

Capacidad antioxidante in vitro de las isoflavonas totales obtenidas de semillas de *Glycine max* L. (Soya) provenientes de la provincia de Jaén-Cajamarca.

Antioxidant capacity in vitro total isoflavones obtained from seeds of Glycine max L. (Soya) from the province of Jaén, Cajamarca .

RUIZ REYES, Segundo¹; VENEGAS CASANOVA, Edmundo²; DÍAZ SOLANO, Hugo³; RODRÍGUEZ QUITO, Ivan.⁴

RESUMEN

En el presente trabajo de investigación cuantificamos las isoflavonas totales obtenidas de semillas de *Glycine max* L. (Soya) provenientes de la provincia de Jaén-Cajamarca, mediante el método descrito por Kostennikova Z.; y determinamos la capacidad antioxidante in vitro de las isoflavonas totales expresada como eficiencia antiradicalaria (E.A.); mediante el método descrito por Brand-Williams, et al; adaptados por la Cátedra de Farmacognosia y Farmacobotánica de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la U.N.T. Por cada concentración y por cada tiempo se determinó los porcentajes de captura del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH*); los que fueron utilizados para determinar gráficamente la concentración necesaria del antioxidante para reducir en un 50% la concentración inicial del DPPH* "IC50" (mediante correlación lineal) y el tiempo necesario para alcanzar la concentración IC50 "TIC50" (mediante cinética de reacción orden uno). Siendo el resultado de la eficiencia antiradicalaria (E.A.) de las isoflavonas totales igual a 0,00250 mL x ug⁻¹ x min⁻¹.

Palabras clave: *Glycine max* L., isoflavonas, genisteína, capacidad antioxidante, DPPH*, "eficiencia antiradicalaria".

ABSTRACT

The amount of total isoflavones from seed of *Glycine max* L. (Soy) from the province of Jaén-Cajamarca, was determined using the method of Kostennikova Z., and in vitro antioxidant capacity of total isoflavones expressed as "antiradical efficiency" (A.E.) was determined using the method of Brand-Williams, et al; both methods adapted by the Department of Pharmacognosy and pharmacobotany of the Faculty of Pharmacy and Biochemistry of the UNT. The "antiradical efficiency" (A.E.) was calculated as the inverse of the product of the concentration of antioxidant needed to reduce by 50% the initial concentration of DPPH* "IC50"(obtained by linear correlation) and the time needed to achieve concentration IC50 "TIC50" (obtained by first order reaction kinetics) for total isoflavones that value was equal to 0.00250 x ng mL⁻¹ x min⁻¹. Both the IC50 as the TIC50 were determined graphically, both using the rates of capture of free radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH *).

Key words: *Glycine max* L., isoflavones, genistein, antioxidant capacity, DPPH*, "antiradical efficiency".

¹Dr. Químico farmacéutico. guille_ruiz2001@hotmail.com

²Mg. Químico farmacéutico. edmund0373@hotmail.com

³Químico farmacéutico. hugords@hotmail.com

⁴Químico farmacéutico. rodri_18jr@hotmail.com

INTRODUCCIÓN

Desde la antigüedad las plantas han sido un recurso al alcance del ser humano para su alimentación y curación de enfermedades; estas últimas llamadas plantas medicinales. La Organización Mundial de la Salud definió en China, en 1980, "planta medicinal" como todo vegetal que contiene en uno o más de sus órganos, sustancias que pueden ser utilizadas con fines terapéuticos, preventivos o que son precursores de hemisíntesis farmacéutica¹.

Glycine max L. (Soya) es una planta herbácea anual, perteneciente a la familia de las Papilionáceas (Fabáceas), caracterizada por presentar tallos rastreros o erectos de hasta 150 cm de altura, provista de pequeños pelos rojizos; hojas ovales, compuestas, tripinadas y pilosas; flores papilionáceas, blanco-amarillentas o azul-violáceas, de pequeño tamaño, agrupadas en inflorescencias axilares. El fruto es una vaina arqueada vellosa con 2-6 semillas subglobosas lisas en su interior, de color variable entre blanco-amarillento y pardo^{2,3}.

Glycine max L. (Soya) es originaria del oriente asiático. De allí se extendió a la mayor parte de los países de Asia, a algunos países de Europa y, posteriormente, al continente americano. Crece y desarrolla en clima sub-tropical y tropical, como los que se tienen en la costa central y norte, y en la selva alta y llano amazónico. La elección de la mejor época de siembra es de gran importancia para la obtención de altos rendimientos en la producción de soya. En las condiciones de Jaén las mayores extensiones se siembran entre julio y octubre^{4,5,6}.

