBARS value.

Oxidized volatile compounds in the control and samples supplemented with antioxidants were also measured, using the Rancimat test to calculate the OSI.

2.4.4. Study of the antioxidant effect of SPM and SPD in extreme oxidation conditions

Samples of soybean oil, containing a concentration of 0.15 mM of SPM and SPD, were spiked with different concentrations of an iron (II) solution (from 0 to 0.35 mM), prepared as described by Leonardis and Maccioła (2002). The oxidation process was then monitored by measuring the OSI with the Rancimat test.

2.4.5. Statistical analysis

Experiments were conducted in triplicate and three replicate analyses were carried out for each sample in order to obtain the mean value. Correlations between antioxidant capacity and the concentration of the compounds were evaluated with Pearson's test and non-linear regression. Analysis of the nonparametrical Kruskal–Wallis analysis was performed to compare the mean values. The least significant difference test was employed to determine differences between means at a 5% significance level. Significance of the results and statistical differences were analyzed using the Statistical Software Package for Windows PASW Statistic 18.0 (SPSS, Chicago, IL, USA).

3. Results and discussion

3.1. Measurements of radical-scavenging capacity

Radical-scavenging capacity of polyamines and the other antioxidants observed by the DPPH method is shown in Table 1. Since polyamines are amphiphilic compounds, the DPPH method was chosen as a screening procedure since it allows the free radical scavenging capacity to be measured in both hydrophilic and lipophilic media.

SPM and SPD showed different antioxidant capacities in both solvents. Under hydrophilic conditions the polyamine capacity towards the radical was almost five times lower than that measured for AA. On the contrary, in ethyl acetate, the antioxidant capacities of polyamines were similar to those measured for AT and PA and, approximately half that of OG.

Thus, compared to the other antioxidants, the radical scavenging capacity of polyamines was low in hydrophilic conditions but similar in lipophilic media. Therefore, the potential effect of polyamines as antioxidants in a lipid matrix such as oil was studied in more depth in the following assays. Kalantzakis, Blekas, Pegklidou, and Pegklidou (2006) also reported that the use of ethyl acetate as the solvent instead of methanol provides reliable measurements for lipophilic compounds.

3.2. Study of the concentration-dependent response of SPM and SPD

Fig. 2a shows the PV of oil spiked with SPM and SPD at three different concentrations (50, 100 and 150 $\mu\text{g/mL}$). Both SPM and SPD showed considerable antioxidant activity, slowing the peroxide formation. Thus, the PV in polyamine-spiked oil samples was lower than in the control.

Table 1

Radical-scavenging activity expressed mmol/L TROLOX by the DPPH method in ethyl acetate and methanol solvent. nm: not measured.

	Methanol	Ethyl acetate
Spermine	1.73 \pm 0.13	0.55 \pm 0.03
Spermidine	1.76 \pm 0.04	0.63 \pm 0.01
α -Tocopherol	nm	0.75 \pm 0.03
Palmitoyl-ascorbic acid	nm	0.70 \pm 0.01
Octyl gallate	nm	1.47 \pm 0.05
Ascorbic acid	7.93 \pm 0.13	nm

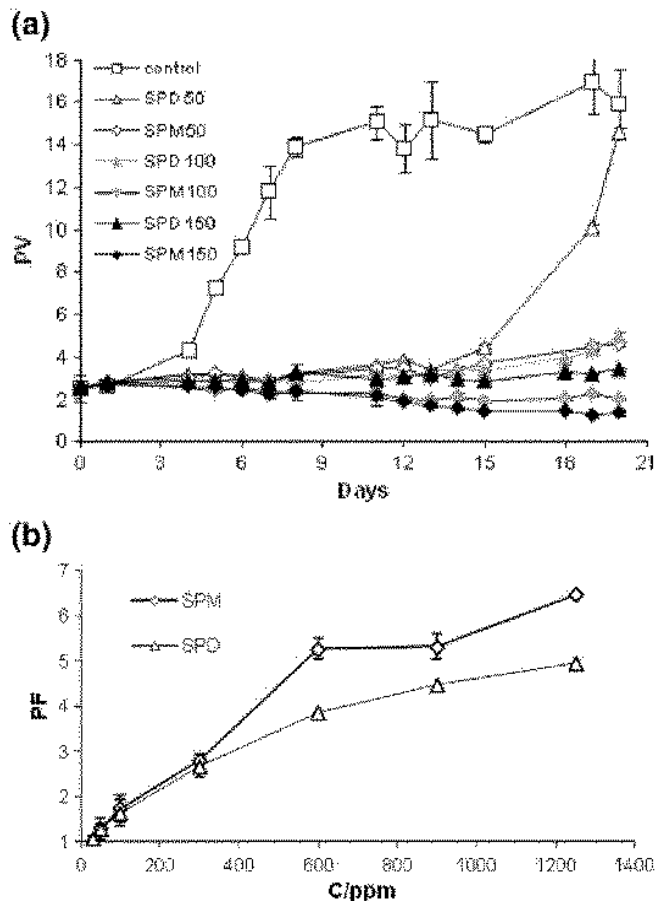


Fig. 2. (a) Evolution of the peroxide value (PV) at three concentrations of spermine (SPM) and spermidine (SPD) at 50, 100 and 150 µg/mL at 50 °C in oil samples in the dark and in contact with air, and (b) the concentration-dependent variations of the protection factor (PF) of soybean oil stabilized with SPM and SPD from 0 to 1250 µg/mL at 100 °C by the Rancimat test.

The less protective effect was shown by the sample supplemented with 50 µg/mL of SPD.

SPM was observed to be a more effective antioxidant than SPD, perhaps because the antioxidant activity of polyamines is related to the number of amine groups (Løvaas, 1991). Thus, SPM or $^+H_3N-(CH_2)_3-NH-(CH_2)_4-NH-(CH_2)_3-NH_3^+$ with four amine groups would be more efficient than SPD or $^+H_3N-(CH_2)_3-NH-(CH_2)_4-NH_3^+$ with three.

During storage, in oil samples spiked with 100 and 150 µg/mL of SPM, PV did not only increase but also dropped under the value measured at time zero. A plausible explanation is that SPM could slow new peroxide formation but could not stop the chain reaction. Therefore, the formed peroxides would continue reacting to become secondary products and consequently, the total amount of peroxides in oil decreased.

The second part of the study was to measure the polyamine antioxidant capacity in a later step of the oxidation process, under accelerated conditions, using the Rancimat test (Fig. 2b). It was observed that the addition of SPM at concentrations > 300 µg/mL was statistically more effective ($p < 0.05$) than the addition of the same amount of SPD.

Løvaas (1991) reported a linear concentration-dependent increase of the PF (measured at 70 °C) in fish oils stabilized with polyamines up to the concentration of 400 µg/mL of SPM and 300 µg/mL of SPD. In our study, we also found that PF of oil samples spiked with both polyamines followed a linear trend when the amount of SPM and SPD added was in the range reported by Løvaas (1991). However, at higher concentrations (ca. 600 µg/mL), the PF showed a saturation trend. The observed changes were better described by a logarithmic

model ($r = 0.9853$, $p < 0.001$ for SPD; $r = 0.9696$, $p < 0.001$ for SPM) than a linear model ($r = 0.9677$, $p < 0.001$ for SPD; $r = 0.9605$, $p < 0.001$ for SPM).

In conclusion, our results showed that both polyamines acted as antioxidants in both early and late steps of the oxidation process and that SPM was a more effective antioxidant than SPD.

3.3. Study of SPM and SPD antioxidant activity compared to other antioxidants at different stages of the oxidation process

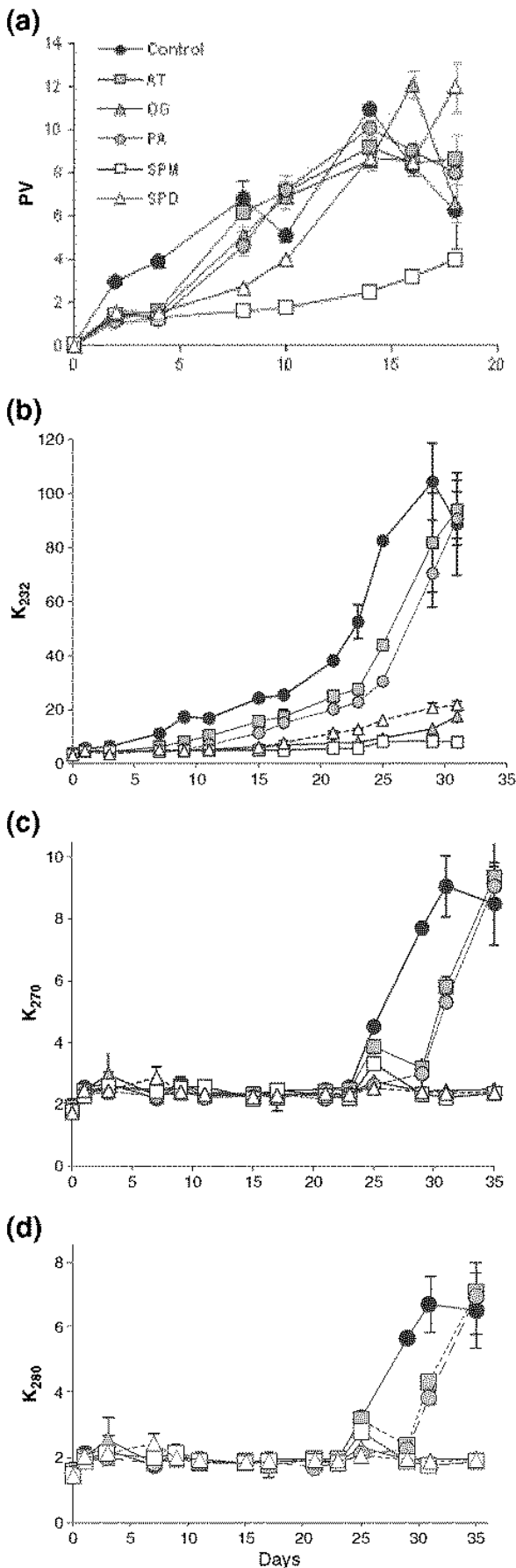
Fig. 3 shows the evolution of the PV (a), the specific extinction coefficients at 232 (b), 270 (c) and 280 nm (d) in control and oil samples stabilized by the addition of SPM, SPD, AT, OG and PA, and stored at 50 °C in darkness and exposed to air. The control, as expected, showed the characteristic pattern of generation and degradation of hydroperoxides. Some authors have pointed out that peroxide formation and destruction are very rapid. Peroxide compounds are primary products in the oxidation process, extremely reactive, and leading to the formation of hydroxyl and carbonyl compounds (Antequera et al., 1992; Guillén & Cabo, 2002). This could explain the notable increase and decrease in PV we observed. The PV of the control increased from the beginning of the experiment to reach a maximum value at day 14. Thereafter, a pronounced decrease of PV was observed until day 18, which was therefore chosen as the endpoint of the experiment.

All the samples spiked with antioxidants showed similar PV until day 4. Afterwards, differences were observed among all the antioxidants tested, but the PV of samples stabilized by SPM was always the lowest. Thus SPM was the most effective antioxidant in preventing the formation of the hydroperoxides and delaying the formation of the secondary oxidation compounds. Moreover, SPD was more effective than OG, AT and PA until day 14, after which its antioxidant effect was similar. These results agreed with Løvaas (1991) who did not observe any peroxide development in fish oil stabilized with SPM during 60 days of storage at room temperature (27 °C).

The more effective prevention of peroxide formation shown by SPM and SPD could be due to their particular mechanisms of action. OG, AT and PA are mainly free radical scavengers while polyamines can additionally act as chelators (Das & Misra, 2004). Polyamines could form complexes by chelating with cations like Cu and Fe (Løvaas, 1997). Polyamines can act as strong chelators due to the presence of a high number of chelating sites (nitrogen groups) (Løvaas, 1997).

Changes in specific extinction coefficients K_{232} , K_{270} , and K_{280} throughout the storage of the control and samples with antioxidants are shown in Fig. 3b, c and d, respectively. Among all the antioxidants, only polyamines delayed the formation of secondary oxidation compounds in comparison with the control, particularly conjugated trienes (Fig. 3c) and carbonyls (Fig. 3d). The antioxidant effect of SPD and SPM at this level was surprisingly high in comparison with that of the other natural antioxidants tested, AT and PA. Only the OG showed the same strong capacity against the formation of secondary oxidation compounds as polyamines. As previously observed for the PV, the K_{232} values also suggested that SPM has a bit more effective antioxidant capacity as SPD. If K_{270} and K_{280} values, which correspond to a later step in the oxidation process, had been monitored in samples stored over 35 days, they would probably have reflected the difference between the effects of both polyamines.

The TBARS value was also used to follow the oxidation process in control and oil-stabilized samples (data not shown). Changes in TBARS values throughout sample storage showed a similar evolution to the extinction coefficient values. Again, the polyamine antioxidant effect was stronger than that of AT and PA and similar to OG. Despite corresponding to different oxidation products, a parallel evolution of the three extinction coefficients and TBARS values was expected, since the four variables were measured at the same level of the chain oxidation reactions.



Triacylglycerols of oil under heating suffer a series of reactions, namely hydrolysis, oxidation, isomerization and finally, polymerization, which could affect the viscosity of the sample (Frankel, 1998). The polymeric compounds formed at the end of the oxidation process were not quantified in this work, but the apparent changes in viscosity due to their presence were easily observed in samples stored at 50 °C. The viscosity at the end of the assays was clearly lower in samples spiked with SPD and SPM than in the controls. Thus, from a qualitative point of view, it was observed that controls and oils added with AT and PA coagulated into a solid and sticky jelly, due to the accumulation of polymers. The samples with OG turned into a thick liquid, whereas those spiked with polyamines remained fluid. A similar gradation in viscosity was found in the samples used to perform Rancimat test. These results are consistent with those found by Løvaas (1991) in fish oils also supplemented with polyamines.

Table 2 compares the antioxidant capacity measured by different methods. Values in the table correspond to time points when control samples achieved the highest values of PV, K₂₃₀, K₂₇₀, K₂₈₀ and TBARS. These results were expressed as the percentage of inhibition of oxidation (%), as reported by Jacobsen, Let, Nielsen, and Meyer (2007) according to the following formula:

$$I\% = [1 - (\text{Value of antioxidant sample} / \text{Value of control})] \times 100.$$

In the PV test, SPM clearly showed the highest statistically significant value ($p < 0.05$) of 1% ($77.26\% \pm 1.3$). As mentioned before, SPM could also act as a chelating agent and, therefore, can delay the hydroperoxide formation for longer than other antioxidants. SPD showed a 1% value not statistically different ($p < 0.05$) from that obtained by OG and AT, but much higher than PA. The relative low activity of AT to prevent peroxide formation in comparison with SPM, SPD and OG could be due to the fact that temperatures $> 40\text{--}60$ °C reduce its antioxidant effect (Evans, Kodali, & Addis, 2002).

In all the specific extinction coefficients, the 1% for both polyamines and OG ranged from 70 to 90%, and no statistically significant differences were found among them ($p < 0.05$). However, the 1% of polyamines and OG was much higher ($p < 0.05$) than that of AT and PA, which ranged from 20 to 40%.

In the TBARS test, 1% values of SPM, SPD and OG were higher than the values of AT and PA ($p < 0.05$). In addition, all TBARS results were generally higher than those obtained from extinction coefficients. It is well known that the TBARS test is unspecific and on its own is unsuitable for studying the effects of antioxidants. However, it is a quick and simple test, widely used, and when applied together with other analytic measurements it provides useful information about the oxidation chain in advanced steps. Therefore, following the AOACS guidelines to assess the capacity of antioxidants, this test was also included in our study since it reinforced the results obtained from the determination of the extinction coefficients.

In conclusion, SPM is a more efficient antioxidant in the first steps of the oxidation process than the others studied in this work. In subsequent steps SPM showed similar efficiency to OG and SPD. AT and PA showed a lower antioxidant capacity in all the performed tests. While OG is a well-recognized artificial antioxidant compound widely used in the food industry, the relatively unknown polyamines are natural substances, and would be more appreciated by the consumers.

Finally, we studied the formation of volatile secondary oxidation products, measured by the Rancimat test, results being expressed as PF. The PF were 1.45 ± 0.06 , 1.48 ± 0.06 , 1.40 ± 0.06 , 1.34 ± 0.06 and 0.99 ± 0.01 for SPM, SPD, OG, PA and AT, respectively. Results showed that, as observed in previous tests, both polyamines had a stronger

Fig. 3. Evolution of peroxide value (PV) (a), specific extinction coefficients at 232 (b), 270 (c) and 280 nm (d) in oil samples stabilized with spermine (SPM), spermidine (SPD), α -tocopherol (AT), octyl gallate (OG) and 6-O-palmitoyl-L-ascorbic acid (PA) stored at 50 °C in dark and exposed to open air.

Table 2

Peroxide values, specific extinction coefficients at 232, 270 and 280 and TBARS value expressed as the percentage of inhibition of the oxidation (I%) stored at 50 °C in dark and exposed to open air. Values within each column followed by the same superscript letter are not significantly different $p < 0.05$.

	PV	K_{232}	K_{270}	K_{280}	TBARS
	14th day	29th day	31th day	31th day	29th day
Spermine	77.26 ^a ± 1.32	92.05 ^a ± 0.41	75.37 ^a ± 0.02	73.35 ^a ± 2.61	85.27 ^a ± 0.90
Spermidine	20.62 ^b ± 2.28	80.07 ^a ± 1.36	73.77 ^a ± 0.01	72.12 ^a ± 0.71	84.22 ^a ± 1.32
α-Tocopherol	16.14 ^b ± 1.41	21.65 ^b ± 4.13	34.94 ^b ± 1.55	38.61 ^b ± 5.53	63.45 ^b ± 0.92
Palmitoyl-ascorbic acid	8.08 ^c ± 4.29	32.44 ^b ± 5.12	41.34 ^b ± 5.77	42.62 ^b ± 4.56	55.05 ^b ± 0.87
Octyl gallate	21.86 ^b ± 4.82	87.54 ^a ± 1.27	72.87 ^a ± 0.93	71.44 ^a ± 1.71	82.50 ^a ± 1.26

antioxidant capacity than the other compounds unless OG, which PF was not statistically different ($p < 0.05$).

The PF of AT was not significantly different from 1 ($p < 0.05$), that is, it did not protect the oil from oxidation. As AT is highly sensitive to heat, the relatively high temperature (100 °C) used in the Rancimat test might have provoked its quick degradation (Evans et al., 2002). The antioxidant capacity of polyamines and other antioxidants measured by the Rancimat test generally showed the same pattern as observed in the tests performed at 50 °C. The polyamines were the most protective antioxidants together with OG, followed by AP and AT. Under the accelerated conditions studied (100 °C and 15 L/h of air flow), oxidation was very fast and the decomposition of hydroperoxides to secondary oxidation products was much more rapid than at 50 °C. High temperatures did not only accelerate the oxidative process, but also lowered oxygen solubility in oil and therefore the mechanisms of oxidation change in comparison with those at low temperatures. Consequently, the results of Rancimat are not directly comparable with those obtained by using stability tests at lower temperatures (Mancebo-Campos, Salvador, & Fregapane, 2007). Nevertheless, since the overall results of the Rancimat test were very similar to those of other tests and considering that it is easy and very quick to use, it constitutes a useful approach to the study of possible antioxidant activities.

3.4. Study of the antioxidant effect of SPM and SPD at extreme oxidation conditions

To confirm the extent of the antioxidant capacity of polyamines observed in the previous assays, an experiment under extreme oxidation conditions (high temperature, oxygen flow, and addition of Fe^{2+}) was carried out. Thus, a low amount of SPD or SPM was added to soybean oil in which oxidation was accelerated by adding increasing amounts of a solution of Fe^{2+} under the same conditions of temperature and oxygen flow. Fe^{2+} acts as a catalyzer since it forms coordination complexes with hydroperoxides, which generate free radicals and accelerate the oxidation process.

The results (Fig. 4) showed that both polyamines maintained a PF higher than 1, meaning soybean oil added with polyamines is less oxidized than control oil, until the iron concentration reached 1.4 mM in

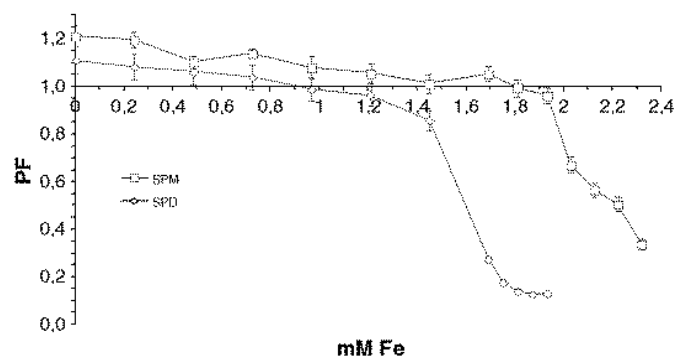


Fig. 4. Protection factor (PF) of soybean oil added with polyamines (0.15 mM) in front of iron (II) expressed in mM.

samples with SPD, and 1.9 mM in samples with SPM. Then in both cases, PF dropped drastically.

These results suggest that polyamines slowed the oxidation process acting as secondary antioxidants and chelating the iron. Both polyamines, at the assayed concentration, maintained the antioxidant capacity until a breaking point when the polyamine concentration was no longer enough to complex the Fe^{2+} present in the media. Again, SPM showed a more effective antioxidant protection than SPD. As mentioned before, SPM with four amine groups would be more efficient in chelating iron ions than SPD with three amine groups. Previous studies have reported that polyamines can form complexes with several metal ions, including Ni^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , and Zn^{2+} . The stability of the chelates depends on the position of the N-groups within the molecule and increases with the number of N-groups and the polyamine chain length (Hares, Ferneliu, & Douglas, 1956; Berstch, Ferneliu, & Block, 1958).

4. Conclusions

In summary, using different methodologies and approaches, we have demonstrated *in vitro* that SPD and SPM, which are naturally present in animal and vegetable food, are strong antioxidant compounds. Under the tested conditions, polyamines showed a higher antioxidant capacity than well-accepted natural or synthetic analogous food antioxidants, such as AT, PA and OG, particularly in the first steps of the oxidative process. In all the assays, SPM showed a higher antioxidant capacity than SPD. Their antioxidant activity seems to be related to their ability to chelate metals, but they could also act as radical scavengers, as observed in the DPPH assay. More studies are required to know the role of these compounds as dietary antioxidants and the possibility to supply the diet with them.

Acknowledgments

The authors would like to thank the "Direcció General de Recerca of the Generalitat de Catalunya" (2009-00668 SGR) for their support and the "Ministerio de Educación y Ciencia" (Spain) for awarding a grant to the PhD student Natalia Toro-Funes. This work was also supported by the "Centre Català de la Nutrició de l'Institut d'Estudis Catalans" (CCNIEC).

References

- Antequera, T., López-Bote, C. J., Córdoba, J. J., García, C., Asensio, M. A., & Ventanas, J. (1992). Lipid oxidative changes in the processing of Iberian pig hams. *Food Chemistry*, 45, 105–110.
- AOCS. American Oil Chemists Society (2009a). Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists Society. (6th ed.). Champaign, IL: AOCS Press [Cd 19-90, reapproved in 2009].
- AOCS. American Oil Chemists Society (2009b). Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists Society. (6th ed.). Champaign, IL: AOCS Press [Cd 12b-92, reapproved in 2009].
- AOCS. American Oil Chemists Society (2009c). Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists Society. (6th ed.). Champaign, IL: AOCS Press [Cg 5-97, reapproved in 2009].
- Badarinath, A. V., Mallikarjuna, K., Madhu-Sudhana-Chetty, C., Ramkanth, S., Rajan, T. V. S., & Gnanaprakash, K. A. (2010). Review on *in-vitro* antioxidant methods: Comparisons, correlations and considerations. *International Journal of PharmTech Research*, 2, 1276–1285.

- Bardocz, S. (1995). Polyamines in food and their consequences for food quality and human health. *Trends in Food Science and Technology*, 6, 341–346.
- Berstch, C. R., Fernelius, W. C., & Block, B. P. (1958). A thermodynamic study of some complexes of metal ions with polyamines. *Journal of Physical Chemistry*, 62, 444–450.
- Das, K. C., & Misra, H. P. (2004). Hydroxyl radical scavenging and singlet oxygen quenching properties of polyamines. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 262, 127–133.
- Douki, T., Bretonniere, Y., & Cadet, J. (2000). Protection against radiation-induced degradation of DNA bases by polyamines. *Radiation Research*, 153, 29–35.
- European Commission Regulation EEC/2568/91 of 11 July 1991 on the characteristics of olive oil and olive-residue oil on the relevant methods of analysis. *Official Journal of European Communities*, 248, 52–55.
- Evans, J. C., Kodali, D. R., & Addis, P. B. (2002). Optimal tocopherol concentrations to inhibit soybean oil oxidation. *Journal of the American Oil Chemical Society*, 79, 47–51.
- Fang, Y. Z., Yang, S., & Wu, G. (2002). Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*, 18, 872–879.
- Frankel, E. N. (1998). *Lipid oxidation*. Dundee, Scotland: The Oil Press [300 pp.].
- Frankel, E. N., & Finley, J. W. (2008). How to standardize the multiplicity of methods to evaluate natural antioxidants. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 56(13), 4901–4908.
- Frankel, E. N., & Meyer, A. S. (2000). The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 1925–1941.
- Groppa, M. D., Tomaro, M. L., & Benavides, M. P. (2007). Polyamines and heavy metal stress: The antioxidant behavior of spermine in cadmium- and copper-treated wheat leaves. *BioMetals*, 20, 185–195.
- Guillén, M. D., & Cabo, N. (2002). Fourier transform infrared spectra data versus peroxide and anisidine values to determine oxidative stability of edible oils. *Food Chemistry*, 77, 503–510.
- Hares, G. B., Fernelius, W. C., & Douglas, B. E. (1956). Equilibrium constants for the formation of complexes between metal ions and polyamines. *Journal of the American Chemistry Society*, 78, 1816–1818.
- Huang, D., Ou, B., & Prior, R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 53, 1841–1856.
- Jacobsen, C., Let, M. B., Nielsen, N. S., & Meyer, A. S. (2007). Antioxidant strategies for preventing oxidative flavour deterioration of foods enriched with n-3 polyunsaturated lipids: A comparative evaluation. *Trends in Food Science and Technology*, 19, 76–93.
- Kalantzakis, G., Blekas, G., Pegklidou, K., & Pegklidou, D. (2006). Stability and radical-scavenging activity of heated olive oil and other vegetable oils. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 108, 329–335.
- Khanna, R. S., Pandey, A., Negi, R., Pande, D., Karki, K., Khanna, H. D., et al. (2011). Characterization and evaluation of antioxidant activity. *Indian Journal of research*, 5, 40–47.
- Kim, H. J., Hamhm, T. S., & Min, D. B. (2007). Hydroperoxide as prooxidant in the oxidative stability of soybean oil. *Journal of American Oil Chemical Society*, 84, 349–355.
- Lagishetty, C. V., & Naik, S. R. (2008). Polyamines: Potential anti-inflammatory agents and their possible mechanism of action. *Indian Journal of Pharmacology*, 40(3), 121–125.
- Larqué, E., Sabater-Molina, M., & Zamora, S. (2007). Biological significance of dietary polyamines. *Nutrition*, 23, 87–95.
- Leonardis, A., & Macciola, V. (2002). Catalytic effect of the Cu(II)- and Fe(III)-cyclohexanebutyrates on olive oil oxidation measured by Rancimat. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 104, 140–199.
- Løvaas, E. (1991). Antioxidative effects of polyamines. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 68, 353–358.
- Løvaas, E. (1997). Antioxidative and metal-chelating effects of polyamines. *Advances in Pharmacology*, 38, 119–149.
- Mancebo-Campos, V., Salvador, M. D., & Fregapane, G. (2007). Comparative study of virgin olive oil behavior under Rancimat accelerated oxidation conditions and long-term room temperature storage. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 55, 8231–8236.
- Minois, N., Carmona-Gutierrez, D., & Madeo, F. (2011). Polyamines in aging and disease. *Aging*, 3(8).
- Moinard, C., Cynober, L., & de Bandt, J. P. (2005). Polyamines: Metabolism and implications in human diseases. *Clinical Nutrition*, 24, 184–197.
- Nishibori, N., Fujihara, S., & Akatuki, T. (2007). Amounts of polyamines in foods in Japan and intake by Japanese. *Food Chemistry*, 100, 491–497.
- Odnizola-Serrano, I., Soliva-Fortuny, R., & Martín-Belloso, O. (2008). Changes of health-related compounds throughout cold storage of tomato juice stabilized by thermal or high intensity pulsed electric field treatments. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 9, 272–279.
- Prior, R. L., Wu, X., & Schaich, K. (2005). Standardized methods for determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 53, 4290–4302.
- Sánchez-Moreno, C. (2002). Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Science and Technology International*, 8, 121–137.
- Shantha, N. C., & Decker, E. A. (1994). Rapid, sensitive, iron-based spectrophotometric methods for determination of peroxide values of food lipids. *Journal of AOAC International*, 77(2), 421–424.
- Soda, K. (2010). Polyamine intake, dietary pattern, and cardiovascular disease. *Medical Hypotheses*, 75, 299–301.
- Soda, K., Kano, Y., Nakamura, T., Kasono, K., Kawakami, M., & Konishi, F. (2005). Spermine, a natural polyamine, suppresses LFA-1 expression on human lymphocyte. *Journal of Immunology*, 175, 237–245.
- Sun, T., & Tanumihardjo, S. A. (2007). An integrated approach to evaluate food antioxidant capacity. *Journal of Food Science*, 72, R159–R165.
- Tadolini, B. (1988). Polyamine inhibition of lipoperoxidation — The influence of polyamines on iron oxidation in the presence of compounds mimicking phospholipid polar heads. *Journal of Biochemistry*, 249, 33–36.

Comunicación escrita III.

M.T. Veciana-Nogues, M. Teruelo de Luis, **N. Toro-Funes**, M.C. Vidal-Carou. Posible mecanismo de acción de las poliaminas como antioxidantes. "V Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (CyTA)". Murcia (España). 26-29 Mayo del 2009.

ESTUDIO DEL POSIBLE MECANISMO ANTIOXIDANTE DE LAS POLIAMINAS

Veciana-Nogués, M.T; Teruelo de Luis, M.Á.; Toro-Funes, N.; Vidal-Carou, M.C.

Departamento de Nutrición y Bromatología-CeRTA, Facultad de Farmacia, Universitat de Barcelona
 Av. Joan XXIII s/n 08028 Barcelona, mcvidal@ub.edu



OBJETIVO

Entre las funciones biológicas de las poliaminas espermina (SPM) y espermidina (SPD) se halla la capacidad de actuar como antioxidantes, principalmente sobre lípidos de membrana, proteínas y ácidos nucleicos. También ha sido estudiada su actividad antioxidante en lípidos alimenticios [1-4]. No obstante, el mecanismo que permite explicar esta actividad no está claro, y se han descrito diferentes posibilidades [1]. De todas ellas, tan solo dos (que actúen como captadores de radicales y otras especies reactivas de oxígeno -antioxidantes primarios- o que actúen como quelantes de iones metálicos dificultando que estos catalicen la creación de radicales -antioxidantes secundarios) son posibles en aceites. El propósito de este trabajo es determinar si la actividad antioxidante de las poliaminas es dosis dependiente, y determinar el mecanismo por el que SPM y SPD son capaces de evitar la oxidación en una fase lipídica continua.

MATERIAL Y MÉTODOS

Muestras: aceite de soja de calidad farmacopea empleado como modelo de matriz fácilmente oxidable, sobre el que se realizaron tres pruebas:

Variación en el porcentaje de protección en función de la concentración de poliaminas. Muestras de aceite, adicionado con concentraciones crecientes de cada una de las poliaminas, fueron oxidadas en un equipo Rancimat 679 a 100°C y un flujo de aire de 15L/hora para determinar su Índice de Estabilidad Oxidativa [5] y poder calcular el porcentaje de protección a cada concentración de poliamina.

Efecto de la adición de poliaminas sobre un aceite previamente oxidado. Muestras de aceite fueron oxidadas en la oscuridad y en contacto con el aire [7]. Su estado de oxidación se siguió midiendo los coeficientes de extinción específicos K_{232} , K_{270} y K_{280} [8] en espectrofotómetro UV-Vis Shimadzu UV-3600. Cuando estos coeficientes comenzaron a aumentar, las muestras fueron adicionadas con cada una de las poliaminas disueltas en butanol a una concentración de 100ppm y se siguieron monitorizando dichos coeficientes.

Variación en el porcentaje de protección en función de la concentración de metal. Muestras de aceite, adicionado con concentraciones crecientes de una solución de hierro (II) en cloroformo:metanol 7:3 y cantidades constantes de cada una de las poliaminas [6], fueron oxidadas en un equipo Rancimat 679 para determinar su Índice de Estabilidad Oxidativa [5] y poder calcular el porcentaje de protección a cada concentración de hierro.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

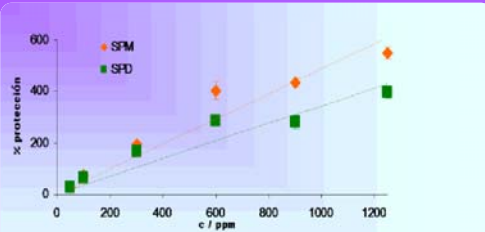


Figura 1: Variación del porcentaje de protección ofrecido por ambas poliaminas al aceite en función de su concentración

En la figura 1 se observa que ambas poliaminas muestran un acusado comportamiento dosis dependiente, con tendencia a perder la linealidad cuando se añaden dosis de poliaminas superiores a 600ppm.

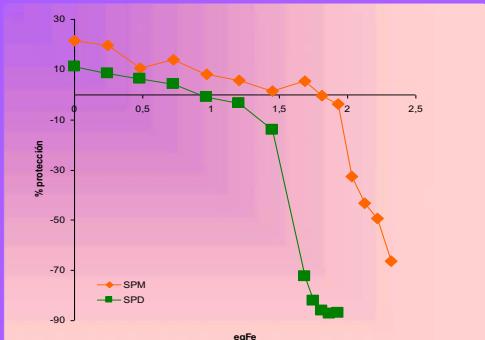


Figura 2: Variación del porcentaje de protección ofrecido por ambas poliaminas al aceite en función de la relación de concentraciones entre la poliamina y el hierro añadidos.

La figura 2 representa el porcentaje de protección contra la relación estequiométrica amina/metal añadidos (representada como cantidad equivalente de hierro, siendo un equivalente la concentración equimolecular). Se observa una disminución paulatina en la protección que ofrece la amina hasta llegar a un punto de saturación, en que la protección cae abruptamente. Esto se correspondería con el comportamiento propio de un quelante, que no podría ofrecer protección ante la oxidación cuando la concentración de metal prooxidante fuese muy superior a la suya. Un captador de radicales, por el contrario, mostraría una reducción rápida y sostenida al agotarse tras actuar.

No se observan diferencias entre el control o las muestras adicionadas de poliaminas (figura 3). En ninguno de los tres coeficientes estudiados. Ello indica que, una vez se alcanza un cierto nivel de oxidación, la adición de poliaminas no comporta actividad antioxidante, lo que apunta hacia un mecanismo tipo antioxidante secundario.

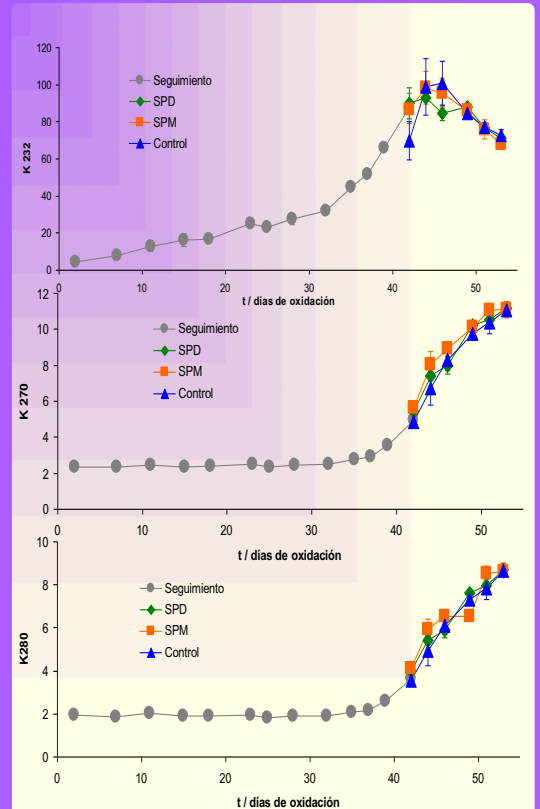


Figura 3: Evolución de los coeficientes de extinción específicos a 232, 270 y 280 nm, respectivamente, en muestras preoxidadas adicionadas con cada una de las poliaminas estudiadas.

CONCLUSIONES

Pese a que ninguna de las tres evidencias anteriores es suficiente por sí sola para determinar el mecanismo de actuación de las poliaminas como antioxidantes, la acumulación de evidencias concurrentes permite deducir que dicho mecanismo se basa en su capacidad para quelar iones metálicos y desactivar con ello su actividad como generadores de radicales. Por tanto, se puede concluir que las poliaminas SPM y SPD actúan como antioxidantes secundarios en aceites. No obstante, el mecanismo de actuación en otras matrices (emulsiones, sistemas biológicos) puede ser distinto y ajustarse a cualquier otro de los sistemas descritos en la literatura.

