

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA



**DETERMINACION DE FENOLES, FLAVONOIDES Y CAPACIDAD
ANTIOXIDANTE EN MELAZA, AZUCAR BLANCO Y MORENO EN EL
INGENIO CHAPARRASTIQUE POR EL METODO DE
ESPECTROFOTOMETRIA ULTRAVIOLETA-VISIBLE**

TRABAJO DE GRADUACION PRESENTADO POR

LORENA MARIBEL AMAYA RODRIGUEZ

CATHERINE ELIZABETH PORTILLO MEMBREÑO

PARA OPTAR AL GRADO DE

LICENCIATURA EN QUIMICA Y FARMACIA

NOVIEMBRE DE 2013

SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTRO AMERICA

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR

ING. MARIO ROBERTO NIETO LOVO

SECRETARIA GENERAL

DRA. ANA LETICIA ZAVALA DE AMAYA

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA

DECANA

LICDA. ANABEL DE LOURDES AYALA DE SORIANO

SECRETARIO

LIC. FRANCISCO REMBERTO MIXCO LOPEZ

COMITÉ DE TRABAJO DE GRADUACION

COORDINADORA GENERAL

Licda. María Concepción Odette Rauda Acevedo

ASESORA DE AREA DE QUIMICA AGRICOLA

MSc. Ena Edith Herrera Salazar

ASESORA DE AREA DE CONTROL DE CALIDAD DE PRODUCTOS FARMACEUTICOS COSMETICOS Y VETERINARIOS

Licda. Zenia Ivonne Arévalo de Márquez

DOCENTES DIRECTORES

Licda. Magnoly Emperatriz Miranda

Lic. Juan Agustín Cuadra Soto

AGRADECIMIENTOS

A Dios todopoderoso, por ser guía, fuente de fuerza y de sabiduría, nuestro apoyo, por las muchas veces que se manifestó a nuestro lado, infinitas gracias Dios sin ti nada de esto sería posible

A nuestros docentes directores Licenciada Magnoly Emperatriz Miranda, por las oportunidades que nos ha brindado, por su paciencia, disposición, confianza, por compartir sus conocimientos y palabras de aliento, Licenciado Juan Agustín Cuadra por su apoyo, su esfuerzo, y sabiduría, que Dios les bendiga.

A la coordinadora general, Licda. María Concepción Odette Rauda Acevedo, por su apoyo, disposición, y dirección, gracias a los cuales mejoramos nuestro trabajo de graduación.

A grupo CASSA, Ingenio Chaparrastique por la oportunidad y el apoyo para desarrollar un tema innovador, por facilitarnos las instalaciones, equipos y reactivos para poder llevar a cabo esta investigación.

A todas las personas que de una u otra forma, han sido parte de este proceso.

Lorena y Catherine

DEDICATORIA

De manera muy especial a:

Dios, mi guía, refugio, fortaleza, mi compañero fiel, quien nunca me dejó, todo se lo debo a él, gracias papá por permitirme obtener este triunfo.

A mi madre Julia Rodríguez, por ser mi ejemplo a seguir, mi confidente, y tantas veces mi paño de lágrimas, por alentarme en los momentos más difíciles, por creer en mí, por enseñarme a ser una mujer valiente, que nunca se rinde, porque eres el reflejo del amor de Dios, porque has luchado por mí, y por darme la oportunidad de ser profesional.

A mi padre que ya está con Dios, sé que estarías orgulloso, a mis hermanos por su paciencia, y compañía ustedes son muy importantes para mí.

A mis tíos/as, que han sido de apoyo y ayuda a lo largo de mi vida, gracias por su gran corazón, a mi familia en general que de una u otra forma son parte de mi triunfo.

A mi compañera y amiga Catherine por tu comprensión, y tu esfuerzo que nos ha permitido culminar exitosamente este proyecto.

A todas las personas que aportaron palabras de aliento, oraciones, conocimiento, apoyo de diversas formas, que Dios se los multiplique.

Lorena Maribel Amaya Rodríguez

DEDICATORIA

De manera muy especial a:

A mi amado Dios por guiarme, protegerme, ser mi fortaleza a lo largo de mi vida, por bendecirme y permitirme finalizar mis estudios con éxito.

A mis adorados padres, Pedro Portillo y Sonia Elizabeth de Portillo, por darme el apoyo, cariño y amor, quien con todos sus esfuerzos fue posible este triunfo, gracias por ser los mejores padres que Dios me pudo dar.

A mi abuelita Aminta, que fue como una madre para mí y que me apoyo en todo, dándome consejos, amor y cariño, te extraño mucho y te amo, gracias por hacer de mí la persona que soy, siempre estarás en mi mente y mi corazón.

A mi abuelo Atilio de grata recordación, y a mi abuela María por brindarme su cariño.

A mi hermano Alexander por el apoyo y los buenos momentos. A mi familia por llevarme en sus oraciones, por darme su apoyo incondicional y cariño.

A mi tía Iris, por sus consejos, por su cariño y apoyo, gracias por creer en mí.