Las isoflavonas son los principales compuestos fenólicos de la semilla de soya, se presentan en pequeñas cantidades en la planta (0,2% - 0,7% de materia seca de la semilla). El contenido de isoflavonas en la soya varía dependiendo de la variedad, condiciones de cultivo y crecimiento, año de cosecha así como también de la forma que hayan sido procesadas⁷.

Las isoflavonas son moléculas pertenecientes al grupo de flavonoides, y son los principales representantes de los fitoestrógenos. Los fitoestrógenos son compuestos no esteroideos que poseen una débil actividad estrogénica, poseen una estructura difenólica heterocíclica, a la que se encuentran unidos grupos oxo, ceto, hidroxilo y ésteres de metilo, y tienen una relación estructural con la estructura -estradiol; se agrupan en cuatro familias farmacológicas: lignanos, cumestanos, lactonas del ácido resocílico e isoflavonas^{8,9}.

Las isoflavonas comparten características generales con los demás flavonoides, tales como: su carácter fenólico e intensa absorción en la región ultravioleta-visible del espectro debido a la presencia de sistemas aromáticos y conjugados; también pueden unirse a los polímeros biológicos, tales como enzimas, transportadores de hormonas, y ácido desoxirribonucleico (ADN);

quelar iones metálicos transitorios, tales como hierro (Fe²⁺), cobre (Cu²⁺), zinc (Zn²⁺), catalizar el transporte de electrones y depurar radicales libres^{10,11,12}.

Los antioxidantes tienen al menos tres importantes papeles en la fisiología animal: captan radicales libres que se producen durante el metabolismo celular normal o por acción de sustancias nocivas (como la radiación ultravioleta), y cuya unión a las membranas celulares produciría su destrucción; impiden el desarrollo de mutaciones, protegiendo las cadenas de ADN, a través de un complejo mecanismo que parece implicar átomos de cobre; protegen a la molécula de colesterol de baja densidad (LDL) de la oxidación, que es el paso previo a su fagocitosis por los macrófagos, con la consiguiente formación de las células espumosas e inicio de la formación de la placa de ateroma en el endotelio arterial^{8,13}.

Los criterios químicos para establecer la capacidad antioxidante de los flavonoides, son: presencia de estructura O-dihidroxi en el anillo B; que confiere una mayor estabilidad a la forma radical y participa en la deslocalización de electrones; doble ligadura, entre los carbonos 2 y 3 en conjugación con el grupo carbonilo de la posición 4 del anillo C; grupo 3-OH en el anillo C y grupo 5-OH en el anillo A; necesarios para ejercer el máximo potencial antioxidante^{8,13,14}.

Un antioxidante es cualquier sustancia que, cuando está presente en concentraciones más bajas con respecto a las de un sustrato oxidable, retrasa significativamente o inhibe la oxidación de éste sustrato. El ser humano produce de manera constante radicales libres como resultado del metabolismo de diversas sustancias. Así mismo, el medio circundante proporciona condiciones que favorecen la exposición a radicales libres formados fuera del organismo, como radiación electromagnética y una amplia variedad de agentes químicos (humo, plaguicidas, conservadores, colorantes, etc.)¹⁵. Además de los flavonoides existen otros compuestos fenólicos que tienen capacidad antioxidante; tales como los taninos, los cuales son sustancias vegetales naturales con un peso molecular comprendido entre 500 y 3000 g/mol, que poseen una gran cantidad de hidroxilos fenólicos y que permiten la formación de complejos estables con proteínas y otros biopolímeros como celulosa y pectina. Pueden dividirse químicamente en dos grupos: taninos hidrolizables llamados también galotaninos o elagitaninos, formados por varias moléculas de ácido fenólico (ácido gálico, digálico, trigálico, ácido elágico) que se unen por un enlace éster a un núcleo central de glucosa; como por ejemplo el ácido tánico y taninos no hidrolizables o condensados, comúnmente llamados proantocianidinas, que son polímeros naturales más resistentes a la ruptura de su molécula que los taninos hidrolizables.

Las estructuras más comunes de este tipo de taninos son las catequinas y epicatequinas^{16,17}.

Un radical libre se define como cualquier átomo o molécula que cuenta con uno o más electrones desapareados, lo que incrementa su reactividad química, dado que busca completar su par electrónico^{15,18}.

Las isoflavonas de la soya, por ser compuestos polifenólicos y por pertenecer al grupo de los flavonoides, se les ha atribuido muchas propiedades farmacológicas, entre ellas las de actuar como captadoras de radicales libres; tal es así, que con su consumo, se pueden prevenir o reducir los daños ocasionados por el estrés oxidativo^{7,8}.

Por lo que es importante determinar la capacidad antioxidante in vitro de las isoflavonas totales obtenidas de semillas de *Glycine max* L. (Soya) provenientes de la provincia de Jaén-Cajamarca, razón por la cual nos planteamos el siguiente problema:

¿Cuál será la capacidad antioxidante in vitro de las isoflavonas totales obtenidas de semillas de *Glycine max* L. (Soya) provenientes de la provincia de Jaén-Cajamarca?