BIBLIOGRAFÍA: [1] Løvaas, E. Antioxidant and Metal-Chelating Effects of Polyamines. *Adv Pharmacol* 38 (1997) 119-149. [2] Løvaas, E. Antioxidative Effects of Polyamines. *JAOCS* 68 (1991) 353-358. [3] Millán Ballester, M. et al. Poster en el "II Simposio Internacional de Alimentos Funcionales", Las Rozas (Madrid), 2006. *Nut Clin XXVI:2* (2006) 201. [4] Teruelo de Luis, M.Á. et al. Poster en el "VI Congreso Internacional de Barcelona sobre la Dieta Mediterránea", Barcelona, 2008. Libro de resúmenes, p226. [5] Método Oficial de la AOCS Cd 12b-92 "Oil Stability Index (OSI)". [6] De Leonardis, A. & Macciola, V. Catalytic effect of the Cu(II)- and Fe(II)-cyclohexanbutyrates on olive oil oxidation measured by Rancimat. *Eur J Lipid Sci Technol* 104 (2002) 156-160. [7] AOCS Recommended Practice Cg 5-97 "Oven Storage Test for Accelerated Aging of Oils". [8] Regulación de la Comisión Europea EEC/2568/91 de 11 de Julio de las características de aceite de oliva y residuos de aceite de oliva en los métodos relevantes de análisis. *Off J Eur Communities* L248 (1991)52-55.

AGRADECIMIENTOS: Los autores desean mostrar su agradecimiento por el apoyo financiero a la Dirección General de Investigación del Ministerio de Educación y Ciencia (proyecto AGL-04640/ALI) y a la Generalitat de Catalunya (proyecto SGR 2005-0237) i al CCNIEC (Centre Català de la Nutrició de l'Institut d'Estudis Catalans).

10.2. Metabolismo intracelular de las isoflavonas en células endoteliales humanas.

Artículo XI.

N. Toro-Funes, M.T. Veciana-Nogués, M.C. Vidal-Carou, J.P.E. Spencer, A. Rodríguez-Mateos: The intracellular metabolism of isoflavones in endothelial cells. Journal of Agricultural and Food Chemistry, En revision.

Índice de impacto (JCR 2012): 2.906

Posición en área "Food and Science Technology": 15/124

Artículo XII.

A. Rodríguez-Mateos, **N. Toro-Funes**, T. Cifuentes-Gomez, M. Cortese-Krott, H. Schroeter, C. Heiss, J. P. E. Spencer (2014). Uptake and metabolism of (-)-epicatechin in endothelial cells. Archives of Biochemistry and Biophysics, In Press.

Índice de impacto (JCR 2012): 3.370

Posición en área "Biochemistry & Molecular Biology": 103/290

Comunicación escrita IV.

N. Toro-Funes, A. Rodríguez-Mateos, J. P. E. Spencer, M. T. Veciana-Nogués, M. C. Vidal-Carou. Intracellular metabolism of isoflavones in endothelial cells. "IUNS 20th International Congress of Nutrition". Granada (España). 15-20 Septiembre del 2013.

10.2.1. Planteamiento y objetivo del estudio

Uno de los efectos beneficiosos atribuidos a las isoflavonas, de igual manera que a los flavonoides, es la prevención frente a enfermedades cardiovasculares. Algunos estudios sugieren que las isoflavonas controlan las funciones de adhesión del endotelio vascular, mediante la regulación de los mecanismos clave de control de las moléculas de adhesión endoteliales, la función de la integrina de los monocitos, citoquinas y quimiocinas y la migración de los monocitos (Squadrito, et al., 2002; Rimbach, et al., 2008; De Andrade, et al., 2011; Zhang, et al., 2013). La ingesta de flavonoides podría inhibir el proceso inflamatorio asociado con la aterogénesis, reduciendo el riesgo de las enfermedades cardiovasculares.

El grupo de investigación de Nutrición Molecular de la Universidad de Reading (UK), en el que se ha realizado la estancia predoctoral, está realizando estudios para evaluar el efecto cardioprotectivo de los flavanoles, en concreto la epicatequina, en modelos *in vivo* e *in vitro*. Su interés en la elucidación de los mecanismos de acción de los flavonoides se ha centrado en la bioactividad de flavonoides y sus metabolitos, glucurónidos, sulfatos y *O*-metilados, en modelos de células humanas y animales. Sin embargo, en la actualidad aún no está claro si los flavonoides y sus metabolitos son absorbidos y metabolizados por las células, lo que resulta importante para la comprensión de los mecanismos de acción en el sistema vascular.

El metabolismo de las isoflavonas y los flavanones ha sido observado en modelos de células del tracto gastrointestinal, tales como los enterocitos y células Caco-2 en monocapa, o en modelos de células hepáticas, pero se ha prestado poca atención al potencial metabolismo intracelular de las isoflavonas en otras células humanas, tales como las células humanas endoteliales de la vena umbilical (HUVEC), a pesar de ser un modelo *in vitro* ampliamente utilizado para la evaluación de los mecanismos de acción de las isoflavonas en el endotelio vascular. No hay información disponible sobre el metabolismo intracelular de las isoflavonas en células endoteliales. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo es colaborar en el estudio del metabolismo intracelular de la epicatequina y sus metabolitos en células endoteliales utilizando hepatocitos HepG2 (modelo de células hepáticas) y células Caco-2 en monocapa (modelo de células intestinales) como controles positivos. Una vez finalizada la estancia predoctoral, utilizando el mismo modelo experimental con las isoflavonas.

10.2.2. Diseño experimental

Primero, se realiza una prueba de estabilidad de la epicatequina (EC) y sus metabolitos glucuronidos, sulfatos y metilados y de las isoflavonas, genisteína (Ge), daidzeína (De) y equol (Eq) en medio basal endotelial durante 24 horas.

Para los experimentos del metabolismo de la EC y sus metabolitos y las isoflavonas en las líneas celulares de HUVEC y HepG2, se añadieron cantidades apropiadas de EC (0, 0,1, 1 y 10 μM) y sus metabolitos (0,25 μM) y de Ge, De y Eq (0, 1, 10 y 100 μM) al medio de crecimiento de las líneas celulares HUVEC y HepG2. Para los experimentos en las células en monocapa Caco-2, se añadieron las mismas cantidades de los flavanoles y las isoflavonas a la parte apical de los insertos para estudiar su transporte. En todos los casos, las células se incubaron a 37°C en una atmósfera humidificada de 5% CO_2 durante 1 hora para los flavanoles y durante 2 horas para las isoflavonas.

Después de la incubación, se recogieron los sobrenadantes de todos los experimentos y se guardaron a -80°C para el análisis. Las células fueron extraídas, lisadas y guardadas a 80°C para el análisis.

10.2.3. Resultados y discusión

Estabilidad de la epicatequina y sus metabolitos y de las isoflavonas

La EC y sus metabolitos se mantuvieron estables en el medio celular después de 1 h de incubación a 37 °C, con niveles decrecientes de $10,2 \pm 1\%$ para la EC, y entre $0,4 \pm 1\%$ y $8,3 \pm 3\%$ para los metabolitos.

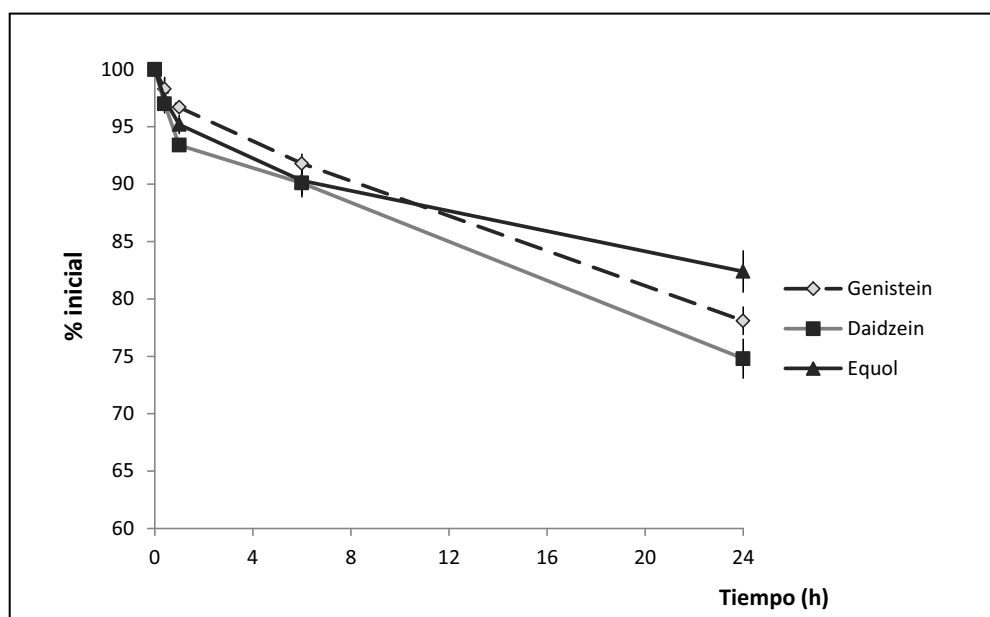
Las concentraciones iniciales de Ge, De y Eq en medio celular a 37 °C disminuyeron alrededor del $5 \pm 2\%$ después de 2 horas de incubación, y alrededor del $78 \pm 1\%$, $75 \pm 2\%$ y $82 \pm 2\%$ de Ge, De y Eq, respectivamente, después de 24 horas (Figura 10.2.1).

Metabolismo intracelular de la epicatequina y sus metabolitos en HUVEC

En cuanto al metabolismo intracelular de la EC en HUVEC, cuando se incubó EC, la EC y los metabolitos 3-metil-epicatequina-7-glucuronido y 3-metil-epicatequina-7-sulfato se detectaron tanto en el sobrenadante como asociados a las células (Figura 10.2.2). Alrededor de un 2% de EC y sus metabolitos se encontraron asociados a las células. Aproximadamente un

52% de la EC total intracelular fue 3-metil-epicatequina-7-glucuronido, un 24% fue 3-metil-epicatequina-7-sulfato y el 26% fue EC. Estos resultados indican que la EC entra en las células y es metabolizada antes de ser expulsada al medio extracelular a sus conjugados glucurónidos, sulfatos y metilados.

Figura 10.2.1. Perfil de estabilidad de las isoflavonas en medio celular a 37 °C.



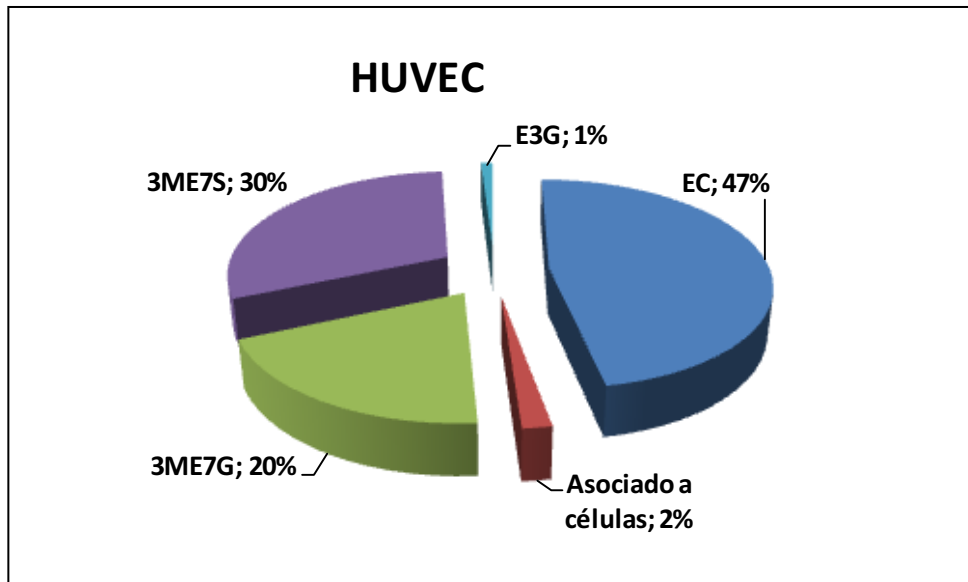
Por otro lado, cuando el mix de los metabolitos glucuronidos, sulfatos y metilados de EC se incubó en HUVEC durante 1 hora, no se detectó ni EC ni ningún metabolito en el sobrenadante ni en las células. Estos resultados coinciden con estudios realizados en otros modelos celulares (fibroblastos y en neuronas corticales) en los que se demuestra que los metabolitos de EC no son transportados a través de la membrana celular (Spencer, et al., 2001).

Metabolismo intracelular de la epicatequina y sus metabolitos en células HepG2 y Caco-2

Cuando se incubó EC en células HepG2, la EC y sus conjugados metil-glucuronidos y metil-sulfatos se detectaron tanto en el sobrenadante como asociados a las células. Aproximadamente el 50% del total de EC se metabolizó en los conjugados metil-glucurónidos y metil-sulfatos (tal como se muestra en la Figura 10.2.3). En las células en monocapa Caco-2, la EC y sus conjugados glucuronidos, metil-glucuronidos y metil-sulfatos se detectaron tanto en la

parte apical como en la parte basolateral indicando que la EC es metabolizada y transportada junto a sus metabolitos a través de la monocapa celular (Figura 10.2.4).

Figura 10.2.2. Resumen del metabolismo celular de la epicatequina en HUVEC.



Además, cuando el mix de los metabolitos glucuronidos, sulfatos y metilados de EC se incubó en células HepG2 y Caco-2 durante 1 hora, ni EC ni ningún metabolito se detectaron en el medio ni asociados a las células.

Figura 10.2.3. Resumen del metabolismo de la epicatequina en las células HepG2.

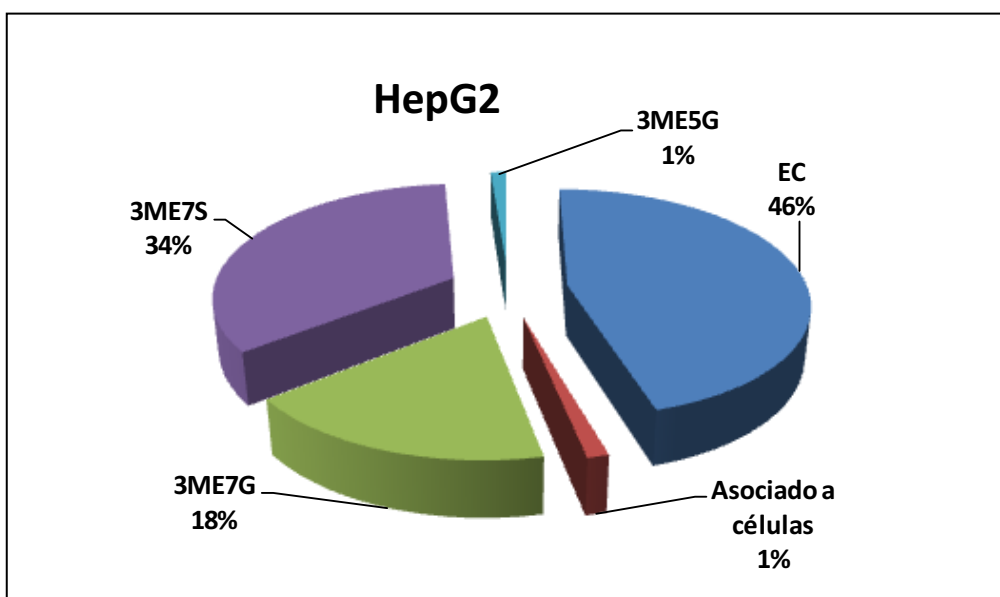
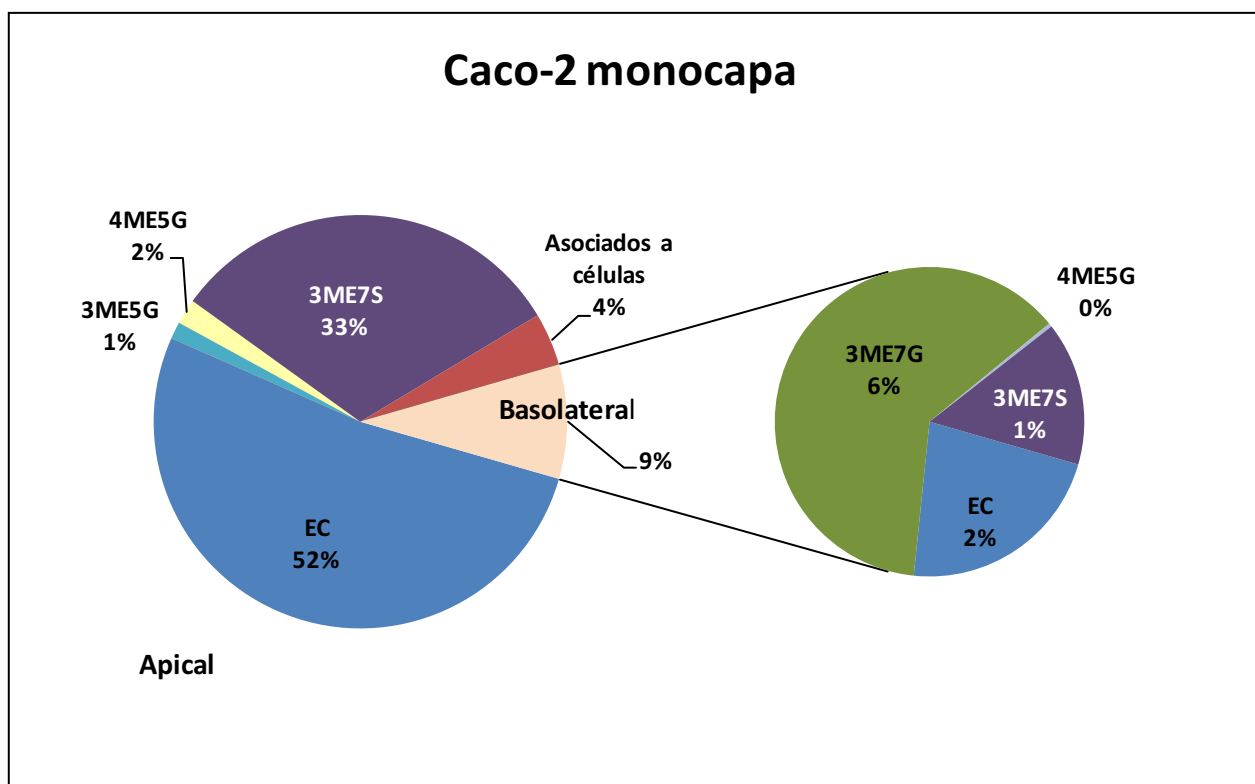


Figura 10.2.4. Resumen del metabolismo de la epicatequina en las células Caco-2.



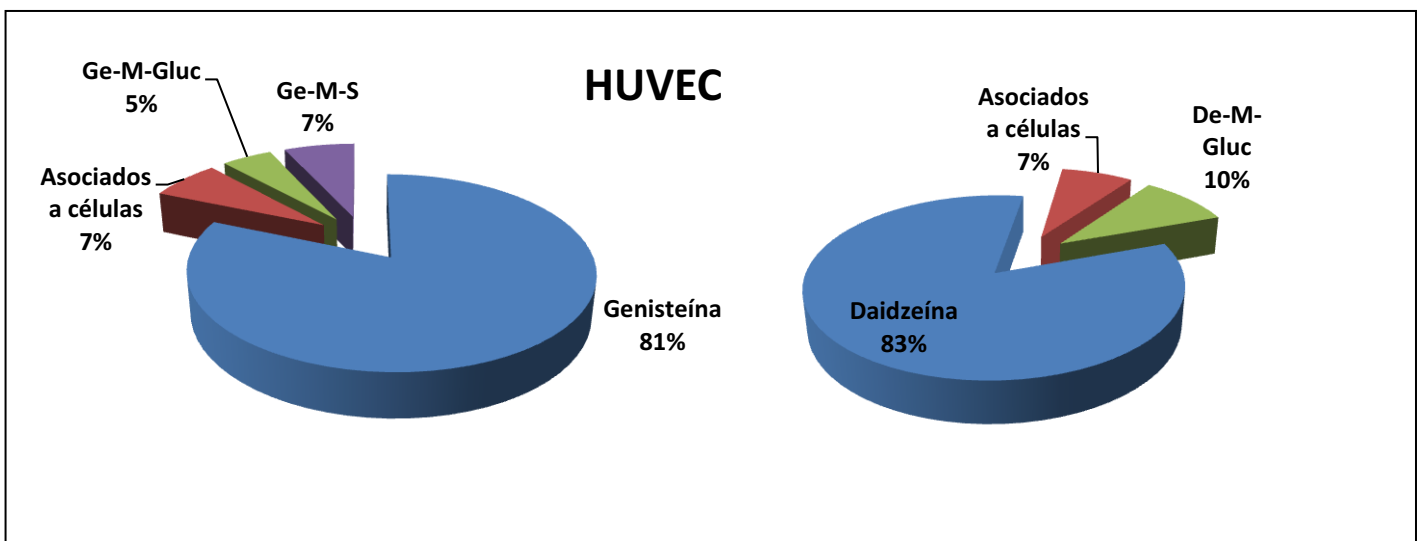
Metabolismo intracelular de las isoflavonas en HUVEC

Cuando se incubó Ge en las células HUVEC, se detectaron la Ge y sus metabolitos genisteina-metil-glucuronido y genistein-metil-sulfato en el sobrenadante y asociados a las células, indicando que Ge entra dentro de las células y es metabolizada. Se encontró un 6-7% del porcentaje de Ge y sus metabolitos en las células, tal como se observa en la Figura 10.2.5. Los metabolitos de Ge representaban entre el 14-19% del total distribuidos tanto en el sobrenadante como asociados a las células.

Cuando se incubó De en las células HUVEC, tanto la De como la daidzeina-metil-glucuronido se detectaron en el sobrenadante y en los lisados celulares, indicando también que De entra dentro de las células y es metabolizada (Figura 10.2.5). Aproximadamente el 5-8% de De se encontró asociada a las células endoteliales, mostrando un comportamiento similar al de Ge. Su metabolito metil-glucuronido representaba el 10-15% del total de De.

Nuestros resultados indican que Ge y De son metabolizadas por las células endoteliales a sus conjugados glucurónidos, sulfatos y metilados probablemente por la acción de UDP glucuronosiltransferasas (UGT), sulfotransferasas, y catecol-O-metiltransferasas (COMT). Al encontrarse los metabolitos tanto en el medio como asociados a las células indica que Ge y De entran en las células y son metabolizadas antes de ser expulsada al medio extracelular.

Figura 10.2.5. Metabolismo de las isoflavanas, genisteína y daidzeína en HUVEC.



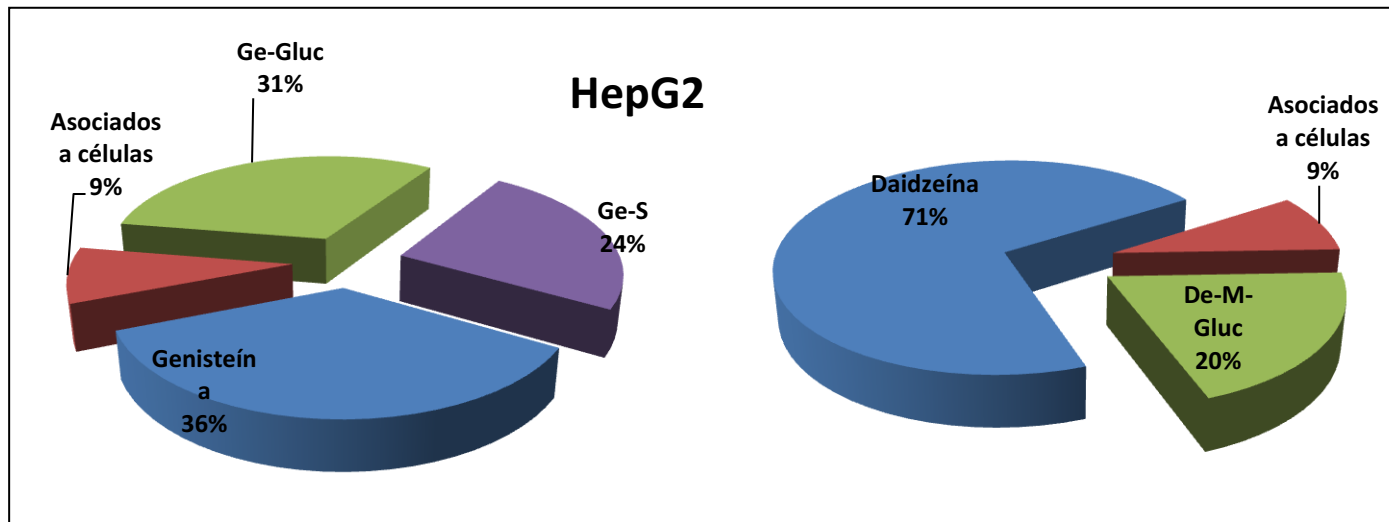
Por otro lado, cuando se incubó el Eq en las células HUVEC, no se detectó ningún metabolito y solamente se detectó el Eq tanto en el sobrenadante como en el lisado celular, indicando que el compuesto entra dentro de las células pero no se metaboliza.

Metabolismo intracelular de las isoflavonas en células HepG2 y Caco-2

Cuando se incubó Ge fue en las células HepG2, se detectaron la Ge y sus metabolitos glucuronidos y sulfatos en el sobrenadante y en las células (Figura 10.2.6). Se metabolizó alrededor del 50% del total de Ge a 1 y 10 μM , y alrededor del 20% a 100 μM . Prácticamente toda la Ge en las células se metabolizó a glucurónidos (60-70%) y a sulfatos (30-40%). Cuando se incubó De en las células HepG2, se detectaron la De y sus metabolitos glucuronidos y sulfatos en el sobrenadante y en las células. Estos resultados están en consonancia con los

observados por Bursztyka, et al. (2008) y Chen et al. (2008), en los que los conjugados glucurónidos son los metabolitos mayoritarios en hepatocitos, junto con los sulfatos.

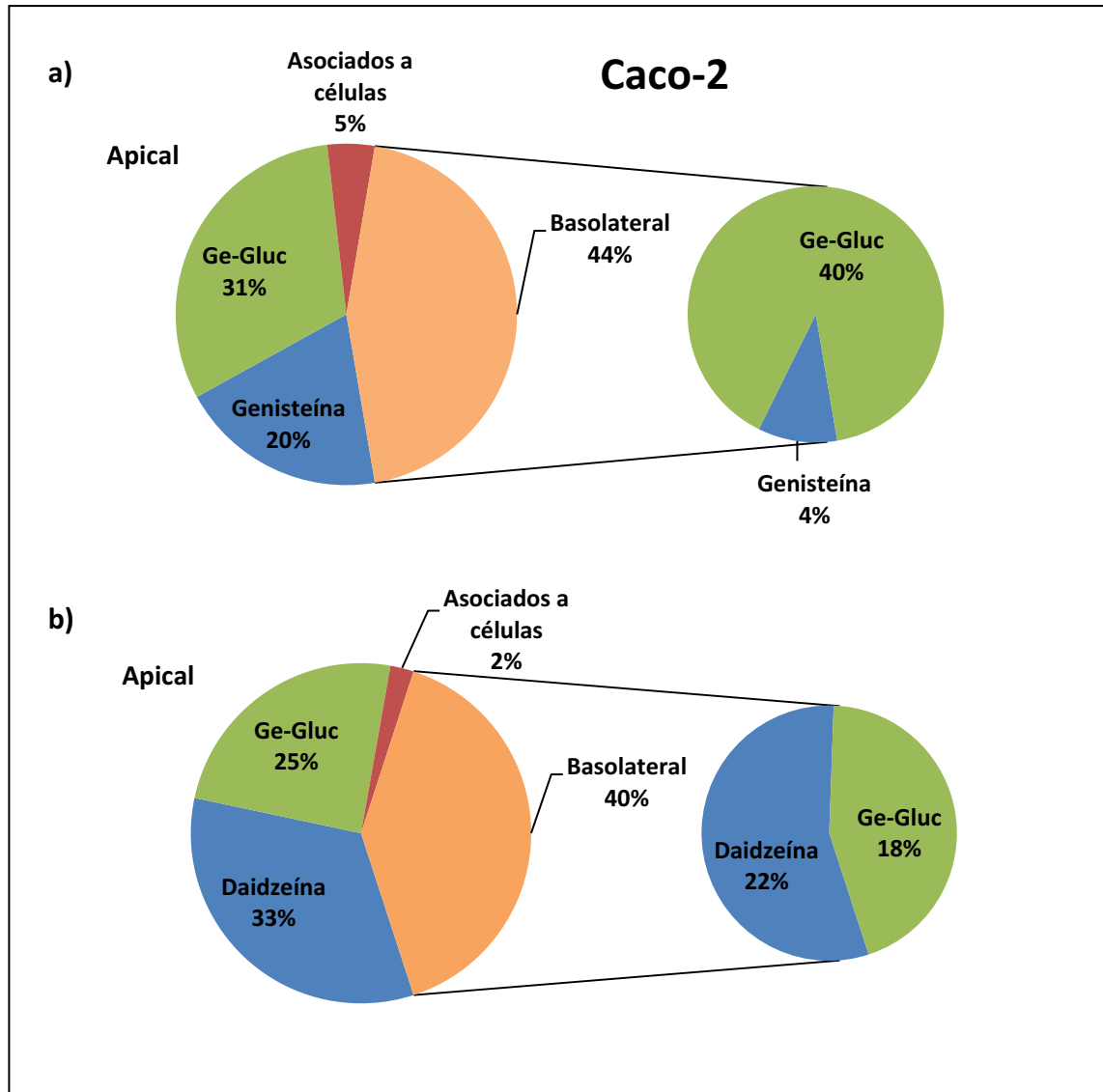
Figura 10.2.6. Metabolismo de las isoflavonas genisteína y daidzeína en células HepG2



Cuando Ge y De se incubaron en las células en monocapa Caco-2, se observó que Ge y De entraron dentro de las células, fueron metabolizadas a metabolitos glucuronidos, y en menor grado a sulfatos (Figura 10.2.7). Estos metabolitos fueron excretados a la parte apical (30-40%) y a la parte basolateral (40-50%) de la membrana. Murota et al. (2002) y Chen et al. (2005) descubrieron similares resultados en células Caco-2. los conjugados sulfatados de Ge y De no se pudieron cuantificar debido al límite de cuantificación del método.

Respecto al metabolismo de Eq en células HepG2, se detectaron Eq y sus metabolitos sulfatados en el sobrenadante y/o asociados a células, sugiriendo que la sulfatación es la ruta metabólica principal del Eq en este tipo de células, lo que resulta en consonancia con un estudio previo realizado por Loukovaara et al. (1995) en que Eq es principalmente sulfatado (alrededor del 95% del total de Eq) en células HepG2. Los conjugados sulfatados no pudieron ser cuantificados al encontrarse a niveles inferiores al límite de cuantificación. En las células Caco-2 en monocapa, el Eq se detectó tanto en la parte apical y basolateral de la membrana como asociadas a las células, mientras que no se detectó ningún metabolito, indicando que este compuesto se transporta a través de las células pero no ha sido metabolizado. En células Caco-2 se ha descrito que el Eq se metaboliza a conjugados de Fase II, pero no se ha establecido qué clase de conjugados.

Figura 10.2.7. Resumen del metabolismo de las isoflavonas genisteína (a) y daidzeína (b) en células Caco-2 en monocapa.



La tabla 10.2.1 muestra un resumen del metabolismo de las isoflavonas en los modelos celulares investigados después de la incubación de Ge, De y Eq durante 2 horas. Las células HUVEC fueron capaces de metabolizar la Ge mediante glucuronidación, sulfatación y metilación, mientras que la De fue glucuronizada y metilada pero no sulfatada. Las células HepG2 y Caco-2 en monocapa fueron capaces de glucuronidar y sulfatar a Ge y De fue solamente glucuronizada. El Eq no fue metabolizado por las células HUVEC y Caco-2 en mononaca, mientras que las HepG2 fueron capaces de sulfatarlo.

Tabla 10.2.1. Resumen del metabolismo las isoflavonas en las líneas celulares HUVEC, HepG2 y Caco-2.

	HUVEC	HepG2	Caco-2
<i>Glucuronidos</i>	Ge-M-G / De-M-G	Ge-G / De-G	Ge-G / De-G
<i>Sulfatos</i>	Ge-M-S	Ge-S / De-S / Eq-S	Ge-S / De-S
<i>Metilados</i>	Ge-M-G / Ge-M-S / De-M-G	-	-
<i>Aglicona</i>	Ge / De / Eq	Ge / De / Eq	Ge / De / Eq

Abreviaturas: genisteína (Ge), daidzeína (De), equol (Eq), genisteína-metil-glucuronido (Ge-M-G), genisteína-metil-sulfato (Ge-M-S), daidzeína-metil-glucuronido (De-M-G), genisteína-glucurónido (Ge-G), genisteína-sulfato (Ge-S), daidzeína-glucuronido (De-G), daidzeína-sulfato (De-S), equol-sulfato (Eq-S).

10.2.3. Aportaciones más relevantes

- ✓ Hasta nuestro conocimiento, estos son los primeros datos sobre el transporte y metabolismo intracelular de las isoflavonas en células endoteliales humanas.
- ✓ La genisteína y la daidzeína son transportadas dentro de la célula y metabolizadas por las células endoteliales a sus conjugados glucurónidos, sulfatos y metilados.
- ✓ El equol entra dentro de las células endoteliales pero no se metaboliza.
- ✓ Las rutas metabólicas de los flavonoides parecen depender del tipo de modelo celular.
- ✓ Aunque se necesitan más estudios sobre el metabolismo de los flavonoides y sus metabolitos en células endoteliales, estos resultados pueden tener importantes implicaciones sobre la investigación de los mecanismos de acción cardioprotectores de los flavonoides en los seres humanos.

Artículo X.

N. Toro-Funes, M.T. Veciana-Nogués, M.C. Vidal-Carou, J.P.E. Spencer, A. Rodríguez-Mateos
The intracellular metabolism of isoflavones in endothelial cells. Journal of Agricultural and Food Chemistry, En revision.

Índice de impacto (JCR 2012): 2.906

Posición en área "Food and Science Technology": 15/124

This document is confidential and is proprietary to the American Chemical Society and its authors. Do not copy or disclose without written permission. If you have received this item in error, notify the sender and delete all copies.

The intracellular metabolism of isoflavones in endothelial cells

Journal:	<i>Journal of Agricultural and Food Chemistry</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Toro-Funes, Natalia; University of Barcelona, Nutrition and Food Science Veciana-Nogués, M. Teresa; University of Barcelona, Nutrition and Food Science Vidal-Carou, M. Carmen; University of Barcelona, Department of Nutrition and Food Science Spencer, Jeremy; University of Reading, Chemistry, Food and Pharmacy Rodriguez-Mateos, Ana; University of Düsseldorf, Division of Cardiology, Pulmonology and Vascular Medicine

SCHOLARONE™
Manuscripts

1 **The intracellular metabolism of isoflavones in endothelial cells**

2 Natalia Toro-Funcs^{1,2}, M. Teresa Veciana-Nogués¹, M. Carmen Vidal-Carou¹, Jeremy
3 P.E. Spencer², Ana Rodriguez-Matcos^{2,3*}

4

5 ¹Department of Nutrition and Food Science-XaRTA, Faculty of Pharmacy, Campus de
6 l'Alimentació Torribera, University of Barcelona, Avda. Prat de la Riba 171, 08921-
7 Santa Coloma de Gramenet, Barcelona, Spain; ²Molecular Nutrition Group, School of

8 Chemistry, Food and Pharmacy, University of Reading, Reading, RG6 6AP, UK;

9 ³Division of Cardiology, Pulmonology, and Vascular Medicine, Medical Faculty,

10 University of Duesseldorf, D-40225 Duesseldorf, Germany

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21 * Author for correspondence

22 Dr Ana Rodriguez-Matcos; e-mail: ana.rodriguez-matcos@mcd.uni-duesseldorf.de

23 Tel:00492118115893

24 **ABSTRACT**

25 Data from epidemiological and human intervention studies have highlighted
26 potential cardiovascular benefits of soy isoflavone-containing foods. In humans,
27 genistein and daidzein are extensively metabolized after absorption into
28 glucuronides and sulfate metabolites. However, limited data exist on isoflavone
29 cellular metabolism, in particular in endothelial cells. We investigated the uptake
30 and cellular metabolism of genistein, daidzein and its major *in vivo* microbial
31 metabolite, equol, in human endothelial (HUVEC), liver (HepG2) and intestinal
32 epithelial cells (Caco-2 monolayer). Our results indicate that genistein and daidzein
33 are taken up by endothelial cells, and metabolized into genistein methyl-
34 glucuronides, genistein methyl-sulfates and daidzein methyl-glucuronides. In
35 contrast, equol was taken up but not metabolized. In HepG2 and Caco-2 cells,
36 glucuronide and sulfate conjugates of genistein and daidzein and a sulfate conjugate
37 of equol were formed. Our findings suggest that endothelial cell metabolism needs
38 to be taken into account when investigating the cardioprotective mechanisms of
39 action of isoflavones.