A mi compañera y amiga de tesis Lorena por brindarme su amistad, confianza, paciencia, comprensión y apoyo.

A mi amiga Karen Villatoro, por su amistad, por darme palabras de aliento, por los buenos momentos que disfrutamos, gracias.

Y a todas las personas que de una u otra forma me apoyaron y me animaron durante mis estudios.

Muchísimas gracias.

Catherine Elizabeth Portillo Membreño

INDICE

Resumen

Capítulo I

1.0 Introducción xxii

Capítulo II

2.0 Objetivos

Capítulo III

3.0 Marco Teórico	27
3.1 Los antioxidantes y las reacciones de oxidación	27
3.2 Especies reactivas del oxígeno (ROS) y radicales libres	30
3.2.1 Tipos de radicales libres	30
3.3 Fuentes y formación de radicales libres	32
3.3.1 Fuentes endógenas	32
3.3.2 Fuentes exógenas	36
3.4 Daño a biomoléculas como consecuencia del estrés oxidativo	36
3.5 Antioxidantes Naturales	38
3.5.1 Compuestos fenólicos	38
3.5.1.1 Principales clases de compuestos fenólicos	39
3.5.1.2 Flavonoides	39
3.5.1.3 Ácidos fenólicos	42
3.5.1.4 Taninos	42
3.5.1.5 Estilbenos y ligninas	43

3.6 Actividad antioxidante	44
3.7 Productos en estudio	47
3.7.1 Caña de Azúcar	47
3.7.1.1 Procesos de obtención	48
3.7.2 Azúcar	50
3.7.3 Melaza	51
3.8 Métodos a utilizar para la determinación de compuestos fenólicos, flavonoides y actividad antioxidante	52
3.8.1 Determinación de fenoles totales de Folinciocalteu	52
3.8.2 Determinación de flavonoides por el método de tricloruro de Aluminio	53
3.8.3 Método ABTS/TEAC	54

Capitulo IV

4.0 Diseño metodológico	58
4.1 Tipo de estudio	58
4.2 Investigación bibliográfica	58
4.3 Investigación de campo	59
4.3.1 Universo	59
4.3.2 Muestra	59
4.4 Parte Experimental	59
4.4.1 Muestra	59
4.4.2 Preparación de la muestra	60
4.4.3 Determinación de fenoles	61
4.4.4 Determinación de flavonoides	65
4.4.5 Determinación de la capacidad antioxidante	67
4.4.6 Determinación de la variación de la capacidad antioxidante	72

Capítulo V

5.0 Resultados y discusión de resultados	75
--	----

Capítulo VI

6.0 Conclusiones	112
------------------	-----

Capítulo VII

7.0 Recomendaciones	115
Bibliografía	
Glosario	
Anexos	

INDICE DE ANEXOS

ANEXO N°

- 1 Lista de cristalería y equipo
- 2 Preparación de reactivos
- 3 Pureza de los estándares
- 4 Condiciones de almacenamiento (Temperatura y humedad) de azúcar blanco y moreno
- 5 Valores críticos de la distribución t de student.

INDICE DE CUADROS

CUADRO N°		Pág
1	Clasificación de los antioxidantes según su naturaleza.	29
2	Clasificación de las especies reactivas de oxígeno	31
3	Clasificación de las especies reactivas de nitrógeno.	32
4	Enfermedades o procesos asociados al daño oxidativo en las moléculas biológicas	37
5	Clasificación de compuestos fenólicos	39
6	Clasificación de flavonoides	41
7	Concentración vs absorbancia de los estándares de ácido gálico	78
8	Concentración vs absorbancia de los estándares de Quercitina	87
9	Concentración vs absorbancia de los estándares de Trolox	95
10	Recopilación de datos utilizados en el cálculo del estadígrafo de contraste de la t de student para azúcar blanco	102
11	Resultados del método estadístico de la t de student para verificar la variación de la actividad antioxidante en azúcar blanco	103

12	Recopilación de datos utilizados en el cálculo del estadígrafo de contraste de la t de student para azúcar moreno	105
13	Resultados del método estadístico de la t de student para verificar la variación de la actividad antioxidante en azúcar moreno	106
14	Recopilación de datos utilizados en el cálculo del estadígrafo de contraste de la t de student para melaza	107
15	Resultados del método estadístico de la t de student para verificar la variación de la actividad antioxidante en melaza	108

INDICE DE FIGURAS

FIGURA N°		Pág
		.
1	Neutralización del radical libre por un antioxidante	28
2	Reducción monovalente del oxígeno y cadena respiratoria.	32
3	Generación de especies oxigénicas en las células fagocitarias.	33
4	Estructura de flavonoides con numeración y especificación de cada heterociclo	40
5	Estructura química del resveratrol	43
6	Reacción química de un antioxidante con un radical libre.	45
7	Reacción química entre un radical antioxidante y un radical libre	45
8	Complejo flavonoides-Al	53
9	Estructura química de ABTS proyectada	54
10	Diluciones de las muestras de azúcar blanco, moreno y melaza	60
11	Diagrama de flujo, desarrollo del método de Folinciocalteu	62
12	Diagrama de flujo, del método de Tricloruro de Aluminio	66
13	Diagrama de flujo, desarrollo del método de ABTS	69
14	Método de Folinciocalteu en azúcar blanco, moreno y melaza	76
15	Curva de calibración del método de Folinciocalteu	78