Siendo el Objetivo general: Determinar la capacidad antioxidante in vitro de las isoflavonas totales extraídas de semillas de *Glycine max* L. (Soya).

MATERIAL Y MÉTODOS

Método para extraer, purificar y cuantificar las isoflavonas totales presentes en semillas de *Glycine max* L. (Soya) provenientes de la provincia de Jaén-Cajamarca, mediante el método descrito por Kostennikova Z. adaptado por la Cátedra de Farmacognosia y Farmacobotánica de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la U.N.T.^{19,20,21}

Este método describe las siguientes etapas:

Recolección de la muestra

Las vainas que contienen las semillas de soya, fueron recolectadas manualmente, en el mes de setiembre del 2008, al haber culminado su ciclo vegetativo que es a los seis meses de su siembra. Luego se sometió a secado, mediante exposición al sol por un tiempo aproximado de dos semanas, y finalmente se extrajeron las semillas, para su posterior utilización^{4,6}.

Extracción y purificación de las isoflavonas totales:

• Desecado y triturado de la droga

Se pesó 500 gramos de semillas de *Glycine max* L. (Soya), desecándose en estufa eléctrica MEMMERT TY U40 a 40 °C, hasta obtener peso constante, luego fué triturado en mortero metálico.

• Desengrasado y despigmentado de la droga

20 gramos de la droga fué triturada y mezclada con cantidad suficiente de arena lavada y tratada, se armó el cartucho de extracción, luego fué introducido en la cámara extractora del equipo Soxhlet, procediendo a extraer la grasa y los pigmentos con éter de petróleo, durante un tiempo aproximado de 4 horas, hasta agotar la grasa y los pigmentos.

• Extracción e hidrólisis de glicósidos de isoflavonas

Después del desengrasado y despigmentado se procedió a la extracción e hidrólisis de los glicósidos de isoflavonas mediante el método de

Soxhlet con 100 mL de mezcla hidrometanólica al 50% v/v, y 100 mL de solución de ácido sulfúrico al 10% p/v, por un tiempo aproximado de 4 horas; obteniendo así el extracto hidrometanólico en medio ácido.

• Purificación de las isoflavonas

El extracto hidrometanólico en medio ácido fué llevado a baño maría (B.M.) a 50°C hasta disminuir a la mitad el volumen inicial de éste extracto, se enfrió y llevó a refrigeración aproximadamente a 15°C durante 1 hora.

Éste extracto refrigerado fué filtrado al vacío, sobre embudo büchner previamente acondicionado a una temperatura menor a 15°C, lavándose el residuo con 3 volúmenes sucesivos de 400 mL de agua bidestilada refrigerada aproximadamente a 15°C, obteniéndose así el papel filtro que contiene las isoflavonas totales.

El papel filtro fué llevado a estufa a 40°C durante 2 horas, luego fué solubilizado en 50 mL de metanol para análisis (p.a.) a 50°C; se trasvasó esta solución a una fiola de 100 mL, repitiendo esta última operación adicionando dos volúmenes sucesivos de 25 mL de metanol p.a.; las dos soluciones resultantes fueron trasvasadas a la fiola de 100 mL para luego aforar. Ésta última solución fué enfriada a temperatura ambiente y filtrada al vacío; a este filtrado se adicionó 100 mL de agua bidestilada; para luego repetir los pasos desde "a" hasta "c".

El último aforo obtenido en el paso "c", representó la primera muestra problema.

Se realizaron otras dos extracciones y purificaciones de isoflavonas totales obtenidas de semillas de *Glycine max* L. (Soya), con las cuales se obtuvo un total de tres muestras problema.

Cuantificación de las isoflavonas totales^{20,21}**Preparación de la Solución Problema:**

De la primera muestra problema se midió un volumen de 2,5 mL y fué aforado a 100 mL con metanol p.a.; de éste aforo se midió tres alícuotas de 3 mL aproximadamente, obteniéndose de cada alícuota 3 lecturas de absorbancias a 310 nm en el espectrofotómetro UV-Visible Hewlett Packard (8452A – Diode Array Spectrofotometer).

Con las otras dos muestras problema, también se realizó el procedimiento anterior.

Preparación de la Solución Blanco:

Se preparó una solución hidrometanólica al 50% v/v como solución blanco, midiendo una alícuota de 3 mL aproximadamente para la respectiva calibración del espectrofotómetro UV-Visible Hewlett Packard (8452A–Diode Array Spectrofotometer).