40

41

42

43 **Key words:** isoflavones; genistein; daidzein; equol; metabolism; endothelial cells,
44 HUVEC; HepG2, Caco-2 monolayer

45

46

47

48

49 **INTRODUCTION**

50 Soy isoflavones have recently received much attention because of their potential
51 health benefits, particularly on the prevention of different types of cancer, osteoporosis
52 and cardiovascular diseases (CVD).¹ However, there is also controversy regarding the
53 safety and efficacy of isoflavones and potential adverse effects have also been
54 reported.^{2,3} Data from human intervention studies suggest isoflavones may have
55 beneficial effects on prognostically validated surrogate markers of CVD, such as blood
56 pressure, endothelial function, or arterial stiffness.⁴⁻⁸ Moreover, several studies have
57 shown that isoflavones exert favorable effects on other biomarkers of CVD, such as
58 plasminogen activator inhibitor-1, endothelin 1, VCAM-1 or NO.⁹⁻¹³ Some studies have
59 shown improvements in plasma lipids and lipoproteins after isoflavone consumption,
60 including lowering blood triglycerides, total and LDL cholesterol levels, increasing
61 HDL cholesterol and the ratio of HDL/LDL cholesterol,¹⁴⁻¹⁶ although some mixed data
62 exist with a recent study and a meta-analysis concluding that no evidence was found for
63 the positive effects of isoflavones on blood lipids.^{17,18}

64 The most abundant soy isoflavones in the diet are genistein (Ge) and daidzein (De).¹⁹
65 They are ingested mainly in the glucoside form, and undergo extensive hydrolysis by
66 intestinal and bacterial β -glucosidases that release the main aglycones.²⁰ De is converted
67 into equol (Eq) due to the action of the intestinal microbiota before absorption.²¹ The
68 isoflavone aglycones are converted into glucuronide metabolites by UDT-
69 glucuronosyltransferases (UGT), and to a lesser extent to sulfate esters catalyzed by
70 sulfotransferases (SULT) at either or both 4' or 7 positions on the isoflavone ring by
71 phase II enzymes during transfer across the small intestine and liver.²² These phase II
72 metabolites are excreted in the bile and are deconjugated in the lower bowel allowing
73 them to be reabsorbed again, creating an enterohepatic circulation.²² Studies showed

74 that the conjugated metabolites of Gc and Dc are mainly found in human plasma as
75 mono- and diglucuronides, mono- and disulfates, and sulfo-glucuronides.²³ Trace
76 amounts of mono- and dimethyl conjugates have also been found in urine.^{24,25}

77 Most of the research investigating the mechanisms of action of flavonoids in the
78 vascular system has tested the bioactivity of flavonoids and their metabolites in human
79 and animal cell models. However, whether flavonoids and metabolites are taken up and
80 metabolized further by cells is at present unclear. In order to assess the potential risks
81 and benefits of soy isoflavones and the mechanisms by which health effects occur, it is
82 important to have a more complete understanding of isoflavone intracellular
83 metabolism. The metabolism of isoflavones has been reported in cell models of the
84 gastrointestinal tract, such as enterocytes and Caco-2 cell monolayers,²⁶⁻²⁸ or in hepatic
85 models,^{29,30} but little attention has been given to the potential intracellular metabolism
86 of isoflavones in other human cells, such as human umbilical vein endothelial cells
87 (HUVEC), despite being a widely used in vitro model for assessing mechanisms of
88 action of isoflavones in the vascular endothelium.^{11,31} Therefore, the aim of this work is
89 to determine the cellular uptake and intracellular metabolism of the isoflavones Gc, Dc
90 and Eq in endothelial cells, using HepG2 hepatocytes (liver cell model) and Caco-2 cell
91 monolayers (small intestine model) as positive controls.

92

93 **MATERIALS AND METHODS**

94 **Cell culture**

95 Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were obtained from Lonza
96 (Basingstoke, UK) and used at passages 2 or 3. The cells were cultured at 37°C with 5%
97 CO₂ in a humidified atmosphere, and supplemented with endothelial culture medium
98 consisted of: 2% foetal bovine serum (10 ml) plus supplements [hEGF (0.5 ml),

99 Hydrocortisone (0.2 ml), GA-1000 (Gentamicin, Amphotericin-B) (0.5 ml), VEGF (0.5
100 ml), hFGF-B (2 ml), R3-IGF-1 (0.5 ml), ascorbic acid (0.5 ml), heparin (0.5 ml) to 500
101 ml endothelial cell basal medium without phenol red (Lonza, UK). Foetal bovine serum
102 was heat inactivated by incubation at 56 °C for 30 minutes. Cells were kept at 37°C in a
103 humidified atmosphere containing 5% CO₂. Cells were seeded at a density of 0.5- 1 x
104 10⁶ cells/dish in Petri dishes (diameter 100 mm).

105 Liver hepatoma cells HcpG2 cells (ATCC, Manassas, VA, US) were cultured at
106 37°C in an atmosphere of 5% CO₂ relative humidity between passages 19-21 in
107 Dulbecco's modified Eagle's medium F-12 with glutamine (500ml), with 10% FBS heat
108 inactivated (50 ml) and 1% of penicillin /streptomycin solution (5ml (PAA, UK). Cells
109 were seeded at a density of 0.5 - 1 x 10⁶ cells/dish in Petri dishes (diameter 100 mm).

110 Human colon adenocarcinoma cells (Caco-2, ECACC Salisbury, Wiltshire, UK)
111 were cultured between passages 15-19 in a humidified atmosphere of 5% CO₂/95% air
112 in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), supplemented with 10% heat-
113 inactivated bovine serum, L-glutamine (2 mM), non-essential amino acids (1%),
114 penicillin (100 U/ml), and streptomycin (100 lg/ml) (all from PAA, UK). Culture
115 medium was changed every 2-3 days and the culture was split approximately every 7
116 days. For subculturing, the cells were removed enzymatically (0.25% trypsin-EDTA, 1
117 min, 37°C), split 1:3, and subcultured in 6 well plates (PAA, UK). For transport
118 experiments, 2.5 x10⁵ cells were seeded in Transwell-clear, tissue culture treated
119 polyester membrane filter inserts (pore size 0.4 mm, diameter 24 mm, PAA, UK) in 6-
120 wells plates. Cells were allowed to grow and differentiate to confluent monolayers for
121 about 20–22 days. The medium was changed twice a week. The apical and basolateral
122 compartments contained 1.2 and 2 ml of culture medium, respectively. The integrity of
123 the monolayers was checked by measuring transepithelial electrical resistance across the

124 layer (TEER) values, using a Millicell-crs epithelial voltohmmeter (Millipore Co.,
125 Bedford, MA). Experiments were conducted only in cell monolayers that showed a
126 TEER value between 400 and 1000 Ω per cm^2 .

127

128 **Assessment of cellular uptake/association and metabolism**

129 HUVEC and HepG2 were grown in petri dishes to a confluence of 80-90%. Prior to
130 experiments, old medium was removed and cells were washed with PBS, pH 7.4.
131 Appropriate amounts of Gc, Dc and Eq (0, 0.1, 1, 10 and 100 μM) were added to 7 ml
132 of the growth medium and cells were incubated at 37°C in a humidified atmosphere
133 containing 5% CO_2 for 2 h. After incubation, 1 mL of the medium was removed and
134 immediately frozen in liquid nitrogen and kept at -80°C afterwards. Cells were washed
135 twice with ice-cold PBS, and 200 μL of ice-cold 0.1M HCl was added. Cells were
136 scraped, the cell homogenates sonicated 3 times for 30 sec, centrifuged at 800 g for 10
137 min and the supernatant was collected and transferred to -80°C storage.

138 For Caco-2 cells experiments, the medium was removed and cells were washed with
139 PBS, pH 7.4. Test compounds (conc. as above) were added to the apical side in 1.2 mL
140 of transport buffer consisting in PBS, 1% non-essential amino acids and 1 mM of
141 ascorbic acid. Transport buffer (2 mL) was also added to the basolateral side. Incubation
142 was performed for 2 h at 37°C at a humidified atmosphere of 5% CO_2 . Then, the apical
143 and basolateral buffer were collected and immediately stored at -80°C. In addition, cell
144 filters were washed with ice-cold PBS, prior to addition of 500 μL of 0.1 M HCl, and
145 cell homogenate collection, which were again sonicated 3 times for 30 sec and
146 centrifuged at 800 g for 10 min, prior to storage at -80°C.

147 Uptake data is expressed as μM in supernatant and cell lysates, per petri dish. Uptake
148 refers to both cytosolic accumulation and membrane/cell-associated. Recoveries were
149 calculated respect to the initial amount of compound incubated on each Petri dish.

150

151 **Stability test of Genistein, daidzein and Equol in cell culture medium**

152 Each isoflavone (10 μM) was dissolved in endothelial basal medium phenol red free
153 and kept in 6-well plates at 37°C with 5% CO_2 in a humidified atmosphere. Samples
154 were taken at pre-determined time points (0, 0.4, 1, 6 and 24 h). All the tests were done
155 in triplicate. The amount of each compound remained in endothelial medium was
156 determined and the residue amount of each compound was plotted against time to obtain
157 their stability profiles.

158

159 **Sample preparation and analysis of isoflavones**

160 Supernatants and cell lysates were evaporated to dryness using a speedvac
161 concentrator (Savant) and dissolved with 0.1 ml of ultra pure water for chromatographic
162 analysis.

163

164 ***Genistein, daidzein and equol determination***

165 Aglycones and Eq were determined by ultra high pressure liquid chromatography
166 (UHPLC-UV) following the method reported by Toro-Funes *et al.*³² Briefly, 1 μl was
167 injected in a reversed-phase Acquity UPLCTM EH C18 1.7 μm column (2.1 \times 50 mm)
168 (Waters Corp., Milford, MA, USA), which was placed in an oven at a constant
169 temperature (35°C). The UPLCTM system (Waters Acquity System, Milford, MA, USA)
170 consisted of a binary pump and an auto-sampler equipped with a diode array detector set
171 to 262 nm for Gc and Dc and to 280 nm for Eq. Solvent A was ultra pure water with

172 0.1% formic acid, and solvent B was acetonitrile with 0.1% formic acid. Linear gradient
173 conditions were as follows: 0 min – 10% B; 1 min – 12% B; 3 min – 22% B; 4 min –
174 23% B; 5 min – 35% B; 6 min – 50%; 8 min – 50% B; 8.1 min – 10% B at flow of
175 0.6 mL/min. Vials filled with either standard solutions or samples were kept at 4°C in
176 the auto sampler.

177

178 *Isoflavone metabolites identification by LC/MS-Orbitrap*

179 Isoflavone metabolites were tentatively identified by liquid chromatography with
180 mass spectrometry detection. An LTQ Orbitrap Velos mass spectrometer (Thermo
181 Scientific, Hemel Hempstead, UK) equipped with an ESI source in positive mode was
182 used to acquire mass spectra in profile mode with a setting of 30,000 resolution at m/z
183 400. Operation parameters were set as follow: source voltage, 3.5 kV; sheath gas, 50
184 (arbitrary units); auxiliary gas, 20 (arbitrary units); sweep gas, 0 (arbitrary units); and
185 capillary temperature, 275°C. Default values were used for most other acquisition
186 parameters (Fourier transform (FT) Automatic gain control (AGC) target 5×10^5 for
187 MS mode and 5×10^4 for MSⁿ mode). Samples were first analysed in full MS mode
188 with the Orbitrap resolution set at 30,000 at m/z 400. The maximum injection time was
189 set to 100 ms with two micro scans for MS mode and to 1,000 ms with one micro scan
190 for MSⁿ mode. The mass range was from 100 to 1,000 m/z. Data analyses were
191 performed using XCalibur software. We used an Accela liquid chromatograph (Thermo
192 Scientific, Hemel Hempstead, UK) equipped with a quaternary pump, a photodiode
193 array detector (PDA) and a thermostated autosampler. An Acquity UPLC™ EH C18
194 1.7 µm column (2.1 × 50 mm) (Waters corp., Milford, MA, USA) with solvent A (ultra
195 pure water with 0.1% formic acid) and B (acetonitrile with 0.1% formic acid) was used.
196 Linear gradient conditions were as follows: 0 min – 10% B; 1 min – 12% B; 3 min –

197 22% B; 4 min – 23% B; 5 min – 35% B; 6 min – 50%; 8 min – 50% B; 10 min – 10% B
198 at flow of 0.6 ml/min. The injection volume was 2 μ l.

199 The concentration of Ge, De and Eq was determined using an external calibration
200 curve produced with the use of authentic standards, while their metabolites were
201 quantified as their corresponding aglycone.

202

203 **RESULTS**

204 **Stability test of isoflavones at 37°C**

205 Stability profiles of Ge, De and Eq compounds in cell medium at 37°C are shown in
206 Figure 1, as the percentage of initial concentration remaining with time. The
207 concentration of Ge, De and Eq decreased by around $5 \pm 2\%$ after 2 hour of incubation,
208 and by around $10 \pm 2\%$ following 6 hours incubation. After 24 hours, the $78 \pm 1\%$, $75 \pm$
209 2% and $82 \pm 2\%$ of Ge, De and Eq, respectively, remained stable in endothelial
210 medium.

211

212 **Identification of isoflavone conjugates in the cell models**

213 The isoflavones and their metabolites tentatively identified in HUVEC, HcpG2 cells
214 and Caco-2 cell monolayers by LTQ-Orbitrap are shown in Table 1. Due to the absence
215 of commercial standards, metabolites were tentatively identified from the accurate exact
216 mass data provided by the LC-MS analysis. Deviation from the calculated mass (5 ppm)
217 and the isotopic pattern score were used to confirm the accuracy of possible molecular
218 formulas. No Ge, De, Eq or conjugates were detected in any of the control samples (0
219 μ M Ge, De, or Eq) and after spiking cells with 0.1 μ M of Ge, De, or Eq. The
220 quantification limits (LOQ) of our method for Ge, De and Eq were 0.1, 0.1 and 0.2

221 nmol/ml for cell lysates, and 0.02, 0.03 and 0.05 nmol/ml for supernatant samples,
222 respectively.

223

224 **Uptake and metabolism of isoflavones in HUVEC cells**

225 When 1, 10 or 100 μM of Gc was incubated with HUVEC cells for 2 hours, Gc and
226 its methyl-glucuronide and methyl-sulfate metabolites were detected in both supernatant
227 and cells (Table 2), indicating that Gc is taken up and metabolized by endothelial cells.
228 The amount of Gc (and metabolites) associated with cells represented 6-7% of the total
229 initial Gc. The percentage of total conjugated Gc in the supernatant and cell lysate was
230 around 14-18%, with 82-86% remaining in the unconjugated form. Total genistein-
231 methyl-glucuronide and genistein-methyl-sulfate represented 25 and 55% of the
232 metabolized aglycone, respectively (Table 2).

233 When Dc was incubated with HUVEC cells, Dc and a methyl-glucuronide metabolite
234 were detected in the supernatant and cell lysate (Table 2), indicating that Dc is also
235 taken up and metabolized by endothelial cells. Around 5-8% of Dc and its metabolite
236 were found associated to cells at 10 and 100 μM . Neither Dc nor its metabolites were
237 found associated to cells at the lower concentrations tested, probably because
238 concentrations were lower than the limit of detection of our method. The methyl-
239 glucuronide metabolite represented around 10-15% of the initial Dc.

240 No Eq metabolites were detected in the supernatant or cell lysate at any
241 concentration after the incubation of Eq in HUVEC. Around 90% of Eq was found in
242 the supernatant, with around 8-12% of Eq found in the cell lysate at 1, 10 and 100 μM
243 (Table 2).

244

245

246 Uptake and metabolism of isoflavones in HepG2

247 Incubation of 1, 10, and 100 μM of Ge with HepG2 cells for 2 hours led to the
248 detection of a genistein-glucuronide and a genistein-sulfate in supernatant and cells
249 (Table 3). Around 50% of the initial Ge was metabolized at 1 and 10 μM , and around
250 20% at 100 μM . Practically all Ge associated to cells was metabolized, being the
251 glucuronide conjugates the most abundant metabolites representing 60-70% of the total,
252 and genistein-sulfate representing 30-40% (Table 3). At 1 μM , the aglycone was not
253 detected either in the supernatant or in the cell lysate.

254 When incubation of HepG2 cells was carried out with De for 2 hours, De and
255 daidzein-glucuronide and daidzein-sulfate metabolites were detected in both supernatant
256 and cells. However, daidzein-sulfate could not be quantified because the level of the
257 metabolite was lower than the limit of quantification (Table 3). At 1 μM , the aglycone
258 De was not detected in the supernatant or cell lysate, and only the glucuronide
259 metabolite was found in the supernatant (~ 7% of total De).

260 After the incubation of Eq in HepG2 cells, Eq and equol-sulfate were detected in the
261 supernatant and/or cells. The sulfate metabolite of equol was quantified in the
262 supernatant at the highest concentration tested. Around 90% of Eq was found in the
263 supernatant, and 3-13% associated to cells (Table 3).

264

265 Uptake, transport and metabolism of isoflavones in the Caco-2 monolayer model

266 After incubation with Ge for 2 hours, Ge-glucuronide and Ge-sulfate metabolites
267 were detected in the apical side, basolateral side and cells. Ge-sulfate could not be
268 quantified because the level of the metabolite present was lower than the limit of
269 quantification. The glucuronide metabolite of Ge was observed to be associated with
270 Caco-2 cells at all concentrations tested (Table 4). In addition, at the highest

271 concentration Ge was also detected in the cell lysate. The glucuronide conjugate was
272 excreted to the apical side (~30-40%) and to the basolateral side (~40-50%). Significant
273 amounts of Ge were also detected in the basolateral side, suggesting that both the
274 aglycone and glucuronide transverse the monolayer. At 1 and 10 μM , around 80% of
275 the initial Ge was glucuronidated, whereas at 100 μM only 12% was found as Ge-
276 glucuronide (Table 4).

277 Incubation of Caco-2 cell monolayers with Dc led to the detection of Dc, a
278 glucuronide and a sulfate metabolite in the cell lysate (Table 4). De-sulfate was detected
279 only at the higher concentration tested. When Dc was incubated at 1 and 10 μM , around
280 50% of the glucuronide conjugate of Dc was found in the apical side, and at the higher
281 concentration tested, around 35%. Around 15% of the aglycone and 40% of its
282 metabolite were found in the basolateral side. De-glucuronide represented around 50%
283 of the initial Dc at 1 and 10 μM , and 10% at the higher concentration tested (Table 4).

284 No Eq conjugates were detected in the apical side, basolateral side or cell lysate at
285 any concentration after the incubation of Eq in Caco-2 cell monolayers (Table 4).
286 Around 20% of Eq was transported to the basolateral side and 8-15% was found
287 associated to cells.

288

289

290

291

292

293

294

295

296 **DISCUSSION**

297 In this work, the uptake and intracellular metabolism of the isoflavones Ge, De and
298 its microbial metabolite Eq in endothelial cells were investigated. We showed that Ge is
299 metabolized into genistein-methyl-glucuronide and genistein-methyl-sulfate, and De is
300 converted into daidzein-methyl-glucuronide in HUVECs. This indicates that, beside the
301 liver and the small intestine, endothelial cells can also metabolize isoflavones by the
302 action of UGT-glucuronosyltransferases (UGT), sulfotransferases (SULT), and catechol
303 methyl transferases (COMT). The isoflavone metabolites were found in the cell lysate
304 and in the cell medium, suggesting that Ge and De are taken up by endothelial cells,
305 methylated, glucuronidated, and sulfated before export to the medium. We cannot
306 discard though that additional conjugation and/or deconjugation reactions might have
307 occurred in the cell medium; however we did not see any of these reactions occurring in
308 the cell medium when testing the stability of Ge, De and Eq, suggesting that the cell
309 medium alone has no glucuronidase/sulfatase/UGT, SULT or COMT activity (Figure
310 1).

311 *In vivo*, glucuronidation and sulfation seem to be the major metabolic pathways in
312 the metabolism of isoflavones, since glucuronides, sulfates, and sulfoglucuronides of Ge
313 and De, and also freely circulating aglycones have been shown to be the major human
314 plasma and urinary metabolites of isoflavones.²³ However, little evidence exists
315 regarding the formation of methylated isoflavone metabolites. Kullin *et al.* and
316 Heinonen *et al.* identified mono- and dimethyl conjugates of Ge and De in trace
317 amounts in human urine samples after soy supplementation,^{24,25} which suggests that
318 methylation of metabolites of isoflavones does occur *in vitro* but *in vivo* only to a very
319 minor extent. As the metabolism of isoflavones in HUVEC cells *in vitro* is not the same

320 than the observed in human *in vivo*, caution should be taken when reaching conclusions
321 on the investigations of mechanisms of action of isoflavones *in vitro*.

322 Beside investigations on hepatic and small intestine cell models, some evidence exist
323 regarding the intracellular metabolism of other flavonoids, such as flavanols, flavonols,
324 and flavanones, in dermal fibroblasts, central nervous system and cancer cells,³³⁻³⁹
325 however very few reports on endothelial metabolism of flavonoids exist. We have
326 recently shown that the flavonoid (-)-epicatechin was taken up and metabolized into 3'-
327 *O*-methyl(-)-epicatechin-7- β -D-glucuronide and 3'-*O*-methyl(-)-epicatechin-7-sulfate
328 conjugates after 1 hour of incubation,⁴⁰ which is in agreement with the data presented
329 here for isoflavones, where formation of methyl-glucuronides and methyl-sulfates took
330 place in HUVEC cells. Anthocyanins, another subclass of flavonoids, have also been
331 shown to be taken up and metabolized into methylated conjugates after incubation with
332 EA.hy926 endothelial cells.⁴¹ To our knowledge, this is the first study to address the
333 uptake and intracellular metabolism of isoflavones in endothelial cells (HUVEC).

334 In the present work, different cell types led to different uptake and metabolism of
335 isoflavones. In the HepG2 cell model, glucuronide and sulfate conjugates of Ge and Dc
336 were detected in both the supernatant and cell lysate, in agreement with previous work,
337 where the 7-*O*-glucuronide conjugate was the major metabolite of Dc and Ge in
338 hepatocytes, together with sulfate conjugates.^{29,30} In the Caco-2 monolayer, we
339 observed that Ge and Dc were taken up by cells, glucuronidated (and, to a smaller
340 extent, sulfated) and excreted to the apical side (~30-40%) and to the basolateral side
341 (~40-50%) (Table 3). These results are also in agreement with previously reported data
342 in Caco-2 cell monolayers.^{26,27}

343 The microbial metabolite of daidzein, equol, was found to be associated to HUVEC,
344 HepG2 and Caco-2 cells at significant concentrations (Tables 2, 3 and 4). In HepG2

345 cells, a sulfate metabolite of Eq was excreted to the medium, suggesting that sulfation is
346 the main metabolic pathway of equol in hepatocyte cell model. This is in accordance to
347 an earlier study in which Eq was mainly sulfated (~95% of initial Eq) in HepG2 cells
348 after 4 days incubation.⁴² However, in our case conjugated equol represented around 4%
349 of the initial Eq, and was only found at the higher concentrations tested, which may be
350 due to the shorter incubation time with HepG2 cells (2 h vs 4 days). In contrast, Schwen
351 *et al.* reported glucuronidation as the primary pathway for the metabolism of Eq in
352 human hepatocytes (~73% of initial Eq), with lesser sulfation metabolism (~22% of
353 initial Eq).⁴³ We did not find any Eq conjugates being formed in HUVEC and Caco-2
354 cell models. No data available about the metabolism of Eq in HUVEC was found in the
355 literature. In Caco-2 monolayers, Eq was shown to be metabolized into phase II
356 conjugates, determined using enzymatic treatment with glucuronidase and sulfatase, so
357 it is unknown whether the metabolites formed were glucuronide or sulfate conjugates.⁴⁴
358 Differences in the analytical methodology and incubation times may explain the
359 differences observed between studies. In humans, Eq circulates in plasma and is
360 excreted in urine predominantly as a glucuronide conjugate, and to a lesser extent as a
361 sulfate.^{21,25} Thus, according to the work presented here, equol *in vitro* metabolism does
362 not reflect human *in vivo* metabolism.

363 Few reports have been published describing the biological activity of isoflavone
364 conjugates, such as the weak estrogenic effect and the activation of human natural killer
365 cells of Ge and De glucuronides,⁴⁵ the inhibitory effect of daidzein-4',7-disulfate on the
366 sterol sulfatase in hamster liver microsomes,⁴⁶ the stimulatory effect of daidzein-7-
367 glucuronide-4'-sulfate on the growth of MCF-7 cells,⁴⁷ and the hypotensive and
368 vasodilator effects of De sulfates in rats.⁴⁸ Rimbach *et al.* reported that sulfation of Ge
369 decreased its antioxidant activity, anti-aggregatory effect and its impact on monocyte

370 and endothelial function *in vitro*,⁴⁹ suggesting that isoflavone conjugates have different
371 biological activities than their parent compounds. Further studies are needed to
372 understand the cellular bioactivity of isoflavones and their metabolites.

373 A limitation of this work is that the limits of quantification of the method were not
374 low enough to quantify all the metabolites identified in the cell samples, in particular
375 the sulfate conjugates of Ge and De. In addition, we cannot discard that additional
376 metabolites present in the samples below our limits of detection were formed and not
377 accounted for here.

378 To sum up, our data shows that the isoflavones Ge and De are taken up by
379 endothelial cells and are metabolized by phase II enzymes into their methylated,
380 glucuronide and sulfate conjugates. However, the microbial metabolite equol is taken up
381 by endothelial cells but is not metabolized. These findings suggest that endothelial cell
382 metabolism needs to be taken into account when investigating the mechanisms of action
383 of isoflavones in the cardiovascular system.

384

385 **ACKNOWLEDGEMENTS**

386 The authors would like to thank the *Ministerio de Educación y Ciencia* (Spain) for a
387 grant to the PhD student Natalia Toro-Funes.

388 **REFERENCES**

- 389 1. Patisaul, H. B.; Jefferson, W. The pros and cons of phytoestrogens. *Front.*
390 *Neuroendocrin.* **2010**, 31, 400–421.
- 391 2. Song, W. O.; Chun, O. K.; Hwang, I.; Shin, H. S.; Kim, B. G.; Kim, K. S.; Lee, S.
392 Y.; Shin, D.; Lee, S. G. Soy isoflavones as safe functional ingredients. *J. Med.*
393 *Food*, **2010**, 10(4), 571–580.
- 394 3. Morcira, A. C.; Silva, A. M.; Santos, M. S.; Sardão, V. A. Phytoestrogens as
395 alternative hormone replacement therapy in menopause: What is real, what is
396 unknown. *J. Steroid. Biochem.* **2014**, 143, 61–71.
- 397 4. Teede, H. J.; McGrath, B. P.; DeSilva, L.; Cchun, M.; Fassoulakis, A.; Nestel, P. J.
398 Isoflavones reduce arterial stiffness: a placebo-controlled study in men and
399 postmenopausal women. *Arterioscler. Thromb. Vas. Biol.* **2003**, 23, 1066–1071
- 400 5. Nestel, P. J.; Yamashita, T.; Sasahara, T.; Pomcroy, S.; Dart, A.; Komcsaroff, P.;
401 Owen, A.; Abbey, M. Soy Isoflavones Improve Systemic Arterial Compliance but
402 Not Plasma Lipids in Menopausal and Perimenopausal Women. *Arterioscler.*
403 *Thromb. Vas. Biol.* **1997**, 17, 3392–3398.
- 404 6. Liu, X. X.; Li, S. H.; Chen, J. Z.; Sun, K.; Wang, X. J.; Wang, X. G.; Hui, R. T.
405 Effect of soy isoflavones on blood pressure: A meta-analysis of randomized
406 controlled trials. *Nutr. Metab. Cardiovas.* **2012**, 22(6), 463–470.
- 407 7. Squadrito, F.; Marini, H.; Bitto, A.; Altavilla, D.; Polito, F.; Adamo, E. B.; D'Anna,
408 R.; Arcoraci, V.; Burnett, B. P.; Minutoli, L.; Di Benedetto, A.; Di Vieste, G.;
409 Cucinotta, D.; de Gregorio, C.; Russo, S.; Corrado, F.; Saitta, A.; Irace, C.; Corrao,
410 S.; Licata, G. Genistein in the metabolic syndrome: results of a randomized clinical
411 trial. *J. Clin. Endocr. Metab.* **2013**, 98, 3366–74.

- 412 8. Lilamand, M.; Kelaiditi, E.; Guyonnct, S.; Incalzi, R. A.; Raynaud-Simon, A.;
413 Vellas, B.; Cesari, M. Flavonoids and arterial stiffness: promising perspectives.
414 *Nutr. Metab. Cardiovas.* 2014, *In press*.
- 415 9. Squadrito, F.; Altavilla, D.; Morabito, N.; Crisafulli, A.; D'Anna, R.; Corrado, F.;
416 Ruggeri, P.; Campo, G. M.; Calapai, G.; Caputi, A. P.; Squadrito, G. The effect of
417 the phytoestrogen genistein on plasma nitric oxide concentrations, endothelin-1
418 levels and endothelium dependent vasodilation in postmenopausal women.
419 *Atherosclerosis*, **2002**, 163, 339–347.
- 420 10. Rimbach, G.; Boesch-Saadatmandi, C.; Frank, J., Fuchs, D.; Wenzel, U.; Daniel,
421 H.; Hall, W. L.; Weinberg, P. D. Dietary isoflavones in the prevention of
422 cardiovascular disease—A molecular perspective. *Food Chem. Toxicol.* **2008**, 46(4),
423 1308–1319.
- 424 11. De Andrade, C. M.; Silva de Sá, M. F.; Torqueti-Toloi, M. R. Effect of
425 phytoestrogens derived from soy bean on expression of adhesion molecules on
426 HUVEC. *Climateric*, **2011**, 1–9.
- 427 12. Zhang, H.; Zheng, F.; Zhao, J., Guo, D.; Chen, X. Genistein Inhibits ox-LDL-
428 induced VCAM-1, ICAM-1 and MCP-1 Expression of HUVECs Through Heme
429 Oxygenase-1. *Arch. Med. Res.*, **2013**, 44, 13–20.
- 430 13. Santhakumar, A. B.; Bulmer, A. C.; Singh, I. A review of the mechanisms and
431 effectiveness of dietary polyphenols in reducing oxidative stress and thrombotic
432 risk. *J. Hum. Nutr. Diet.* **2014**, 27(1), 1–21.
- 433 14. Anderson, J. W.; Johnstone, B. M.; Cook, N. Meta-analysis of the effects of soy
434 protein intake on serum lipids. *N. Engl. J. Med.* **1995**, 333, 276–82.

- 435 15. Taku, K.; Umegaki, K.; Sato, Y.; Taki, Y.; Endoh, K.; Watanabe, S. Soy
436 isoflavones lower serum total and LDL cholesterol in humans: a meta-analysis of 11
437 randomized controlled trials. *Am. J. Clin. Nutr.* **2007**, 85(4), 1148–1156.
- 438 16. Liu, Z. M.; Ho, S. C.; Chen, Y. M.; Liu, J.; Woo, J. Cardiovascular Risks in
439 Relation to Daidzein Metabolizing Phenotypes among Chinese Postmenopausal
440 Women. *PloS one*, **2014**, 9(2), e87861.
- 441 17. Qin, Y., Niu, K., Zeng, Y., Liu, P., Yi, L., Zhang, T., Zhang Q. Y., Zhu, J. D., &
442 Mi, M. T. Isoflavones for hypercholesterolaemia in adults. *Cochrane Database*
443 *Syst. Rev.* **2013**, 6, CD009518.
- 444 18. Mainini, G.; Torcella, M.; Di Donna, M. C.; Esposito, E.; Ercolano, S.; Correa, R.;
445 Cucinella, G.; Stradella, L., Luisi, A.; Basso, A., Cerrito, F. V.; Cicatiello, R.;
446 Matteo, M.; De Franciscis, P. Nonhormonal management of postmenopausal
447 women: effects of a red clover based isoflavones supplementation on climacteric
448 syndrome and cardiovascular risk serum profile. *Clin. Exp. Obstet. Gyn.* **2012**,
449 40(3), 337–341.
- 450 19. Shelnut, S. R.; Cimino, C. O.; Wiggins, P. A.; Ronis, M. J. J.; Badger, T. M.
451 Pharmacokinetics of the glucuronides and sulfate conjugates of genistein and
452 daidzein in men and women after consumption of a soy beverage. *Am. J. Clin. Nutr.*
453 **2002**, 76, 588–594.
- 454 20. Németh, K.; Plumb, G. W.; Berrin, J. G.; Juge, N.; Jacob, R.; Naim, H. I.;
455 Williamson, G.; Swallow, D. L.; Kroon, P. A. Deglycosylation by small intestinal
456 epithelial cell β -glucosidases is a critical step in the absorption and metabolism of
457 dietary flavonoid glycosides in humans. *Eur. J. Nutr.* **2003**, 42, 29–42.
- 458 21. Setchell, K. D.; Clerici, C. Equol: history, chemistry, and formation. *J. Nutr.* **2010**,
459 140(7), 1355S–1362S.

- 460 22. Barnes, S. The biochemistry, chemistry and physiology of the isoflavones in
461 soybeans and their food products. *Lymphat. Res. Biol.*, **2010**, 8(1), 89–98.
- 462 23. Hosoda, K.; Furuta, T.; Yokokawa, A.; Ishii, K. Identification and quantification of
463 daidzein-7-glucuronide-4'-sulfate, genistein-7-glucuronide-4'-sulfate and genistein-
464 4',7-diglucuronide as major metabolites in human plasma after administration of
465 kinako. *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, 397, 1563–1572.
- 466 24. Kulling, S. E.; Honig, D. M.; Metzler, M. Oxidative Metabolism of the Soy
467 Isoflavones Daidzein and Genistein in Humans in Vitro and in Vivo. *J. Agric. Food*
468 *Chem.*, **2001**, 49, 3024–3033
- 469 25. Heinonen, S. M.; Hoikkala, A.; Wahala, K.; Adlercreutz, H. Metabolism of the soy
470 isoflavones daidzein, genistein and glycitein in human subjects: Identification of
471 new metabolites having an intact isoflavonoid skeleton. *J. Steroid Biochem.* **2003**,
472 87, 285–299.
- 473 26. Murota, K.; Shimizu, S.; Miyamoto, S.; Izumi, T.; Obata, A.; Kikuchi, M.; Terao, J.
474 Unique uptake and transport of isoflavone aglycones by human intestinal Caco-2
475 cells: comparison of isoflavonoids and flavonoids. *J. Nutr.* **2002**, 132, 1956–1961.
- 476 27. Chen, J.; Lin, H.; Hu, M. Absorption and metabolism of genistein and its five
477 isoflavone analogs in the human intestinal Caco-2 model. *Cancer Chemoth. Pharm.*
478 **2005**, 55, 159–169.
- 479 28. Wu, B.; Kulkarni, K.; Basu, S.; Zhang, S.; Hu, M. First-pass metabolism via UDP-
480 glucuronosyltransferase: a barrier to oral bioavailability of phenolics. *J. Pharm. Sci.*
481 **2011**, 100(9), 3655–3681.
- 482 29. Bursztyka, J.; Perdua E.; Tullicz, J.; Debrauwer, L.; Delous G.; Canlet, C.; De
483 Sousa, G.; Rahmani, R.; Benfenati, E.; Cravedi, J. Comparison of genistein

- 484 metabolism in rats and humans using liver microsomes and hepatocytes. *Food*
485 *Chem. Toxicol.* **2008**, 48, 939–948.30
- 486 30. Chen, Y.; Huang, C., Zhou, T.; Chen, G. Genistein induction of human
487 sulfotransferases in HepG2 and Caco-2 cells. *Basic Clinical Pharmacol.* **2008**, 103,
488 553–559.31
- 489 31. Chacko, B. K.; Chandler, R. T.; D'Alessandro, T. L.; Mundhekar, A.; Khoo, N. H.;
490 Botting, N.; Barnes, S; Patel, R. P. Anti-Inflammatory Effects of Isoflavones are
491 Dependent on Flow and Human Endothelial Cell PPAR γ . *J. Nutr.* **2007**, 137, 351–
492 356.
- 493 32. Toro-Funcs, N.; Odriozola-Serrano, I.; Bosch-Fusté, J.; Latorre-Moratalla, M. L.;
494 Vcciana-Nogués, M. T.; Izquierdo-Pulido, M., Vidal-Carou, M. C. Fast
495 simultaneous determination of free and conjugated isoflavones in soy milk by
496 UHPLC–UV. *Food Chem.* **2012**, 135(4), 2832–2838.
- 497 33. Spencer, J. P.; Abd-el-Mohsen, M. M.; Rice-Evans, C. Cellular uptake and
498 metabolism of flavonoids and their metabolites: implications for their bioactivity.
499 *Arch. Biochem. Biophys.* **2004**, 423, 148–161.
- 500 34. Spencer, J. P.; Kuhnle, G. G.; Williams, R. J.; Rice-Evans, C. Intracellular
501 metabolism and bioactivity of quercetin and its in vivo metabolites. *Biochem. J.*
502 **2003**, 372, 173–181.
- 503 35. Spencer, J. P.; Schroeter, H.; Crossthwaithe, A. J.; Kuhnle, G., Williams, R. J.; Rice-
504 Evans, C. Contrasting influences of glucuronidation and O-methylation of
505 epicatechin on hydrogen peroxide-induced cell death in neurons and fibroblasts.
506 *Free Rad. Biol. Med.* **2001**, 31, 1139–1146.
- 507 36. Spencer, J. P.; Schroeter, H.; Kuhnle, G.; Srail, S. K.; Tyrrell, R. M.; Hahn, U.;
508 Rice-Evans, C. Epicatechin and its in vivo metabolite, 3'-O-methyl epicatechin,

- 509 protect human fibroblasts from oxidative-stress-induced cell death involving
510 caspase-3 activation. *Biochem. J.* **2001**, 354, 493–500.
- 511 37. Vafeiadou, K.; Vauzour, D.; Rodriguez-Mateos, A.; Whiteman, M.; Williams, R. J.;
512 Spencer, J. P. Glial metabolism of quercetin reduces its neurotoxic potential. *Arch.*
513 *Biochem. Biophys.* **2008**, 478, 195–200.
- 514 38. Proteggente, A. R.; Basu-Modak, S.; Kuhnle, G.; Gordon, M. J.; Youdim, K.;
515 Tyrrell, R.; Rice-Evans, C. A. Hesperetin glucuronide, a photoprotective agent
516 arising from flavonoid metabolism in human skin fibroblasts. *Photochem.*
517 *Photobiol.* **2003**, 78, 256–261.
- 518 39. Salucci, M.; Stivala, L. A.; Maiani, G.; Bugianesi, R.; Vannini, V. Flavonoids
519 uptake and their effect on cell cycle of human colon adenocarcinoma cells (Caco2).
520 *Br. J. Cancer.* **2002**, 86, 1645–1651.
- 521 40. Rodriguez-Mateos, A.; Toro-Funcs., N.; Cifuentes-Gomez, T.; Cortese-Krott, M.;
522 Heiss, C.; Spencer, J. P. E. Uptake and metabolism of (–)-epicatechin in endothelial
523 cells. *Arch. Biochem. Biophys.* **2014**, In Press. DOI: 10.1016/j.abb.2014.03.014
- 524 41. Ziberna, L.; Tramer, F.; Mozc, S.; Vrhovsek, U., et al. Transport and bioactivity of
525 cyanidin 3-glucoside into the vascular endothelium. *Free Rad. Biol. Med.* **2012**, 52,
526 1750–1759.
- 527 42. Loukovaara, M.; Carson, M.; Palotie, A. Regulation of sex hormone-binding
528 globulin production by isoflavonoids and patterns of isoflavonoid conjugation in
529 HepG2 cell cultures. *Steroids*, 1995, 60, 656–661.
- 530 43. Schwen, R. J.; Nguyen, L.; Jackson, R. L. Elucidation of the metabolic pathway of
531 S-equol in rat, monkey and man. *Food Chem. Toxicol.* 2012, 50(6), 2074–2083.
- 532 44. Walsh, K. R.; Failla, M. L. Transport and metabolism of Equol by Caco-2 human
533 intestinal cells. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, 57(18), 8297–8302.