16	Método de Tricloruro de Aluminio en azúcar blanco, moreno y melaza	85
17	Curva de calibración del método de Tricloruro de Aluminio	87
18	Método de ABTS en azúcar blanco, moreno y melaza	93
19	Curva de calibración del método radical catiónico ABTS	95
20	Campana de Gauss para el azúcar blanco	104
21	Campana de Gauss para el azúcar moreno	106
22	Campana de Gauss para la melaza	109

INDICE DE TABLAS

TABLA N°		Pág.
1	Recopilación de resultados obtenidos en estudios anteriores en azúcar moreno	50
2	Recopilación de resultados obtenidos en estudios anteriores en azúcar blanco	50
3	Recopilación de resultados obtenidos en estudios anteriores en melaza	51
4	Absorbancias y factor de dilución del azúcar blanco, moreno y melaza por el método de Folinciocalteu	77
5	Resultados mensuales de fenoles totales, por el método de Folinciocalteu en azúcar blanco, moreno y melaza	81
6	Absorbancias y factor de dilución del azúcar blanco, moreno y melaza por el método de Tricloruro de Aluminio	85
7	Resultados mensuales del contenido de flavonoides, por el método de Tricloruro de Aluminio	91
8	Absorbancias y factor de dilución de azúcar blanco, moreno y melaza por el método ABTS	94
9	Resultados mensuales del contenido de actividad antioxidante, por el método ABTS en azúcar blanco, moreno y melaza	99

10	Promedio de los resultados obtenidos de fenoles, flavonoides y capacidad antioxidante en melaza, azúcar blanco y moreno en este estudio	100
11	Porcentajes de inhibición del azúcar blanco, moreno y melaza	100
12	Comparación de la cantidad de fenoles, y capacidad antioxidante determinados por distintos autores en distintos productos vs los resultados obtenidos de las muestras analizadas	109
13	Condiciones de almacenamiento (temperatura y humedad) de azúcar blanco y moreno	
14	Valores críticos de la distribución de t de student	

ABREVIATURAS

- **ABTS:** Acido 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)
- **ABTS•+:** Radical Catiónico ABTS
- **Abs:** Absorbancia
- **ADP:** Adenosin Difosfato
- **ADN:** Acido Desoxirribonucleico
- **AlCl₃:** Tricloruro de Aluminio
- **ATP:** Adenosin Trifosfato
- **DPPH:** 2,2-Difenil-1-picrilhidrazil
- **ERNs:** Especies Reactivas de Nitrógeno
- **EROs:** Especies Reactivas de Oxígeno
- **FRAP:** Poder Antioxidante de Reducción Férrica (ferric reducing activity power)
- **GAE:** Equivalentes de Acido Gálico
- **HO•:** Radical Hidroxilo
- **HO₂•:** Radical Hidroperóxido
- **H₂O₂:** Peróxido de Hidrogeno
- **K₂S₂O₈:** Persulfato de Potasio
- **LDL:** Lipoproteína de Baja Densidad (Low-density lipoprotein)
- **mg:** miligramos
- **mL:** mililitros

- **mM:** milimolar
- **μM :** micro Moles
- **μg :** microgramos
- **Na_2CO_3 :** Carbonato de Sodio
- **NADPH:** Nicotinamida Adenina Dinucleotido Fosfato
- **NO^\bullet :** Oxido Nítrico
- **NO_2^\bullet :** Dióxido de Nitrógeno
- **$\text{O}_2^{\bullet-}$:** Radical Superóxido
- **$^1\text{O}_2$:** Oxígeno Singlete
- **O_3 :** Ozono
- **ONOO^\ominus :** Peróxido de Nitrógeno
- **R^\bullet :** Radical Libre
- **RO^\bullet :** Radical Alcoxilo
- **ROO^\bullet :** Radical Péroxilo
- **SOD:** Superóxido Dismutasa
- **SO_2 :** Dióxido de Azufre
- **TEAC:** Capacidad Antioxidante en Equivalentes de Trolox
- **TROLOX:** Análogo hidrosoluble del alfa-tocoferol, (6-hidroxi-2, 5, 7, 8 tetrametilcromo-2 ácido carboxílico)

RESUMEN

El presente trabajo de investigación se realizó en el Ingenio Chaparrastique de la ciudad de San Miguel en el periodo 2012-2013, y tuvo como objetivo determinar fenoles, flavonoides y capacidad antioxidante en melaza, azúcar blanco y moreno por el método de espectrofotometría ultravioleta -visible, utilizando una muestra de referencia proporcionada por el Ingenio Chaparrastique

La determinación de fenoles se llevó a cabo, por el método de Folinciocalteu en los meses de Enero a Junio; los flavonoides se determinaron por el método de Tricloruro de Aluminio durante los meses de Marzo a Junio y la capacidad antioxidante mediante el método radical catiónico Acido 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS) en los meses de Abril a Junio; los análisis fueron realizados en el laboratorio de "Pago por calidad de caña" del Ingenio Chaparrastique.