Preparación de la Solución Patrón:

0,005 g de genisteína grado HPLC al 97% de pureza, fué disuelto con cantidad suficiente para 5 mL (c.s.p. 5 mL) de metanol p.a.; de esta solución se midió un volumen de 0,2 mL, aforándose a 25 mL con solución hidrometanólica al 50%.

De éste último aforo se midió 9 alícuotas de 3 mL aproximadamente, obteniéndose de cada alícuota tres lecturas de absorbancias a 310 nm en el espectrofotómetro UV-Visible Hewlett Packard (8452A–Diode Array Spectrofotometer).

Cálculo de la concentración de isoflavonas totales^{20,21}

La concentración de isoflavonas totales expresadas en genisteína, fué calculada empleando la fórmula descrita por Kostennikova Z.

Método para determinar la capacidad antioxidante in vitro del extracto metanólico de isoflavonas totales, mediante el método desarrollado por Brand Williams et al, adaptado por la Cátedra de Farmacognosia y Farmacobotánica de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la U.N.T.^{22,23,24}**a. Fundamento del Método**^{22,23}

El fundamento del método descrito por Brand Williams et al, consiste en que el radical libre estable 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH*) tiene un electrón desapareado y es de color azul-violeta, decolorándose hacia amarillo pálido por reacción con una sustancia capturadora de radicales libres; la absorbancia es medida espectrofotométricamente a 517 nm. La diferencia de absorbancias, permite obtener el porcentaje de captación de radicales libres.

b.Capacidad antioxidante in vitro del extracto metanólico de isoflavonas totales²⁴**Determinación de los porcentajes de captura del radical DPPH***

Se preparó un set de 15 tubos problema, por triplicado; recubiertos con papel aluminio, a los cuales fué adicionado 1 mL de la solución de DPPH* 0,1 mM.

Enfrentando luego a cada uno de los volúmenes anteriores con diferentes volúmenes del extracto metanólico de isoflavonas totales, en las cantidades que se indican a continuación.

Nº de tubo	mL de DPPH* (0,1 mM)	mL de extracto metanólico de I. T.	mL de metanol (c.s.p.)
1	1,0	0,2	4 mL
2	1,0	0,4	4 mL
3	1,0	0,6	4 mL
4	1,0	0,8	4 mL
5	1,0	1,0	4 mL
6	1,0	1,2	4 mL
7	1,0	1,4	4 mL
8	1,0	1,6	4 mL
9	1,0	1,8	4 mL
10	1,0	2,0	4 mL
11	1,0	2,2	4 mL
12	1,0	2,4	4 mL
13	1,0	2,6	4 mL
14	1,0	2,8	4 mL
15	1,0	3,0	4 mL
Blanco	0	0	4 mL
Control	1,0	0	4 mL

-Cada tubo fué mezclado lentamente, dejándose reposar a temperatura ambiente, protegido de la luz, hasta cumplir los 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, y 45 minutos; en cada intervalo de tiempo se realizaron tres lecturas de absorbancia a 517 nm, en el espectrofotómetro UV-Visible Hewlett Packard(8452A-Diode Array Spectrophotometer).
-Para todos los tubos problema se preparó un

control (que consistió en 1 mL de solución de DPPH* 0,1 mM más 3 mL de metanol p.a.) y se leyó la absorbancia a 517 nm en el espectrofotómetro. Se utilizó metanol p.a. como blanco.

- El porcentaje de radicales DPPH* capturados, fué calculado aplicando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de captura de radicales DPPH}^* = \frac{\text{Abs. control} - \text{Abs. muestra}}{\text{Abs. control}} \times 100$$

Determinación de la concentración necesaria del antioxidante para reducir en un 50% la concentración inicial del DPPH*(IC₅₀)^{25,26,27}

- Para cada tiempo fué graficado porcentajes de captura de radicales DPPH* versus concentraciones del extracto metanólico de isoflavonas totales.
- Utilizando el intercepto y la pendiente de la línea de regresión lineal se calculó el valor IC₅₀, aplicando la siguiente fórmula:

$$IC_{50} = \frac{50 - b}{m}$$

Donde:

IC₅₀: Concentración necesaria del antioxidante para reducir en un 50% la concentración inicial del radical DPPH*.

b: Intercepto de la línea de regresión lineal.

m: Pendiente de la línea de regresión lineal.

Determinación del tiempo para alcanzar la concentración IC₅₀ (TIC₅₀)^{25,26,28}

- Para cada concentración del extracto metanólico de isoflavonas totales fue graficado tiempos de medida de porcentajes de captura de DPPH* versus $\ln [(\%C - \%C^{00}) / (\%C^t - \%C^{00})]$; siendo, %C: % de captura del DPPH* a tiempo 0, %C t: % de captura del DPPH* a determinado tiempo (t), %C⁰⁰: % de captura del DPPH* a tiempo infinito (t⁰⁰).
- Utilizando la pendiente de la línea de regresión lineal se calculó el valor TIC₅₀, aplicando la siguiente fórmula:

$$TIC_{50} = \frac{\ln(2)}{m}$$

Donde:

IC₅₀: Tiempo necesario para alcanzar la concentración IC₅₀.

ln: Logaritmo natural.

m: Pendiente de la línea de regresión lineal.