- 534 45. Zhang, Y.; Song, T. T.; Cunnick, J. E.; Murphy, P. A.; Hendrich, S. Daidzein and
535 genistein glucuronides in vitro are weakly estrogenic and activate human natural
536 killer cells at nutritionally relevant concentrations. *J. Nutr.* **1999**, 129(2), 399–405.
- 537 46. Wong, C. K.; Keung, W. M. Daidzein sulfoconjugates are potent inhibitors of sterol
538 sulfatase (EC 3.1. 6.2). *Biochem. Bioph. Res. Co.* **1997**, 233(3), 579–583.
- 539 47. Kinjo, J.; Tsuchihashi, R.; Morito, K.; Hirose, T.; Aomori, T.; Nagao, T.; Okabe,
540 H.; Nohara, T.; Masamune, Y. (2004). Interactions of phytoestrogens with estrogen
541 receptors α and β (III). Estrogenic activities of soy isoflavone aglycones and their
542 metabolites isolated from human urine. *Biol. Pharm. Bull.*, **2004**, 27(2), 185–188.
- 543 48. Cao, Y. X.; Yang, X. J.; Liu, J.; Li, K. X. Effects of daidzein sulfates on blood
544 pressure and artery of rats. *Basic Clinical Pharm. Toxicol.* **2006**, 99(6), 425–430.
- 545 49. Rimbach, G.; Weinberg, P. D.; de Pascual-Teresa, S.; Alonso, M. G.; Ewins, B. A.;
546 Turner, R.; Minihane, A. N.; Botting, N.; Fairley, B.; Matsugo, S.; Uchida, Y.;
547 Cassidy, A. Sulfation of genistein alters its antioxidant properties and its effect on
548 platelet aggregation and monocyte and endothelial function. *Biochim Biophys Acta*
549 *(BBA)-General Subjects*, **2004**, 1670(3), 229–237.

Figure Legends

Figure 1: Stability profiles of genistein, daidzein and equol after 0,4,1,6 and 24 h incubation with endothelial basal medium at 37 °C with 5% CO₂ in a humidified atmosphere (10 μM). Stability is expressed as percentage of initial concentration remaining with time as determined by UHPLC-UV (n=3).

Table 1: List of the compounds identified by an LTQ Orbitrap Velos mass spectrometer in supernatant and cell lysates of HUVEC, HepG2 and Caco-2 monolayer after incubation with genistein, daidzein or equol for 2 hours.

Compound	Cell model	[M+H] ⁺	Acc. Mass	M.F.
Genistein	HUVEC / Hep-G2 / Caco-2	271	271.0601	C ₁₅ H ₁₀ O ₅
Genistein-glucuronide	Hep-G2 / Caco-2	447	447.0921	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁
Genistein-sulfate	Hep-G2 / Caco-2	351	351.0177	C ₁₅ H ₁₀ O ₈ S
Genistein-methyl-glucuronide	HUVEC	462	462.1156	C ₂₂ H ₂₁ O ₁₁
Genistein-methyl-sulfate	HUVEC	366	366.0404	C ₁₆ H ₁₃ O ₈ S
Daidzein	HUVEC / Hep-G2 / Caco-2	255	255.0652	C ₁₅ H ₁₀ O ₄
Daidzein-sulfate	Hep-G2 / Caco-2	335	335.0221	C ₁₅ H ₁₀ O ₇ S
Daidzein-glucuronide	Hep-G2 / Caco-2	431	431.0973	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₀
Daidzein-methyl-glucuronide	HUVEC	446	446.1207	C ₂₂ H ₂₁ O ₁₀
Equol	HUVEC / Hep-G2 / Caco-2	243	243.1016	C ₁₅ H ₁₄ O ₃
Equol-sulfate	Hep-G2	323	323.0584	C ₁₅ H ₁₄ O ₆ S

Abbreviations: Acc. mass, accurate mass; MF, molecular formula.

Table 2: Uptake and metabolism of genistein, daidzein and equol in HUVEC. Results are given in $\mu\text{M} \pm \text{SEM}$ ($n=3$). The recoveries were calculated respect to the initial amount of each isoflavone (0.1, 1, 10 and 100 μM).

	0.1 μM		1 μM		10 μM		100 μM	
	Supernatant	Cell lysate	Supernatant	Cell lysate	Supernatant	Cell lysate	Supernatant	Cell lysate
Genistein	nd	nd	0.83 ± 0.05	0.05 ± 0.01	8.34 ± 0.09	0.48 ± 0.05	78.95 ± 4.85	0.61 ± 0.03
Ge-Gluc	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Ge-S	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Ge-M-Gluc	nd	nd	0.05 ± 0.01	nd	0.46 ± 0.02	0.08 ± 0.01	4.97 ± 0.39	1.62 ± 0.09
Ge-M-S	nd	nd	0.09 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.68 ± 0.06	0.21 ± 0.02	7.85 ± 0.75	3.47 ± 0.25
% Recovery	0%	0%	97%	7%	95%	7%	92%	6%
Daidzein	nd	nd	0.81 ± 0.04	nd	7.93 ± 0.56	0.38 ± 0.02	78.98 ± 6.05	1.46 ± 0.09
De-Gluc	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
De-M-Gluc	nd	nd	0.08 ± 0.01	nd	0.84 ± 0.07	0.51 ± 0.04	10.61 ± 1.01	4.44 ± 0.55
De-S	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
% Recovery	0%	0%	89%	0%	88%	9%	90%	6%
Equol	nd	nd	0.89 ± 0.07	0.12 ± 0.02	9.14 ± 0.84	0.08 ± 0.01	89.15 ± 3.85	10.84 ± 1.33
Eq-S	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
% Recovery	0%	0%	89%	12%	91%	8%	89%	11%

Abbreviations: Ge-Gluc, genistein-glucuronide; Ge-S, genistein-sulfate; Ge-M-Gluc, genistein-methyl-glucuronide; Ge-M-S, genistein-methyl-sulfate; De-Gluc, daidzein-glucuronide; De-M-Gluc, daidzein-methyl-glucuronide; De-S, daidzein-sulfate; Eq-S, equol-sulfate; nd, not detected.

Table 3: Uptake and metabolism of genistein, daidzein, and equol (μM) in HepG2 cells.

Results are given in $\mu\text{M} \pm \text{SEM}$ ($n=3$). The recoveries were calculated respect to the initial amount of each isoflavonc (0.1, 1, 10 and 100 μM).

	0.1 μM		1 μM		10 μM		100 μM	
	Supernatant	Cell lysate	Supernatant	Cell lysate	Supernatant	Cell lysate	Supernatant	Cell lysate
Genistein	nd	nd	nd	nd	2.32 \pm 0.25	nd	81.77 \pm 6.11	0.91 \pm 0.02
Ge-Gluc	nd	nd	0.28 \pm 0.01	0.07 \pm 0.01	2.14 \pm 0.19	0.47 \pm 0.02	8.54 \pm 0.77	3.88 \pm 0.20
Ge-S	nd	nd	0.11 \pm 0.01	0.04 \pm 0.01	1.66 \pm 0.14	0.16 \pm 0.01	4.03 \pm 0.32	1.22 \pm 0.04
Ge-M-Gluc	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Ge-M-S	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
% Recovery	0%	0%	39%	11%	61%	6%	94%	6%
Daidzein	nd	nd	nd	nd	5.09 \pm 0.03	nd	78.63 \pm 4.39	1.18 \pm 0.03
De-Gluc	nd	nd	0.07 \pm 0.01	nd	4.15 \pm 0.02	0.63 \pm 0.03	14.03 \pm 1.22	4.45 \pm 0.23
De-M-Gluc	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
De-S	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nq	nq
% Recovery	0%	0%	7%	0%	92%	6%	93%	6%
Equol	nd	nd	0.93 \pm 0.06	0.07 \pm 0.01	8.72 \pm 0.07	1.26 \pm 0.09	96.71 \pm 3.47	3.28 \pm 0.12
Eq-S	nd	nd	nd	nd	nq	nd	4.11 \pm 0.25	nd
% Recovery	0%	0%	93%	7%	87%	13%	101%	3%

Abbreviations: Ge-Gluc, genistein-glucuronide; Ge-S, genistein-sulfate; Ge-M-Gluc, genistein-methyl-glucuronide; Ge-M-S, genistein-methyl-sulfate; De-Gluc, daidzein-glucuronide; De-M-Gluc, daidzein-methyl-glucuronide; De-S, daidzein-sulfate; Eq-S, equol-sulfate; nd, not detected; nq, not quantified.

Table 4: Uptake and metabolism of genistein, daidzein, and equol (μM) in Caco-2 monolayers. Results are given in $\mu\text{M}\pm\text{SEM}$ ($n=3$). The recoveries were calculated respect to the initial amount of each isoflavone (0.1, 1, 10 and 100 μM).

	0.1 μM			1 μM			10 μM			100 μM		
	Apical	Basolateral	Cell lysate	Apical	Basolateral	Cell lysate	Apical	Basolateral	Cell lysate	Apical	Basolateral	Cell lysate
Genistein	nd	nd	nd	0.18 \pm 0.01	nd	nd	2.13 \pm 0.11	0.41 \pm 0.02	nd	66.26 \pm 2.33	14.05 \pm 0.98	6.12 \pm 0.04
Ge-Gluc	nd	nd	nd	0.34 \pm 0.02	0.43 \pm 0.03	0.03 \pm 0.01	3.49 \pm 0.22	4.48 \pm 0.03	0.39 \pm 0.01	3.87 \pm 0.25	4.65 \pm 0.03	3.77 \pm 0.02
Ge-S	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nq	nq	nq
Ge-M-Gluc	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Ge-M-S	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
% Recovery	0%	0%	0%	52%	43%	3%	56%	49%	4%	70%	19%	10%
Daidzein	nd	nd	nd	0.23 \pm 0.01	0.11 \pm 0.01	nd	3.19 \pm 0.23	1.87 \pm 0.07	0.41 \pm 0.02	73.87 \pm 4.52	10.49 \pm 0.85	2.07 \pm 0.01
De-Gluc	nd	nd	nd	0.34 \pm 0.02	0.23 \pm 0.01	0.03 \pm 0.01	2.16 \pm 0.15	1.59 \pm 0.08	0.64 \pm 0.04	3.58 \pm 0.26	4.31 \pm 0.02	2.46 \pm 0.01
De-M-Gluc	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
De-S	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nq	nq	nq
% Recovery	0%	0%	0%	57%	34%	3%	54%	35%	6%	77%	15%	5%
Equol	nd	nd	nd	0.71 \pm 0.01	0.22 \pm 0.01	0.08 \pm 0.01	6.94 \pm 0.44	2.22 \pm 0.16	0.82 \pm 0.05	62.65 \pm 3.77	22.46 \pm 1.25	14.89 \pm 1.00
Eq-S	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
% Recovery	0%	0%	0%	71%	22%	8%	70%	22%	8%	63%	22%	15%

Abbreviations: Ge-Gluc, genistein-glucuronide; Ge-S, genistein-sulfate; Ge-M-Gluc, genistein-methyl-glucuronide; Ge-M-S, genistein-methyl-sulfate; De-Gluc, daidzein-glucuronide; De-M-Gluc, daidzein-methyl-glucuronide; De-S, daidzein-sulfate; Eq-S, equol-sulfate; nd, not detected; nq, not quantified.

Figure 1

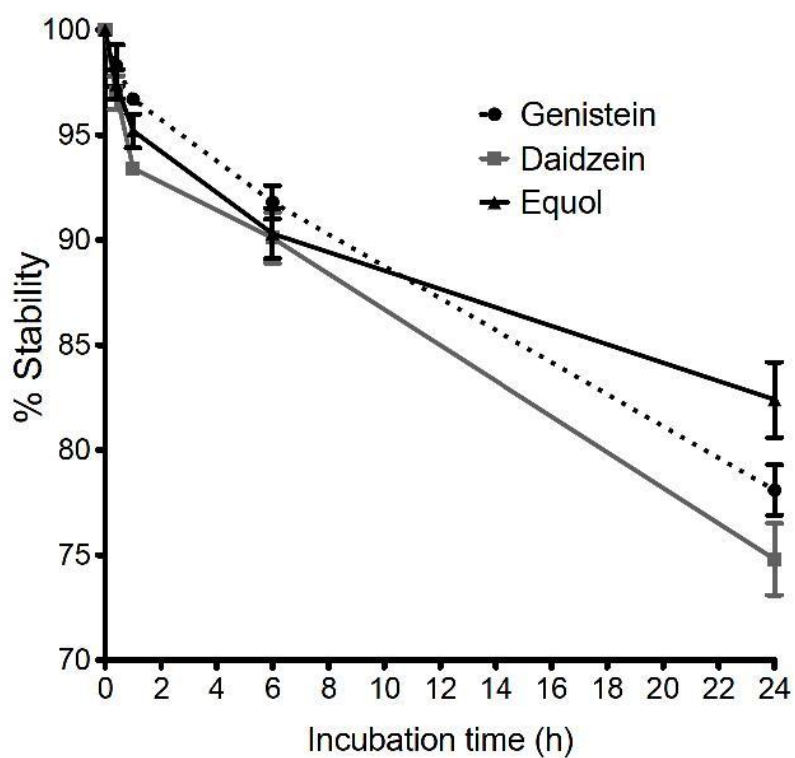
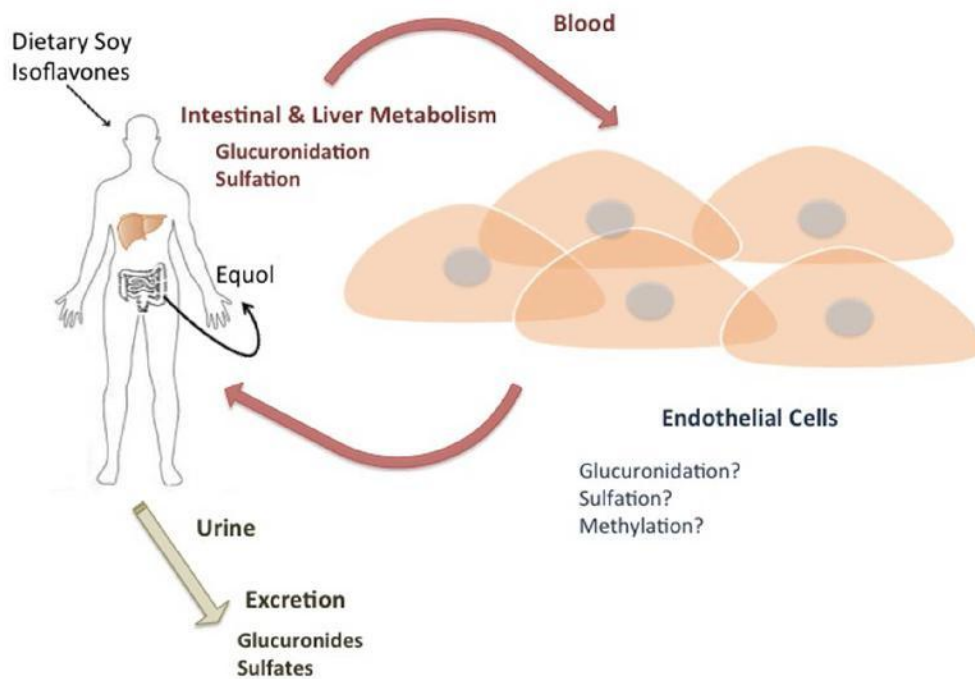


Figure for table of contents (TOC)



Artículo XII.

A. Rodríguez-Mateos, **N. Toro-Funes**, T. Cifuentes-Gomez, M. Cortese-Krott, H. Schroeter, C. Heiss, J. P. E. Spencer (2014). Uptake and metabolism of (-)-epicatechin in endothelial cells. Archives of Biochemistry and Biophysics, In Press.

Índice de impacto (JCR 2012): 3.370

Posición en área "Biochemistry & Molecular Biology": 103/290



Contents lists available at ScienceDirect

Archives of Biochemistry and Biophysics

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yabbi



Uptake and metabolism of (–)-epicatechin in endothelial cells

Ana Rodriguez-Mateos^{a,b,*}, Natalia Toro-Funes^{b,c}, Tania Cifuentes-Gomez^b, Miriam Cortese-Krott^a, Christian Heiss^a, Jeremy P.E. Spencer^b

^a Division of Cardiology, Pulmonology, and Vascular Medicine, Medical Faculty, University of Duesseldorf, D-40225 Dusseldorf, Germany

^b Molecular Nutrition Group, School of Chemistry, Food and Pharmacy, University of Reading, RG2 6AP Reading, UK

^c Department of Nutrition and Food Science-XaRTA, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, 08921 Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:
Received 19 January 2014
and in revised form 19 March 2014
Available online xxxx

Keywords:
(–)-Epicatechin
Uptake
Phase II metabolism
HUVEC
Endothelial cells
HepG2
Caco-2 monolayer

ABSTRACT

Accumulating evidence suggest that diets rich in cocoa flavanols may have beneficial effects on cardiovascular health. The major cocoa flavanol monomer, (–)-epicatechin (EC), is readily absorbed and circulates primarily as glucuronidated, sulfated, and *O*-methylated metabolites in human plasma. However, cellular metabolism, for example in endothelial cells, is less well defined. In the present study we detail the uptake and cellular metabolism of EC and its major *in vivo* metabolites, (–)-epicatechin-3'-β-D-glucuronide (E3G), (–)-epicatechin-3'-sulfate (E3S), 3'-*O*-methyl-(–)-epicatechin-5-sulfate (3ME5S), and 3'-*O*-methyl-(–)-epicatechin-7-sulfate (3ME7S) in human endothelial (HUVEC), liver (HepG2) and intestinal epithelial cells (Caco-2 monolayer). Our results indicate that EC associates with HUVECs, leading to its intracellular metabolism to 3ME7G and 3ME7S. In contrast, none of the metabolites were taken up by the cells. The metabolic rate and pattern of metabolism in HUVECs was similar to that observed in HepG2 cells, whilst in Caco-2 cells EC was metabolized to E3G, 3ME5G, 3ME7G, 4ME5G, 4ME7G and 3ME7S. Our data support the notion that endothelial cells may contribute significantly to EC metabolism. However, major human circulating metabolites are not accounted for in these model systems underscoring that caution should be taken when drawing conclusions on *in vivo* flavanol metabolism from *in vitro* experiments.

© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Accumulating evidence from dietary intervention studies suggest that cocoa flavanols are capable of promoting clinically significant improvements in cardiovascular health through their potential to lower blood pressure [1–6], improve endothelial function [7–12] or inhibit platelet aggregation and activation [13–15] following oral intake. Extensive evidence has shown that the major cocoa flavanol monomer, (–)-epicatechin, is metabolized after absorption to glucuronides, sulfates, and *O*-methylated forms by phase II enzymes during transfer across the small intestine and liver. Recent studies showed that the main structurally-related

(–)-epicatechin metabolites (SREM)¹ found in humans are (–)-epicatechin-3'-β-D-glucuronide (E3G), (–)-epicatechin-3'-sulfate (E3S), 3'-*O*-methyl-(–)-epicatechin-5-sulfate (3ME5S), and 3'-*O*-methyl-(–)-epicatechin-7-sulfate (3ME7S) [16,17]. Interest in the elucidation of the mechanisms of action of flavonoids *in vivo* has focused on the bioactivity of flavonoids and their metabolites in several human and animal cell models. An important consideration when attempting to investigate the mechanisms of action is whether the cell type associated with biological effects i.e. endothelial cells are able to take up and metabolize flavanols and/or their metabolites. As the structurally related metabolites represent the majority of

¹ Abbreviations used: EC, (–)-epicatechin; E3G, (–)-epicatechin-3'-β-D-glucuronide; E3S, (–)-epicatechin-3'-sulfate; 3ME5S, 3'-*O*-methyl-(–)-epicatechin-5-sulfate; 3ME7S, 3'-*O*-methyl-(–)-epicatechin-7-sulfate; SREM, main structurally-related (–)-epicatechin metabolites; E5G, (–)-epicatechin-5-β-D-glucuronide; E7G, (–)-epicatechin-7-β-D-glucuronide; E7S, (–)-epicatechin-7-sulfate; 3ME5G, 3'-*O*-methyl-(–)-epicatechin-5-β-D-glucuronide; 3ME7G, 3'-*O*-methyl-(–)-epicatechin-7-β-D-glucuronide; 4ME5G, 4'-*O*-methyl-(–)-epicatechin-5-β-D-glucuronide; 4ME7G, 4'-*O*-methyl-(–)-epicatechin-7-β-D-glucuronide; 3EE, 3'-*O*-ethyl-(–)-epicatechin; SPE, solid-phase extraction; HUVEC, human umbilical vein endothelial cells; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; DMF, *N,N*-dimethyl formamide; UGT, UDP-glucuronosyltransferases.

* Corresponding author at: Division of Cardiology, Pulmonology, and Vascular Medicine, Medical Faculty, University of Duesseldorf, D-40225 Dusseldorf, Germany.

E-mail address: ana.rodriguez-mateos@med.uni-duesseldorf.de (A. Rodriguez-Mateos).

2

A. Rodríguez-Mateos et al./Archives of Biochemistry and Biophysics xxx (2014) xxx–xxx

the circulating flavanol pool, they are the most likely to mediate bio-activity of flavanols ingested by humans. However it remains unclear whether these forms express biological activities at the cellular level. The cellular effects of flavonoid metabolites will ultimately depend on the extent to which they associate with cells, either by interactions with membrane or uptake into the cytosol. As the biological mechanisms of action of flavonoids are not clearly established, both forms of accumulation may be important.

The uptake of flavonoids and their metabolites seem to be dependent on cell type. However rather than differing levels of passive diffusion, this is probably due to a greater level of intracellular metabolism and faster rate of export from different cells [18]. Little attention has been given to the potential intracellular metabolism of flavonoids, and in particular, on the intracellular metabolism of flavonoid metabolites, other than the reported in cell models of the gastrointestinal tract, such as hepatocytes, liver microsomes and Caco-2 monolayer, models commonly used for *in vitro* investigations on the absorption and metabolism of drugs and phytochemicals in the small intestine and in the liver. In addition, some evidence exist regarding the intracellular metabolism of flavonoids in cells of the skin, dermal fibroblasts, in cells of the central nervous system and cancer cells [18–24], however scarce evidence exist regarding the intracellular metabolism of flavonoids in endothelial cells.

The aim of this study was to determine the cellular uptake and metabolism of (–)-epicatechin and its major phase II metabolites in endothelial cells. As a control and to compare with human *in vivo* metabolism and with the metabolism of other cell systems, the metabolism of (–)-epicatechin and metabolites was also assessed in healthy young men and in a model of human liver cells (HepG2) and human intestinal epithelial cells (Caco-2 monolayer).

Materials and methods

Materials

Authentic (–)-epicatechin (EC) metabolite standards, including (–)-epicatechin-3'-β-D-glucuronide (E3G), (–)-epicatechin-5-β-D-glucuronide (E5G), (–)-epicatechin-7-β-D-glucuronide (E7G), (–)-epicatechin-3'-sulfate (E3S), (–)-epicatechin-5-sulfate (E5S), (–)-epicatechin-7-sulfate (E7S), 3'-O-methyl-(–)-epicatechin-5-β-D-glucuronide (3ME5G), 3'-O-methyl-(–)-epicatechin-7-β-D-glucuronide (3ME7G), 4'-O-methyl-(–)-epicatechin-5-β-D-glucuronide (4ME5G), 4'-O-methyl-(–)-epicatechin-7-β-D-glucuronide (4ME7G), 3'-O-methyl-(–)-epicatechin-5-sulfate (3ME5S), 3'-O-methyl-(–)-epicatechin-7-sulfate (3ME7S) and 3'-O-ethyl-(–)-epicatechin (3EE, recovery standard) were provided by Mars Inc. (Hackensack, NJ, USA). Catechol and resorcinol (internal standards for flavanols), (–)-epicatechin, water, *N,N*-dimethyl formamide, methanol, acetic acid and acetonitrile (HPLC grade) were purchased from Fisher Scientific (Loughborough, UK). Specialized HPLC solvents were purchased from Hichrom (Walkerburn, UK) and HPLC columns were from Phenomenex (Watford, UK). Solid-phase extraction (SPE) cartridges (Oasis HLB 60 mg, 3 cc) were obtained by Waters (Manchester, UK).

Human study design

As part of a bigger study investigating the absorption, metabolism and excretion of cocoa flavanols in healthy individuals, 20 healthy young men between 18 and 35 years old were recruited. Blood samples were collected before and after 1 h consumption of a flavanol drink containing 800 mg cocoa flavanols/75 kg of body weight (of which 106 mg were EC, and 680 mg flavanol dimers–decamers). Plasma was obtained by whole-blood centrifugation

(EDTA-containing vacutainers) at 3000 g for 15 min at 4 °C, and spiked with ascorbic acid (final concentration: 1 mg/ml) before storage at –80 °C. The study was conducted according to the guidelines laid down in the Declaration of Helsinki and all procedures involving human subjects were approved by the University of Reading Research Ethics Committee (ref: 08/08).

Cell culture

Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were obtained from Lonza (Basingstoke, UK) and used at passages 2 or 3. The cells were cultured at 37 °C with 5% CO₂ in a humidified atmosphere, and supplemented with endothelial culture medium consisted of: 2% fetal bovine serum (10 ml) plus supplements [hEGF (0.5 ml), Hydrocortisone (0.2 ml), GA-1000 (Gentamicin, Amphotericin-B) (0.5 ml), VEGF (0.5 ml), hFGF-B (2 ml), R3-IGF-1 (0.5 ml), ascorbic acid (0.5 ml), heparin (0.5 ml) to 500 ml endothelial cell basal medium without phenol red (Lonza, UK). Fetal bovine serum was heat inactivated by incubation at 56 °C for 30 min. Cells were kept at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. Cells were seeded at a density of 0.5–1 × 10⁶ cells/dish in Petri dishes (diameter 100 mm).

Liver hepatoma cells HepG2 cells (ATCC, Manassas, VA, US) were cultured at 37 °C in an atmosphere of 5% CO₂ relative humidity between passages 19 and 21 in Dulbecco's modified Eagle's medium F-12 with glutamine (500 ml), with 10% FBS heat inactivated (50 ml) and 1% of penicillin/streptomycin solution (5 ml (PAA, UK)). Cells were seeded at a density of 0.5–1 × 10⁶ cells/dish in Petri dishes (diameter 100 mm).

Human colon adenocarcinoma cells (Caco-2, ECACC Salisbury, Wiltshire, UK) were cultured between passages 15 and 19 in a humidified atmosphere of 5% CO₂/95% air in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), supplemented with 10% heat-inactivated bovine serum, L-glutamine (2 mM), non-essential amino acids (1%), penicillin (100 U/ml), and streptomycin (100 lg/ml) (all from PAA, UK). Culture medium was changed every 2–3 days and the culture was split approximately every 7 days. For subculturing, the cells were removed enzymatically (0.25% trypsin–EDTA, 1 min, 37 °C), split 1:3, and subcultured in 6 well plates (PAA, UK). For transport experiments, 2.5 × 10⁵ cells were seeded in Transwell-clear, tissue culture treated polyester membrane filter inserts (pore size 0.4 μm, diameter 24 mm, PAA, UK) in 6-wells plates. Cells were allowed to grow and differentiate to confluent monolayers for about 20–22 days. The medium was changed twice a week. The apical and basolateral compartments contained 1.2 and 2 ml of culture medium, respectively. The integrity of the monolayers was checked by measuring transepithelial electrical resistance across the layer (TEER) values, using a Millicell-ERS epithelial voltohmmeter (Millipore Co., Bedford, MA). Experiments were conducted only in cell monolayers that showed a TEER value between 400 and 1000 Ω per cm².

Assessment of cellular uptake/association and metabolism

HUVEC and HepG2 were grown in petri dishes to a confluence of 80–90%. Prior to experiments, old medium was removed and cells were washed with PBS, pH 7.4. Appropriate amounts of EC (0, 0.1, 1, and 10 μM), or a mix of the major structurally related EC metabolites (E3G, E3S, 3ME5S, and 3M7S 250 nM), were added to the growth medium (7 ml) and cells were incubated at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ for 1 h. After incubation, 1 ml of the medium was removed and immediately frozen in liquid nitrogen and kept at –80 °C afterwards. Cells were washed twice with ice-cold PBS, and 200 μl of ice-cold 0.1 M HCl was added. Cells were scraped, the cell homogenates sonicated 3 times for 30 s, centrifuged at 800g for 10 min and the supernatant was collected and

transferred to -80°C storage. One aliquot of 20 μL was kept separately for protein analysis.

For Caco-2 cells, the medium was removed and cells were washed with PBS, pH 7.4. Test compounds (conc. as above) were added to the apical side in 1.2 ml of transport buffer consisting in PBS, 1% non-essential amino acids and 1 mM of ascorbic acid. Transport buffer (2 ml) was also added to the basolateral side. Incubation was for 1 h at 37°C at a humidified atmosphere of 5% CO_2 , after which apical and basolateral medium was collected, frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C . In addition, cell filters were washed with ice-cold PBS, prior to addition of 500 μL of 0.1 M HCl, and cell homogenate collection, which were again sonicated 3 times for 30 s and centrifuged at 800g for 10 min, prior to storage at -80°C .

Uptake data is expressed as picomoles in supernatant and cell lysates, per petri dish, or pmol/mg protein in cell lysate. Uptake refers to both cytosolic accumulation and membrane/cell-associated. Recoveries were calculated respect to the initial amount of compound incubated on each Petri dish.

Stability tests of (–)-epicatechin and its metabolites in cell culture medium

EC and its metabolites (E3G, E3S, 3ME5S and 3ME7S, 1 μM) were dissolved in endothelial basal medium phenol red free and kept in 6-well plates at 37°C with 5% CO_2 in a humidified atmosphere for 1 h. All the tests were done in triplicate. The amount of each compound remained in endothelial medium was determined by HPLC.

Sample preparation and analysis of (–)-epicatechin and its metabolites in plasma, supernatants and cell lysates by HPLC

The analytical protocol previously described for the analysis of SREM in plasma and urine [16] was adapted in order to measure cellular levels of flavanols and metabolites. Supernatants (1 ml) or cell lysates received 50 μL of 3'-O-ethyl-(–)-epicatechin (10 μM) (recovery standard) and 2 ml of phosphoric acid 3.4% (w/v) pH 1.2. Samples were vortexed and kept on ice. Thereafter, samples were loaded onto solid phase extraction (SPE) cartridges (Oasis HLB 60 mg, 3 cc) previously conditioned with 1 ml of *N,N*-dimethyl formamide (DMF):methanol (7:3) and 0.5% (v/v) acetic acid in water. The washing steps consisted of 3 ml of 0.5% (v/v) acetic acid in water, 1 ml of water:methanol:acetic acid (80:20:0.5) and 1 ml of 0.5% (v/v) acetic acid in acetonitrile. For elution, cartridges were dried and eluted with the addition of 1 ml of DMF:methanol (7:3) twice. The total volume was reduced to approximately 50 μL using a speedvac concentrator (Thermo Electron Corp., SPD131DDA-115) at 2–3 mmHg of pressure and refrigerated vapor trap (Thermo Electron Corp., RVT4101-115) working at -100°C . Samples were then mixed with a solution containing 75 pmols of catechol and 300 pmols of resorcinol (internal standards).

EC and its metabolites were quantified using an Agilent 1200 series HPLC (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, USA) equipped with a diode array detector, a fluorescence detector linked to the HP Chemstation Software system and an electrochemical detector using CoulArray software, as previously described [16]. Samples (100 μL) were injected onto a reversed-phase Phenomenex Luna C18 (2) column (4.6 \times 150 mm) with 3 μm particle size. The mobile phase consisted of HPLC water (A), 200 mM Sodium Acetate, pH 4.4/methanol (84/16) (B), Methanol (C), and Acetonitrile (D). The flow rate was 0.8 ml/min. Detection of flavanols and their metabolites was performed using the fluorescent detector with excitation wavelength of 276 nm and emission wavelength of 316 nm and the electrochemical detector with potentials of 550 and 225 mV. The

concentration of each compound was determined using an external calibration curve produced with the use of authentic standards provided by Mars Incorporated.

Statistical analysis

Data were expressed as means \pm SEM. Statistical comparisons were made by one way ANOVA with a confidence level of 95%, using Graph-Pad Prism 5.02 software (GraphPad, San Diego, CA, USA). The significance level was set at $p < 0.05$.

Results

Absorption and metabolism of (–)-epicatechin in humans

Following consumption of a flavanol-rich drink containing 800 mg of cocoa flavanols per 75 kg of body weight (106 mg of EC), a range of structurally related EC metabolites (SREM) were detected and quantified by HPLC with fluorescence and electrochemical detection. At 1 h post-consumption, E3G, E3S, 3ME5S, and 3ME7S were the major metabolites detected in the plasma of all subjects post-consumption (517 \pm 68, 212 \pm 22, 125 \pm 15, and 116 \pm 16 nM, respectively), accounting for approximately 94% of the sum of total flavanol metabolites quantified, with the remaining consisting of E5S, E7G, E7S and native EC (25 \pm 3, 5 \pm 2, 17 \pm 7, and 7 \pm 2 nM, respectively) (Fig. 1).

Stability test of (–)-epicatechin and its metabolites

EC and the major structurally-related EC metabolites present in human plasma upon ingestion were stable in cell medium following 1 h incubation at 37°C , with levels decreasing by 10.2 \pm 1% for EC ($p = 0.02$), 0.4 \pm 1% ($p = 0.9$) for E3G, 8.3 \pm 3% for E3S ($p = 0.04$), 6.9 \pm 4% for 3ME5S ($p = 0.9$), and 1.4 \pm 3% ($p = 0.4$) for 3ME7S.

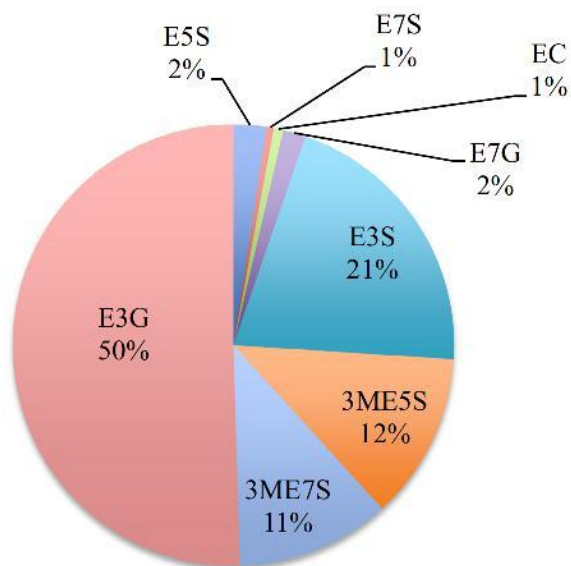


Fig. 1. Metabolism of (–)-epicatechin (EC) in human subjects ($n = 20$) after 1 h post-consumption of 800 mg of cocoa flavanols (per 75 kg of body weight) containing 106 mg of EC. The 4 major structurally related-EC metabolites (SREM) were (–)-epicatechin-3- β -D-glucuronide (E3G), (–)-epicatechin-3'-sulfate (E3S), 3'-O-methyl-(–)-epicatechin-5-sulfate (3ME5S) and 3'-O-methyl-(–)-epicatechin-7-sulfate (3ME7S). Other metabolites present in a minor extent (1–2% of the total) were (–)-epicatechin-5-sulfate (E5S), (–)-epicatechin-7-sulfate (E7S), (–)-epicatechin-7- β -D-glucuronide (E7G) and EC.

282 *Uptake and metabolism of (–)-epicatechin and its metabolites in*
283 *endothelial cells*

284 When 0.1, 1, or 10 μM of EC was incubated with HUVEC cells for
285 1 h, EC, 3ME7G, and 3ME7S were detected in both supernatant and
286 cells (Table 1). The percentage of EC and metabolites associated
287 with cells after 1 h of incubation was between 0.2% and 5%.
288 Approximately 52% of the total cell-associated EC was 3ME7G,
289 24% 3ME7S with 26% being EC (1 μM EC, Table 1). In medium,
290 approximately 50% of the EC initially added was recovered as
291 3ME7G and 3ME7S. At the higher concentrations tested (10 μM),
292 E3G was also found in the supernatant (Table 1).

293 When a mix of the major flavanol metabolites (E3G, E3S,
294 3ME5S, and 3ME7S) was incubated with HUVECs, no metabolites
295 or EC were found in the cell lysate following exposure, although
296 all exposed metabolites were detected in the medium, accounting
297 for approximately 60% of the initial amounts added (Table 2).
298 The recovery for each metabolite was different, with 90% recovery for
299 E3G, 46% for E3S, 64% for 3ME5S and 38% for 3ME7S. Although
300 we have shown that the metabolites tested are stable in cell med-
301 ium at the conditions used in the experiments, we cannot discount
302 that the metabolites exposed were less stable in the presence of
303 cells.

304 *Uptake and metabolism of (–)-epicatechin and its metabolites in*
305 *HepG2 cells*

306 Incubation of 0.1, 1, and 10 μM of EC with HepG2 cells for 1 h,
307 led to the detection of EC, 3ME7G, 4ME5G, 3ME5S and 3ME7S in
308 both supernatant and cell lysates (Table 1). The percentage of EC

309 associated to the cells was 0.2–0.7%. Approximately 50% of the
310 total cell-associated EC was unconjugated, and 50% was metabo-
311 lized to 3ME7G, 3ME7S and 3ME7G in equal amounts (0.1 μM
312 EC, Table 1). At the higher concentration tested, the profile chan-
313 ged, with 42% unconjugated EC, 47% 3ME7S, 9% 3ME7G, and minor
314 amounts of 3ME5S and 4ME5G found in the cell lysate (Table 1). In
315 medium collected after 1 h exposure, around 39% of EC was uncon-
316 jugated, 43% was found as 3ME7S and 18% as 3ME7G. The rate of
317 conjugation of EC in HepG2 was similar to HUVECs.