Los resultados obtenidos en la determinación de fenoles, expresados en mg equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra en el azúcar blanco son 3.4 - 5.08 mg/g, para el azúcar moreno los resultados son 10.17- 12.85 mg/g y para la melaza son 796.98 - 852.78 mg/g.

En el análisis de flavonoides, los resultados son expresados en mg equivalentes de Quercitina por gramo de muestra, para el azúcar blanco se obtuvieron valores de 0.016 - 0.022 mg/g, en el azúcar moreno es 0.037- 0.043 mg/g, en la melaza 2.09 - 2.36 mg/g.

En la determinación de la actividad antioxidante, se obtuvieron resultados expresados en mg equivalente de Trolox por gramo de muestra, que indicaron que el azúcar blanco contiene 46.15 - 47.11 mg/g, para azúcar moreno 50.10 - 52.11 mg/g y en la melaza 1,551.51 - 1,605.33 mg/g.

Por lo cual se confirmó que al consumir estos productos, se evitan reacciones de oxidación en las células del organismo.

Con el fin de evaluar la capacidad antioxidante en las muestras, se empleó el diseño de la t de student, el cual demostró que no existe una diferencia significativa en la variación de la actividad antioxidante en la melaza, azúcar blanco y moreno durante los 3 meses analizados.

Según los resultados obtenidos, el producto que mayor contenido de antioxidantes presentó es la melaza, seguido por el azúcar moreno y el azúcar blanco.

Basándose en estos resultados, se recomienda a la población consumir preferiblemente azúcar moreno por poseer un contenido mayor de antioxidantes por gramo de producto, con respecto al azúcar blanco.

CAPITULO I
INTRODUCCION

1.0 INTRODUCCION

Los antioxidantes son moléculas, capaces de retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas e inhibir reacciones de oxidación, haciéndolo ellos mismos.

La oxidación es una reacción química de transferencia de electrones de una sustancia a un agente oxidante, que puede producir radicales libres que originan reacciones en cadena que dañan las células, esto se produce debido a que los radicales libres son átomos o grupos de átomos que tienen un electrón desapareado con capacidad de aparearse, por lo que son muy reactivos, por lo tanto, recorren nuestro organismo intentando robar un electrón de las moléculas estables con el fin de alcanzar su estabilidad electroquímica y lograr su función específica en la célula, esto puede conducir a diversas enfermedades, como envejecimiento precoz, problemas del sistema cardiovascular (arteriosclerosis), problemas en el sistema nervioso, daño genético (mutaciones y cánceres), entre otras, por ello, actualmente el interés por alimentos naturales, que proporcionen sustancias beneficiosas a la salud se ha incrementado, estas sustancias son los antioxidantes.

Recientes estudios señalan múltiples referencias sobre el contenido antioxidante, en los extractos de la caña de azúcar y su uso para el tratamiento de diversas enfermedades, parte de los antioxidantes encontrados en los productos de la caña de azúcar, son fenoles y flavonoides entre otros.

En la investigación se determinó el contenido de fenoles por el método de Folinciocalteu, flavonoides por el método colorimétrico de tricloruro de Aluminio y capacidad antioxidante por el método radical catiónico Acido 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS) en melaza, azúcar blanco y moreno desde Enero a junio del 2013 en las instalaciones del laboratorio de pago por calidad de caña en el Ingenio Chaparrastique en la Ciudad de San Miguel.

Según los resultados obtenidos, el producto que mayor contenido de fenoles, flavonoides y actividad antioxidante presentó es la melaza, seguido por el azúcar moreno y en menor proporción el azúcar blanco.

Se realizó un diseño estadístico utilizando la t de student con el fin de evaluar las variaciones de la actividad antioxidante en las muestras, el cual revelo que no existen variaciones significativas en la actividad antioxidante de la melaza, azúcar blanco y moreno durante los meses analizados.

CAPITULO II

OBJETIVOS

2.0 OBJETIVOS

2.1 Objetivo General

Determinar fenoles, flavonoides y capacidad antioxidante en melaza, azúcar blanco y moreno del Ingenio Chaparrastique por el método de espectroscopia ultravioleta-visible.

2.2 Objetivos Específicos:

2.2.1. Cuantificar fenoles por el método de Folinciocalteu.

2.2.2. Analizar el contenido de flavonoides por el método colorimétrico de Tricloruro de aluminio

2.2.3. Evaluar la capacidad antioxidante por el ensayo radical catiónico Acido 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS).

2.2.4. Estudiar las variaciones de la capacidad antioxidante, durante tres meses del periodo de almacenamiento de las muestras en el Laboratorio del Ingenio Chaparrastique.