Determinación de la "eficiencia antiradicalaria" (E.A.)^{25, 26, 29}

Se calculó el promedio de los IC₅₀ de todos los tiempos y el promedio de los T IC₅₀ de todas las concentraciones.

La "eficiencia antiradicalaria" (E.A.) fué determinada utilizando la siguiente fórmula:

$$E.A = \frac{1}{IC_{50} \times T IC_{50}}$$

Donde:

IC₅₀ = Concentración necesaria del antioxidante para reducir en un 50% la concentración inicial del radical DPPH*

T_{IC₅₀} =Tiempo necesario para alcanzar la concentración IC₅₀.

C. Capacidad antioxidante in vitro de la solución de ácido gálico 0,1mM^{24, 25, 26}

Se preparó una solución de ácido gálico 0,1 mM conservándose refrigerado, en envase de vidrio, recubierto con papel de aluminio.

Luego fué repetido todos los pasos descritos en la determinación de la capacidad antioxidante in vitro del extracto metanólico de isoflavonas totales, de acuerdo a lo que se indica a continuación:

Nº de Tubo	mL de DPPH* (0,1 mM)	mL de sol. de ácido gálico (0,1 mM)	mL de metanol (c.s.p.)
1	1,0	0,2	4 mL
2	1,0	0,4	4 mL
3	1,0	0,6	4 mL
4	1,0	0,8	4 mL
5	1,0	1,0	4 mL
6	1,0	1,2	4 mL
7	1,0	1,4	4 mL
8	1,0	1,6	4 mL
9	1,0	1,8	4 mL
10	1,0	2,0	4 mL
11	1,0	2,2	4 mL
12	1,0	2,4	4 mL
13	1,0	2,6	4 mL
14	1,0	2,8	4 mL
15	1,0	3,0	4 mL
Blanco	0	0	4 mL
Control	1,0	0	4 mL

D. Capacidad antioxidante in vitro de la solución de ácido tánico 0,1mM^{24, 25, 26}

Se preparó una solución de ácido tánico 0,1 mM conservándose refrigerado, en envase de vidrio, recubierto con papel de aluminio.

Luego fué repetido todos los pasos descritos en la determinación de la capacidad antioxidante in vitro del extracto metanólico de isoflavonas totales, de acuerdo a lo que se indica a continuación:

Nº de Tubo	mL de DPPH* (0,1 mM)	mL de sol. de ácido tánico (0,1 mM)	mL de metanol (c.s.p.)
1	1,0	0,2	4 mL
2	1,0	0,4	4 mL
3	1,0	0,6	4 mL
4	1,0	0,8	4 mL
5	1,0	1,0	4 mL
6	1,0	1,2	4 mL
7	1,0	1,4	4 mL
8	1,0	1,6	4 mL
9	1,0	1,8	4 mL
10	1,0	2,0	4 mL
11	1,0	2,2	4 mL
12	1,0	2,4	4 mL
13	1,0	2,6	4 mL
14	1,0	2,8	4 mL
15	1,0	3,0	4 mL
Blanco	0	0	4 mL
Control	1,0	0	4 mL

E. Análisis estadístico de datos^{30,31,32,33}

Los datos obtenidos fueron caracterizados mediante parámetros estadísticos descriptivos como la media aritmética (\bar{x}), la desviación estándar (δ) y el coeficiente de variación (C.V.); siendo este último el criterio de aceptación estadístico de los promedios obtenidos.

Los valores de eficiencia antiradicalaria de los tres set de cada antioxidante fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA) de un factor, utilizando un nivel de significancia del 95% ($P < 0,05$). Éste análisis de varianza fue obtenido utilizando el programa estadístico SPSS 17.0 en español.

RESULTADOS

Cuadro 1: Concentración de isoflavonas totales expresados en %, presente en semillas de *Glycine max L. (Soya)* provenientes de la provincia de Jaén-Cajamarca.

Nº de muestras problemas	Absorbancias promedios (nm)	* Porcentaje de isoflavonas totales
M1	0,28237	0,52722%
M2	0,28240	0,52727%
M3	0,28239	0,52725%
Promedio	0,28239	0,52725%
D. S.	0,00002	0,00003
** C.V. (%)	0,00541	0,00477

Donde:

D. S.: Desviación estándar.

C.V. (%): Coeficiente de variación.³

*Criterio de aceptación: 0,2% - 0,7%⁷

** Criterio de aceptación: C.V. menor o igual a 30%^{30,31,32,33}

Cuadro 2: Capacidad antioxidante expresado como "eficiencia antiradicalaria" (E.A.) de las isoflavonas totales, ácido gálico y ácido tánico.