318 No metabolites or EC were found in cell lysates following expo-
319 sure to the mixture of E3G, E3S, 3ME5S and 3ME7S with all being
320 recovered in the medium at 1 h and accounting for 100% of the ini-
321 tial amount exposed (Table 2). However, the relative abundance of
322 each individual SREM was different after incubation, with 3 times
323 more E3G than the initially added, and lower E3S (27% of initial),
324 3ME7S (39% of initial) and 3ME7S (59% of initial) (Table 2).

325 *Uptake, transport and metabolism of (–)-epicatechin and its*
326 *metabolites in the Caco-2 monolayer model*

327 After incubation with EC, both EC and 3ME7S were observed to
328 be associated with Caco-2 cells at all the concentrations tested
329 (Table 3). In addition, at 10 μM EC, 3ME7G was also detected in
330 the cell lysate (Table 3). Beside EC, significant amounts of 6 metabo-
331 lites were found in the apical side (E3G, 3ME5G, 3ME7G, 4ME5G,
332 4ME7G and 3ME7S), whereas EC and 3ME7S were detected in the
333 basolateral side, suggesting only those 2 compounds transverse the
334 monolayer. However, at the higher concentration tested, small
335 amounts of E3G, 3ME7G and 4ME5G were also detected in the
336 basolateral side (Table 3).

337 **Table 1**
338 Uptake and metabolism of (–)-epicatechin (EC) in HUVEC and HepG2 in petri dishes containing approximately 1×10^6 cells/dish. The percentages of each metabolite in medium
339 or cells are given in brackets.

	0.1 μM EC (700 pmol)		1 μM EC (7000 pmol)		10 μM EC (70,000 pmol)	
	Supernatant	Cell	Supernatant	Cell	Supernatant	Cell
<i>HUVEC</i>						
EC	350 (100%)	nd	3910 (99%)	17 (0.4%)	34396 (99.8%)	60 (0.2%)
E3G	nd	nd	nd	nd	828 (100%)	nd
E5G	nd	nd	nd	nd	nd	nd
E7G	nd	nd	nd	nd	nd	nd
E3S	nd	nd	nd	nd	nd	nd
E5S	nd	nd	nd	nd	nd	nd
E7S	nd	nd	nd	nd	nd	nd
3ME5G	nd	nd	nd	nd	nd	nd
3ME7G	129 (82%)	29 (18%)	1880 (97%)	48 (2.5%)	13752 (99.8%)	20 (0.14%)
4ME5G	nd	nd	nd	nd	nd	nd
4ME7G	nd	nd	nd	nd	nd	nd
3ME5S	nd	nd	nd	nd	nd	nd
3ME7S	262 (98%)	5 (2%)	2660 (99%)	13 (0.5%)	18311 (99.8%)	44 (0.2%)
Total	741 (96%)	34 (4%)	8450 (99%)	78 (1%)	67287 (99.8%)	124 (0.2%)
% Recovery	106	5	121	1	96	0.2
<i>HepG2</i>						
EC	232 (99%)	3 (1%)	3285(100%)	nd	29279 (99%)	168 (0.6%)
E3G	nd	nd	nd	nd	nd	nd
E5G	nd	nd	nd	nd	nd	nd
E7G	nd	nd	nd	nd	nd	nd
E3S	nd	nd	nd	nd	nd	nd
E5S	nd	nd	nd	nd	nd	nd
E7S	nd	nd	nd	nd	nd	nd
3ME5G	nd	nd	nd	nd	nd	nd
3ME7G	107 (99%)	1 (0.9%)	1286 (100%)	nd	9758 (99.6%)	37 (0.4%)
4ME5G	nd	nd	nd	nd	295 (99.9%)	0.3 (0.1%)
4ME7G	nd	nd	nd	nd	nd	nd
3ME5S	nd	1 (100%)	nd	nd	nd	8 (100%)
3ME7S	259 (99.6%)	1 (0.4%)	2058 (99.8%)	3 (0.1%)	13529 (98.6%)	189 (1.3%)
Total	598 (99%)	6 (0.9%)	6633 (99.8%)	12 (0.2%)	52862 (99.2%)	402 (0.7%)
% Recovery	85.4	0.7	94.8	0.2	75.5	0.6

All data are mean values of uptake and are represented in pmol and percentage of total in supernatant or cells (brackets).

Table 2

Uptake and metabolism of a mixture of the major structurally-related (–)-epicatechin metabolites (SREM, mix of 250 nM of E3G, 250 nM of E3S, 250 nM of 3ME5S, and 250 nM of 3ME7S) in HUVEC, HepG2 and Caco-2 monolayer. The percentages of each metabolite in medium or cells are given in brackets.

Initial (pmol)		HUVEC SREM mix		HepG2 SREM mix		Caco-2 SREM mix		
		Supernatant	Cell	Supernatant	Cell	Apical	Cell	Basolateral
1750	EC	nd	nd	nd	nd	14.5 (100%)	nd	nd
	E3G	1571 (100%)	nd	5200 (100%)	nd	2159 (96%)	21 (0.9%)	65 (2.9%)
	E5G	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	E7G	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
1750	E3S	806 (100%)	nd	476 (100%)	nd	1569 (100%)	nd	nd
	E5S	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	E7S	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	3ME5G	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	3ME7G	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	4ME5G	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	4ME7G	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	3ME5S	1116 (100%)	nd	683 (100%)	nd	1719 (100%)	nd	nd
1750	3ME7S	667 (100%)	nd	1042 (100%)	nd	1578 (100%)	nd	nd
7000	Total	4160 (100%)	nd	7404 (100%)	nd	7040 (98.8%)	21 (0.3%)	65 (0.9%)
	% Recovery	59.4	nd	105.8	0.0	100.6	0.3	0.9

All data are mean values of uptake and are represented in pmol and in percentage of total in supernatant or cells (brackets).

Table 3

Uptake and metabolism of (–)-epicatechin (EC) in Caco-2 monolayer. Results are expressed in pmoles and the recoveries were calculated respect to the initial amount of EC. The percentages of each metabolite in medium or cells are given in brackets.

	0.1 μM EC (700 pmol)			1 μM EC (7000 pmol)			10 μM EC (70,000 pmol)		
	Apical	Cell	Basolateral	Apical	Cell	Basolateral	Apical	Cell	Basolateral
EC	395 (94%)	14 (3%)	13 (3%)	2294 (95%)	49 (2%)	76 (3%)	14620 (94%)	385 (2%)	620 (4%)
E3G	nd	nd	nd	6 (100%)	nd	nd	41 (91%)	nd	4 (9%)
E5G	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
E7G	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
E3S	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
E5S	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
E7S	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
3ME5G	2 (100%)	nd	nd	70 (100%)	nd	nd	313 (100%)	nd	nd
3ME7G	4 (100%)	nd	nd	48 (100%)	nd	nd	456 (99%)	2(1%)	2 (1%)
4ME5G	nd	nd	nd	79 (100%)	nd	nd	602 (97%)	nd	18 (3%)
4ME7G	nd	nd	nd	10 (100%)	nd	nd	60 (100%)	nd	nd
3ME5S	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
3ME7S	218 (95%)	5 (2%)	7 (3%)	1315 (94%)	32 (2%)	48 (3%)	9233 (93%)	255 (3%)	441 (4%)
Total	619 (94%)	19 (3%)	20 (3%)	3822 (95%)	81 (2%)	124 (3%)	25325 (93%)	642 (2%)	1085 (4%)
% Recovery	88	3	3	55	1	2	36	1	2

All data are mean values of uptake and are represented in pmol and percentage of total in supernatant or cells (brackets).

After exposure to the metabolite mix, only E3G was found to be associated to the Caco-2 cells (0.3% of the initial SREM) and present in the basolateral side (0.9% of the initial SREM), whereas all 4 metabolites (E3G, E3S, 3ME5S, 3ME7S) were found in the apical side. A small amount of EC was also found in the apical side at the higher concentration tested (Table 3). In contrast to HUVEC and HepG2 cells, the relative abundance of the individual metabolites was similar to the initial amount incubated in the cells (90–98% recovery), except for a slight increase in E3G recovery (128% respect to the initial amount of E3G added).

Discussion

Existing investigations on the mechanisms of action of dietary flavanols in cells have not taken into account the potential uptake and cellular metabolism of EC and metabolites. We show that such cellular metabolism may be relevant for those investigating mechanisms of action of flavanols. We show that EC is metabolized to 3ME7G and 3ME7S in HUVECs, presumably by the action of UDP-glucuronosyltransferases (UGT), sulfotransferases, and COMT. These metabolites were found in the cell lysate and in the medium, suggesting that EC is taken up by endothelial cells, methylated, glucuronidated, and sulfated before export to the medium. The

metabolite 3ME7S is one of the major 4 SREM that we have found in human plasma after consumption of a flavanol-rich drink (Fig. 1), together with E3G, E3S and 3ME5S, which is in agreement with recent work [16,17]. The metabolite 3ME7G has been also detected in human urine after ingestion of chocolate, however in very low amounts [17].

In contrast, when the major *in vivo* metabolites of EC (SREM) were incubated with HUVEC cells, no uptake or metabolism by endothelial cells was observed, which suggests that endothelial cells do not take up SREM i.e. there is no passive diffusion of SREM between supernatant and endothelial cell cytoplasm, that intracellular metabolites of EC are transported out of cells, and that extracellular glucuronidase activity appears implausible, as no EC was detected in the cell lysate or in the medium after incubation with the metabolite mix. This is in agreement with previous work conducted in dermal fibroblasts and cortical neurons [20], where EC was taken up by cells but no (–)-epicatechin-5-O-β-D-glucuronide or (–)-epicatechin-7-O-β-D-glucuronide were found associated with cells. Quercetin-7-O-β-D-glucuronide has also been shown unable to enter fibroblast cells, whilst quercetin has been detected in whole cell lysates [19]. The increase in polarity with glucuronidation and sulfation may limit their capacity to enter the cells. This suggests that the biological activity of glucuronide and sulfate metabolites may be restricted to the cell membrane, and not to

Table 4
Uptake and metabolism of (–)-epicatechin (EC, 1 μM) after 1 h incubation in HUVEC, HepG2 and Caco-2 monolayer cells.

	Cell-associated EC (1 μM; pmol/mg protein)		
	HUVEC	HepG2	Caco-2
EC	184 ± 0.8	24 ± 0.01	147 ± 17
E3G	nd	nd	nd
E5G	nd	nd	nd
E7G	nd	nd	nd
E3S	nd	nd	nd
E5S	nd	nd	nd
E7S	nd	nd	nd
3ME5G	nd	nd	nd
3ME7G	395 ± 4.8	7 ± 0.05	nd
4ME5G	nd	nd	nd
4ME7G	nd	nd	nd
3M5S	nd	5 ± 0.8	nd
3ME7S	139 ± 1.4	20 ± 0.06	92 ± 11
Total	718 ± 5.4	56 ± 0.02	239 ± 22

the cytosolic fraction. The uptake of EC in HUVECs was found to be higher than in HepG2 and Caco-2 monolayer (Table 4), and similar than that observed in cortical neurons (24 vs 12 pmol/10⁶ cells in HUVEC) [20]. Our data are also in agreement with that previously reported for the uptake of EC in fibroblasts (184 vs 127 pmol/mg protein, in HUVEC and fibroblasts, respectively) (Table 4) [18]. Thus, endothelial cells may be an important organ for metabolism, and for removal of unconjugated EC from blood.

As in HUVECs, the major metabolites of EC formed in HepG2 were 3ME7G and 3ME7S, together with smaller amounts of 4ME5G and 3ME5S (Fig. 2), whereas in Caco-2 cells 6 metabolites were formed, including E3G, 3ME5G, 3ME7G, 4ME5G, 4ME7G and 3ME7S (Fig. 2). Of them, 3ME7S was the most abundant metabolite formed in HUVEC, HepG2 and Caco-2 monolayer cells, and a major human plasma metabolite (Fig. 1). E3G and 3ME5S were formed in minimal amounts in Caco-2 and HepG2, respectively, and E3S was not formed at all in any of the cell models. Thus, the metabolites formed only account for 1 of the 4 major SREM in human plasma, which suggest that the *in vitro* models investigated here do not completely reflect *in vivo* metabolism.

When a mix of the major human SREM was incubated with HepG2, as in HUVEC, no metabolites were found to be associated to the cells. Surprisingly, the relative abundance of each individual metabolite was changed with respect to the initial amounts added, with higher amounts of E3G, but lower E3S, 3ME5S, and 3ME7S, compatible with the hypothesis that desulfation and possibly

demethylation followed by glucuronidation took place in HepG2 (Table 2).

Flavonoid glucuronidation is catalyzed by an array of UGT1 and UGT2B isoforms [25], although there is no clear consensus on this, and available evidence suggest that different types of flavonoids are glucuronidated by the action of different isoenzymes [25,26]. In particular little information exist regarding the expression and activity of Phase II enzymes in endothelial cells. A recent study has identified UGT1A9 as a producer of E3G *in vitro* [27], and UGT2B was reported to be present at the protein level in endothelial cells [28], however it is presently unknown which are the major UGT isoforms responsible for the glucuronidation of EC *in vivo*. Steffen et al. [29] observed that when HUVEC cells were incubated for 24 h with (–)-epicatechin, 3'-O-methyl-(–)-epicatechin and 4'-O-methyl-(–)-epicatechin were generated in the cells, and they attributed this finding to the presence of COMT in cells. It is possible that after 24 h incubation the metabolites generated will be different than after 1 h incubation, or that the techniques available at the time and the lack of available standards were insufficient to accurately identified the metabolites formed, in particular the glucuronidated and sulfated metabolites. Beside this, very few reports on endothelial metabolism of flavonoids exist. Anthocyanins have been shown to be taken up and metabolized after incubation with endothelial cells [30,31], and a gut microbial metabolite of procyanidins and (–)-epicatechin, the δ-(3,4-dihydroxyphenyl)-γ-valerolactone, was shown to be taken up by endothelial cells [32], however cell metabolism was not investigated.

It has been suggested that deconjugation of flavonoid metabolites may be necessary for them to exert beneficial effects. Experiments in spontaneously hypertensive rats showed that the antihypertensive effects of quercetin-3-glucuronide were abolished by β-glucuronidase inhibition, suggesting that deconjugation is required for the bioactivity of quercetin metabolites [33]. Those experiments were conducted *in vivo* and *in vitro* in mesenteric vessels, and it has been suggested that flavonoid conjugates may pass through the injured endothelium to reach vascular smooth muscle cells or macrophages and exert their biological effects in the blood vessels followed by deconjugation of the conjugates [34,35]. Thus, it is possible that phase II metabolites may be converted into the aglycone by the action of glucuronidases and sulfatases, however under our *in vitro* conditions, we did not observed any EC being formed after SREM incubation in HUVEC.

In conclusion, our results suggest that HUVEC cells cannot take up EC metabolites, although they can take up and metabolize unconjugated EC into 3ME7G and 3ME7S, which then can be eff-

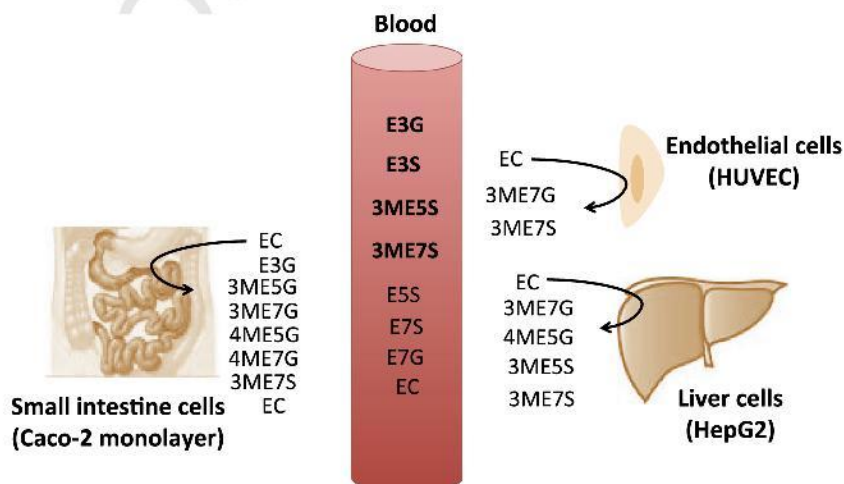


Fig. 2. Uptake and metabolism of (–)-epicatechin (EC) in HUVEC (endothelial cells) HepG2 (liver cells) and Caco-2 monolayer (small intestine) cell lines.

luxed back to the extracellular medium. Other major human metabolites present in plasma after flavanol consumption, such as E3G, E3S, and 3ME5S do not seem to be generated in cells. Further investigations are needed on the uptake and metabolism of flavonoids and their metabolites in endothelial cells, and the role of UGT, SULT, COMT, glucuronidases, and sulfatases in the conjugation and deconjugation of flavonoids and their metabolites in different human tissues and cells, in order to elucidate the mechanisms that are driving the vasculoprotective effects of flavonoids in humans.

Acknowledgments

This work was supported by a European Union FP7 research Grant (FP7-KBBE-2008-2B) entitled “Targeted delivery of dietary flavanols for optimal human cell function: effect on cardiovascular health (FLAVIOLA)”.

References

- [1] D. Grassi, S. Necozione, C. Lippi, G. Croce, et al., *Hypertension* 46 (2005) 398–405.
- [2] D. Taubert, R. Roosen, C. Lehmann, N. Jung, E. Schomig, *JAMA* 298 (2007) 49–60.
- [3] B. Buijsse, C. Weikert, D. Drogan, M. Bergmann, H. Boeing, *Eur. Heart J.* 31 (2010) 1616–1623.
- [4] A. Cassidy, E.J. O'Reilly, C. Kay, L. Sampson, et al., *Am. J. Clin. Nutr.* 93 (2011) 338–347.
- [5] C. Heiss, M. Kelm, *Eur. Heart J.* 31 (2010) 1554–1556.
- [6] K. Ried, T. Sullivan, P. Fakler, O.R. Frank, N.P. Stocks, *BMC Med.* 8 (2010) 39.
- [7] M.B. Engler, M.M. Engler, C.Y. Chen, M.J. Malloy, et al., *J. Am. Coll. Nutr.* 23 (2004) 197–204.
- [8] C. Heiss, A. Dejam, P. Kleinbongard, T. Schewe, et al., *JAMA* 290 (2003) 1030–1031.
- [9] C. Heiss, D. Finis, P. Kleinbongard, A. Hoffmann, et al., *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 49 (2007) 74–80.
- [10] H. Schroeter, C. Heiss, J. Balzer, P. Kleinbongard, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103 (2006) 1024–1029.
- [11] J. Balzer, T. Rassaf, C. Heiss, P. Kleinbongard, et al., *J. Am. Coll. Cardiol.* 51 (2008) 2141–2149.
- [12] C. Heiss, S. Jahn, M. Taylor, W.M. Real, et al., *J. Am. Coll. Cardiol.* 56 (2010) 218–224.
- [13] K.J. Murphy, A.K. Chronopoulos, I. Singh, M.A. Francis, et al., *Am. J. Clin. Nutr.* 77 (2003) 1466–1473.
- [14] D.A. Pearson, T.G. Paglieroni, D. Rein, T. Wun, et al., *Thromb. Res.* 106 (2002) 191–197.
- [15] L.M. Ostertag, N. O'Kennedy, P.A. Kroon, G.G. Duthie, B. de Roos, *Mol. Nutr. Food Res.* 54 (2010) 60–81.
- [16] J.I. Ottaviani, T.Y. Momma, G.K. Kuhnle, C.L. Keen, H. Schroeter, *Free Radic. Biol. Med.* 52 (2012) 1403–1412.
- [17] L. Actis-Goretta, A. Leveques, F. Giuffrida, F. Romanov-Michailidis, et al., *Free Radic. Biol. Med.* 53 (2012) 787–795.
- [18] J.P. Spencer, M.M. Abd-el-Mohsen, C. Rice-Evans, *Arch. Biochem. Biophys.* 423 (2004) 148–161.
- [19] J.P. Spencer, G.G. Kuhnle, R.J. Williams, C. Rice-Evans, *Biochem. J.* 372 (2003) 173–181.
- [20] J.P. Spencer, H. Schroeter, A.J. Crossthwaite, G. Kuhnle, et al., *Free Radic. Biol. Med.* 31 (2001) 1139–1146.
- [21] J.P. Spencer, H. Schroeter, G. Kuhnle, S.K. Srail, et al., *Biochem. J.* 354 (2001) 493–500.
- [22] K. Vafeiadou, D. Vauzour, A. Rodriguez-Mateos, M. Whiteman, et al., *Arch. Biochem. Biophys.* 478 (2008) 195–200.
- [23] A.R. Proteggente, S. Basu-Modak, G. Kuhnle, M.J. Gordon, et al., *Photochem. Photobiol.* 78 (2003) 256–261.
- [24] M. Salucci, L.A. Stivala, G. Maiani, R. Bugianesi, V. Vannini, *Br. J. Cancer* 86 (2002) 1645–1651.
- [25] B. Wu, K. Kulkarni, S. Basu, S. Zhang, M. Hu, J. Pharm. Sci. 100 (2011) 3655–3681.
- [26] Y.C. Wong, L. Zhang, G. Lin, Z. Zuo, *Expert Opin. Drug Metab.* 5 (2009) 1399–1419.
- [27] J.W. Blount, M. Ferruzzi, D. Raftery, G.M. Pasinetti, R.A. Dixon, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 417 (2012) 457–461.
- [28] O. Barbier, H. Lapointe, M. El Alfy, D.W. Hum, A. Belanger, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85 (2000) 4819–4826.
- [29] Y. Steffen, C. Gruber, T. Schewe, H. Sies, *Arch. Biochem. Biophys.* 469 (2008) 209–219.
- [30] L. Ziberna, F. Tramer, S. Moze, U. Vrhovsek, et al., *Free Radic. Biol. Med.* 52 (2012) 1750–1759.
- [31] S. Ohno, S. Nakajin, *Drug Metab. Dispos.* 37 (2009) 32–40.
- [32] K. Uhlenhut, P. Hogger, *Free Radic. Biol. Med.* 53 (2012) 305–313.
- [33] P. Galindo, I. Rodriguez-Gomez, S. Gonzalez-Manzano, M. Duenas, et al., *PLoS ONE* 7 (2012) e32673.
- [34] Y. Kawai, T. Nishikawa, Y. Shiba, S. Saito, et al., *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 9424–9434.
- [35] M. Mochizuki, K. Kajiya, J. Terao, K. Kaji, et al., *Biofactors* 22 (2004) 201–204.

489
490
491
492
493
494
495
496
497
498
499
500
501
502
503
504
505
506
507
508
509
510
511
512
513
514
515
516
517
518
519
520
521
522
523
524
525
526
527
528
529
530
531
532
533
534

Comunicación escrita IV.

N. Toro-Funes, A. Rodríguez-Mateos, J. P. E. Spencer, M. T. Veciana-Nogués, M. C. Vidal-Carou. Intracellular metabolism of isoflavones in endothelial cells. "IUNS 20th International Congress of Nutrition". Granada (España). 15-20 Septiembre del 2013.

Intracellular metabolism of isoflavones in endothelial cells



Toro-Funes N.^{a,b}; Rodríguez-Mateos A.^b; Spencer J.P.E.^b; Veciana-Nogués M.T.^a; Vidal-Carou M.C.^a;

^a Department of Nutrition and Food Science-XaRTA, Campus de l'Alimentació Torribera, University of Barcelona. Av. Prat de la Riba 171, 08921 Santa Coloma de Gramenet. Barcelona, Spain. Tel: +34 934033785 e-mail: mcvidal@ub.edu

^b Molecular Nutrition Group, School of Chemistry, Food and Pharmacy, University of Reading, PO Box 226, RG2 6AP, Reading, UK

Background and Objectives:

Consumption of soy isoflavones, in particular genistein (Ge) and daidzein (De), may have beneficial effects on cardiovascular health, including a favourable effect on blood lipids, inhibition of platelet aggregation and improvement of vascular function (Rimbach et al., 2008). De could be converted into equol (Eq) due to the action of intestinal microbiota before absorption (Setchell, 2002). Ge and De are extensively metabolized after absorption by phase II enzymes to form mainly glucuronide and sulfate metabolites (Hosoda et al., 2010). Little attention has been given to the potential intracellular metabolism of isoflavones in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC), despite being a widely used *in vitro* model for assessing mechanisms of action of polyphenols in the vascular endothelium (Andrade et al., 2011). Therefore, the aim of this work is to determine whether endothelial cells (HUVEC) can metabolize isoflavones, using hepatocytes and Caco-2 cells monolayer as positive controls.

Methods:

Ge, De and Eq (0-100 µM), were incubated in HUVEC, Hep-G2 and Caco-2 monolayer cell lines for 2 h. Then, supernatants and cell lysates were collected and processed for analysis. Aglycones were determined by ultra high pressure liquid chromatography with UV detection (UHPLC-UV) following the method by Toro-Funes et al. (2012). Isoflavone metabolites were identified by liquid chromatography with mass spectrometry detection (LC-LTQ-MS).



Results:

Incubation of HUVEC with Ge for 2 hours led to the formation of methylglucuronide and methylsulfate metabolites of Ge, found in both supernatant and cell lysate, representing the 16-20% of the initial amount of Ge (Table 1). Ge was mainly metabolized as genistein-methyl-sulfate (55-65%) whereas genistein-methyl-glucuronide form only achieved 25-35%. When incubation of HUVEC was carried out with De, a methylglucuronide metabolite was detected in the supernatant and cell lysate, representing around the 10-15% of the initial De (Table 1). We found that Ge and De can enter endothelial cells after 2 hours of incubation. Eq can also enter endothelial cells however is not metabolized by phase II enzymes.

Table 1: Genistein, daidzein, equol and their conjugates (µM) in the HUVEC cell model.

	0.1 µM		1 µM		10 µM		100 µM	
	Supernatant	Cell lysate	Supernatant	Cell lysate	Supernatant	Cell lysate	Supernatant	Cell lysate
Genistein	nd	nd	0.83	0.05	8.34	0.48	78.95	0.61
Ge-Gluc	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Ge-S	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Ge-M-Gluc	nd	nd	0.05	nd	0.46	0.08	4.97	1.62
Ge-M-S	nd	nd	0.09	0.02	0.68	0.21	7.85	3.47
Daidzein	nd	nd	0.81	nd	7.93	0.38	78.98	1.46
De-Gluc	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
De-M-Gluc	nd	nd	0.08	nd	0.84	0.51	10.61	4.44
Equol	nd	nd	0.89	0.12	9.14	0.08	89.15	10.84

Abbreviations: Ge-Gluc, genistein-glucuronide; Ge-S, genistein-sulfate; Ge-M-Gluc, genistein-methyl-glucuronide; Ge-M-S, genistein-methyl-sulfate; De-Gluc, daidzein-glucuronide; De-M-Gluc, daidzein-methyl-glucuronide.



Figure 1: Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC). Available on the website of ScienCellTM Research Laboratories on www.sciencellonline.com

Table 3: Genistein, daidzein, equol and their conjugates (µM) in the Caco-2 cell monolayer.

	0.1 µM			1 µM			10 µM			100 µM		
	Apical	Basolateral	Cell lysate	Apical	Basolateral	Cell lysate	Apical	Basolateral	Cell lysate	Apical	Basolateral	Cell lysate
Genistein	nd	nd	nd	0.18	nd	nd	2.13	0.41	nd	66.26	14.05	6.12
Ge-Gluc	nd	nd	nd	0.34	0.43	0.03	3.49	4.48	0.39	3.87	4.65	3.77
Ge-S	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Ge-M-Gluc	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Ge-M-S	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Daidzein	nd	nd	nd	0.23	0.11	nd	3.19	1.87	0.41	73.87	10.49	2.07
De-Gluc	nd	nd	nd	0.34	0.23	0.03	2.16	1.59	0.64	3.58	4.31	2.46
De-M-Gluc	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Equol	nd	nd	nd	0.7	0.22	0.08	6.94	2.22	0.82	62.65	22.46	10.89

Abbreviations: Ge-Gluc, genistein-glucuronide; Ge-S, genistein-sulfate; Ge-M-Gluc, genistein-methyl-glucuronide; Ge-M-S, genistein-methyl-sulfate; De-Gluc, daidzein-glucuronide; De-M-Gluc, daidzein-methyl-glucuronide.

Conclusions:

Ge and De are metabolized into their methyl conjugates in endothelial cells, while Eq metabolites were not detected. These findings may have important implications in the investigation of the cardioprotective mechanisms of action of isoflavones.

Keywords: Endothelial cells, isoflavones, intracellular metabolism



Figure 2: Human Hepatocellular carcinoma Hep-G2 cells.

In the Hep-G2 cell model, a glucuronide and sulfate conjugates of Ge were detected in both supernatant and cell lysate, representing the 50% of initial Ge at 1 and 10 µM (Table 2). The genistein-glucuronide represented the 60-70%. In the case of De, only a glucuronide conjugate was found in the supernatant and cell lysate, representing the 70-80 and 15-20%, respectively (Table 2). No metabolites of Eq were found in Hep-G2 cells, however Eq was found in the cell lysate.

Table 2: Genistein, daidzein, equol and their conjugates (µM) in the Hep-G2 cell model.

	0.1 µM		1 µM		10 µM		100 µM	
	Supernatant	Cell lysate	Supernatant	Cell lysate	Supernatant	Cell lysate	Supernatant	Cell lysate
Genistein	nd	nd	nd	nd	2.32	nd	81.77	0.91
Ge-Gluc	nd	nd	0.28	0.07	2.14	0.47	8.54	3.88
Ge-S	nd	nd	0.11	0.04	1.66	0.16	4.03	1.22
Ge-M-Gluc	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Ge-M-S	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Daidzein	nd	nd	nd	nd	5.09	nd	78.63	1.18
De-Gluc	nd	nd	0.07	nd	4.15	0.63	14.03	4.45
De-M-Gluc	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Equol	nd	nd	0.93	0.07	8.72	1.26	96.71	3.28

Abbreviations: Ge-Gluc, genistein-glucuronide; Ge-S, genistein-sulfate; Ge-M-Gluc, genistein-methyl-glucuronide; Ge-M-S, genistein-methyl-sulfate; De-Gluc, daidzein-glucuronide; De-M-Gluc, daidzein-methyl-glucuronide.

Ge and De can be transported through the Caco-2 cell monolayer to the basolateral side (Table 3). Moreover, Ge and De were found in the cell lysate. Ge and De were metabolized into their glucuronide conjugates and excreted to the apical side (~30-40%) and basolateral side (~40-50%). Eq can also be transported through the Caco-2 cell monolayer, but no metabolites were found (Table 3).

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. Puesta a punto de un método por UHPLC que permite la determinación de 12 isoflavonas en la bebida de soja en 8 min, con una linealidad, sensibilidad, precisión y exactitud muy satisfactorias.
2. Las bebidas de soja y almendra aportan un valor nutritivo interesante, igual o superior al de la leche de vaca en algunos nutrientes, siendo además ricas en compuestos bioactivos que no se encuentran en la leche de vaca. Hasta donde llega nuestro conocimiento, no hay aportaciones previas sobre el valor nutritivo y biofuncional de la leche de almendra.
3. Las bebidas de soja presentan más proteínas y poliaminas que las bebidas de almendra y contenidos comparables de grasa, fibra y fitoesteroles. El perfil de la grasa es diferente, predominando el oleico en la bebida de almendra y el linoleico en la de soja. En comparación con la leche de vaca, ambas bebidas aportan fibra y fitoesteroles, y una mayor cantidad de tocoferoles y poliaminas.
4. Los tratamientos por UHPH permiten una mejora de la extracción de algunos compuestos bioactivos, como los fitoesteroles y las isoflavonas, siendo mayor el grado de extracción a medida que aumentan la presión y la temperatura aplicadas. En contrapartida afectan negativamente a componentes nutritivos, como los tocoferoles.
5. Los tratamientos por UHPH mantienen el perfil de aminoácidos, perfil de ácidos grasos, la disponibilidad de la lisina, los fitoesteroles de las bebidas de soja y de almendra, en comparación con los térmicos. El tratamiento térmico UHT produce una mayor digestibilidad de las proteínas y extracción de isoflavonas de las bebidas de soja que los tratamientos UHPH. Por otro lado, el tratamiento de esterilización UHT es más agresivo en la bebida de almendra que los tratamientos UHPH, produciendo una mayor proporción de ácidos *trans* y una mayor degradación de los tocoferoles que los tratamientos de UHPH.

6. Los compuestos más estables durante el almacenamiento de las bebidas de pasteurizadas o esterilizadas por UHPH fueron los esteroides vegetales.
7. Los tocoferoles se degradaron durante el almacenamiento en todas las muestras, aunque los tratamientos convencionales de pasteurización y de UHT los conservaron igual o mejor que los diferentes tratamientos por UHPH.
8. La disponibilidad de la lisina disminuyó durante el almacenamiento, pero se mantuvo más elevada en las bebidas de soja tratadas por UHPH. No se observaron diferencias entre tratamientos respecto a la pérdida de digestibilidad proteica a lo largo del almacenamiento.
9. Las isoflavonas de las bebidas de soja se mantuvieron más estables en los productos esterilizados que en los pasteurizados, presumiblemente porque fueron degradadas por la actividad microbiana residual de los productos pasteurizados.
10. Las bebidas de soja pasteurizadas térmicamente muestran una mayor formación de agliconas y una disminución de la disponibilidad de la lisina durante el almacenamiento en refrigeración que las muestras tratadas por UHPH, lo cual supone un efecto negativo desde un punto de vista sensorial y nutricional.
11. El contenido total y el perfil de las formas químicas de las isoflavonas en los productos derivados de la soja es muy diferente en función del tipo de producto. En los productos fermentados abundan las agliconas, mientras que en los productos no fermentados son mayoritarios los β -glucósidos.
12. Los productos derivados de la soja comerciales aportan cantidades elevadas de isoflavonas, que, con un consumo racional, superan en algunos casos los niveles mínimos sugeridos para lograr los efectos beneficiosos que se le atribuyen. Una o dos raciones de algunos productos derivados de la soja aportan contenidos de isoflavonas del mismo orden o incluso superiores a los que aporta una dosis de las preparaciones fitoterapéuticas para mujeres premenopáusicas y menopáusicas.
13. Teniendo en cuenta el nivel de seguridad establecido por el Panel de Expertos (NTP-CERHR), existe un riesgo potencial de sufrir efectos adversos de las isoflavonas en lactantes alimentados con fórmulas infantiles a base de soja.

14. Algunos productos fermentados de soja, como el sufu, el tamari o el paté de soja, contienen un alto contenido de aminas biógenas, especialmente de histamina y tiramina. Considerando la ración de consumo habitual, sólo el consumo de sufu puede conllevar un riesgo de aparición de efectos adversos de estas aminas, especialmente cuando hay un tratamiento con fármacos que inhiben la DAO y la MAO. Por su contenido en histamina, no son productos recomendables para personas con intolerancia a la histamina.
15. Las poliaminas, espermina y espermidina, presentan una gran capacidad antioxidante, mayor que la de algunos antioxidantes naturales o análogos sintéticos, como el α -tocoferol, el palmitato de ascorbilo o el galato de octilo. La actividad antioxidante de las poliaminas se manifiesta en todas las etapas del proceso oxidativo. Su capacidad antioxidante abre la puerta su utilización como aditivos antioxidantes naturales en los alimentos.
16. La actividad antioxidante de las poliaminas parece estar relacionada con su capacidad para quelar metales, y esto explica que la SPM (con cuatro grupos amino) tenga una mayor capacidad antioxidante que la SPD (con tres grupos amino). Además de este efecto, las poliaminas también tienen una cierta capacidad de captar radicales libres (aunque inferior a la de los otros antioxidantes estudiados).
17. Las isoflavonas, genisteina y daidzeina, son metabolizadas por las células endoteliales humanas a sus derivados conjugados. El equol entra dentro de las células endoteliales pero no se metaboliza. Este hallazgo puede tener interés para investigar los mecanismos de acción cardioprotectores de los flavonoides en los seres humanos.

CONCLUSIONS

1. A validated UHPLC-UV method for the simultaneous determination of 12 isoflavones in soymilk in 8 minutes shows satisfactory linearity, sensitivity, precision, and accuracy.
2. Soymilk and almond milk provide an interesting nutritive value, similar or greater than cow's milk. These vegetal milks are also rich in bioactive compounds, not found in cow's milk. To our knowledge, there is no previous data about the nutritional and biofunctional value of almond milk.
3. Soymilk contains more content of proteins and polyamines than almond milk and comparable levels of fat, fiber and phytosterols. They show different fatty acid profile, the oleic acid is the mayor one in almond milk whereas linoleic acid is the mayor in soymilk. Compared to cow's milk, both vegetable milks provide fiber and phytosterols, and higher levels of polyamines and tocopherols.
4. UHPH treatments improve the extraction of some bioactive compounds, such as phytosterols and isoflavones, being higher as pressure and temperature increase. On the other hand, both pressure and temperature affect the stability of some nutritive compounds, such as tocopherols.
5. UHPH treatments maintain the amino acid profile, fatty acid profile, the availability of lysine of soymilk and almond milk as heat treatments. The UHT heat treatment produces a higher digestibility of proteins and a higher extraction of isoflavones in soymilk than UHPH treatments. Furthermore, the UHT treatment produces a higher proportion of *trans* fatty acids and higher degradation of tocopherols in almond milk than UHPH treatments.
6. Phytosterols were the most stable compounds during storage of pasteurized or sterilized-UHPH soymilks.