CAPITULO III
MARCO TEORICO

3.0 MARCO TEORICO

3.1. Los antioxidantes y las reacciones de oxidación. ^{(15) (29)}

Un antioxidante puede definirse como “cualquier sustancia que en concentraciones bajas en comparación con la sustancia oxidada retrasa o inhibe significativamente la oxidación de esta sustancia”. La oxidación es una reacción química de transferencia de electrones de una sustancia a un agente oxidante. Las reacciones de oxidación pueden producir radicales libres los cuales son átomos o grupos de átomos que tienen un electrón desapareado, por lo que son muy reactivos, ya que tienden a captar un electrón de otros átomos con el fin de alcanzar su estabilidad electroquímica. El término “radical libre” enfatiza una reactividad más alta comparada con moléculas cuyos átomos están ligados a otros por covalencia (enlace por compartición de electrones). Una vez que el radical libre ha conseguido sustraer el electrón (reducción) que necesita, la molécula estable que lo pierde (oxidación) se convierte a su vez en un radical libre por quedar con un electrón desapareado, iniciándose así una reacción en cadena que dañan las células.

El antioxidante al reaccionar con el radical libre le cede un electrón oxidándose a su vez y transformándose en un radical libre débil, con escasos o nulos efectos tóxicos y que en algunos casos como la vitamina E, pueden regenerarse a su forma primitiva por la acción de otros antioxidantes. (Ver figura 1) ⁽⁷⁾

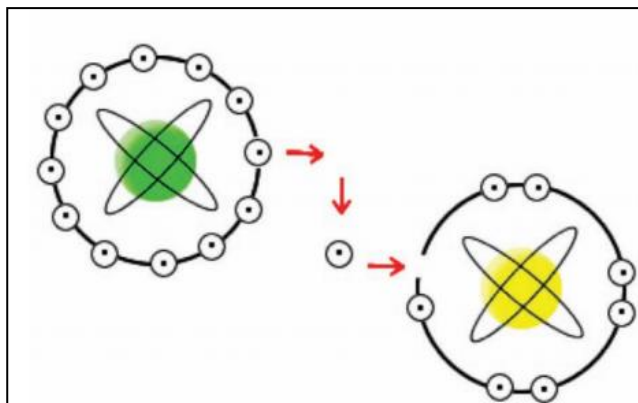


Figura N°1: Neutralización del radical libre por un antioxidante

El cuerpo tiene varios mecanismos de defensa para neutralizar el estrés oxidativo mediante el uso de agentes antioxidantes. Los antioxidantes se pueden producir en las células (antioxidante endógeno) y / o suministrados externamente a través de los alimentos / suplementos, (antioxidantes exógenos). ⁽¹⁵⁾

Los sistemas de defensa frente a los radicales libres los podemos clasificar según su mecanismo de acción, o según su naturaleza.

SEGÚN EL MECANISMO DE ACCIÓN: A su vez los podemos clasificar en primarios, secundarios y terciarios. ⁽²⁹⁾

Antioxidantes primarios: Previenen la formación de nuevos radicales libres, esto lo consiguen convirtiendo los radicales libres existentes en moléculas menos perjudiciales antes de que puedan reaccionar o evitando la formación de radicales libres a partir de otras moléculas.

Antioxidantes secundarios: Capturan los radicales evitando las reacciones en cadena, la mayoría de estos compuestos son diarilaminas y fenoles capaces de aceptar el electrón desapareado del radical libre y de estabilizarlo en su estructura, evitando así la propagación de la cadena radicalaria.

Antioxidantes terciarios: Reparar las biomoléculas dañadas por los radicales libres, incluyen enzimas reparadoras de ADN y la metionina sulfóxido reductasa.

SEGÚN LA NATURALEZA: Se clasifican en enzimáticos y no enzimáticos ⁽²⁸⁾

Cuadro N°1: Clasificación de los antioxidantes según su naturaleza. ⁽²⁸⁾

ANTIOXIDANTES	PROPIEDADES
ENZIMATICOS	
Superóxido Dismutasa (SOD)	<ul style="list-style-type: none"> - Elimina los radicales superóxidos. - Primera línea de defensa.
Glutación peroxidasa.	<ul style="list-style-type: none"> - Remueve H₂O₂ e hidroperóxidos orgánicos. - Cada una de las subunidades contiene un átomo de selenio que es esencial para su actividad.
Catalasa	<ul style="list-style-type: none"> - Cataliza la descomposición del H₂O₂ para formar agua y oxígeno. - Junto con la peroxidasa actúa como protector de la hemoglobina y otras proteínas ricas en grupos tiolicos frente a la oxidación.
NO ENZIMATICOS	
Vitamina C (ácido ascórbico)	<ul style="list-style-type: none"> - Neutraliza directamente al ion superóxido, radical oxidrilo, oxígeno singlete. - Regenera la forma oxidada de la vitamina E.
Glutación	<ul style="list-style-type: none"> - Principal sistema de defensa a nivel intracelular frente a las agresiones oxidantes. - Interviene en la síntesis del DNA. - Participa en la detoxificación de xenóbioticos. - Actúa como protector frente a la radiación y al estrés oxidativo

