

Actividad antioxidante de extractos de soja

María del Huerto Farías¹, Analía V. Medina^{1,2}, Lucrecia L. Chaillou¹, Mónica A. Nazareno^{1,2}

(1) Laboratorio de Antioxidantes y Procesos Oxidativos, Instituto de Ciencias Químicas, Facultad de Agronomía y Agroindustrias, Universidad Nacional de Santiago del Estero. farias.huerto@gmail.com, veromedina83@hotmail.com, llchaillou@yahoo.com, nazareno@unse.edu.ar

(2) CITSE - CONICET - UNSE

RESUMEN: Los porotos de soja (*Glycine max*), además de constituir una fuente de proteínas tanto para la dieta humana y animal, poseen numerosas clases de fitoquímicos con propiedades benéficas para la salud, entre las que se destacan las propiedades antioxidantes. En países donde la dieta de la población no incluye soja, los productos procesados surgen como una alternativa interesante. Por ejemplo, las harinas de soja pueden utilizarse en la elaboración de panes de alto contenido en fitoestrógenos; los productos elaborados en base a proteínas de soja se pueden agregar a productos cárneos, sopas, bebidas, y otros alimentos. El objetivo de este trabajo fue cuantificar la actividad antirradicalaria y antioxidante de los extractos de porotos y harina de soja, utilizando diferentes técnicas analíticas. Se prepararon extractos etanólicos y metanólicos, la extracción se hizo a 60 °C, utilizando ultrasonificación. Se ensayó la actividad antirradicalaria frente a los radicales libres DPPH[•] y ABTS^{•+} y la actividad antioxidante mediante la técnica de decoloración de β -caroteno. Todas las muestras analizadas presentaron actividad antirradicalaria y antioxidante, destacándose los extractos etanólicos. Esta actividad se correlaciona directamente con el contenido de polifenoles.

1 INTRODUCCIÓN

Durante las últimas décadas, los conocimientos sobre el impacto de la dieta en la salud se han incrementado notablemente. Los beneficios del consumo de porotos de soja y productos derivados están bien documentados, por ejemplo, existen evidencias de que puede prevenir ciertos tipo de cáncer (Alekel et al., 1998); reduce el riesgo de osteoporosis (Coward et al., 1993); posee un rol benéfico en enfermedades renales crónicas (Ranich et al., 2001); disminuye el riesgo de enfermedad coronaria (Lucas et al., 2001).

Numerosas clases de fitoquímicos han sido identificados en semillas de soja, incluyendo saponinas, ácidos fenólicos, ácido fítico, fitosteroles e isoflavonas (Phillips et al., 2002; Romani et al., 2003). De estos compuestos, las isoflavonas de semillas de soja son las más estudiadas, debido a que se les atribuyen gran parte de las propiedades benéficas del consumo de soja con la dieta (Rimbach et al., 2008; Steiner et al., 2007; Zhang et al., 2004) y a que su contenido es significativo, el cual varía en un rango de 0,4 a 9,5 mg/g. El mismo depende de numerosos factores, entre ellos, la genética, las

condiciones de crecimiento, los factores ambientales, el año de cosecha, etc. (Hoeck et al., 2000; Lee et al., 2003).

La capacidad de estos compuestos de actuar como antioxidantes se evidencia al prevenir y retrasar el daño oxidativo en células y tejidos vivos (Wei et al., 1995). Este daño se debe a que el consumo de oxígeno inherente al metabolismo celular, asimismo como fuentes exógenas generan radicales libres oxidativos y la interacción de estas especies con moléculas de lípidos produce nuevos radicales que pueden interactuar con moléculas esenciales para la vida como ácidos nucleicos y proteínas produciendo reacciones de oxidación que involucran alteraciones y modificaciones en su funcionalidad (Benavente - García et al., 1997). Por ello, en los últimos años, se ha registrado un considerable interés por el estudio de los mecanismos de oxidación, los radicales libres y la función que éstos cumplen en el organismo y en los alimentos (Jiménez-Escrig et al., 2000), además se ha incrementado la atención científica sobre los potenciales efectos preventivos y terapéuticos de bebidas y alimentos.