7. Tocopherols were degraded during storage in all samples, although conventional pasteurization and UHT treatments preserved these nutritive compounds the same or better than UHPH treatment.
8. The availability of lysine decreased during storage, but was higher in UHPH-treated soymilks. No differences in the evolution of protein digestibility between treatments throughout storage were observed.
9. Isoflavones were more stable in sterilized than in pasteurized soymilk, presumably because they were degraded by residual microbial activity of pasteurized products.
10. Thermal pasteurized-soymilks showed a higher formation of aglycones and a lower availability of lysine under refrigerated storage than UHPH-pasteurized samples, which implies a negative effect from a sensory and nutritional point of view.
11. Total content and profile of isoflavones in soybean products are very different, depending on the type of product. Aglycones were the major chemical forms in fermented products, whereas β -glucosides were higher in non-fermented products.
12. An usual consumption of these products achieves the recommended healthy levels of isoflavones. One or two servings of some soybean products provide isoflavone contents of the same order or even higher than those provided by phytotherapeutic preparations for premenopausal and postmenopausal women.
13. There is a potential risk of adverse effects of isoflavones in infants fed by soybean-based infant formula, taking into account the safety levels established by the Panel of Experts (NTP-CERHR).
14. Some fermented soybean products such as sufu, tamari or soybean paste, contain a high content of biogenic amines, especially histamine and tyramine. Considering the usual serving consumption, only the consumption of sufu may involve a risk of adverse effects of these amines, especially individuals taking drugs that inhibit MAO and DAO.
15. Polyamines, spermine and sperdimine, have a high antioxidant capacity, higher than that of some natural or synthetic analogues antioxidants, such as α -tocopherol, ascorbyl palmitate or octyl gallate. Polyamines showed a high antioxidant activity in all steps of the oxidative

process. Their antioxidant capacity leads to the possibility to use them as natural antioxidants in food additives.

16. The antioxidant capacity of polyamines seems to be related to its ability to chelate metals, and this explains why SPM (with four amino groups) have a higher antioxidant capacity than the SPD (with three amino groups). In addition to this effect, polyamines also have some capacity to scavenge free radicals (although inferior to that of other antioxidants).
17. Isoflavones, genistein and daidzein, are metabolized by human endothelial cells into conjugates. In contrast, equol was taken up but not metabolized. This finding may be of interest to investigate the mechanisms of action of isoflavones in the cardiovascular system.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A

Achouri, A., Boye, J.I. & Zamani, Y. (2008). Soybean variety and storage effects on soymilk flavour and quality. *International Journal of Food Science & Technology*, 43, 82-90.

Adlercreutz, H., Honjo, H., Higashi, A., Fotsis, T., Hämäläinen, E., Hasegawa, T., & Okada, H. (1991). Urinary excretion of lignans and isoflavonoid phytoestrogens in Japanese men and women consuming a traditional Japanese diet. *The American journal of clinical nutrition*, 54(6), 1093-1100.

Ahn-Jarvis, J., Clinton, S. K., Riedl, K. M., Vodovotz, Y., & Schwartz, S. J. (2012). Impact of food matrix on isoflavone metabolism and cardiovascular biomarkers in adults with hypercholesterolemia. *Food & function*, 3(10), 1051-1058.

Akoum, O., Richfield, D., Jaffrin, M. Y., Ding, L. H., & Swart, P. (2006). Recovery of trypsin inhibitor and soy milk protein concentration by dynamic filtration. *Journal of Membrane Science*, 279, 291-300.

Albert, A., Altabre, C., Baro, F., Buendía, E., Cabero, A., Cancelo, M. J., ... & Vazquez, F. (2002). Efficacy and safety of a phytoestrogen preparation derived from *Glycine max* (L.) Merr in climacteric symptomatology: A multicentric, open, prospective and non-randomized trial. *Phytomedicine*, 9(2), 85-92.

Albillos, S. M., Jin, T., Howard, A., Zhang, Y., Kothary, M. H., & Fu, T.-J. (2008). Purification, crystallization and preliminary X-ray characterization of prunin-1, a major component of the almond (*Prunus dulcis*) allergen amandin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 5352–5358.

Alhonen, L., Halmekytö, M., Kosma, V. M., Wahlfors, J., Kauppinen, R., & Jänne, J. (1995). Life-long over-expression of ornithine decarboxylase (ODC) gene in transgenic mice does not lead to generally enhanced tumorigenesis or neuronal degeneration. *International journal of cancer*, 63(3), 402-404.

Alves, R.T., Casal, S. & Oliveira, P.P. (2009). Tocopherols in espresso coffee: Analytical method development and validation. *Food Chemistry*, 115, 1549-1555.

Amon, U., Bangha, E., Küster, T., Menne, A., Vollrath, I. B., & Gibbs, B. F. (1999). Enteral histaminosis: Clinical implications. *Inflammation research*, 48(6), 291-295.

Ang, H. G., Kwik, W. L., & Theng, C. Y. (1985). Development of soymilk- A review. *Food Chemistry*, 17, 235-250.

AOAC (2000). Official methods of analysis. Association of Official Analytical Chemists. Washington, DC: Association of Official Analytical Chemists.

AOCS. American Oil Chemists Society (2009a). Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists Society. (6th ed.). Champaign, IL: AOCS Press [Cd 19-90, reapproved in 2009].

AOCS. American Oil Chemists Society (2009b). Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists Society. (6th ed.). Champaign, IL: AOCS Press [Cd 12b-92, reapproved in 2009].

AOCS. American Oil Chemists Society (2009c). Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists Society. (6th ed.). Champaign, IL: AOCS Press [Cg 5–97, reapproved in 2009].

Apers, S., Naessens, T., Van Den Steen, K., Cuyckens, F., Claeys, M., Pieters, L., & Vlietinck, L. (2004). Fast high-performance liquid chromatography method for quality control of soy extracts. *Journal of Chromatography A*, 1038, 107–112.

Asociación Española de Normalización (1991). Catálogo de Normas UNE. Madrid (Spain).

Awad, A. B., & Fink, C. S. (2000). Phytosterols as anticancer dietary components: evidence and mechanism of action. *The Journal of nutrition*, 130(9), 2127-2130.

Azzaro AJ, Vandenberg CM, Blob LF, Kemper EM, Sharoky M, Oren DA and Campbell BJ, 2006. Tyramine pressor sensitivity during treatment with the selegiline transdermal system 6 mg/24 h in healthy subjects. *Journal of Clinical Pharmacology*, 46, 8, 933-44.

B

Bai, X.; Byun, B. Y.; Mah, J. H. Formation and destruction of biogenic amines in Chunjang (a black soybean paste) and Jajang (a black soybean sauce). *Food Chemistry*, 2013, 141, 1026-1031.

Bardócz, S. (1995). Polyamines in food and their consequences for food quality and human health. *Trends in Food Science & Technology*, 6(10), 341-346.

Barnes, S. (2010). The biochemistry, chemistry and physiology of the isoflavones in soybeans and their food products. *Lymphatic research and biology*, 8(1), 89-98.

Barros-Dourado, L. R., Fonseca-Pascoal, L. A., Kazue-Sakomura, N., Perazzo-Costa, F. G., & Biagiotti, D. (2011). Soybeans (*Glycine max*) and soybean products in poultry and swine nutrition. *Recent Trends for Enhancing the Diversity and Quality of Soybean Products*. InTech Publishing, Rijeka, Croatia, 175-190.

Bedell, S., Nachtigall, M., & Naftolin, F. (2014). The pros and cons of plant estrogens for menopause. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 139, 225-236.

Behloul, N., & Wu, G. (2013). Genistein: a promising therapeutic agent for obesity and diabetes treatment. *European journal of pharmacology*, 698(1), 31-38.

Beral, V., Banks, E., Reeves, G., & Bull, D. (2003). Breast cancer and hormone-replacement therapy: the Million Women Study. *The Lancet*, 362(9392), 1330-1331.

Berge, K. E., Tian, H., Graf, G. A., Yu, L., Grishin, N. V., Schultz, J., ... & Hobbs, H. H. (2000). Accumulation of dietary cholesterol in sitosterolemia caused by mutations in adjacent ABC transporters. *Science*, 290(5497), 1771-1775.

Berlin I, Zimmer R, Cournot A, Payan C, Pedarriosse AM and Puech AJ, 1989. Determination and comparison of the pressor effect of tyramine during long-term moclobemide and tranylcypromine treatment in healthy volunteers. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 46, 3, 344-51.

Bernbaum, J. C., Umbach, D. M., Ragan, N. B., Ballard, J. L., Archer, J. I., Schmidt-Davis, H., & Rogan, W. J. (2008). Pilot studies of estrogen-related physical findings in infants. *Environmental health perspectives*, 116(3), 416-420.

- Bhathena, S. J., & Velasquez, M. T. (2002). Beneficial role of dietary phytoestrogens in obesity and diabetes. *The American journal of clinical nutrition*, 76(6), 1191-1201.
- Bitto, A., Polito, F., Squadrito, F., Marini, H., D'Anna, R., Irrera, N., ... & Altavilla, D. (2010). Genistein aglycone: a dual mode of action anti-osteoporotic soy isoflavone rebalancing bone turnover towards bone formation. *Current medicinal chemistry*, 17(27), 3007-3018.
- Bitzur, R. Phytosterols: another way to reduce LDL cholesterol levels. *International Heart and Vascular Disease Journal*, 25.
- Björkhem, I. (2002). Do oxysterols control cholesterol homeostasis?. *Journal of Clinical Investigation*, 110(6), 725-730.
- Bouaouina, H., Desrumaux, A., Loisel, C. & Legrand, J. (2006). Functional properties of whey proteins as affected by dynamic high-pressure treatment. *International Dairy Journal*. 16, 275-284.
- Borrelli, F., & Ernst, E. (2010). Alternative and complementary therapies for the menopause. *Maturitas*, 66(4), 333-343.
- Boucher, B. A., Cotterchio, M., Kreiger, N., & Thompson, L. U. (2008). Soy formula and breast cancer risk. *Epidemiology*, 19(1), 165-166.
- Bouic, P. J., & Lamprecht, J. H. (1999). Plant sterols and sterolins: a review of their immunomodulating properties. *Alternative Medicine Reviews*, 4(3), 170-7.
- Bors, W., Langebartels, C., Michel, C., & Sandermann Jr, H. (1989). Polyamines as radical scavengers and protectants against ozone damage. *Phytochemistry*, 28(6), 1589-1595.
- Bradford, P. G., & Awad, A. B. (2010). Modulation of signal transduction in cancer cells by phytosterols. *Biofactors*, 36(4), 241-247.
- Breytenbach, U., Clark, A., Lamprecht, J., & Bouic, P. (2001). Flow cytometric analysis of the Th1–Th2 balance in healthy individuals and patients infected with the human immunodeficiency virus (HIV) receiving a plant sterol/sterolin mixture. *Cell biology international*, 25(1), 43-49.
- Brink, T., Damink, C., Joosten, H. M. L. J., & Huis In't Veld, J. H. J. (1990). Occurrence and formation of biologically active amines in foods. *International Journal of Food Microbiology*, 11(1), 73-84.
- Briñez, W. J., Roig-Sagues, A. X., Hernández, M. M., & Guamis, B. (2006a). Inactivation of *Listeria innocua* in milk and orange juice by ultrahigh-pressure homogenization. *Journal of Food Protection* 69, 86-92.
- Britz, S. and Kremer, D.F. (2002). Warm temperatures or drought during seed maturation increase free α -tocopherol in seeds of soybean (*Glycine max* [L.] Merr.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 6058-6063.
- Broadley, K.H. (2010). The vascular effects of trace amines and amphetamines. *Pharmacology and Therapeutics*, 125, 363-375.
- Brodal, B. P., Eliassen, K. A., Rønning, H., & Osmundsen, H. (1999). Effects of dietary polyamines and clofibrate on metabolism of polyamines in the rat. *The Journal of nutritional biochemistry*, 10(12), 700-708.
- Brown, N. M., & Setchell, K. D. (2001). Animal models impacted by phytoestrogens in commercial chow: implications for pathways influenced by hormones. *Laboratory investigation*, 81(5), 735-747.

Brownsell, V. L. col. 1993. Deterioro y Conservación de los Alimentos. *La Ciencia aplicada en el estudio de los Alimentos*. Ed. Diana. México, DF.

Brüll, F., Mensink, R. P., & Plat, J. (2009). Plant sterols: functional lipids in immune function and inflammation?. *Clinical Lipidology*, 4(3), 355-365.

Brüll, F., Mensink, R. P., Van den Hurk, K., Duijvestijn, A., & Plat, J. (2010). TLR2 activation is essential to induce a Th1 shift in human peripheral blood mononuclear cells by plant stanols and plant sterols. *Journal of biological chemistry*, 285(5), 2951-2958.

Bryant, M., Cassidy, A., Hill, C., Powell, J., Talbot, D., & Dye, L. (2005). Effect of consumption of soy isoflavones on behavioural, somatic and affective symptoms in women with premenstrual syndrome. *British journal of nutrition*, 93(05), 731-739.

Bujard, E., Finot, P.A. (1978). Mesure de la disponibilité et du blocage de la lysine dans les laits industriels. *Annales de la Nutrition et de l'Alimentation*, 32, 291-305.

Bursztyka, J.; Perdua E.; Tulliez, J.; Debrauwer, L.; Delous G.; Canlet, C.; De Sousa, G.; Rahmani, R.; Benfenati, E.; Cravedi, J. Comparison of genistein metabolism in rats and humans using liver microsomes and hepatocytes. *Food Chemistry and Toxicology*, 2008, 48, 939–948.

Burton GW, Ingold KU. 1986. Vitamin E: Application of the principles of physical organic chemistry to the exploration of its structure and function. *Acc. Chem. Res.*19, 194–201.

Byun, B. Y., Bai, X. & Mah, J. H. (2013). Occurrence of Biogenic Amines in Doubanjiang and Tofu. *Food Science and Biotechnology*, 22(1), 55-62.

C

Calandra, S., Tarugi, P., Speedy, H. E., Dean, A. F., Bertolini, S., & Shoulders, C. C. (2011). Mechanisms and genetic determinants regulating sterol absorption, circulating LDL levels, and sterol elimination: implications for classification and disease risk. *Journal of lipid research*, 52(11), 1885-1926.

Calpe-Berdiel, L., Escolà-Gil, J. C., Benítez, S., Bancells, C., González-Sastre, F., Palomer, X., & Blanco-Vaca, F. (2007). Dietary phytosterols modulate T-helper immune response but do not induce apparent anti-inflammatory effects in a mouse model of acute, aseptic inflammation. *Life sciences*, 80(21), 1951-1956.

Cassidy, A. (2006). Factors affecting the bioavailability of soy isoflavones in humans. *Journal of AOAC International*, 89(4), 1182-1188.

Cassidy, A., & Hooper, L. (2006). Phytoestrogens and cardiovascular disease. *British Menopause Society Journal*, 12(2), 49-56.

Cerrada-Gimenez, M., Pietilä, M., Loimas, S., Pirinen, E., Hyvönen, M. T., Keinänen, T. A., ... & Alhonen, L. (2011). Continuous oxidative stress due to activation of polyamine catabolism accelerates aging and protects against hepatotoxic insults. *Transgenic research*, 20(2), 387-396.

César, I. D. C., Braga, F. C., Vianna-Soares, C. D., Nunan, E. D. A., Barbosa, T. A. F., & Moreira-Campos, L. M. (2007). Determination of daidzein, genistein and glycitein in isoflavone capsules by thin layer chromatography (TLC) and high performance liquid chromatography (HPLC). *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 17, 616–625.

- César, I. D. C., Braga, F. C., Vianna-Soares, C. D., Nunan, E. D. A., Pianetti, G. A., & Moreira-Campos, L. M. (2008). Quantification of genistein and genistin in soy dry extracts by UV-visible spectrophotometric method. *Quimica Nova*, 31, 1933–1936.
- CESNID (2005). Tablas de composición de alimentos del CESNID. Ed. McGraw Hill Americana.
- Charron, C. S., Allen, F. L., Johnson, R. D., Pantalone, V. R., & Sams, C. E. (2005). Correlations of oil and protein with isoflavone concentration in soybean [*Glycine max* (L.) Merr.]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(18), 7128-7135.
- Charles, C., Yuskavage, J., Carlson, O., John, M., Tagalicud, A. S., Maggio, M., ... & Basaria, S. (2008). Effects of high-dose isoflavones on metabolic and inflammatory markers in healthy postmenopausal women. *Menopause (New York, NY)*, 16(2), 395-400.
- Chattopadhyay, M. K., Tabor, C. W., & Tabor, H. (2002). Absolute requirement of spermidine for growth and cell cycle progression of fission yeast (*Schizosaccharomyces pombe*). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(16), 10330-10334.
- Chen, S. (1989). Principles of soymilk production. En: Food uses of whole oil and protein seeds, Lusas, E. W., Erikson, D. R., & Nip, W. K. American Oil Chemists' Society, Champaign, Illinois. pp: 40-45.
- Chen, J., Lin, H. & Hu, M. (2005). Absorption and metabolism of genistein and its five isoflavone analogs in the human intestinal Caco-2 model. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 55, 159–169.
- Chen, T.R. & Wei, Q.H. (2008). Analysis of bioactive aglycone isoflavones in soy bean and soybean products. *Nutrition and Food Science*, 38, 540–547.
- Coates, A. M., & Howe, P. R. (2007). Edible nuts and metabolic health. *Current opinion in lipidology*, 18(1), 25-30.
- Committee on Toxicity of Chemicals in Food, Consumer Products and the Environment (COT) (2003). Phytoestrogens and Health. The Food Standards Agency, Reino Unido. (http://www.food.gov.uk/science/ouradvisors/toxicity/COTwg/wg_phyto/).
- Consensos en Fitoterapia Ginecológica. 2008. Madrid: Panamericana. ISBN: 978-84-9835-104-0.
- Coward, L., Smith, M., Kirk, M. & Barnes, S. (1998). Chemical modification of isoflavones in soyfoods during cooking and processing. *American Journal of Clinical Nutrition*, 68, 1486-1491.
- Craig-Schmidt, M. C., & Teodorescu, C. A. (2007). Trans-Fatty Acids in Foods. Fatty Acids in Foods and their Health Implications, 377.
- Crane, T. E., Khulpateea, B. R., Alberts, D. S., Basen-Engquist, K., & Thomson, C. A. (2013). Dietary Intake and Ovarian Cancer Risk: A Systematic Review. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, cebp-0515.
- Crawford, S. L., Jackson, E. A., Churchill, L., Lampe, J. W., Leung, K., & Ockene, J. K. (2013). Impact of dose, frequency of administration, and equol production on efficacy of isoflavones for menopausal hot flashes: a pilot randomized trial. *Menopause*, 20(9), 911-921.
- Crisafulli, A., Altavilla, D., Squadrito, G., Romeo, A., Adamo, E. B., Marini, R., ... & Squadrito, F. (2004). Effects of the phytoestrogen genistein on the circulating soluble receptor activator of nuclear factor κ B ligand-osteoprotegerin system in early postmenopausal women. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 89(1), 188-192.

Cruz, N., Capellas, M., Hernández, M., Trujillo, A.J., Guamis, B. & Ferragut, V. (2007). Ultra high pressure homogenization of soymilk: Microbiological, physicochemical and microstructural characteristics. *Food Research International*, 40, 725-732.

Csapó-Kiss, Z., Stefler, J., Martin, T.J., Makray, S. & Csapó, J. (1995). Composition of Mares' Colostrum and Milk. Protein Content, Amino Acid Composition and Contents of Macroand Microelements. *International Dairy Journal*, 5, 403-415.

Curtis, P. J., Sampson, M., Potter, J., Dhatariya, K., Kroon, P. A., & Cassidy, A. (2012). Chronic ingestion of flavan-3-ols and isoflavones improves insulin sensitivity and lipoprotein status and attenuates estimated 10-year CVD risk in medicated postmenopausal women with type 2 diabetes A 1-year, double-blind, randomized, controlled trial. *Diabetes Care*, 35(2), 226-232.

D

Dai, J., Li, Y., Zhou, H., Chen, J., Chen, M., & Xiao, Z. (2013). Genistein Promotion of Osteogenic Differentiation through BMP2/SMAD5/RUNX2 Signaling. *International journal of biological sciences*, 9(10), 1089.

Das, R., & Kanungo, M. S. (1982). Activity and modulation of ornithine decarboxylase and concentrations of polyamines in various tissues of rats as a function of age. *Experimental gerontology*, 17(2), 95-103.

Das, K. C., & Misra, H. P. (2004). Hydroxyl radical scavenging and singlet oxygen quenching properties of polyamines. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 262, 127-133.

Davies, C. G. A., Netto, F. M., Glassenap, N., Gallaher, C. M., Labuza, T. B., & Gallaher, D. D. (1998). Indication of the Maillard Reaction during Storage of Protein Isolates. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 46, 2485-2489.

De Andrade, C. M., Silva de Sá, M. F., & Torqueti-Toloi, M. R. (2011). Effect of phytoestrogens derived from soy bean on expression of adhesion molecules on HUVEC. *Climateric*, 1-9.

De Caterina, R., & Massaro, M. (2005). Omega-3 fatty acids and the regulation of expression of endothelial pro-atherogenic and pro-inflammatory genes. *Journal of Membrane Biology*, 206, 103-116.

De Jong, A., Plat, J., & Mensink, R. P. (2003). Metabolic effects of plant sterols and stanols (Review). *The Journal of nutritional biochemistry*, 14(7), 362-369.

Debruyne, I., & Riaz, M. N. (2006). Soy base extract: soymilk and dairy alternatives. *Soy applications in food*, 111-132.

Decker, E.A., Warner, K., Richards, M.P., & Fereidoon, S. (2005) Measuring antioxidants effectiveness in food. *Jouranal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 4303-4310.

Demel, R. A., & De Kruffy, B. (1976). The function of sterols in membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes*, 457(2), 109-132.

Dentith, S., & Lockwood, B. (2008). Development of techniques for the analysis of isoflavones in soy foods and nutraceuticals. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 11, 242-247.

Desai, F., Ramanathan, M., Fink, C. S., Wilding, G. E., Weinstock-Guttman, B., & Awad, A. B. (2009). Comparison of the immunomodulatory effects of the plant sterol β -sitosterol to simvastatin in

peripheral blood cells from multiple sclerosis patients. *International immunopharmacology*, 9(1), 153-157.

Desrumaux, A., & Marcand, J. (2002). Formation of sunflower oil emulsions stabilized by whey proteins with high-pressure homogenization (up to 350 MPa): Effect of pressure on emulsion characteristics. *International Journal of Food Science & Technology*, 37, 263-269.

Dharma, R., Suyatna, F. D., Mansyur, M., & Hidajat, A. (2013). Effect of soy isoflavone supplementation on vascular endothelial function and oxidative stress in postmenopausal women: a community randomized controlled trial. *Asia Pacific journal of clinical nutrition*, 22(3).

Die, M. D., Bone, K. M., Williams, S. G., & Pirodda, M. V. (2013). Soy and soy isoflavones in prostate cancer: a systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *BJU international*.

Diels, A.J., Callewaert, L., Wuytack, E.Y., Masschalck, B., & Michiels, C.W. (2005). Inactivation of *Escherichia coli* by high-pressure homogenisation is influenced by fluid viscosity but not by water activity and product composition. *International Journal of Food Microbiology*, 101, 281-291.

Donkor, O. N., Henriksson, A., Vasiljevic, T., & Shah, N. P. (2007b). Rheological properties and sensory characteristics of set-type soy yogurt. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 9868-9876.

Donsì, F., Ferrari, G., & Maresca, P. (2009a). High-pressure homogenization for food sanitization. In *Global Issues in Food Science and Technology* (Edited by, Gustavo Barbosa-Cánovas, Alan Mortimer, David Lineback, Walter Spiess, Ken Buckle, & Paul Colonna), Academic Press, USA. pp. 309-352.

Douki, T., Bretonniere, Y., & Cadet, J. (2000). Protection against Radiation-Induced Degradation of DNA Bases by Polyamines. *Radiation Research*, 153, 29-35.

Dumay, E., Chevalier-Lucia, D., Picart-Palmade, L., Benzaria, A., Gràcia-Julià, A., & Blayo, C. (2013). Technological aspects and potential applications of (ultra) high-pressure homogenisation. *Trends in Food Science & Technology*, 31(1), 13-26.

Duncan, A. M., Underhill, K. E., Xu, X., LaValleur, J., Phipps, W. R., & Kurzer, M. S. (1999a). Modest Hormonal Effects of Soy Isoflavones in Postmenopausal Women 1. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 84(10), 3479-3484.

Duncan, A. M., Merz, B. E., Xu, X., Nagel, T. C., Phipps, W. R., & Kurzer, M. S. (1999b). Soy Isoflavones Exert Modest Hormonal Effects in Premenopausal Women 1. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 84(1), 192-197.

E

EFSA Panel on Biological Hazards-BIOHAZ, 2011. Scientific Opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods. *EFSA Journal* 9(10), 2393.

Eisen, B., Ungar, Y., & Shimoni, E. (2003). Stability of isoflavones in soy milk stored at elevated and ambient temperatures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(8), 2212-2215.

Eisenberg, T., Knauer, H., Schauer, A., Büttner, S., Ruckenstuhl, C., Carmona-Gutierrez, D., ... & Madeo, F. (2009). Induction of autophagy by spermidine promotes longevity. *Nature cell biology*, 11(11), 1305-1314.

Esteves, E.A., Martino, H.S.D., Oliveira, F.C.E., Bressan J., & Costa, N.M.B. (2010). Chemical composition of a soybean cultivar lacking lipoxygenases (LOX2 and LOX3). *Food Chemistry*, 122(11), 238-242.

European Atherosclerosis Society (EAS) (2014). Consensus Position Paper on plant sterols and plant stanols in the management of dyslipidaemia and prevention of cardiovascular disease. Disponible en: <http://www.eas-society.org/consensus-paper-on-plant-sterols-and-plant-stanols.aspx> (Último acceso: Abril, 2014)

European Food Safety Authority (2011). Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to soy isoflavones and protection of DNA, proteins and lipids from oxidative damage (ID 1286, 4245), maintenance of normal blood LDL cholesterol concentrations (ID 1135, 1704a, 3093a), reduction of vasomotor symptoms associated with menopause (ID 1654, 1704b, 2140, 3093b, 3154, 3590), maintenance of normal skin tonicity (ID 1704a), contribution to normal hair growth (ID 1704a, 4254), "cardiovascular health" (ID 3587), treatment of prostate cancer (ID 3588) and "upper respiratory tract" (ID 3589) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006. *EFSA Journal*; 9(7):2264 [44 pp.].

European Food Safety Authority (2012a). Scientific Opinion on the substantiation of a health claim related to isolated soy protein and reduction of blood LDL-cholesterol concentrations pursuant to Article 14 of Regulation (EC) No 1924/2006. *EFSA Journal*; 10(2):2555 [17 pp.].

European Food Safety Authority (2012b). Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to soy isoflavones and maintenance of bone mineral density (ID 1655) and reduction of vasomotor symptoms associated with menopause (ID 1654, 1704, 2140, 3093, 3154, 3590) (further assessment) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006. *EFSA Journal*; 10(8):2847 [36 pp.].

European Pharmacopoeia (2008). 8th ed, Council of Europe, Strasbourg.

F

FAO (1970). Amino-Acid content of foods and biological data on proteins. FAO food and nutrition series. Rome, Italy: FAO.

FAO. (2002). Chapter XIX soybeans: Post-harvest Operations. Disponible en: <http://www.fao.org/inpho/content/compand/text/Ch19sec1.htm#>.

Fávaro Trindade, S.C., Cascardo Silva, F., Freitas, S., & Couri, S. (1997). Comportamiento reológico de los "yogurts" de soya homogeneizados y no homogeneizados. *Alimentaria* 285, 69-73.

Ferrer, E., Alegría, A., Courtois, G., & Farré, R. (2000). High-performance liquid chromatographic determination of Maillard compounds in store-brand and name-brand ultra-high-temperature-treated cows' milk. *Journal of Chromatography A*, 881, 599-606.

Finot, P.A., Deutsch, R., & Bujard, E. (1981). The extent of the Maillard reaction during the processing of milk. *Progress in Food and Nutrition Science*, 5, 345-355.

Flebes, C., Soto, C., Saldaña, A., & Garcia, B. (2002). Funciones de la Vitamina E. *Revista Cubana de Estomatología*, 40, 28-32.

Floury, J., Desrumaux, A., & Legrand, J. (2002). Effect of ultra-high-pressure homogenization on structure and on rheological properties of soy protein-stabilized emulsions. *Journal of Food Science*, 67, 3388-3395.

- Floury, J., Desrumaux, A., Axelos, M.V., & Legrand, J. (2003). Effect of high pressure homogenisation on methylcellulose as food emulsifier. *Journal of Food Engineering*, 58, 227-238.
- Floury, J., Bellettre, J., Legrand, J., & Desrumaux, A. (2004a). Analysis of a new type of high pressure homogeniser. A study of the flow pattern. *Chemical Engineering Science*, 59, 843-853.
- Floury, J., Legrand, J., & Desrumaux, A. (2004b). Analysis of a new type of high pressure homogeniser. Part B. study of droplet break-up and re-coalescence phenomena. *Chemical Engineering Science*, 59, 1285-1294.
- Fitzpatrick, L. A. (2003). Phytoestrogens—mechanism of action and effect on bone markers and bone mineral density. *Endocrinology and metabolism clinics of North America*, 32(1), 233-252.
- Fonseca, N. D., Villar, M. P. M., Donangelo, C. M., & Perrone, D. (2014). Isoflavones and soyasaponins in soy infant formulas in Brazil: Profile and estimated consumption. *Food chemistry*, 143, 492-498.
- Frankel, E.N. (1993). In search of better methods to evaluate natural antioxidants and oxidative stability in food lipids. *Trends in Food Science and Technology*, 4, 220-225.
- Frankel, E.N. (1996). Antioxidants in lipid foods and their impact on food quality. *Food Chemistry*, 57, 51-55.
- Frankel, E.N. & Meyer, A.S. (2000). The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 1925-1941.
- Frankel, E.N., & Finley, J.W. (2008). How to Standardize the Multiplicity of Methods To Evaluate Natural Antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 4901-4908
- Fransen, H. P., de Jong, N., Wolfs, M., Verhagen, H., Verschuren, W. M., Lütjohann, D., ... & Mensink, R. P. (2007). Customary use of plant sterol and plant stanol enriched margarine is associated with changes in serum plant sterol and stanol concentrations in humans. *The Journal of nutrition*, 137(5), 1301-1306.
- Frascarelli, S., Gghelardoni, S., Chiellini, G., Vardiu, R., Ronca-Testoni, S., Scalan, T.S., Grandy, D.K., & Zucchi, R. (2008). Cardiac effects of trace amines: pharmacological characterization of trace amines-associated receptors. *European Journal of Pharmacology*, 587, 1-3, 231-236.
- Friedman, M. & Brandon, D.L. (2001). Nutritional and health benefits of soy proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49, 1069-1086.
- Fritz, H., Seely, D., Flower, G., Skidmore, B., Fernandes, R., Vadeboncoeur, S., ... & Fergusson, D. (2013). Soy, Red Clover, and Isoflavones and Breast Cancer: A Systematic Review. *PLoS one*, 8(11), e81968.
- Fu, Z., Zhang, W., Zhen, W., Lum, H., Nadler, J., Bassaganya-Riera, J., ... & Liu, D. (2010). Genistein induces pancreatic β -cell proliferation through activation of multiple signaling pathways and prevents insulin-deficient diabetes in mice. *Endocrinology*, 151(7), 3026-3037.
- Fujisawa, S., & Kadoma, Y. (2005). Kinetic evaluation of polyamines as radical scavengers. *Anticancer research*, 25(2A), 965-969.

G

- Gallaher, D., & Schneeman, B.O. (1986). Nutritional and metabolic response to plant inhibitors of digestive enzymes. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 199, 167-184.
- Gallagher, J. C., Satpathy, R., Rafferty, K., & Haynatzka, V. (2004). The effect of soy protein isolate on bone metabolism. *Menopause*, 11(3), 290-298.
- Genovese, M. I., & Lajolo, F. M. (2002). Isoflavones in soy-based foods consumed in Brazil: levels, distribution, and estimated intake. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(21), 5987-5993.
- Gibson, G. R., & Roberfroid, M. B. (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotic. *Journal of Nutrition*, 125, 1401-1412.
- Gliszczynska-Swiglo, A., & Sikorska, E. (2004). Simple reversed-phase liquid chromatography method for determination of tocopherols in edible plant oils. *Journal of Chromatography A*, 1048, 195-198.
- Glória, M. B. A., Tavares-Neto, J., & Labanca, R. A. (2005). Influence of Cultivar and Germination on Bioactive Amines in Soybeans (*Glycine max* L. Merrill). *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 53(19), 7480-7485.
- Golbitz, P. (1995). Traditional soyfoods – Processing and Products. *Journal of Nutrition*, 125, S570-S572.
- Ghosh, P., & Fenner, G. P. (1999). Improved method for gas chromatographic analysis of genistein and daidzein from soybean (*Glycine max*) seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 3455–3456.
- Gold, E. B., Leung, K., Crawford, S. L., Huang, M. H., Waetjen, L. E., & Greendale, G. A. (2013). Phytoestrogen and fiber intakes in relation to incident vasomotor symptoms: results from the Study of Women’s Health Across the Nation. *Menopause*, 20(3), 305-314.
- Grieshop, C.M., & Fahey, G.C. (2001). Comparison of Quality Characteristics of Soybeans from Brazil, China, and the United States. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 2669-2673.
- Groppa, M. D., Tomaro, M. L., & Benavides, M. P. (2007). Polyamines and heavy metal stress: the antioxidant behavior of spermine in cadmium- and copper-treated wheat leaves. *BioMetals*, 20, 185-195.
- Groppa, M. D., & Benavides, M. P. (2008). Polyamines and abiotic stress: recent advances. *Amino acids*, 34(1), 35-45.
- Guamis, B., Trujillo, A., Ferragut, V., & Daoudy, L. (2006). Aplicaciones de las altas presiones en la industria alimentaria. En: *Técnicas avanzadas de procesamiento y conservación de alimentos*. Editores: Blanco, C. A., Gómez, M., Ronda, F., & Caballero, P. A. Valladolid. pp. 61-76.
- Guan, R. F., Liu, Z. F., Zhang, J. J., Wei, Y. X., Wahab, S., Liu, D. H., & Ye, X. Q. (2013). Investigation of biogenic amines in sufu (*furu*): A Chinese traditional fermented soybean food product. *Food Control*, 31, 345-352.
- Guimarães, V. M., Tavares de Rezende, S., Moreira, M. A. Gonçalves de Barros, E., & Felix, C. R. (2001). Characterization of α -galactosidase from germinating soybean seed and their use for hydrolysis of oligosaccharides. *Phytochemistry*, 58, 67-73.
- Guo, S-T., Ono, T., & Mikami, M. (1997). Interaction between protein and lipid in soybean milk at elevated temperature. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 4601-4605.

Gupta, R.P. & Gupta, R.R. (1988). Equipment for Making No-Beany Flavor Soymilk US Patent-4744524. May, 17, 1988. *Official Gazette of the United States Patent and Trademark Office Patents*. Appl No. 32,538.

Guzman, G.J. and Murphy, P.A. (1986). Tocopherols of soybean seeds and soybean curd (Tofu). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 34, 791-795.

Gylling, H., Plat, J., Turley, S., Ginsberg, H. N., Ellegård, L., Jessup, W., ... & Chapman, M. J. (2014). Plant sterols and plant stanols in the management of dyslipidaemia and prevention of cardiovascular disease. *Atherosclerosis*, 232(2), 346-360.

H

Hale, G. E., Hughes, C. L., & Cline, J. M. (2002). Endometrial cancer: hormonal factors, the perimenopausal "window of risk," and isoflavones. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 87(1), 3-15.

Halliwell, B., & Chirico, S. (1993) Lipid peroxidation: its mechanism, measurement and significance. *American Journal of Clinical Nutrition*, 57 (suppl): 715s-725s.

Hayes, M. G., & Kelly, A. L. (2003a). High pressure homogenisation of raw whole bovine milk (a) effects on fat globule size and other properties. *Journal of Dairy Research*, 70, 297-305.

Hayes, M. G., & Kelly, A. L. (2003b). High pressure homogenisation of milk (b) effects on indigenous enzymatic activity. *Journal of Dairy Research*, 70, 307-313.

Hayes, M. G., Fox, P. F., & Kelly, A. L. (2005). Potential applications of high pressure homogenisation in processing of liquid milk. *Journal of Dairy Research* 72, 25-33.

Head, K. A. (1999). Ipriflavone: an important bone-building isoflavone. *Alternative medicine review: a journal of clinical therapeutic*, 4(1), 10-22.

Hedlund, T. E., Maroni, P. D., Ferucci, P. G., Dayton, R., Barnes, S., Jones, K., ... & Gray, K. J. (2005). Long-term dietary habits affect soy isoflavone metabolism and accumulation in prostatic fluid in caucasian men. *The Journal of nutrition*, 135(6), 1400-1406.

Hendriks, HF, Weststrate, JA, van Vliet, T, Meijer, GW. (1999). Spreads enriched with three different levels of vegetable oil sterols and the degree of cholesterol lowering in normocholesterolaemic and mildly hypercholesterolaemic subjects. *European Journal of Clinical Nutrition*, 53, 319-327.

Henno, P., Maurey, C., Danel, C., Bonnette, P., Souilamas, R., Stern, M., ... & Israël-Biet, D. (2009). Pulmonary vascular dysfunction in end-stage cystic fibrosis: role of NF-κB and endothelin-1. *European Respiratory Journal*, 34(6), 1329-1337.

Herrera, E. (1991). Formación de las grasas: biosíntesis de ácidos grasos y triacilglicéridos. Ed. Herrera E: Bioquímica, Aspectos estructurales y vías metabólicas. Nueva York, Interamericana. McGraw-Hill. pp 591-614.

Hesseltine, C. W. (1984). Fermented foods in the Orient with emphasis on soy sauce. *J. Japan Soy Sauce Res Inst.*, 10(3), 69-81.

Hornero-Mendez, D., Perez-Galvez, A., & Minguez-Mosquera, M.I. (2001). A rapid spectrophotometric method for the determination of peroxide value in food lipids with high carotenoid content. *Journal of American Oil Chemists Society*, 78, 1151-1155.

Horwitz, W. (1982). Evaluation of analytical methods used for regulation of foods and drugs. *Analytical Chemistry*, 54(1), 67–76.