Cuadro N°1: Continuación

ANTIOXIDANTES	PROPIEDADES
Vitamina E	<ul style="list-style-type: none"> - Neutraliza el radical superóxido. - Protege las membranas biológicas por ser liposoluble. - Inhibe la fase de propagación de la cadena de la lipoperoxidación.
Carotenoides	<ul style="list-style-type: none"> - β- caroteno: posee actividad antioxidante. - Se ha descrito como el más importante neutralizador del oxígeno singlete aislado de la naturaleza.
Ácido úrico	<ul style="list-style-type: none"> - Potente actividad antioxidante. - Elimina radicales OH[*]
Iones metálicos: transferrina.	<ul style="list-style-type: none"> - Quelar iones de metales responsables de la reacción de Fenton

3.2. ESPECIES REACTIVAS DEL OXIGENO (ROS) Y RADICALES LIBRES. ⁽²⁹⁾

3.2.1. TIPOS DE RADICALES LIBRES ⁽²⁹⁾

- **ERO** (Especies Reactivas del Oxígeno)
- **ERN** (Especies Reactivas del Nitrógeno).

Radical libres de oxígeno (ERO) ⁽⁶⁾

Los orbitales moleculares más externos del O₂ se encuentran ocupados por dos electrones no apareados, cada uno de ellos, situado en un orbital π (π) diferente formando lo que se denomina un bi-radical. Es decir, tiene dos electrones libres o desapareados, pero estos electrones tienen el mismo giro o spin, por lo que sólo pueden interactuar con los electrones de otros

elementos y compuestos que estén libres y que tengan el giro opuesto. Esto significa que para aceptar un par de electrones de un sustrato, el O_2 debe invertir el spin o giro de uno de sus electrones, lo cual requiere una gran cantidad de energía. Esta es la razón por la cual el O_2 no es muy reactivo y que la materia orgánica no entra en combustión espontánea en contacto con O_2 .

La toxicidad del O_2 se explica entonces debido a la formación de especies reactivas del oxígeno (EROs). Las ERO son radicales libres donde el electrón desapareado se sitúa predominante sobre el átomo de oxígeno por lo que son más reactivos que éste en su estado basal.

Las principales clases de EROS son las siguientes ⁽²⁹⁾:

Cuadro N°2 Clasificación de las especies reactivas de oxígeno. ⁽²⁹⁾

ESPECIE	SIMBOLO
Radical superóxido	$O_2^{\cdot -}$
Radical Hidroperóxido	HO_2^{\cdot}
Peróxido de hidrógeno	H_2O_2
Radical Hidróxilo	HO^{\cdot}
Oxígeno Singlete	1O_2
Radical alcóxilo	RO^{\cdot}
Radical peróxilo	ROO^{\cdot}
Ozono	O_3

Radicales libres de nitrógeno (ERN) ⁽²⁸⁾:

Las especies reactivas del nitrógeno representan otra clase de radicales libres a los cuales, en los últimos años, se les ha dado mucha importancia.

Cuadro N°3: Clasificación de las especies reactivas de nitrógeno.

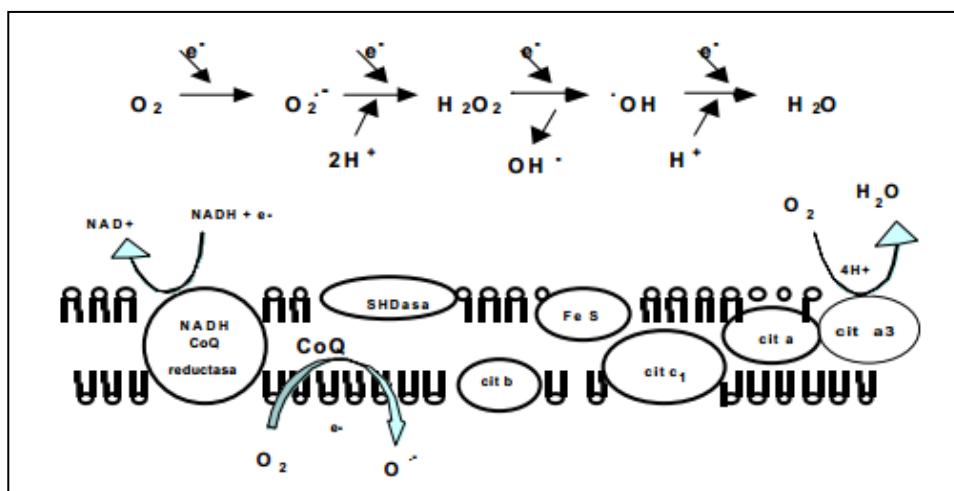
ESPECIE	SIMBOLO
Óxido nítrico	NO^\bullet
Peróxido de Nitrógeno	ONOO^\bullet
Dióxido de Nitrógeno	NO_2^\bullet

3.3. FUENTES Y FORMACION DE RADICALES LIBRES ⁽²⁸⁾

3.3.1. FUENTES ENDOGENAS

- Cadena respiratoria ⁽³⁾

La cadena de transporte electrónico mitocondrial es una de las principales fuentes de radicales libres en la célula. Son muchas las patologías en las que se ha descrito que la mitocondria genera radicales libres, siendo una de las causas del estrés oxidativo que sufre la célula.