Antioxidante	E.A. (mL x ug ⁻¹ x min ⁻¹)
Isoflavonas totales	0,00250
Ácido gálico	0,00414
Ácido tánico	0,00031
Promedio	0,00232
Desv. estándar	0,00192
** C.V. (%)	*** 82,94549

Donde:

E.A.: Eficiencia antiradicalaria.

C.V. (%): Coeficiente de variación.

** Criterio de aceptación: C.V. menor o igual a 30%^{30, 31, 32, 33}

*** Valor que indica que existe una gran dispersabilidad entre las E.A. de cada antioxidante.

DISCUSIÓN

En el presente trabajo de investigación, se logró determinar la capacidad antioxidante in vitro de las isoflavonas totales presentes en semillas de *Glycine max L.* (Soya) provenientes de la provincia de Jaén-Cajamarca, expresada como eficiencia antiradicalaria; con el propósito de poder darle una aplicabilidad y contribuir con la sociedad.

El cuadro 1 muestra la concentración de isoflavonas totales, cuyo valor fué 0,52725%, el cual se encuentra dentro del criterio de aceptación dado por la Asociación Argentina de Dietistas y Nutricionista Dietistas; la que da un rango de 0,2% - 0,7% de isoflavonas totales presentes en la materia seca de semilla de *Glycine max L.* (Soya)⁷.

Existen tres maneras de expresar la capacidad antioxidante in vitro de una sustancia, tales como el porcentaje de captura del DPPH*, la concentración necesaria para reducir al 50% la concentración inicial del DPPH*(IC₅₀), y la "eficiencia antiradicalaria" (E.A.).

Se determinó la cinética de reacción del DPPH*, basado en la elección del máximo valor de los coeficientes de correlación lineal (R²) de las líneas de tendencia de los gráficos diseñados para cada orden de cinética de reacción, encontrándose que la cinética de reacción del DPPH* se adecua mejor

para una cinética de orden 1²⁸. Los valores de IC₅₀ fueron obtenidos mediante correlación lineal, mientras que los valores de TIC₅₀ fueron obtenidos mediante una cinética de reacción de orden uno^{27,28}. La capacidad antioxidante in vitro fue expresada como "eficiencia antiradicalaria" (E.A.) de las isoflavonas totales, el ácido gálico y el ácido tánico, para lo cual se consideró el promedio de los valores IC₅₀ y TIC₅₀ de todas las concentraciones y de todos los tiempos respectivamente, de los tres set diseñados, para cada antioxidante.

El cuadro 2 muestra el coeficiente de variación de las "eficiencias antiradicalarias" (E.A.) de los tres antioxidantes, cuyo valor fué 82,94549%; existiendo una gran dispersabilidad entre estos valores; lo que demuestra que los tres antioxidantes presentan capacidades antioxidantes diferentes.

Bafna A, et al; determinaron la capacidad antioxidante frente al DPPH*, del extracto de metanol de los rizomas de *Curculigo orchoides* Gaertn, encontrando un IC₅₀ de 105,99 ug x mL⁻¹ para dicho extracto, y un IC₅₀ de 52,71 ug x mL⁻¹ para el patrón curcumina; cuyos valores son mayores al IC₅₀ de las isoflavonas totales, que fué de 37,50 ug x mL⁻¹ 34.

En el presente trabajo de investigación, se logró determinar la capacidad antioxidante in vitro de las

isoflavonas totales presentes en semillas de *Glycine max* L. (Soya) provenientes de la provincia de Jaén-Cajamarca, expresada como eficiencia antiradicalaria; con el propósito de poder darle una aplicabilidad y contribuir con la sociedad.

El cuadro 1 muestra la concentración de isoflavonas totales, cuyo valor fué 0,52725%, el cual se encuentra dentro del criterio de aceptación dado por la Asociación Argentina de Dietistas y Nutricionista Dietistas; la que da un rango de 0,2% - 0,7% de isoflavonas totales presentes en la materia seca de semilla de *Glycine max* L. (Soya)⁷. Existen tres maneras de expresar la capacidad antioxidante in vitro de una sustancia, tales como el porcentaje de captura del DPPH*, la concentración necesaria para reducir al 50% la concentración inicial del DPPH*(IC₅₀), y la "eficiencia antiradicalaria" (E.A.).