Hosoda, K., Furuta, T., Yokokawa, A., & Ishii, K. (2010). Identification and quantification of daidzein-7-glucuronide-4'-sulfate, genistein-7-glucuronide-4'-sulfate and genistein-4', 7-diglucuronide as major metabolites in human plasma after administration of kinako. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 397(4), 1563-1572.

Howard, P. A., Lehnhardt, W. F., & Orthoefer, F. T. (Jan. 11, 1983). 7S and 11S vegetable protein fractionation and isolation. USA. 4,368,151.

Hsieh, H. M., Wu, W. M., & Hu, M. L. (2011). Genistein attenuates d-galactose-induced oxidative damage through decreased reactive oxygen species and NF- κ B binding activity in neuronal PC12 cells. *Life sciences*, 88(1), 82-88.

Hsu, H.W., Vavak, D.L., Satterlee, L.D., & Miller, G.A. (1997). A multienzyme technique for estimating protein digestibility. *Journal of Food Science*, 42(5), 1269-1273.

Huang, D., Ou, B., & Prior, R. L. (2005). The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 3, 1841-1856.

Huang, H., Liang, H., & Kwok, K.C. (2006). Effect of thermal processing on genistein, daidzein and glycitein content in soymilk. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(7), 1110-1114.

Hunter, D., & Burritt, D.J. (2012). Polyamines of Plant Origin - An Important Dietary Consideration for Human Health, *Phytochemicals as Nutraceuticals - Global Approaches to Their Role in Nutrition and Health*, Dr Venketeshwer Rao (Ed.), ISBN: 978-953-51-0203-8, InTech, DOI: 10.5772/26902. Available from: <http://www.intechopen.com/books/phytochemicals-as-nutraceuticals-global-approaches-to-their-role-in-nutrition-and-health/polyamines-of-plant-origin-an-important-dietary-consideration-for-human-health>.

Hutabarat, L.S., Greenfield, H., & Mulholland H. (2001). Isoflavones and coumestrol in soybeans and soybean products from Australia and Indonesia. *Journal of Food Composition and Analyses*, 14, 43–58.

Hwang, C.S., Kwak, H. S., Lim, H.J., Lee, S. H., Kang, Y.S., Choe, T.B., ... & Han, K.O. (2006). Isoflavone metabolites and their in vitro dual functions: They can act as an estrogenic agonist or antagonist depending on the estrogen concentration. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 101(4), 246-253.

Hwang, K.A., Park, M.A., Kang, N.H., Yi, B.R., Hyun, S.H., Jeung, E.B., & Choi, K.C. (2013). Anticancer effect of genistein on BG-1 ovarian cancer growth induced by β -estradiol or bisphenol A via the suppression of the crosstalk between estrogen receptor alpha and insulin-like growth factor-1 receptor signaling pathways. *Toxicology and applied pharmacology*, 272(3), 637-646.

Hyun, J., Shin, S.Y., So, K.M., Lee, Y.H., & Lim, Y. (2012). Isoflavones inhibit the clonogenicity of human colon cancer cells. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 22(8), 2664-2669.

I

Igarashi, K., & Kashiwagi, K. (2000). Polyamines: mysterious modulators of cellular functions. *Biochemical and biophysical research communications*, 271(3), 559-564.

Irvine, C.H., Shand, N., Fitzpatrick, M.G., & Alexander, S.L. (1998). Daily intake and urinary excretion of genistein and daidzein by infants fed soy-or dairy-based infant formulas. *The American journal of clinical nutrition*, 68(6), 1462S-1465S.

Isanga, J., & Zhang, G.N. (2008). Soybean bioactive components and their implications to health—a review. *Food reviews international*, 24(2), 252-276.

Ismail, B., & Hayes, K. (2005). β -Glycosidase activity toward different glycosidic forms of isoflavones. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(12), 4918-4924.

Iwuoha, C.I., & Umunnakwe, K.E. (1997). Chemical, physical and sensory characteristics of soymilk as affected by processing method, temperature and duration of storage. *Food Chemistry*, 59, 373-379.

Izquierdo-Pulido, M., Veciana-Nogués, M.T., Mariné-Font, A., & Vidal-Carou, M.C. (1999). Polyamine and biogenic amine evolution during food processing. *Polyamines in Health and Nutrition*, 139.

Iwuoha, C.I. & Umunnakwe, K.E. (1997). Chemical, physical and sensory characteristics of soymilk as affected by processing method, temperature and duration of storage. *Food Chemistry*. 59, 373-379.

Izumi, T., Piskula, M. K., Osawa, S., Obata, A., Tobe, K., Saito, M., ... & Kikuchi, M. (2000). Soy isoflavone aglycones are absorbed faster and in higher amounts than their glucosides in humans. *The Journal of nutrition*, 130(7), 1695-1699.

J

Jarisch R, (2004). Histamin-Intoleranz, Histamin und Seekrankheit. 2nd ed. Stuttgart.

Jayagopal, V., Albertazzi, P., Kilpatrick, E. S., Howarth, E. M., Jennings, P. E., Hepburn, D. A., & Atkin, S. L. (2002). Beneficial effects of soy phytoestrogen intake in postmenopausal women with type 2 diabetes. *Diabetes care*, 25(10), 1709-1714.

Jefferson, W. N., Patisaul, H. B., & Willians, C. J. (2012). Reproductive consequences of developmental phytoestrogen exposure. *Reproduction*, 143, 1741–7899.

Johnson, L.A., Hoover, W.J. & Deyoe, C.W. (1983). Soymilk process. US Patent-4409256. October, 11, 1983. *Official Gazette of the United States Patent and Trademark Office Patents*. Appl No. 249,717.

Jones, P. J., MacDougall, D. E., Ntanios, F., & Vanstone, C. A. (1997). Dietary phytosterols as cholesterol-lowering agents in humans. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 75(3), 217-227.

Jooyandeh H. (2011). Soy products as healthy and functional foods. *Middle-East Journal of Science Research*, 7, 71–80.

K

Kakkar, R. K., & Sawhney, V. K. (2002). Polyamine research in plants—a changing perspective. *Physiologia Plantarum*, 116(3), 281-292.

Kalač P., & Krausová P. (2005). A review of dietary polyamines: Formation, implications for growth and health and occurrence in foods. *Food Chemistry*, 90, 219-230.

Kamal-Eldin, A., & Appelqvist, L.A. 1996. The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids*, 31, 671-701.

- Kano, M., Takayanagi, T., Harada, K., Sawada, S., & Ishikawa, F. (2006). Bioavailability of isoflavones after ingestion of soy beverages in healthy adults. *The Journal of Nutrition*, 136(9), 2291-2296.
- Kao, T. H., & Chen, B. H. (2002). An improved method for determination of isoflavones in soybean powder by liquid chromatography. *Chromatographia*, 56, 423-430.
- Karademir, B., & Ozer, N. K. (2013). Molecular Function of Tocopherols in Age Related Diseases. *Current pharmaceutical design*.
- Keinan-Boker, L., Peeters, P. H. M., Mulligan, A. A., Navarro, C., & Slimani, N. (2002). Soy product consumption in 10 European countries: The European prospective investigation into cancer and nutrition (EPIC) study. *Public Health Nutrition*, 5, 1217-1226.
- Kelly, W.J., & Muske, K.R. (2004). Optimal operation of high-pressure homogenization for intracellular product recovery. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 27, 25-37.
- Kennedy, A. (1998). The Bowman-Birk inhibitor from soybeans as an anticarcinogenic agent. *American Journal of Clinical Nutrition*, 68, 1406S-1412.
- Kielczewska, K., Kruk, A., Czerniewicz, M., Warminska, M. & Haponiuk, E. (2003). The effect of high-pressure homogenization on changes in milk colloidal and emulsifying systems. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*. 12, 43-46.
- Kiely, M., Faughnan, M., Wähälä, K., Brants, H., & Mulligan, A. (2003). Phyto-oestrogen levels in foods: the design and construction of the VENUS database. *British Journal of Nutrition*, 89(S1), S19-S23.
- Kim, H. J., Hamhm, T. S., & Min, D. B. (2007). Hidroperoxide as prooxidant in the oxidative stability of soybean oil. *Journal of American Oil Chemical Society*, 84: 349-355.
- Kim, M. H., Park, J. S., Seo, M. S., Jung, J. W., Lee, Y. S., & Kang, K. S. (2010). Genistein and daidzein repress adipogenic differentiation of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells via Wnt/ β -catenin signalling or lipolysis. *Cell proliferation*, 43(6), 594-605.
- King, J.C., Blumberg, J., Ingwersen, L., Jenag, M., & Tucker K.L. (2008). Tree Nuts and Peanuts as Components of a Healthy Diet. *Journal of Nutrition*, 138(9), 1736-1740.
- Klein, C. B., & King, A. A. (2007). Genistein genotoxicity: Critical considerations of in vitro exposure dose. *Toxicology and applied pharmacology*, 224(1), 1-11.
- Kleinig, A.R., & Middelberg, A.J. (1996). The correlation of cell disruption with homogenizer valve pressure gradient determined by computational fluid dynamics. *Chemical Engineering Science*, 51, 5103-5110.
- Klump, S. P., Allred, M. C., Macdonald, J. L., & Ballam, J. M. (2001). Determination of isoflavones in soy and selected foods containing soy by extraction, saponification and liquid chromatography: collaborative study. *Journal of AOAC International*, 84, 1865-1883.
- Korn, A., Da Prada, M., Rafflesberg, W., Allen, S., & Gasic, S. (1988). Tyramine pressor effect in man: studies with moclobemide, a novel, reversible monoamine oxidase inhibitor. *Journal of Neural Transmission*, 26, 57-71.
- Kotenko, L. D., Mamatkhanov, A. U., & Turakhozhaev, M. T. (1993). Spectrophotometric determination of flavones. *Chemistry of Natural Compounds*, 29, 590-591.

Krebs, E.E., Ensrud, K.E., MacDonald, R., & Wilt, T.J. (2004). Phytoestrogens for treatment of menopausal symptoms: a systematic review. *Obstetrics & Gynecology*, 104(4), 824-836.

Kronenberg, F., & Fugh-Berman, A. (2002). Complementary and alternative medicine for menopausal symptoms: a review of randomized, controlled trials. *Annals of Internal Medicine*, 137(10), 805-813.

Kung, H. F., Tsai, Y. H., & Wei, C. I. (2007). Histamine and other biogenic amines and histamine-forming bacteria in miso products. *Food Chemistry*, 101(1), 351-356.

Kusano, T., Berberich, T., Tateda, C., & Takahashi, Y. (2008). Polyamines: essential factors for growth and survival. *Planta*, 228(3), 367-381.

Kwok, K. C., & Niranjana, K. (1995). Review: Effect of thermal processing on soymilk. *International Journal of Food Science & Technology*, 30, 263-295.

Kwok, K. C., Shiu, Y. W., Yeung, C. H., & Niranjana, K. (1998). Effect of thermal processing on available lysine, thiamine and riboflavin content in soymilk. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 77, 473-478.

Kwok, K. C., Liang, H.-H., & Niranjana, K. (2002). Optimizing conditions for thermal processes of soy milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 4834-4838.

Kwon, D. Y., Daily III, J. W., Kim, H. J., & Park, S. (2010). Antidiabetic effects of fermented soybean products on type 2 diabetes. *Nutrition research*, 30(1), 1-13.

Kiely, M., Faughnan, M., Wähälä, K., Brants, H., & Mulligan, A. (2003). Phyto-oestrogen levels in foods: the design and construction of the VENUS database. *British Journal of Nutrition*, 89(S1), S19-S23.

L

Lada, A.T., & Rudel, L.L. (2003). Dietary monounsaturated versus polyunsaturated fatty acids: which is really better for protection from coronary heart disease?. *Current Opinions of Lipidology*, 14, 41-46.

Ladero, V., Calles-Enríquez, M., Fernández, M., & Alvarez, M.A. (2010). Toxicological effects of dietary biogenic amines. *Current Nutrition and Food Science*, 6, 145-156.

Lagari, V.S., & Levis, S. (2013). Phytoestrogens in the Prevention of Postmenopausal Bone Loss. *Journal of Clinical Densitometry*, 16(4), 445-449.

Lagari, V.S., & Levis, S. (2014). Phytoestrogens for menopausal bone loss and climacteric symptoms. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 139, 294-301.

Lakshmanan, R., de Lamballerie, M., & Jung, S. (2006). Effect of soybean-to-water ratio and pH on pressurized soymilk properties. *Journal of Food Science*, 71, E384- E391.

Lapcık, O., Hill, M., Hampl, R., Wähälä, K., & Adlercreutz, H. (1998). Identification of isoflavonoids in beer. *Steroids*, 63(1), 14-20.

Larqué, E., Sabater-Molina, M., & Zamora, S. (2007). Biological significance of dietary polyamines. *Nutrition*, 23(1), 87-95.

Lateef, A., Khan, A.Q., Tahir, M., Khan, R., Rehman, M.U.,... & Sultana, S. (2013). Androgen deprivation by flutamide modulates uPAR, MMP-9 expressions, lipid profile, and oxidative stress: amelioration by daidzein. *Molecular and cellular biochemistry*, 374(1-2), 49-59.

- Latorre-Moratalla, M.L., Veciana-Nogués, M.T., Bover-Cid, S., Garriga, M., Aymerich, T., Zanardi, E., Ianieri, A., Fraqueza, M.J., Patarata, L., Drosinos, E.H., Laukova, A., Talon, R., Vidal-Carou, M.C., 2008. Biogenic amines in traditional fermented sausages produced in selected European countries. *Food Chemistry*, 107, 912-921.
- Latorre-Moratalla, M.L., Bosch-Fusté, J., Lavizzari, T., Bover-Cid, S., Veciana-Nogués, M.T., & Vidal-carou, M.C. (2009) Validation of an ultrahigh pressure liquid chromatographic method for the determination of biologically active amines in food. *Journal of chromatography A*, 1216, 7715-7720.
- Lehane, L., & Olley, J. (2000). Histamine fish poisoning revisited. *International Journal of Food Microbiology*, 58, 1-2, 1-37.
- Lee, S.J., Ahn, J. K., Khanh, T.D., Chun, S.C., Kim, S.L., Ro, H.M., & Chung, I.M. (2007). Comparison of isoflavone concentrations in soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) sprouts grown under two different light conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(23), 9415-9421.
- Lee, S.D., Gershkovich, P., Darlington, J.W., & Wasan, K.M. (2012). Inhibition of cholesterol absorption: targeting the intestine. *Pharmaceutical research*, 29(12), 3235-3250.
- Lešková, E., Kubíková, J., Kováčiková, E., Košická, M., Porubská, J., & Holčíková, C. (2006). Vitamin losses: Retention during heat treatment and continual changes expressed by mathematical models. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 252-276.
- Liener, I.E., Goodale, R.L., Deshmukh, A., Satterberg, T.L., Ward, G., DiPietro, C.M., Bankey, P.E. & Borner, J.W. (1988). Effect of a trypsin inhibitor from soybeans (Bowman-Birk) on the secretory activity of the human pancreas. *Gastroenterology*, 94, 419-427.
- Liggins, J., Bluck, L.J.C., Coward, W.A., & Bringham, S.A. (1998). Extraction and quantification of daidzein and genistein in food. *Analytical Biochemistry*, 264, 1-7.
- Linares, D.M., Martín, M.C., Ladero, V., Alvarez, M.A., Fernández, M. (2011). Biogenic amines in dairy products. *Critical Reviews of Food Science and Nutrition*, 51, 691-703.
- Liu, K. (1999). Soybeans: Chemistry, technology and utilization. Aspen publisher, Inc. Gaithersburg, USA. pp. 532.
- Liu, K. (2004). Soybeans: Chemistry, technology and utilization. Aspen Publisher, Inc. Gaithersburg, Maryland USA.
- Liu, Z.S., & Chang, S.K. (2007). Soymilk viscosity as influenced by heating methods and soybean varieties. *Journal of food processing and preservation*, 31(3), 320-333.
- Liu, X. X., Li, S.H., Chen, J.Z., Sun, K., Wang, X.J., Wang, X.G., & Hui, R.T. (2012). Effect of soy isoflavones on blood pressure: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 22(6), 463-470.
- Liu, Z.M., Ho, S.C., Woo, J., Chen, Y.M., & Wong, C. (2014). Randomized controlled trial of whole soy and isoflavone daidzein on menopausal symptoms in equol-producing Chinese postmenopausal women. *Menopause*, 21(6), 1.
- Loukovaara, M., Carson, M., & Palotie, A. (1995). Regulation of sex hormone-binding globulin production by isoflavonoids and patterns of isoflavonoid conjugation in HepG2 cell cultures. *Steroids*, 60, 656-661.

Løvaas, E. (1997). Antioxidative and Metal-Chelating Effects of Polyamines. *Advances in Pharmacology*, 38, 119-149.

Lye, H.S., Kuan, C.Y., Ewe, J.A., Fung, W.Y., & Liong, M.T. (2009). The improvement of hypertension by probiotics: effects on cholesterol, diabetes, renin, and phytoestrogens. *International journal of molecular sciences*, 10(9), 3755-3775.

M

Ma, D., Zhang, Y., Yang, T., Xue, Y., Wang, P. (2014). Isoflavone intake inhibits the development of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene(DMBA)-induced mammary tumors in normal and ovariectomized rats. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 54(1), 31-8.

Magee, P.J., McGlynn, H., & Rowland, I.R. (2004). Differential effects of isoflavones and lignans on invasiveness of MDA-MB-231 breast cancer cells in vitro. *Cancer letters*, 208(1), 35-41.

Mahmoud, A.M., Yang, W., & Bosland, M.C. (2014). Soy isoflavones and prostate cancer: A review of molecular mechanisms. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 140, 116-132.

Mainini, G., Torella, M., Di Donna, M.C., Esposito, E., Ercolano, S., Correa, R., Cucinella, G., Stradella, L., ...& De Franciscis, P. (2002). Nonhormonal management of postmenopausal women: effects of a red clover based isoflavones supplementation on climacteric syndrome and cardiovascular risk serum profile. *Clinical Obstetrics and Gynecology*, 40(3), 337-341.

Maintz, L., & Novak, N. (2007). Histamine and histamine intolerance. *American Journal of Clinical Nutrition*, 85, 1185-1196.

Majumdar, A.P.N. (2003). Regulation of gastrointestinal mucosal growth during aging. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 54, 143-154.

Malaypally, S. P., & Ismail, B. (2010). Effect of protein content and denaturation on the extractability and stability of isoflavones in different soy systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(16), 8958-8965.

Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American journal of clinical nutrition*, 79(5), 727-747.

Marangoni, F., & Poli, A. (2010). Phytosterols and cardiovascular health. *Pharmacological Research*, 61(3), 191-199.

Mariné-Font A, Vidal-Carou MC, Izquierdo-Pulido M, Veciana-Nogués MT and Hernández-Jover T, 1995. Les amines biogènes dans les aliments: leur signification, leur analyse. *Annals Falsif. Expert. Chim.* 88, 119-140.

Martin-Tanguy, J. (2001). Metabolism and function of polyamines in plants: recent development (new approaches). *Plant Growth Regulation*, 34(1), 135-148.

Martinelli, A. & Hesseltine, C.W. (1964). Tempeh fermentation: packing and tray fermentations. *Food Technology*, 18, 761-770.

Martínez, V.C., Frías, J., & Vidal, V.C. (2005). Raffinose family oligosaccharides and sucrose contents in 13 Spanish lupin cultivars. *Food Chemistry*, 91, 645-649.

Mataix, J., & Ochoa, J. (2002). Vitaminas. Ed. Mataix Verdú J. *Nutrición y Alimentación Humana*, p.p. 137-203. Ergon, Majadahonda (Madrid).

- Murota, K., Shimizu, S., Miyamoto, S., Izumi, T., Obata, A., Kikuchi, M., & Terao, J. (2002). Unique uptake and transport of isoflavone aglycones by human intestinal Caco-2 cells: comparison of isoflavonoids and flavonoids. *Journal of Nutrition*, 132, 1956–1961.
- Mazur, W., Fotsis, T., Wahala, K., Ojala, S., Salakka, A., & Adlercreutz, H. (1996). Isotope dilution gas chromatographic-mass spectrometric method for the determination of isoflavones, coumesterol and lignans in food samples. *Analytical Biochemistry*, 233, 169–180
- Mazur, W. (1998). 11 Phytoestrogen content in foods. *Baillière's clinical endocrinology and metabolism*, 12(4), 729-742.
- McCabe, B.J. (1986). Dietary tyramine and other pressor amines in MAOI regimens: a review. *Journal of American Dietetic Association*, 86, 8, 1059-64.
- McCarver, G., Bhatia, J., Chambers, C., Clarke, R., Etzel, R., Foster, W., Hoyer, P., Leeder, J. S., Peters, J. M., Rissman, E., Rybak, M., Sherman, C., Toppari, J., & Turner, K. (2011). NTP-CERHR expert panel report on the developmental toxicity of soy infant formula. *Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology*, 92, 421–68.
- MacDonald, R. S., Guo, J., Copeland, J., Browning, J. D., Sleper, D., Rottinghaus, G. E., & Berhow, M. A. (2005). Environmental influences on isoflavones and saponins in soybeans and their role in colon cancer. *The Journal of nutrition*, 135(5), 1239-1242.
- Maintz, L., Benfadal, S., Allam, J.P., Hagemann, T., Fimmers, R., & Novak, N., (2006). Evidence for a reduced histamine degradation capacity in a subgroup of patients with atopic eczema. *Journal of Allergy Clinical Immunology*, 117, 5, 1106-1112.
- Mellenthin, O., & Galensa, R. (1999). Analysis of polyphenols using capillary zone electrophoresis and HPLC: detection of soy, lupin, and pea protein in meat products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 594–602.
- Messina, M. (1999). Legumes and soybeans: overview of their nutritional profiles and health effects. *The American journal of clinical nutrition*, 70(3), 439s-450s.
- Messina, M., & Redmond, G. (2006). Effects of soy protein and soybean isoflavones on thyroid function in healthy adults and hypothyroid patients: a review of the relevant literature. *Thyroid*, 16(3), 249-258.
- Micke, G.A., Fujiya, N.M., & Tonin, F.G. (2006). Method development and validation for isoflavones in soy germ pharmaceutical capsules using micellar electrokinetic chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41, 1625–1632.
- Minois, N., Carmona-Gutierrez, D., & Madeo, F. (2011). Polyamines in aging and disease. *Aging (Albany NY)*, 3(8), 716.
- Minois, N. (2014). Molecular Basis of the 'Anti-Aging'Effect of Spermidine and Other Natural Polyamines-A Mini-Review. *Gerontology*.
- Mita, M., Tanaka, H., Yanagihara, H., Nakagawa, J.I., Hishinuma, S., Sutherland, C., ... & Shoji, M. (2012). Membrane depolarization-induced RhoA/Rho-associated kinase activation and sustained contraction of rat caudal arterial smooth muscle involves genistein-sensitive tyrosine phosphorylation. *Journal of smooth muscle research= Nihon Heikatsukin Gakkai kikanishi*, 49, 26-45.

Moinard, C., Cynober, L., & de Bandt, J.P. (2005). Polyamines: metabolism and implications in human diseases. *Clinical Nutrition*, 24(2), 184-197.

Molina, E., Papadopoulou, A., & Ledward, D. A. (2001). Emulsifying properties of high pressure treated soy protein isolate and 7S and 11S globulins. *Food Hydrocolloids* 15, 263-269.

Morandi, S., D'Agostina, A., Ferrario, F. & Arnoldi, A. (2004). Isoflavone content of Italian soy food products and daily intakes of some specific classes of consumers. *European Food Research and Technology*, 221, 84-91.

Moreau, R. A., Whitaker, B.D., & Hicks, K.B. (2002). Phytosterols, phytostanols, and their conjugates in foods: structural diversity, quantitative analysis, and health-promoting uses. *Progress in Lipid Research*, 41(6), 457-500.

Moreiras, O, Carbajal, A, Cabrera, L., & Cuadrado, C. (2013). Tablas de composición de alimentos. Ediciones Pirámide (Grupo Anaya, SA). 16ª edición revisada y ampliada. ISBN: 978-84-368-2903-7.

Moreau, R.A., Whitaker, B.D., & Hicks, K.B. (2002). Phytosterols, phytostanols, and their conjugates in foods: structural diversity, quantitative analysis, and health-promoting uses. *Progress in Lipid Research*, 41(6), 457-500.

Morris, C., Thorpe, J., Ambrosio, L., & Santin, M. (2006). The soybean isoflavone genistein induces differentiation of MG63 human osteosarcoma osteoblasts. *The Journal of nutrition*, 136(5), 1166-1170.

Mulligan, A.A., Welch, A.A., McTaggart, A.A., Bhaniani, A., & Bingham, S.A. (2007). Intakes and sources of soya foods and isoflavones in a UK population cohort study (EPIC-Norfolk). *European Journal of Clinical Nutrition*, 61(2), 248-254.

Mullin, W.J., Fregeau-Reid, J.A., Butler, M., Poysa, V., Woodrow, L., Jessop, D.B., & Raymond, D. (2001). An interlaboratory test of a procedure to assess soybean quality for soymilk and tofu production. *Food Research International*, 34, 669-677.

Munro, I.C., Harwood, M., Hlywka, J.J., Stephen, A.M., Doull, J., Flamm, W.G., & Adlercreutz, H. (2003). Soy isoflavones: a safety review. *Nutrition reviews*, 61(1), 1-33.

Murphy, P.A., Song, T., Buseman, G., & Barua, K. (1997). Isoflavones in Soy-Based Infant Formulas. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 4635-4638.

N

Nagata, C., Kabuto, M., Kurisu, Y., & Shimizu, H. (1997). Decreased serum estradiol concentration associated with high dietary intake of soy products in premenopausal Japanese women. *Nutrition and Cancer*, 29, 3.

Nakamura, Y., Tsuji, S. & Tonogai, Y. (2000). Determination of the levels of isoflavonoides in soybeans and soy-derived foods and estimation of isoflavonoides by Japanese daily intake. *Journal of AOAC International*, 83, 635-650.

Nayvelt, I., Hyvonen, M.T., Alhonen, L., Pandya, I., Thomas, T., Khomutov, A.R., Vepsalainen, J., Patel, R., Keinanen, T.A., & Thomas, T.J. (2010). DNA condensation by chiral alpha-methylated polyamine analogues and protection of cellular DNA from oxidative damage. *Biomacromolecules*, 11, 97-105.

Neill, A. S., Ibiebele, T. I., Lahmann, P. H., Hughes, M. C., Nagle, C. M., & Webb, P. M. (2013). Dietary phyto-oestrogens and the risk of ovarian and endometrial cancers: findings from two Australian case-control studies. *British Journal of Nutrition*, 1-11.

Nelson, A. I., Steinberg, M. I., & Wei, L. S. (1976). Illinois process for preparation of soymilk. *Journal of Food Science*, 41(1), 57-61.

Nelson, H. D., Vesco, K. K., Haney, E., Fu, R., Nedrow, A., Miller, J., ... & Humphrey, L. (2006). Nonhormonal Therapies for Menopausal Hot Flashes Systematic Review and Meta-analysis. *Jama*, 295(17), 2057-2071.

Nielsen, N. (1985). The structure and complexity of the 11S polypeptides in soybeans *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 62, 1680-1686.

Niki, E., Yoshida, Y., Saito, Y., y Noguchi, N. (2005). Lipid peroxidation: Mechanisms, inhibition, and biological effects. *Biochem Biophys Res Commun*, 338(1), 668-676.

Nishimura, K., Shiina, R., Kashiwagi, K., & Igarashi, K. (2006). Decrease in polyamines with aging and their ingestion from food and drink. *Journal of biochemistry*, 139(1), 81-90.

Nunomura, N. & Sakai, M. (1986). Legume-based fermented foods. CRC Press, Inc. Boca Ratón, FL.

Nursten, H. E. (2005). The Maillard reaction: chemistry, biochemistry, and implications. Royal Society of Chemistry.

O

O'Brien, J., Morrissey, P.A. and Ames, J.M. (1989). Nutritional and toxicological aspects of the Maillard browning reaction in foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 28, 211-248.

Ordiozola-Serrano, I., Soliva-Fortuny, R., & Martín-Belloso, O. (2008). Changes of health-related compounds throughout cold storage of tomato juice stabilized by thermal or high intensity pulsed electric field treatments. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 9, 272-279.

Oguntunde, A.O., & Akintoye, O.A. (1991). Measurement and comparison of density, specific heat and viscosity of cow's milk and soymilk. *Journal of Food Engineering*, 13, 221-230.

Ohr, L. M. (2004). Powerhouse proeinic soy and whey have bright future. *Food Technology*, 58, 71-76.

Okubo, K., Iijima, M., Kobayashi, Y., Yoshikoshi, M., Uchida, T., & Kudou, S. (1992). Components responsible for the undesirable taste of soybean seeds. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 56, 99-103.

Omoni, A. O., & Aluko, R. E. (2005). Soybean foods and their benefits: potential mechanisms of action. *Nutrition reviews*, 63(8), 272-283.

Ono, T., Takeda, M., & Shuntang, G. (1996). Interaction of protein particles with lipids in soybean milk. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 60, 1165-1169.

Opara, E. C., & Rockway, S. W. (2006). Antioxidants and micronutrients. *Disease-a-Month*, 52(4), 151-163.

Ostlund R.E. (2002a). Phytosterols in human nutrition. *Annual Review of Nutrition*, 22(1), 533-549.

Ostlund, R.E., Racette, S.B., Okeke, A., & Stenson, W.F. (2002b). Phytosterols that are naturally present in commercial corn oil significantly reduce cholesterol absorption in humans. *The American journal of clinical nutrition*, 75(6), 1000-1004.

Otieno, D. O., Ashton, J. F., & Shah, N. P. (2005). Stability of β -glucosidase Activity Produced by *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* spp. in Fermented Soymilk During Processing and Storage. *Journal of Food Science*, 70, 236-241.

Otieno, D.O., Ashton, J.F., & Shah, N.P. (2007). Role of microbial strain and storage temperatures in the degradation of isoflavone phytoestrogens in fermented soymilk with selected β -glucosidase *Lactobacillus casei* strains. *Food research international*, 40(3), 371-380.

P

Packer, L., & Obermüller-Jevic, U. (2002). Vitamin E in Disease Prevention and Therapy: Future Perspectives en Packer L, Traber M, Kraemer K, Frei B. (Ed.) *The Antioxidant Vitamins C and E*, 255-288. AOCs Press, California.

Palacios-González, B., Zarain-Herzberg, A., Flores-Galicia, I., Noriega, L. G., Alemán-Escondrillas, G., Zariñan, T., ... & Tovar, A. R. (2014). Genistein stimulates fatty acid oxidation in a leptin receptor-independent manner through the JAK2-mediated phosphorylation and activation of AMPK in skeletal muscle. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1841(1), 132-140.

Pansini, F., Mollica, G., & Bergamini, C.M. (2005). Management of the menopausal disturbances and oxidative stress. *Current pharmaceutical design*, 11(16), 2063-2073.

Park, C.Y., & Weaver, C.M. (2012). Vitamin D interactions with soy isoflavones on bone after menopause: a review. *Nutrients*, 4(11), 1610-1621.

Park, K., Ju, W.C., Yeo, J.H., Kim, J.Y., Seo, H.S., Uchida, Y., & Cho, Y. (2014). Increased OPG/RANKL ratio in the conditioned medium of soybean-treated osteoblasts suppresses RANKL-induced osteoclast differentiation. *International journal of molecular medicine*, 33(1), 178-184.

Patat, A., Berlin, I., Durrieu, G., Armand, P., Fitoussi, S., Molinier, P., & Caille, P. (1995). Pressor effect of oral tyramine during treatment with bexloxtone, a new reversible monoamine oxidase-A inhibitor, in healthy subjects. *Journal of Clinical Pharmacology*, 35, 6, 633-43.

Patisaul, H.B., & Jefferson, W. (2010). The pros and cons of phytoestrogens. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 31(4), 400-419.

Peng, L., Kawagoe, Y., Hogan, P., & Delmer, D. (2002). Sitosterol- β -glucoside as primer for cellulose synthesis in plants. *Science*, 295(5552), 147-150.

Peñalvo, J. L., Nurmi, T., & Adlercreutz, H. (2004a). A simplified HPLC method for total isoflavones in soy products. *Food Chemistry*, 87, 297-305.

Peñalvo, J.L., Castilho, M.C., Silveira, M. I. N., Matallana, M.C., & Torija, M.E. (2004b). Fatty acid profile of traditional soymilk. *European Food Research and Technology*, 219, 251-253.

Pereda, J., Ferragut, V., Guamis, B., & Trujillo, A. J. (2006). Effect of ultra high- pressure homogenisation on natural-occurring micro-organisms in bovine milk. *Milchwissenschaft-Milk Science International*, 61, 245-248.

- Pereda, J., Ferragut, V., Quevedo, J.M., Guamis, B., & Trujillo, A.J. (2007). Effects of ultra-high pressure homogenization on microbial and physicochemical shelf life of milk. *Journal of Dairy Science*, 90, 1081-1093.
- Pereda, J., Ferragut, V., Buffa, M., Guamis, B. & Trujillo, A.J. (2008). Proteolysis of ultra- high pressure homogenised treated milk during refrigerated storage. *Food Chemistry*. 111, 696-702.
- Perona, J.S., Cañizares, J., Montero, E., Sánchez-Domínguez, J.M., Catalá, A., Ruiz-Gutiérrez, V. (2004). Virgin olive oil reduces blood pressure in hypertensive elderly subjects *Clinical Nutrition*, 23, 1113-1121.
- Phillips, K. M., Ruggio, D. M., & Ashraf-Khorassani, M. (2005). Phytosterol composition of nuts and seeds commonly consumed in the United States. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(24), 9436-9445.
- Picart, L., Thiebaut, M., René, M., Pierre Guiraud, J., Cheftel, J.C., & Dumay, E. (2006). Effects of high pressure homogenisation of raw bovine milk on alkaline phosphatase and microbial inactivation. A comparison with continuous short-time thermal treatments. *Journal of Dairy Research*. 73, 454-463.
- Pizzoferrato, L., Manzi, P., Vivanti, V., Nicoletti, I., Corradini, C., & Cogliandro, E. (1998). Maillard reaction in milk-based foods: Nutritional consequences. *Journal of Food Proteins*, 61, 235-239.
- Plat, J., Kerckhoffs, D. A., & Mensink, R. P. (2000). Therapeutic potential of plant sterols and stanols. *Current opinion in lipidology*, 11(6), 571-576.
- Plat, J., & Mensink, R.P. (2002). Effects of plant stanol esters on LDL receptor protein expression and on LDL receptor and HMG-CoA reductase mRNA expression in mononuclear blood cells of healthy men and women. *The FASEB journal*, 16(2), 258-260.
- Plaza, L., Sánchez-Moreno, C., De Ancos, B., Elez-Martínez, P., Martín-Belloso, O., & Cano, M. P. (2011). Carotenoid and flavanone content during refrigerated storage of orange juice processed by high-pressure, pulsed electric fields and low pasteurization. *LWT-Food Science and Technology*, 44(4), 834-839.
- Poliseli-Scopel, F. H., Hernández-Herrero, M., Guamis, B., & Ferragut, V. (2012). Comparison of ultra high pressure homogenization and conventional thermal treatments on the microbiological, physical and chemical quality of soymilk. *LWT-Food Science and Technology*, 46(1), 42-48.
- Poliseli-Scopel, F. H., Hernández-Herrero, M., Guamis, B., & Ferragut, V. (2013). Characteristics of soymilk pasteurized by ultra high pressure homogenization (UHPH). *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 20, 73-80.
- Poliseli-Scopel, F. H., Hernández-Herrero, M., Guamis, B., & Ferragut, V. (2014). Sterilization and aseptic packaging of soymilk treated by ultra high pressure homogenization. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*.
- Puppo, C., Chapleau, N., Speroni, F., Lamballerie-Anton, M., Michel, F., Añón, C., & Anton, M. (2004). Physicochemical Modifications of High-Pressure-Treated Soybean Protein Isolates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(6), 1564–1571.
- Prabhakaran, M. P., Perera, C. O., & Valiyaveettil, S. (2005). Quantification of isoflavones in soymilk and tofu from South East Asia. *International journal of food properties*, 8(1), 113-123.

Prawiradjaja, S. (2003). Process optimization for solid extraction, flavor improvement and fat removal in the production of soymilk from full fat soy flakes. Thesis Master Iowa State University, Ames Iowa.

Prior, R.L., Wu, X., & Schaich, K. (2005) Standardized methods for determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 4290-4302.

Pru, J. K. (2012). The bone-promoting actions of formononetin in established osteopenia. *Menopause*, 19(8), 843-844.

Q

Qin, Y., Niu, K., Zeng, Y., Liu, P., Yi, L., Zhang, T., Zhang Q. Y., Zhu, J. D., & Mi, M. T. (2013). Isoflavones for hypercholesterolaemia in adults. *Cochrane Database Syst. Rev.*, 6, CD009518

R

Raschke, M., Wähälä, K., & Pool-Zobel, B. L. (2006). Reduced isoflavone metabolites formed by the human gut microflora suppress growth but do not affect DNA integrity of human prostate cancer cells. *British journal of nutrition*, 96(03), 426-434.

Ratnayake, W. M., L'Abbé, M. R., Mueller, R., Hayward, S., Plouffe, L., Hollywood, R., & Trick, K. (2000). Vegetable oils high in phytosterols make erythrocytes less deformable and shorten the life span of stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *The Journal of Nutrition*, 130(5), 1166-1178.

Rauscher-Gabernig, E., Grossgut, R., Bauer, F., & Paulsen, P. (2009). Assessment of alimentary histamine exposure of consumers in Austria and development of tolerable levels in typical foods. *Food Control*, 20, 423-9.

Read, S. M., & Bacic, T. (2002). Prime time for cellulose. *Science*, 295(5552), 59-60.

Reed, S. D., Lampe, J. W., Qu, C., Gundersen, G., Fuller, S., Copeland, W. K., & Newton, K. M. (2013). Self-reported menopausal symptoms in a racially diverse population and soy food consumption. *Maturitas*, 75(2), 152-158.