En países donde la dieta de la población no incluye soja, los productos procesados surgen

como una alternativa interesante. Por ejemplo, las harinas de soja pueden utilizarse en la elaboración de panes de alto contenido en fitoestrógenos; los productos elaborados en base a proteínas de soja se pueden agregar a productos cárneos, sopas, bebidas, y otros productos procesados (Genovese et al., 2006).

El objetivo de este trabajo fue cuantificar la actividad antirradicalaria y antioxidante de extractos de porotos y harina de soja, utilizando diferentes técnicas analíticas.

2 METODOLOGÍA

2.1. Preparación de los extractos de porotos y harina de soja

Se utilizaron porotos y harina de soja procedentes de supermercados locales. Se aplicó la técnica de cuarteo para obtener muestras de 10 g. Los porotos con y sin cutícula se molieron finamente, en molinillo de café.

Las muestras fueron sometidas a extracción a 60°C, con etanol de 96%, etanol al 70% y metanol al 80%, utilizando diferentes tiempos de ultrasonificación, de acuerdo con lo informado por Rostagno et al. (2003) y diferentes relaciones entre la masa de muestra y el volumen de solvente.

Los métodos utilizados, en los que se indica tipo de solvente; relación entre masa de muestra y volumen de solvente y tiempo de ultrasonificación fueron:

- Etanol 96%; 1:6; 2 horas (M1)
- Etanol 96%; 1:6; 4 horas (M2)
- Etanol 96%; 1:6; 6 horas (M3)
- Metanol 80 %; 1:45; 1 hora (M4)
- Etanol 70%; 1:6; 30 minutos (3 extracciones sucesivas) (M5).

2.2. Determinaciones analíticas

2.2.1. Actividad Antirradicalaria

Se determinaron los cambios en la absorbancia a 517 nm durante 10 min de una solución de 1,1 difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH*) 33,6µg/mL en metanol (con el agregado de 400 µL de extracto). La medición se realizó en espectrofotómetro UNICAM UV-Visible UV2. La actividad antirradicalaria (AAR) se calculó, mediante la ecuación:

$$AAR (\%) = 100 \left[1 - \frac{A_m^\infty}{A^0} \right] \quad (1)$$

Donde:

A^0 : absorbancia al tiempo 0 sin el agregado de muestra

A_m^∞ : absorbancia de la muestra al tiempo infinito

La absorbancia en estado estacionario se obtuvo mediante el ajuste de los perfiles cinéticos.

De la misma manera se determinó la actividad antirradicalaria de los extractos frente al radical catión del ácido 2,2'-Azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS^{•+}). Este se generó mediante oxidación con persulfato de potasio durante 16 h en oscuridad hasta lograr la formación del radical coloreado. Luego se diluyó con buffer fosfato (pH 7) hasta una absorbancia de 0,70 ±0,01 (Rice-Evans et al., 1996). Se agregaron alícuotas de 200 µL de extracto. La absorbancia se monitoreó a 734 nm durante 10 min. Para el cálculo de la actividad se aplicó la ecuación (1).

2.2.2. Actividad antioxidante

Se utilizó el método de decoloración de β-caroteno inducida enzimáticamente. Para ello, se prepararon soluciones de β-caroteno y ácido linoleico en solución micelar de Tween 20 y buffer borato de sodio (pH 9). Alícuotas de estas soluciones se mezclaron, a esto se le adicionó 500µL de extracto y lipoxigenasa de soja para inducir la oxidación y se leyó la absorbancia a 460 nm durante 10 min (Chaillou y Nazareno 2006). La actividad antioxidante (AAO) se calculó, mediante la ecuación sugerida por Burda y Oleszek (2001):

$$\% AAO = 100 \times \left[1 - \frac{(A_m^0 - A_m^t)}{(A_c^0 - A_c^t)} \right] \quad (2)$$

Donde A_m^0 y A_c^0 es la absorbancia de la muestra y del control a 0 min, respectivamente; A_c^t y A_m^t son las absorbancias para un tiempo de 10 min del control y de la muestra, respectivamente. La AAO se expresó como unidades equivalentes de quercetina en mg/g muestra, utilizándose para ello una curva de calibración. Todas las determinaciones se realizaron por duplicado.