Se determinó la cinética de reacción del DPPH*, basado en la elección del máximo valor de los coeficientes de correlación lineal (R²) de las líneas de tendencia de los gráficos diseñados para cada orden de cinética de reacción, encontrándose que la cinética de reacción del DPPH* se adecua mejor para una cinética de orden 1²⁸. Los valores de IC₅₀ fueron obtenidos mediante correlación lineal, mientras que los valores de TIC₅₀ fueron obtenidos mediante una cinética de reacción de orden uno^{27,28}.

La capacidad antioxidante in vitro fue expresada como "eficiencia antiradicalaria" (E.A.) de las isoflavonas totales, el ácido gálico y el ácido tánico, para lo cual se consideró el promedio de los valores IC50 y TIC50 de todas las concentraciones y de todos los tiempos respectivamente, de los tres set diseñados, para cada antioxidante.

El cuadro 2 muestra el coeficiente de variación de las "eficiencias antiradicalarias" (E.A.) de los tres antioxidantes, cuyo valor fué 82,94549%; existiendo una gran dispersabilidad entre estos valores; lo que demuestra que los tres antioxidantes presentan capacidades antioxidantes diferentes.

Bafna A, et al; determinaron la capacidad antioxidante frente al DPPH*, del extracto de metanol de los rizomas de *Curculigo orchioides* Gaertn, encontrando un IC50 de 105,99 ug x mL-1 para dicho extracto, y un IC50 de 52,71 ug x mL-1 para el patrón curcumina; cuyos valores son mayores al IC50 de las isoflavonas totales, que fué de 37,50 ug x mL-1 34.

Kalola J, et al; determinaron la capacidad

antioxidante frente al DPPH*, del extracto metanólico de raíz de *Inula cappa*, encontrando un IC50 de 116,64 ug x mL-1 para dicho extracto, y un IC50 de 4,85 ug x mL-1 para el patrón pirogalol; siendo el IC50 de dicho extracto mayor que el IC50 de las isoflavonas totales, y el IC50 del patrón pirogalol menor que el IC50 de las isoflavonas totales, que fué de 37,50 ug x mL-1 35.

El coeficiente de variación es una medida de dispersión de los datos obtenidos, por lo que se utilizó como criterio de aceptación estadístico de los promedios, utilizados en la cuantificación de las isoflavonas totales y en la determinación de su capacidad antioxidante 30, 31, 32, 33.

El valor P encontrado mediante análisis de varianza (ANOVA) de un factor, con un nivel de significancia del 95% (P<0,05), de las "eficiencias antiradicalarias" de los tres set de cada antioxidante, fué menor a 0,05; lo que indica que existe una desigualdad entre estas medias poblacionales 36.

Un valor P mayor a 0,05 indica que existe una igualdad entre las medias poblacionales; y un valor P menor a 0,05 indica que existe una desigualdad entre las medias poblacionales. Para determinar nuestro análisis de varianza se utilizó el programa estadístico SPSS 15.0 en español³⁶.

La "eficiencia antiradicalaria" de las isoflavonas totales, cuyo valor fué 0,00250 mL x ug⁻¹ x min⁻¹, se obtuvo promediando las eficiencias antiradicalarias de los tres set diseñados en la determinación de las capacidades antioxidantes de las tres muestras problema.

Las "eficiencias antiradicalarias" del ácido gálico y del ácido tánico, cuyos valores fueron 0,00414 mL x ug⁻¹ x min⁻¹ y 0,00031 mL x ug⁻¹ x min⁻¹ respectivamente; los cuales fueron obtenidos promediando las "eficiencias antiradicalarias" de los tres set diseñados en la determinación de sus capacidades antioxidantes.

Ordenando de mayor a menor las "eficiencias antiradicalarias" de los tres antioxidantes, encontramos el siguiente orden: ácido gálico > isoflavonas totales > ácido tánico.

La capacidad antioxidante de los compuestos polifenólicos, entre ellos los flavonoides y los ácidos polifenólicos, está determinada por la estructura química, el número y la localización de los grupos hidroxilo dadores de electrones; lo que tendría una posible implicancia en nuestros resultados obtenidos^{37,38}.

CONCLUSIÓN

Después de la realización del presente trabajo de investigación, se concluye que:

- La "eficiencia antiradicalaria" (E.A.) de las isoflavonas totales extraídas de semillas de *Glycine max* L. (Soya) provenientes de la provincia de Jaén-Cajamarca, fué igual a 0,00250 mL x ug⁻¹ x min⁻¹; siendo este valor mayor que la eficiencia antiradicalaria del ácido tánico, y menor que la "eficiencia antiradicalaria" del ácido gálico.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Villar del Fresno, A.(1999). Farmacognosia General. España.
2. Alonso, J.(2004). Tratado de Fitofármacos y Nutracéuticos. Argentina.
3. Mostacero J, Mejía F, Gamarra O.(2002) Taxonomía de las Fanerógamas Útiles del Perú. Vol. I. 1º ed. Perú..
4. Bullon O.(1985). Producción y Protección de cultivos. Perú
5. Sánchez A.(1988).Cultivos Oleaginosos. México
6. Solari M.(2004). Las Isoflavonas. Su relación con la enfermedad renal y otras patologías crónicas concomitantes. Argentina
7. Haya J, Camil C, Pérez T.(2002). Fitoestrógenos: Conocimientos Básicos y Utilidad Clínica.España
8. Hernández J, Mariscal M, Rivas A, Feriche B, Velasco J, Olea F.(2009) Estimación de la ingesta de fitoestrógenos en población femenina. España.
9. Guillermo R.(2002).Comprobación del Efecto Cicatrizante de Peperomia scutellaefolia.Perú
10. Lock de Ugaz O(194). Investigación Fitoquímica. Métodos en el Estudio de Productos Naturales. 2º ed. Perú
11. Martínez S, González J, Culebras J, Tuñón M.(2009) Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. España
12. Escamilla C, Cuevas E, Guevara J(2009). Flavonoides y sus acciones antioxidantes. México:
13. Díaz J, Juárez M.(2007). Bioquímica. Un Enfoque Básico Aplicado a las Ciencias de la Vida. India
14. Gómez B, Corominas T.(2003) Nuevos métodos de análisis en flujo (F.I.A. y multiconmutación) aplicados a la determinación por quimioluminiscenci directa de fenoles y polifenoles. España
15. Avendaño C.(2001). Introducción a la Química Farmacéutica.España
16. Ruiz S.(2008). Determinación de la técnica de extracción de flavonoides totales de las hojas de Mangífera.Perú
17. Gutiérrez Y, Miranda M, Varona N, Tania A.(2000). Validación de 2 métodos espectrofotométricos para la cuantificación de taninos y flavonoides (quercetina) en Psidium guajaba L. Cuba
18. Díaz H, Rodríguez I.(2009).Extracción y cuantificación de isoflavonas totales expresados en genisteína en granos de Glycine max L. (Soya) provenientes de la provincia de Jaén-Cajamarca. Perú
19. Murillo E, Tique M, Ospina L, Lombo O.(2006). Evaluación Preliminar de la Actividad Hipoglicemiante en Ratones Diabéticos por Aloxano y Capacidad Antioxidante in vitro de Extractos de Bauhinia kalbreyeri Harms. Colombia
20. Rivero A, Betancort J.(2009). Evaluación de la Actividad Antioxidante de Polifenoles de Algas Marinas.España
21. Díaz H, Rodríguez I.(2009). Extracción y cuantificación de isoflavonas totales expresados en genisteína en granos de Glycine max L. (Soya) provenientes de la provincia de Jaén-Cajamarca.
22. Murillo E, Tique M, Ospina L, Lombo O.(2006) Evaluación Preliminar de la Actividad Hipoglicemiante en Ratones Diabéticos por Aloxano y Capacidad Antioxidante in vitro de Extractos de Bauhinia kalbreyeri Harms. Colombia.
23. Rivero A, Betancort J.(2006). Evaluación de la Actividad Antioxidante de Polifenoles de Algas Marinas. [Práctica de Laboratorio (Práctica VI.3)]. España.
24. Murillo E.(2002).Actividad Antioxidante de Bebidas de Frutas y de Té Comercializadas en Costa Rica. Panamá: Universidad de Panamá.
25. Padilla F, Rincón A, Bou-Rached L.(2008) Contenido de Polifenoles y Actividad Antioxidante de Varias Semillas y Nueces.
26. Guala M, Elder H, Pérez G, Chiesa A.(2009). Evaluación del Poder Antioxidante de Fracciones de Aceite Esencial Crudo de Schinus molle L. obtenidas por Destilación al Vacío. Argentina.
27. Bolaños B.(2003).Determinación de las propiedades antioxidantes de los jugos de fruta producidos industrialmente disponibles para su consumo en el área metropolitana de la Ciudad de Guatemala.
28. Chang R. Físicoquímica con aplicaciones a sistemas biológicos. México: Ed.Compañía editorial continental, S.A de C.V; 1992.Pp.431-435.
29. Rincón M, Vásquez M, Padilla C.(2005). Composición química y compuestos bioactivos de las harinas de cáscaras de naranja (Citrus sinensis), mandarina (Citrus reticulata) y toronja (Citrus paradisi) cultivadas en Venezuela. [Archivos Latinoamericanos de Nutrición]. Venezuela: Universidad Central de Venezuela.
30. Domenech J. Bioestadística. Métodos Estadísticos Para Investigadores. 1º ed. España: Ed. Herder S.A.; 1980. Pp. 315-320, 617.

Recibido: 13 enero 2012 | Aceptado: 10 mayo 2012



NEGOCIOS INTERNACIONALES