**Figura N° 2:** Reducción monovalente del oxígeno y cadena respiratoria

La reducción monovalente de la molécula de oxígeno da lugar a la formación de la mayoría de estos compuestos. Sin embargo el 95% del oxígeno que respiramos es reducido a H_2O por acción de la citocromo oxidasa a3 mediante un mecanismo en el que participan cuatro centro redox proporcionando, además, la principal fuente de energía (ATP) en el organismo. También a nivel del complejo I y del complejo quinona-semiquinona- ubiquinol (Q_{10}) actuando como aceptor de electrones se puede formar el O_2^- .

Se calcula que entre el 1% y el 2% de los electrones transportados por la cadena de transporte electrónico mitocondrial en estado IV (cuando todo el ADP está en forma de ATP) no llegan al complejo IV y producen reducciones parciales del oxígeno. ⁽⁴⁾

- Producción de radicales libres en los distintos estados mitocondriales. ^{(3) (4)}

Células fagocitarias.

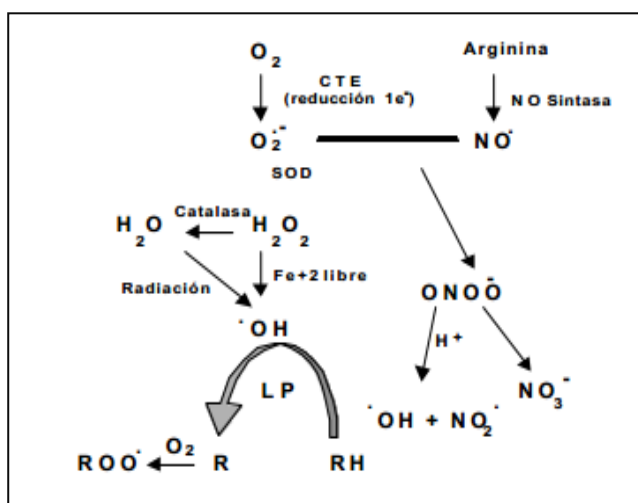


Figura N° 3: Generación de especies oxigénicas reactivas en las células fagocitarias.

Las células fagocitarias (neutrófilos, monocitos o macrófagos), utilizan el sistema de la NADPH oxidasa generando directamente O_2^- . Por otra parte, dichas células también generan óxido nítrico (NO) por acción de la óxido nítrico sintasa sobre la arginina intracelular, como un mecanismo de defensa con el óxido nítrico da lugar a la formación del peróxido de nitrógeno ($ONOO^-$) capaz de inducir peroxidación lipídica en las lipoproteínas. ⁽³⁾

Durante la fagocitosis, una oxidasa unida a membranas es activada en estas células, llevando a un aumento en la captación de oxígeno y en la producción de O_2^- y H_2O_2 . Se cree que las células fagocíticas activadas generan importantes cantidades de H_2O_2 y que éste es el principal compuesto responsable del potencial citotóxico observado en la inflamación tisular localizada. Además de la generación de peróxido de hidrógeno el radical hidroxilo ($\cdot OH$) también puede ser generado durante la fagocitosis. Este radical se produce a través de la reacción de Haber-Weiss o la reacción de Fenton catalizada por hierro. ⁽⁴⁾

Reacción de Fenton-Haber-Weiss. ⁽⁴⁾

Consiste en la reducción del H_2O_2 por iones de metales de transición, sobre todo el ion ferroso (Fe^{+2}) y, en menor medida, el cuproso (Cu^+) y otros iones. El peróxido de hidrógeno o agua oxigenada (H_2O_2) es una molécula relativamente estable en ausencia de catalizadores que promuevan su descomposición. Fenton descubrió, a finales del siglo pasado, que se podían oxidar moléculas orgánicas por mezclas de peróxido de hidrógeno y Fe^{+2} (reactivo de Fenton). Fueron Haber y Weiss quienes dieron una primera explicación del mecanismo de reacción: el Fe^{+2} reduce al H_2O_2 , que a su vez se descompone en el radical hidroxilo y el ion hidroxilo.

Esto puede representarse de la siguiente manera:



Autooxidación. ⁽³⁾

La autooxidación de compuestos de carbono reducido como son aminoácidos, proteínas, lípidos, glúcidos, y ácidos nucleicos dan lugar también a la formación de radicales libres.

- Sistemas de transporte electrónico del retículo endoplasmático y membrana nuclear. ⁽³⁾

Ambos sistemas de membranas intracelulares contienen los citocromos P₄₅₀ y b₅ que pueden oxidar ácidos grasos insaturados y xenóbioticos. Son monooxigenasas que actúan activando el oxígeno molecular a especies electrofílicas de oxígeno (bien radicales, o bien generadoras a su vez de radicales) que pueden ser liberada en la célula.