Regulación de la Comisión Europea. (1991) EEC/2568/91 del 11 de Julio en Las características del aceite de oliva y residuos del aceite de oliva en los métodos relevantes de análisis. *Off. J. Eur. Communities*. L248: 52-55.

Reilly, J.K., Lanou, A.J., Barnard, N.D., Seidl, K., & Green, A.A. (2006) Acceptability of Soymilk as a Calcium-Rich Beverage in Elementary School Children. *Journal of the American Dietetic Association*, 106(4), 590-593.

Rice-Evans, C. (2004). Flavonoids and isoflavones: absorption, metabolism, and bioactivity. *Free Radical Biology and Medicine*, 36(7), 827-828.

Richardson, D.P., Astrup, A., Cocaul, A., & Ellis, P. (2009). The nutritional and health benefits of almonds: a healthy food choice. *Food Science and Technology Bulletin: Functional Foods*, 6(4), 41-50.

Richelle, M., Pridmore-Merten, S., Bodenstab, S., Enslin, M., & Offord, E.A. (2002). Hydrolysis of isoflavone glycosides to aglycones by β -glycosidase does not alter plasma and urine isoflavone pharmacokinetics in postmenopausal women. *The Journal of nutrition*, 132(9), 2587-2592.

Rickert, D.A., Meyer, M.A., Hu, J., & Murphy, P.A. (2004). Effect of extraction pH and temperature on isoflavone and saponin partitioning and profile during soy protein isolate production. *Journal of food science*, 69(8), C623-C631.

Righetti, L., Tassoni, A., & Bagni, N. (2008). Polyamines content in plant derived food: A comparison between soybean and Jerusalem artichoke. *Food Chemistry*, 111, 852-856.

Rigueira, J.C.S., Rodrigues, M.I., & Gloria, M.B.A. (2011). Optimization of the analytical extraction of polyamines from milk. *Talanta*, 86, 195-199.

Rimbach, G., Boesch-Saadatmandi, C., Frank, J., Fuchs, D., Wenzel, U., Daniel, H., Hall, W. L., & Weinberg, P.D. (2008). Dietary isoflavones in the prevention of cardiovascular disease—A molecular perspective. *Food Chemistry and Toxicology*, 46(4), 1308–1319.

Roesch, R., & Corredig, M. (2003). Texture and microstructure of emulsions prepared with soy protein concentrate by high-pressure homogenization. *Lebensmittel- Wissenschaft Und-Technologie*, 36, 113-124.

Roginsky, V., & Lissi, E.A. (2005) Review of methods to determine chain-breaking antioxidants activity in food. *Food Chemistry*, 92: 235-254.

Romagnolo, D.F., & Selmin, O.I. (2012). Flavonoids and cancer prevention: a review of the evidence. *Journal of nutrition in gerontology and geriatrics*, 31(3), 206-238.

Ronis, M.J., Little, J.M., Barone, G.W., Chen, G., Radominska-Pandya, A., & Badger, T.M. (2006). Sulfation of the isoflavones genistein and daidzein in human and rat liver and gastrointestinal tract. *Journal of medicinal food*, 9(3), 348-355.

Rozman, K. K., Bhatia, J., Calafat, A. M., Chambers, C., Culty, M., Etzel, R. A., ... & Umbach, D. (2006a). NTP-CERHR Expert Panel Report on the reproductive and developmental toxicity of soy formula. *Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology*, 77(4), 280-397.

Rozman, K.K., Bhatia, J., Calafat, A.M., Chambers, C., Culty, M., Etzel, R.A., ... & Umbach, D. (2006b). NTP-CERHR expert panel report on the reproductive and developmental toxicity of genistein. *Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology*, 77(6), 485-638.

Rozner, S., & Garti, N. (2006). The activity and absorption relationship of cholesterol and phytosterols. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 282, 435-456.

Rubanyi, GM; Johns, A.; Kauser, K. Effect of estrogen on endothelial function and angiogenesis. *Vascular Pharmacology*, v. 38, n. 2, p. 89-98, 2002.

Ruiz-Larrea, M. B., Mohan, A. R., Paganga, G., Miller, N. J., Bolwell, G. P., & Rice-Evans, C. A. (1997). Antioxidant activity of phytoestrogenic isoflavones. *Free radical research*, 26(1), 63-70.

Ryan-Borchers, T. A., Park, J. S., Chew, B. P., McGuire, M. K., Fournier, L. R., & Beerman, K. A. (2006). Soy isoflavones modulate immune function in healthy postmenopausal women. *The American journal of clinical nutrition*, 83(5), 1118-1125.

S

Sachan, D.S. et al. (2005). Decreasing oxidative stress with choline and carnitine in women. *Journal American Nutrition*, 24, 172-176.

- Sacks, F.M., Lichtenstein, A., Van Horn, L., Harris, W., Kris-Etherton, P., & Winston, M. (2006). Soy protein, isoflavones, and cardiovascular health an American Heart Association science advisory for professionals from the nutrition committee. *Circulation*, 113(7), 1034-1044.
- Sakamoto, Y., Naka, A., Ohara, N., Kondo, K., & Iida, K. (2013). Daidzein regulates proinflammatory adipokines thereby improving obesity-related inflammation through PPAR γ . *Molecular nutrition & food research*.
- Salas-Salvadó, J., Fernández-Ballart, J., Ros, E., Martínez-González, M. A., Fitó, M., Estruch, R., ... & Covas, M. I. (2008). Effect of a Mediterranean diet supplemented with nuts on metabolic syndrome status: one-year results of the PREDIMED randomized trial. *Archives of internal medicine*, 168(22), 2449-2458.
- Sanchez-Moreno, C. & Larrauri, J.A. (1998). Main methods used in lípido oxidation determination. *Food Science and Technology International*, 4, 391-399.
- Sanchez-Moreno, C. (2002). Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Science and Technology International*. 8, 121-137.
- Sandra, S., & Dalgleish, D.G. (2005). Effects of ultra-high-pressure homogenization and heating on structural properties of casein micelles in reconstituted skim milk powder. *International Dairy Journal*. 15, 1095-1104.
- Sangwan, N. K., Gupta, K., & Dhindsa, K. S. (1986). Fatty acid composition of developing soybeans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 34, 415-417.
- Santhakumar, A. B., Bulmer, A. C., & Singh, I. (2014). A review of the mechanisms and effectiveness of dietary polyphenols in reducing oxidative stress and thrombotic risk. *Journal of Human Nutrition and Dietetics*, 27(1), 1-21.
- Sarwar, G., Botting, H. G., & Peace, R. W. (1988). Amino acid rating method for evaluating protein adequacy of infant formulas. *Journal-Association of Official Analytical Chemists*, 72(4), 622-626.
- Sattler, J., Häfner, D., Klotter, H.J., Lorenz, W., & Wagner, P.K. (1988). Food induced histaminosis as an epidemiological problem: plasma histamine elevation and haemodynamic alterations after oral histamine administration and blockade of diamine oxidase (DAO). *Agents and Actions*, 23, 361- 365.
- Schrader, C., Ernst, I., Sinnecker, H., T Soukup, S., Kulling, S. E., & Rimbach, G. (2012). Genistein as a potential inducer of the anti-atherogenic enzyme paraoxonase-1: studies in cultured hepatocytes in vitro and in rat liver in vivo. *Journal of cellular and molecular medicine*, 16(10), 2331-2341.
- Seiler, N., & Raul, F. (2005). Polyamines and apoptosis. *Journal of cellular and molecular medicine*, 9(3), 623-642.

Seiquer, I., Díaz-Alguacil, J., Delgado-Andrade, C., López-Frías, M., Hoyos, A. M., Galdó, G., & Navarro, M. P. (2006). Diets rich in Maillard reaction products affect protein digestibility in adolescent males aged 11–14 y. *The American journal of clinical nutrition*, *83*(5), 1082-1088.

Serra, M., Trujillo, A.J., Quevedo, J.M., Guamis, B., & Ferragut, V. (2007). Acid coagulation properties and suitability for yogurt production of cows' milk treated by high-pressure homogenisation. *International Dairy Journal*. *17*, 782-790.

Serra, M., Trujillo, A.J., Jaramillo, P.D., Guamis, B., & Ferragut, V. (2008). Ultra-high pressure homogenization-induced changes in skim milk: Impact on acid coagulation properties. *Journal of Dairy Research*. *75*, 69-75.

Sessa, D.J., & Wolf, W.J. (2001). Bowman-Birk inhibitors in soybean seed coats. *Industrial Crops and Products*, *14*, 73-83.

Setchell, K.D., Zimmer-Nechemias, L., Cai, J., & Heubi, J.E. (1997). Exposure of infants to phyto-oestrogens from soy-based infant formula. *The Lancet*, *350*(9070), 23-27.

Setchell, K.D., Brown, N.M., Zimmer-Nechemias, L., Brashear, W.T., Wolfe, B.E., Kirschner, A.S., & Heubi, J.E. (2002a). Evidence for lack of absorption of soy isoflavone glycosides in humans, supporting the crucial role of intestinal metabolism for bioavailability. *The American journal of clinical nutrition*, *76*(2), 447-453.

Setchell, K. D., Brown, N. M., & Lydeking-Olsen, E. (2002b). The clinical importance of the metabolite equol—a clue to the effectiveness of soy and its isoflavones. *The Journal of nutrition*, *132*(12), 3577-3584.

Setchell, K. D., Clerici, C., Lephart, E. D., Cole, S. J., Heenan, C., Castellani, D., ... & Heubi, J. E. (2005). S-equol, a potent ligand for estrogen receptor β , is the exclusive enantiomeric form of the soy isoflavone metabolite produced by human intestinal bacterial flora. *The American journal of clinical nutrition*, *81*(5), 1072-1079.

Setchell, K. D., & Clerici, C. (2010). Equol: history, chemistry, and formation. *The Journal of nutrition*, *140*(7), 1355S-1362S.

Sikorski, Z.E. (2007). *Chemia żywności. Praca zbiorowa, t.1, WNT*,. ISBN 978-83-204-3273-2, Warszawa.

Simon, J. A., Hsia, J., Cauley, J. A., Richards, C., Harris, F., Fong, J., ... & Hulley, S. B. (2001). Postmenopausal Hormone Therapy and Risk of Stroke The Heart and Estrogen-progestin Replacement Study (HERS). *Circulation*, *103*(5), 638-642.

Silva, C., Aranda, F. J., Ortiz, A., Martínez, V., Carvajal, M., & Teruel, J. A. (2011). Molecular aspects of the interaction between plants sterols and DPPC bilayers: an experimental and theoretical approach. *Journal of colloid and interface science*, *358*(1), 192-201.

Shalaby, A.R. (1996). Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Research International*, *29*, 7, 675-690.

- Shaterzadeh, H., Bürger-Mendonça, M., Alonso, A., & Hermes-Lima, M. (2011). The antioxidant effect of genistein on the in vitro metal-mediated formation of free radicals. *Clinical Biochemistry*, 44(13), S226.
- Shi, H., Nam, P. K., & Ma, Y. (2010). Comprehensive profiling of isoflavones, phytosterols, tocopherols, minerals, crude protein, lipid, and sugar during soybean (*Glycine max*) germination. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(8), 4970-4976.
- Shiraiwa, M., Harada, K., & Okubo, K. (1991). Composition and content of saponins in soybean seed according to variety, cultivation year and maturity. *Agricultural and Biological Chemistry*, 55, 323-331.
- Shukla, S., Kim, J. K. & Kim, M. (2011). Occurrence of Biogenic Amines in Soybean Food Products, Soybean and Health, Prof. Hany El-Shemy (Ed.), ISBN: 978-953-307-535-8, InTech, DOI: 10.5772/19021. Available from: <http://www.intechopen.com/books/soybean-and-health/occurrence-of-biogenic-amines-in-soybean-food-products>
- Smolarek, A. K., & Suh, N. (2011). Chemopreventive activity of vitamin E in breast cancer: A focus on γ - and δ -Tocopherol. *Nutrients*, 3(11), 962-986.
- Sociedad Española de individuos intolerantes a la lactosa (ADILAC) (2013). Disponible en: <http://www.lactosa.org/bienvenida.html>
- Soda, K., Dobashi, Y., Kano, Y., Tsujinaka, S., & Konishi, F. (2009a). Polyamine-rich food decreases age-associated pathology and mortality in aged mice. *Experimental gerontology*, 44(11), 727-732.
- Soda, K., Kano, Y., Sakuragi, M., Takao, K., Lefor, A., & Konishi, F. (2009b). Long-term oral polyamine intake increases blood polyamine concentrations. *Journal of nutritional science and vitaminology*, 55(4), 361-366.
- Soda, K. (2011). Polyamines - The Principal Candidate Substance of Soybean-Induced Health, Soybean and Health, Prof. Hany El-Shemy (Ed.), ISBN: 978-953-307-535-8, InTech, DOI: 10.5772/17715. Available from: <http://www.intechopen.com/books/soybean-and-health/polyamines-the-principal-candidate-substance-of-soybean-induced-health>.
- Soda, K., Kano, Y., & Chiba, F. (2012). Food Polyamine and Cardiovascular Disease-An Epidemiological Study. *Global journal of health science*, 4(6), p170.
- Soda, K., Kano, Y., Chiba, F., Koizumi, K., & Miyaki, Y. (2013). Increased polyamine intake inhibits age-associated alteration in global DNA methylation and 1, 2-dimethylhydrazine-induced tumorigenesis. *PloS one*, 8(5), e64357.
- Soler, L., Canellas, J., & Saura-Calixto, F. (1988). Oil content and fatty acid composition of developing almond seeds. *Journal of agricultural and food chemistry*, 36(4), 695-697.
- Solís, V.E., & Salas, G. G. (2009). Implicaciones metabólicas del consumo excesivo de fructosa. *Acta Médica Costarricense*, 49(4).

Somekawa, Y., Chiguchi, M., Ishibashi, T., & Aso, T. (2001). Soy intake related to menopausal symptoms, serum lipids, and bone mineral density in postmenopausal Japanese women. *Obstetrics & Gynecology*, 97(1), 109-115.

Souci, S. W., Fachmann, W., & Kraut, H. (2008). Food Composition and Nutritional Tables (7th revised and completed edition) Medpharm Scientific Publishers.

Soupas, L., Huikko, L., Lampi, A. M., & Piironen, V. (2006). Oxidative stability of phytosterols in some food applications. *European Food Research and Technology*, 222(3-4), 266-273.

Spackman, D.H., Stein, W. H. and Moore, S. (1958). Automatic Recording Apparatus for Use in Chromatography of Amino Acids. *Anal. Chem.*, 30 (7), pp 1190–1206.

Spencer, J. P., Schroeter, H., Crossthwaite, A.J., Kuhnle, G., Willians, R. J., & Rice-Evans, C. (2001). Contrasting influences of glucuronidation and O-methylation of epicatechin on hydrogen peroxide-induced cell death in neurons and fibroblasts. *Free Radical Biology Medicine*, 31, 1139–1146.

Squadrito, F., Altavilla, D., Morabito, N., Crisafulli, A., D'Anna, R., Corrado, F., ... & Squadrito, G. (2002). The effect of the phytoestrogen genistein on plasma nitric oxide concentrations, endothelin-1 levels and endothelium dependent vasodilation in postmenopausal women. *Atherosclerosis*, 163, 339–347.

Stanley, J. (2005). Vitamin E supplements and vascular disease. *Lipid Technology*, 17, 15-21.

Stratton JE, Hutkin RW and Taylor SL, 1991. Biogenic amines in cheese and other fermented foods: a review. *Journal of Food Proteins*, 54, 460-470.

Suárez-Jacobo, Á., Gervilla, R., Guamis, B., Roig-Sagués, A.X., & Saldo, J. (2010). Effect of UHPH on indigenous microbiota of apple juice: A preliminary study of microbial shelf-life. *International Journal of Food Microbiology*. 136, 261-267.

Suárez-Jacobo, Á. (2011). Study of the application of ultra-high pressure homogenization (UHPH) treatments in apple juice [dissertation]. Universitat Autònoma de Barcelona, Spain.

Sun, T. & Tanumihardjo, S.A. (2007). An integrated approach to evaluate food antioxidant capacity. *Journal of Food Science*, 72, R159-R165.

Szkudelska, K., Nogowski, L., & Szkudelski, T. (2000). Genistein affects lipogenesis and lipolysis in isolated rat adipocytes. *The Journal of Steroid Biochemistry and molecular biology*, 75(4), 265-271.

T

Tadolini B. (1988). Polyamine inhibition of lipoperoxidation - the influence of polyamines on iron oxidation in the presence of compounds mimicking phospholipid polar heads. *Journal of Biochemistry*, 249, 33-36.

Taylor SL, 1986. Histamine food poisoning: toxicology and clinical aspects. *CRC Critical Reviews in Toxicology*, 17, 2, 91-128.

Tedford, L. A., Kelly, S. M., Price, N. C., & Schaschke, C. J. (1999). Interactive Effects of Pressure, Temperature and Time on the Molecular Structure of β -Lactoglobulin. *Journal of food science*, 64(3), 396-399.

Teixeira, S. R., Tappenden, K. A., Carson, L., Jones, R., Prabhudesai, M., Marshall, W. P., & Erdman, J. W. (2004). Isolated soy protein consumption reduces urinary albumin excretion and improves the serum lipid profile in men with type 2 diabetes mellitus and nephropathy. *The Journal of nutrition*, 134(8), 1874-1880.

Teruelo de Luis, M.A.; Latorre Moratalla, M.L.; Veciana-Nogués, M.T. & Vidal-Carou, M.C. (2008). The polyamines Spermine and Spermidine as antioxidants in food. Poster en el VII Congreso Internacional de Barcelona sobre la Dieta Mediterranea. Barcelona. Libro de resúmenes, p. 226.

Thanh, V. H., Okubo, K., & Shibasaki, K. (1975). Isolation and characterization of the multiple 7S globulins of soybean protein. *Plant Physiology*, 56, 19-22.

Thiebaud, M., Dumay, E., Picart, L., Guiraud, J. P., & Cheftel, J. C. (2003). High-pressure homogenisation of raw bovine milk. effects on fat globule size distribution and microbial inactivation. *International Dairy Journal*, 13, 427-439.

Toda, K., Chiba, K., & Ono, T. (2007). Effect of components extracted from okara on the physicochemical properties of soymilk and tofu texture. *Journal of Food Science*, 72, C108-C113.

Torres-Penaranda, A.V. & Reitmeier, C.A. (2001). Sensory descriptive analysis of soymilk. *Journal of Food Science*. 66, 352-356.

Tsukamoto, C., Shimada, S., Igita, K., Kudou, S., Kokubun, M., Okubo, K., & Kitamura, K. (1995). Factors affecting isoflavone content in soybean seeds: changes in isoflavones, saponins, and composition of fatty acids at different temperatures during seed development. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43(5), 1184-1192.

Turner, R., Baron, T., Wolfram, S., Minihane, A. M., Cassidy, A., Rimbach, G., & Weinberg, P. D. (2004). Effect of circulating forms of soy isoflavones on the oxidation of low density lipoprotein. *Free radical research*, 38(2), 209-216.

Tyagi, A. M., Srivastava, K., Singh, A. K., Kumar, A., Changkija, B., Pandey, R., ... & Singh, D. (2012). Formononetin reverses established osteopenia in adult ovariectomized rats. *Menopause*, 19(8), 856-863.

U

Uda, K., Tsujikawa, T., Fujiyama, Y., & Bamba, T. (2003). Rapid absorption of luminal polyamines in a rat small intestine ex vivo model. *Journal of gastroenterology and hepatology*, 18(5), 554-559.

US Agricultural Research Service. 2008. USDA-Iowa State University database on the isoflavone content of foods, release 1.3. U.S. Department of Agriculture, Washington, DC.

USDA (2003). National nutrient database for standard reference. Legume and legume products. (Último acceso 2013).

<http://ars.usda.gov/SP2UserFiles/Place/1234500/Data/SR24/reports/sr24fg16.pdf>

USDHHS, U. (2010). Dietary guidelines for Americans. *Department of Agriculture, Department of Health and Human Services*. <http://www.health.gov/dietaryguidelines/dga2010/dietaryguidelines2010.pdf> (Último acceso 2014).

V

Vacek J, Klejdus B, Lojkova L & Kuban V (2008) Current trends in isolation, separation, determination and identification of isoflavones: A review. *Journal of Separation Science*, 31, 2054–2067.

Valencia-Flores, D. C., Hernández-Herrero, M., Guamis, B., & Ferragut, V. (2013). Comparing the Effects of Ultra-High-Pressure Homogenization and Conventional Thermal Treatments on the Microbiological, Physical, and Chemical Quality of Almond Beverages. *Journal of food science*, 78(2), E199-E205.

Valerio, M., & Awad, A. B. (2011). β -Sitosterol down-regulates some pro-inflammatory signal transduction pathways by increasing the activity of tyrosine phosphatase SHP-1 in J774A. 1 murine macrophages. *International immunopharmacology*, 11(8), 1012-1017.

Valero, M., Recrosio, N., Saura, D., Muñoz, N., Martí, N., & Lizama, V. (2007). Effects of ultrasonic treatments in orange juice processing. *Journal of Food Engineering*, 80(2), 509-516.

Valsecchi, A. E., Franchi, S., Panerai, A. E., Rossi, A., Sacerdote, P., & Colleoni, M. (2011). The soy isoflavone genistein reverses oxidative and inflammatory state, neuropathic pain, neurotrophic and vasculature deficits in diabetes mouse model. *European journal of pharmacology*, 650(2), 694-702.

Valsta, L. M., Kilkinen, A., Mazur, W., Nurmi, T., Lampi, A. M., Ovaskainen, M. L., & Pietinen, P. (2003). Phyto-oestrogen database of foods and average intake in Finland. *British Journal of Nutrition*, 89(S1), S31-S38.

Van Buren, J.P., Steinkraus, K.H., Hackler, L. R., El Rawi, I., & Hand, D. B. (1964). Heat effects on soymilk, indices of protein quality in dried soymilks. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 12, 524-528.

van Erp-Baart, M. A. J., Brants, H. A., Kiely, M., Mulligan, A., Turrini, A., Sermoneta, C., ... & Valsta, L. M. (2003). Isoflavone intake in four different European countries: the VENUS approach. *British Journal of Nutrition*, 89(S1), S25-S30.

Velasco, J.; Dobarganes, C. (2002) Oxidative stability of virgin olive oil. *European Journal Lipid Science Technology*, 661-676.

Velazquez-Estrada, R.M., Hernández-Herrero, M.M., Gervilla-Fernández, R., Guamis- López, B. & Roig-Sagués, A.X. (2008). Effect of ultra high pressure homogenisation (UHPH) on the microbiological and chemical characteristics of orange juice. 46th EFPRG Conference, Spain. pp. 73.

Velázquez-Estrada, R. M., Hernández-Herrero, M. M., Rüfer, C. E., Guamis-López, B., & Roig-Sagués, A. X. (2013). Influence of ultra high pressure homogenization processing on bioactive compounds and antioxidant activity of orange juice. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 18, 89-94.

Venkatachalam, Mahesh, and Shridhar K. Sathe. "Chemical composition of selected edible nut seeds." *Journal of agricultural and food chemistry*, 54.13 (2006): 4705-4714.

Viadel, B., Alegría, A., Barberá, R., Farré, R., Lagarda, M.J. (1999). Evaluación de un método para la determinación por CLAR de triptófano en fórmulas para lactantes. *Alimentaria*, 303, 165-167.

Vidal-Carou, M. C., Latorre-Moratalla, M. L., Veciana-Nogués, M. T., & Bover-Cid, S. (2007). Biogenic amines: risks and control. *Handbook of fermented meat and poultry*, 455-468.

Vidal-Valverde, C., Ruiz, R., & Medrano, A. (1993). Effects of frozen and other storage conditions on α -tocopherol content of cow milk. *Journal of dairy science*, 76(6), 1520-1525.

Villares, A., Rostagno, M. A., García-Lafuente, A., Guillamón, E., & Martínez, J. A. (2011). Content and profile of isoflavones in soy-based foods as a function of the production process. *Food and bioprocess technology*, 4(1), 27-38.

Virk-Baker, M. K., Barnes, S., Krontiras, H., & Nagy, T. R. (2013). S-(–) equol producing status not associated with breast cancer risk among low isoflavone-consuming US postmenopausal women undergoing a physician-recommended breast biopsy. *Nutrition Research*.

Vivó, M., Vera, N. D., Cortés, R., Mengod, G., Camón, L., & Martínez, E. (2001). Polyamines in the basal ganglia of human brain. Influence of aging and degenerative movement disorders. *Neuroscience letters*, 304(1), 107-111.

W

Wagner, K.H., Tomasch, R., & Elmadfa, I. (2001). Impact of diets containing corn oil or olive/sunflower oil mixture on the human plasma and lipoprotein lipid metabolism. *European Journal of Nutrition*, 40, 161-7.

Walsh, P. C. (2005). Effects of long-term vitamin E supplementation on cardiovascular events and cancer: a randomized controlled trial. *The Journal of urology*, 174(5), 1823-1824.

Wang, H. J., & Murphy, P. A. (1994). Isoflavone composition of American and Japanese soybeans in Iowa: effects of variety, crop year, and location. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42(8), 1674-1677.

Wang, B., Xiong, Y.L. & Wang, C. (2001). Physicochemical and sensory characteristics of flavored soymilk during refrigeration storage. *Journal of Food Quality*. 24, 513-526.

Wang, R., Xu, C., Zhao, W., Zhang, J., Cao, K., Yang, B., & Wu, L. (2003). Calcium and polyamine regulated calcium-sensing receptors in cardiac tissues. *European Journal of Biochemistry*, 270(12), 2680-2688.

Wang, Q., Ke, L., Yang, D., Bao, B., Jiang, J., & Ying, T. (2007). Change in oligosaccharides during processing of soybean sheet. *Asia Pasific Journal of Clinical Nutrition (suppl 1)* 89-94.

Wantke, F., Gotz, M. & Jarisch, R. (1993). Histamine-free diet: treatment of choice for histamine-induced food intolerance and supporting treatment for chronic headaches. *Clinical Expert Allergy*, 23, 982–985.

Warner, K., & Gehring, M. M. (2009). High-Temperature Natural Antioxidant Improves Soy Oil for Frying. *Journal of food science*, 74(6), C500-C505.

Weder, J.K. (1986). Inhibition of human proteinases by grain legumes. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 199, 239-279.

Wilkens, W. F., Mattick, L. R., & Hand, D. B. (1967). Effect of processing method on oxidative off-flavor of soybean milk. *Food Technology* 21, 86-89.

Wilson, T.A. et al. (1998). Soy lecithin reduces plasma lipoprotein cholesterol and early atherogenesis in hypercholesterolemic monkeys and hamsters: beyond linoleate. *Atherosclerosis*, 140, 147-153.

Wiseman, H., Casey, K., Bowey, E. A., Duffy, R., Davies, M., Rowland, I. R., ... & Clarke, D. B. (2004). Influence of 10 wk of soy consumption on plasma concentrations and excretion of isoflavonoids and on gut microflora metabolism in healthy adults. *The American journal of clinical nutrition*, 80(3), 692-699.

Wöhrl, S., Hemmer, W., Focke, M., Rappersberger, K., & Jarisch, R. (2004). Histamine intolerance-like symptoms in healthy volunteers by oral provocation with liquid histamine. *Allergy Asthma Proceedings*, 25, 5, 305-311.

Wolf, W. J. (1970). Soybean Proteins: Their functional, chemical, and physical properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 18, 969-976.

Wong, J. M., Kendall, C. W., Marchie, A., Liu, Z., Vidgen, E., Holmes, C., ... & Jenkins, D. J. (2012). Equol status and blood lipid profile in hyperlipidemia after consumption of diets containing soy foods. *The American journal of clinical nutrition*, 95(3), 564-571.

Wu, X.; Beecher, G.R.; Holden, J.M.; Haytowitz, D.B.; Gebhardt, S.E.; Prior, R.L. (2004) Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 4026-4037.

X

Xiao, C.W. (2008). Health effects of soy protein and isoflavones in humans. *The Journal of nutrition*, 138(6), 1244S-1249S.

Xie, Q., Chen, M. L., Qin, Y., Zhang, Q. Y., Xu, H. X., Zhou, Y., ... & Zhu, J. D. (2013). Isoflavone consumption and risk of breast cancer: a dose-response meta-analysis of observational studies. *Asia Pacific journal of clinical nutrition*, 22(1).

Y

Yada, S., Lapsley, K., & Huang, G. (2011). A review of composition studies of cultivated almonds: Macronutrients and micronutrients. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24(4), 469-480.

Yang, Y. & Hodges, C. (2005). Separation Science Redefined, (special issue of LC-GC N. Am.), May.

Yang, Y., Gao, M., Wu, Z., & Guo, Y. (2010). Genistein attenuates low temperature induced pulmonary hypertension in broiler chicks by modulating endothelial function. *European journal of pharmacology*, 649(1), 242-248.

Yokosuka, T. (1986). Soy sauce biochemistry. *Advances in Food Research*, 30, 195-329.

Yoshiki, Y., Kudou, S. & Okubo, K. (1998). Relationship between chemical structures and biological activities of triterpenoid saponins from soybean. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 62, 2291-2299.

Yuan, S. & Chang, K.C. (2007). Selected odor compounds in soymilk as affected by chemical composition and lipoxygenases in five soybean materials. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 426-431.

Yuan, S., Chang, S. K., Liu, Z., & Xu, B. (2008). Elimination of trypsin inhibitor activity and beany flavor in soy milk by consecutive blanching and ultrahigh-temperature (UHT) processing. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(17), 7957-7963.

Z

- Zamora, A., Ferragut, V., Jaramillo, P.D., Guamis, B. & Trujillo, A.J. (2007). Effects of ultra-high pressure homogenization on the cheese-making properties of milk. *Journal of Dairy Science*, 90, 13-23.
- Zarkadas, C. G., Yu, Z., Voldeng, H. D., & Minero-Amador, A. (1993). Assessment of the protein quality of a new high-protein soybean cultivar by amino acids analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41, 616-623.
- Zeng, X., Feng, Y., Yang, L., Huang, Y., Zhou, D., Sun, J., ... & Deng, Y. (2008). Single-and multiple-dose pharmacokinetics of genistein capsules in healthy chinese subjects: A phase I, randomized, open-label study. *Current Therapeutic Research*, 69(4), 318-333.
- Zhang, H., Takenaka, M., & Isobe, S. (2004). DSC and electrophoretic studies on soymilk protein denaturation. *Journal of thermal analysis and calorimetry*, 75(3), 719-726.
- Zhang, Y., & Chen, H. (2011). Genistein, an epigenome modifier during cancer prevention. *Epigenetics*, 6(7), 888-891.
- Zhang, H., Zheng, F., Zhao, J., Guo, D., & Chen, X. (2013). Genistein Inhibits ox-LDL-induced VCAM-1, ICAM-1 and MCP-1 Expression of HUVECs Through Heme Oxygenase-1. *Archives in Medicine Research*, 44, 13-20.
- Zimmer, R., Puech, A.J., Philipp, F., & Korn, A. (1990). Interaction between orally administered tyramine and moclobemide. *Acta Psychiatrica Scandinavica*, 360, 78-80.
- Zou, T., Liu, L., Rao, J., Marasa, B.S., Chen, J., Xiao, L., Zhou, H., Gorospe, M., & Wang, J.-Y. (2008). Polyamines modulate the subcellular localization of RNA-binding protein HuR through AMP-activated protein kinase-regulated phosphorylation and acetylation of importing α 1. *Biochemical Journal*, 409, 389-398.
- Zubik, L., & Meydani, M. (2003). Bioavailability of soybean isoflavones from aglycone and glucoside forms in American women. *The American journal of clinical nutrition*, 77(6), 1459-1465.

ÍNDICE DE PUBLICACIONES

Artículo I	117
N. Toro-Funes , I. Odriozola-Serrano, J. Bosch-Fuste, M.L. Latorre-Moratalla, M.T. Veciana-Nogues, M. Izquierdo-Pulido, M.C. Vidal-Carou. (2012). Fast simultaneous determination of free and conjugated isoflavones in soy milk by UHPLC–UV. <i>Journal of Food Chemistry</i> , 135, 2832-2838. (Índice de impacto (JCR 2012): 3.334; Posición en área “Food and Science Technology”: 10/124)	
Artículo II	143
N. Toro-Funes , M.T. Veciana-Nogues, M.C. Vidal-Carou. Nutritional and Biofunctional composition of soymilk and almond milk available from the Spanish market. En preparación para <i>Journal of food composition and analysis</i> .	
Artículo III	163
N. Toro-Funes , J. Bosch-Fusté, M.T. Veciana-Nogues, M.C. Vidal-Carou (2014). Effect of ultra high pressure homogenization treatment on the bioactive compounds of soya milk. <i>Food Chemistry</i> , 152, 597-602. (Índice de impacto (JCR 2012): 3.334; Posición en área “Food and Science Technology”: 10/124).	
Artículo IV	171
N. Toro-Funes , J. Bosch-Fusté, M.T. Veciana-Nogues, M.C. Vidal-Carou (2014). Effect of ultra high pressure homogenization treatment on the phytosterols and some antioxidant compounds of almond milk. En preparación para <i>Journal of Agricultural and Food Chemistry</i> .	
Artículo V	173
N. Toro-Funes , J. Bosch-Fusté, M.T. Veciana-Nogues, M.C. Vidal-Carou (2014). Comparison of the effects oh ultra high pressure homogenization and heat treatments on the bioactive compounds of soymilk and almond milk. En preparación.	
Artículo VI	191
N. Toro-Funes , J. Bosch-Fusté, M.T. Veciana-Nogues, M.C. Vidal-Carou (2014). Changes of isoflavones and protein quality in soymilk pasteurized by ultra high pressure homogenization throughout storage. <i>Food Chemistry</i> , In Press. (Índice de impacto (JCR 2012): 3.334; Posición en área “Food and Science Technology”: 10/124).	

Artículo VII	221
N. Toro-Funes , J. Bosch-Fusté, M.T. Veciana-Nogues, M.C. Vidal-Carou (2014). Isoflavone profile and protein quality in sterilized soymilk treated by Ultra High Pressure Homogenization during storage. Food Chemistry, Under Revision. (Índice de impacto (JCR 2012): 3.334; Posición en área “Food and Science Technology”: 10/124).	
Artículo VIII	261
N. Toro-Funes , J. Bosch-Fusté, M. L. Latorre-Moratalla, M.T. Veciana-Nogues, M.C. Vidal-Carou. Biologically active amines in soybean products from the Spanish market. Food Chemistry, Under revision. (Índice de impacto (JCR 2012): 3.334; Posición en área “Food and Science Technology”: 10/124).	
Artículo IX	301
N. Toro-Funes , M. L. Latorre-Moratalla, J. Bosch-Fusté, M.T. Veciana-Nogues, M.C. Vidal-Carou. Isoflavones in commercial soybean-based products. Approaches to the intake assessment in adults and to the risk assessment in infants. En preparación.	
Artículo X	319
N. Toro-Funes , J. Bosch-Fusté, M.T. Veciana-Nogues, M. Izquierdo-Pulido, M.C. Vidal-Carou. In vitro antioxidant activity of dietary polyamines. Food Research International, 51, 141-147. (Índice de impacto (JCR 2012): 3.003; Posición en área “Food and Science Technology”: 13/124)	
Artículo XI	345
N. Toro-Funes , M.T. Veciana-Nogués, M.C. Vidal-Carou, J.P.E. Spencer, A. Rodríguez-Mateos’ The intracellular metabolism of isoflavones in endothelial cells. Journal of Agricultural and Food Chemistry, En revision. (Índice de impacto (JCR 2012): 2.906; Posición en área “Food and Science Technology”: 15/124).	
Artículo XII	379
A. Rodríguez-Mateos, N. Toro-Funes , T. Cifuentes-Gomez, M. Cortese-Krott, H. Schroeter, C. Heiss, J. P. E. Spencer (2014). Uptake and metabolism of (-)-epicatechin in endothelial cells. Archives of Biochemistry and Biophysics, In Press. DOI: 10.1016/j.abb.2014.03.014 (Índice de impacto (JCR 2012): 3.370; Posición en área “Biochemistry & Molecular Biology”: 103/290).	

ÍNDICE DE COMUNICACIONES ESCRITAS Y ORALES

Comunicación escrita I	249
N. Toro-Funes , J. Bosch-Fusté, M. L. Latorre-Moratalla, M.T. Veciana-Nogues, M.C. Vidal-Carou. Efecto de la Ultra Alta Presión de Homogeneización sobre la estabilidad de las isoflavonas en la bebida de soja durante el almacenamiento en refrigeración. "VII Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (CyTA)". Córdoba (España). 12-14 Junio del 2013.	
Comunicación escrita II	303
N. Toro-Funes , M.T. Veciana-Nogues, J. Bosch-Fusté, O. Comas-Basté, M.C. Vidal-Carou (2014). Estimación del riesgo asociado al consumo de fórmulas infantiles a base de soja por lactantes de 0 a 6 meses. "XIV Congreso de la Sociedad Española de Nutrición (SEN)". Zaragoza, (España). 27-29 Septiembre del 2012.	
Comunicación escrita III	331
M.T. Veciana-Nogues, M. Teruelo de Luis, N. Toro-Funes , M.C. Vidal-Carou. Posible mecanismo de acción de las poliaminas como antioxidantes. "V Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (CyTA)". Murcia (España). 26-29 Mayo del 2009.	
Comunicación escrita IV	389
N. Toro-Funes , A. Rodríguez-Mateos, J. P. E. Spencer, M. T. Veciana-Nogués, M. C. Vidal-Carou. Intracellular metabolism of isoflavones in endothelial cells. "IUNS 20 th International Congress of Nutrition". Granada (España). 15-20 Septiembre del 2013.	
Comunicación Oral	289
N. Toro-Funes , J. Bosch-Fusté, M. L. Latorre-Moratalla, M.T. Veciana-Nogues, M.C. Vidal-Carou (2014). Aminas biógenas en productos derivados de soja de mercado español . "V Congreso Internacional de Autocontrol y Seguridad Alimentaria (KAUSAL)". Barcelona (España). 17-19 Octubre del 2012.	
http://www.kausal.cat/docs_CO/natalia_toro.pdf	