2.3. Tratamiento estadístico

Se calculó la media y la desviación estándar de los datos obtenidos.

3 RESULTADOS

En las Fig.1 y Fig.2 se presenta la actividad antirradicalaria porcentual de los extractos de porotos de soja con cutícula (C) y sin cutícula (SC) y harina de soja (H), obtenidos con los diferentes métodos de extracción, especificados más arriba, frente a los radicales libres DPPH* y ABTS^{•+}, respectivamente.

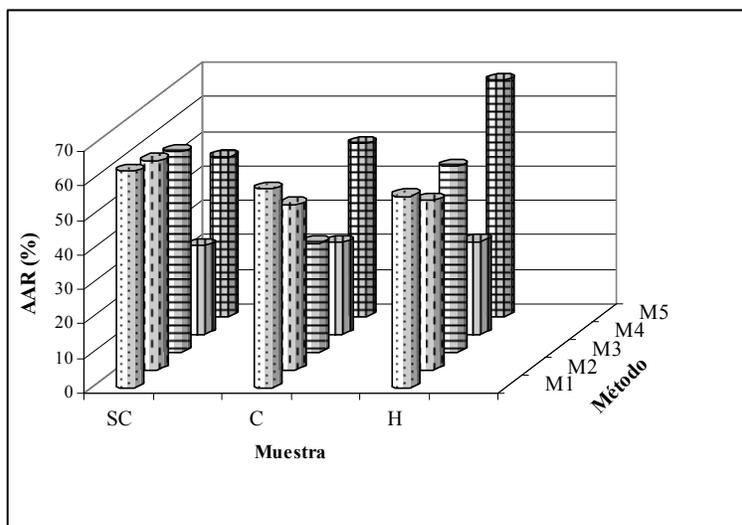


Figura 1. Actividad antirradicalaria de extractos de semillas y harina de soja frente a DPPH•

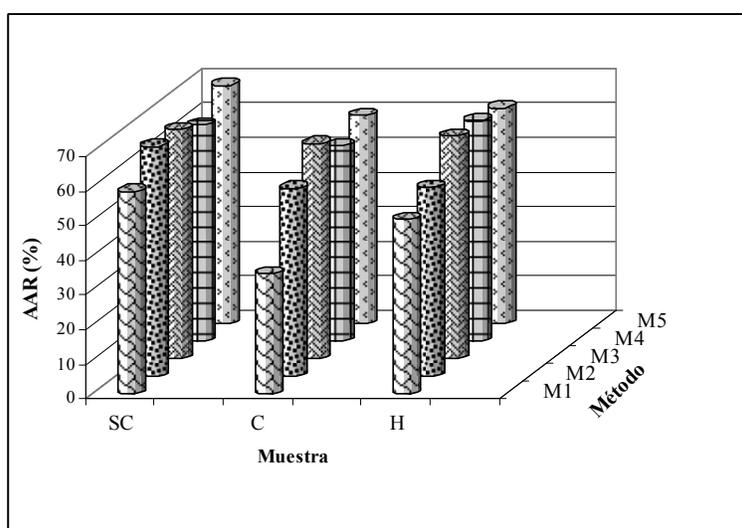


Figura 2. Actividad antirradicalaria de extractos de semillas y harina de soja frente a ABTS•+

En la Fig.1 se puede observar que la máxima actividad atrapadora frente a DPPH• corresponde a los extractos de harina de soja extraída con etanol al 70%, seguida por los extractos etanólicos de porotos de soja sin cutícula. Estos resultados están de acuerdo a lo informado por Kumar et al. (2009).

La máxima AAR fue observada en grano de soja. En la Fig.2 se muestra que la mayor actividad se determinó en muestras de porotos de soja, sin cutícula, obtenidos con etanol al 70%, seguidos por los extractos etanólicos y metanólicos. Los resultados obtenidos en este ensayo revelan un

mejor comportamiento antirradicalario de los extractos etanólicos, siendo mayor el poder atrapador del radical libre ABTS•+.

A modo de ejemplo, en las Fig. 3 y Fig. 4. se presentan los perfiles cinéticos del atrapamiento de los radicales libres ensayados ante el agregado del extracto etanólico de porotos de soja sin cutícula, obtenidos con etanol 70°. Como puede observarse, la velocidad de captura del radical libre por acción de los compuestos presentes en los extractos de soja es mayor frente a ABTS•+.

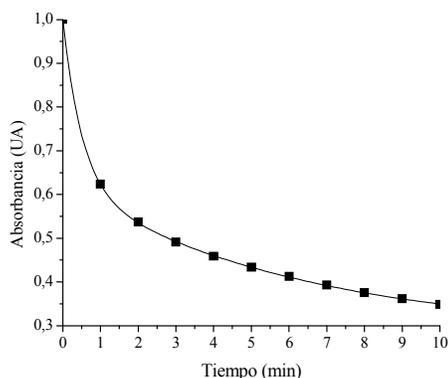


Figura 3. Perfil cinético de decoloración de ABTS^{•+}

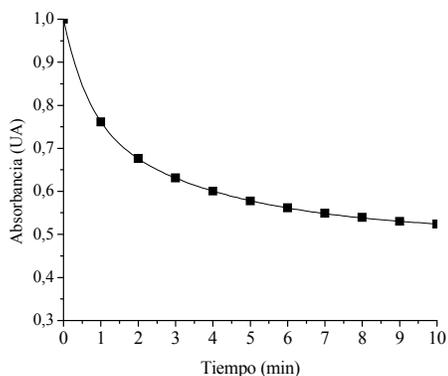


Figura 4. Perfil cinético de decoloración de DPPH[•]

Los resultados de la actividad antioxidante, se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1. Actividad antioxidante de extractos de soja

Método	Muestra		
	SC	C	H
	AAO (%)		
M1	0,3	5,4	33,2
M2	9,2	44,9	56,9
M3	71,8	92,7	41,6
M4	40,8	22,9	28,9
M5	47,2	24,1	49,2

La mayor actividad antioxidante se midió en el extracto etanólico de porotos de soja con cutícula sometidos a 6 h de ultrasonificación, seguida por el extracto de granos sin cutícula preparado de la misma manera que el anterior. Con respecto a la muestra harina de soja, se determinó un porcentaje apreciable de actividad antioxidante el

extracto etanólico sometido a 4 horas de ultrasonificación.

Se encontró relación lineal positiva entre el contenido de polifenoles totales de los extractos y AAR y AAO, con $R^2 > 0,7$.

4 CONCLUSIONES

Los porotos y la harina de soja son productos naturales que poseen numerosos compuestos bioactivos con propiedades beneficiosas para la salud humana. Todas las muestras analizadas presentaron actividad antirradicalaria y antioxidante, destacándose los extractos etanólicos. Esta actividad se correlaciona directamente con el contenido de polifenoles.

5 REFERENCIAS

- Alekel, L., C.M. Hasler, S. Juma, B.W. Drum, & S.C. Kukreja, Role of soy protein with normal or reduced isoflavone content in reversing bone loss induced by ovarian hormone deficiency in rats, *American Journal of Clinical Nutrition*, 68,1358S–1363S, 1998.
- Benavente-García, O., J. Castillo, F. Marin, A. Ortuño & J. Del Río, Uses and properties of Citrus flavonoids, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 12, 4505-4515, 1997.
- Burda, S. & W. Oleszek, Antioxidant and antiradical activities of flavonoids, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 2774-2779, 2001.
- Chaillou, L. & M. Nazareno, New Method to Determine Antioxidant Activity of Polyphenols, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 8397-8402, 2006.
- Coward, L., N.C. Barnes, K.D.R. Setchell & S. Barnes, Genistein, daidzein, and their β -glycoside conjugates: antitumor isoflavones in soybean foods from American and Asian diets, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41, 1961–1967, 1993.
- Genovese, M.I., J. Davila & F.M. Lajolo, Isoflavones in Processed Soybean Products from Ecuador. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 49, 853-859, 2006.
- Hoeck, J.A., W.R. Fehr, P.A. Murphy & G.A. Welke, Influence of genotype and environment on isoflavone contents of soybean, *Crop Science*, 40, 48-51, 2000.
- Jiménez-Escrig, A., I. Jiménez-Jiménez, C. Sanchez-Moreno & F. Saura-Calixto, Evaluation of free radical scavenging of dietary carotenoids by the stable radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, *Journal of Science of Food and Agriculture*, 80, 1686-1690, 2000.

- Kumar, V., A. Rani, Dixit, A.K., D. Bhatnagar & S. Chauhan, Relative changes in tocopherols, isoflavones, total phenolic content, and antioxidative activity in soybean seeds at different reproductive stages, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 2705-2710, 2009.
- Lee, S.J., W. Yan, J.K; Ahn & I.M. Chung, Effects of year, site, genotype and their interactions on various soybean isoflavones, *Field Crop Research*, 81, 181-192, 2003.
- Lucas, E.A., D.A. Khalil, B.P. Daggy & B.H. Arjmandi, Ethanol-extracted soy protein isolate does not modulate serum cholesterol in golden Syrian hamsters: A model of postmenopausal hypercholesterolemia, *Journal of Nutrition*, 131, 211-214, 2001.
- Phillips, K.M., D.M. Ruggio, J.I. Toivo, M.A. Swank & A.H. Simpkins, Free and esterified sterol composition of edible oils and fats, *Journal of Food Composition and Analysis*, 15, 123-142, 2002.
- Ranich, T., S.J. Bhatena & M.T. Velasquez, Protective effects of dietary phytoestrogens in chronic renal disease, *Journal of Renal Nutrition*, 11, 183-193, 2001.
- Rice-Evans, C., N.J. Miller & G. Paganga, Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids, *Free Radical Biology & Medicine*, 20, 933-956, 1996.
- Rimbach, G., C. Boesch-Saadatmandi, J. Frank, D. Fuchs, U. Wenzel, H. Daniel, W.L. Hall & P.D. Weinberg, Dietary isoflavones in the prevention of cardiovascular disease – A molecular perspective, *Food Chemical and Toxicology*, 46, 1308-1319, 2008.
- Romani, A., P. Vignolini, C. Galardi, C. Aroldi, C. Vazzana & D. Heimler, Polyphenolic content in different plant parts of soy cultivars grown under natural conditions, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 5301-5306, 2003.
- Rostagno, M., M. Palma & C.G. Barroso, Ultrasound-assisted extraction of soy isoflavones. *Journal of chromatography*, 1012, 119-128, 2003.
- Steiner, C., W.H.M. Peters, E.P. Gallagher, P. Magee, I. Rowland & B.L. Pool-Zobel, Genistein protects human mammary epithelial cells from benzo(a)pyrene-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxide and 4-hydroxy-2-nonenal genotoxicity by modulating the glutathione/glutathione S-transferase system, *Carcinogenesis*, 28, 738-748, 2007.
- Wei, H., R. Bowen, Q. Cai, S. Barnes & Y. Wang, Antioxidant and antipromotional effects of the soybean isoflavone genistein, *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 208, 124-130, 1995.
- Zhang, Y.C., J. H. Lee, Y. Vodovotz & S.J. Schwartz, Changes in distribution of isoflavones and beta-glucosidase activity during soy bread proofing and baking, *Cereal Chemistry*, 81, 741-745, 2004.