Peroxisomas ⁽¹²⁾

Los peroxisomas son potentes fuentes celulares de producción de peróxido de hidrógeno debido a su alta concentración en oxidasas, ninguna de las cuales utiliza el superóxido como precursor del mismo.

La catalasa peroxisomal es la enzima que metaboliza la mayor parte del peróxido de hidrógeno generado por las oxidasas de los peroxisomas.

Xantina Oxidasa ⁽³⁾

La enzima xantina oxidasa representa otra fuente de radicales libres. Esta enzima participa en el camino degradativo de las bases púricas, catalizando la transformación de hipoxantina en xantina y está en ácido úrico en dos pasos sucesivos de oxidación. La amplia distribución de esta enzima citosólica, sugiere un rol importante en las condiciones patológicas tales como daño por isquemia de una amplia variedad de órganos,

particularmente en la mucosa intestinal. La xantino oxidasa es una flavoproteína que contiene molibdeno, hierro y azufre.

3.3.2. FUENTES EXOGENAS ⁽²⁶⁾ ⁽³⁾

Las fuentes exógenas de radicales libres pueden ser:

- **Factores ambientales:** contaminantes aéreos fotoquímicos, hiperoxia, pesticidas, humos del tabaco, solventes, anestésicos e hidrocarburos aromáticos.
- **Farmacológicas:** Xenóbioticos, drogas. Algunos de los efectos de estas drogas se han atribuido a su capacidad para reducir el oxígeno a superóxido, peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo.

3.4 DAÑO A BIOMOLÉCULAS COMO CONSECUENCIA DEL ESTRÉS OXIDATIVO ⁽¹⁵⁾ ⁽¹⁶⁾

Estrés oxidativo se define como una situación en la que existe tanto un aumento en la velocidad de generación de especies reactivas del oxígeno como una disminución de los sistemas de defensa, lo que resulta en una mayor concentración, en estado estacionario, de EROs. Es en esta situación de estrés oxidativo en la que se manifiestan las lesiones que producen los radicales libres.

Estos reaccionan químicamente con lípidos, proteínas, carbohidratos y ADN al interior de las células, y con componentes de la matriz extracelular, por lo que pueden desencadenar un daño irreversible que, si es muy extenso, puede llevar a la muerte celular.

Cuadro N° 4: Enfermedades o procesos asociados al daño oxidativo en las moléculas biológicas ⁽¹⁶⁾

ENFERMEDADES	DAÑO OXIDATIVO EN LAS MOLECULAS BIOLOGICAS
Envejecimiento	<ul style="list-style-type: none"> - Peroxidación de los ácidos grasos de la membrana celular y daño al ADN. - Los radicales libres toma un electrón de las células tejido de colágeno, provocando que la piel pierda la elasticidad y como consecuencia la aparición de arrugas y sequedad.
Enfermedades del corazón.	<ul style="list-style-type: none"> - Peroxidación de lípidos en las partículas de LDL con daño de otros de sus componentes. - Los radicales libres dañan las grasas de la ingesta, llamada “grasa oxidada”, la grasa oxidada es grasa más pegajosa por lo que se adhiere a las paredes de las arterias con mayor facilidad pudiendo causar un infarto de miocardio.
Diabetes	<ul style="list-style-type: none"> - Autooxidacion de la glucosa. - Disminución de la secreción de insulina en el páncreas por interferencia de los radicales libres.
Cáncer	<ul style="list-style-type: none"> - Daño al ADN.
Cataratas	<ul style="list-style-type: none"> - Modificaciones irreversibles en las proteínas.
Cuadros inflamatorios crónicos.	<ul style="list-style-type: none"> - Activación de genes relacionados con la respuesta inflamatoria.
Enfermedades neurodegenerativas	<ul style="list-style-type: none"> - Radicales libres de oxigeno inducen apoptosis y desdoblamiento de proteínas.

3.5 ANTIOXIDANTES NATURALES ⁽¹⁵⁾

En los últimos años, el uso de antioxidantes naturales se ha promovido y la literatura ha reconocido que la sustitución de los antioxidantes sintéticos por los naturales puede tener varias ventajas. La investigación sobre antioxidantes naturales se ha centrado principalmente en compuestos fenólicos, flavonoides, en particular, como posibles fuentes de antioxidantes naturales. Los compuestos fenólicos son agentes reductores y su potencial relacionado con la salud le ha atribuido a su capacidad antioxidante propiedades de gran alcance que pueden proteger al organismo de las reacciones de oxidación causados por radicales libres.

3.5.1 COMPUESTOS FENOLICOS ⁽¹⁴⁾⁽¹⁵⁾

Los compuestos fenólicos constituyen uno de los grupos de sustancias más numerosos y ampliamente distribuidos en el reino vegetal. Ellos son productos del metabolismo secundario de las plantas, que son determinantes en la calidad sensorial y nutrición de las frutas, verduras y otras plantas.

Se ha demostrado que los polifenoles dietéticos juegan un papel importante en la salud humana. Se ha reportado que la ingesta elevada de verduras, frutas, cereales integrales y algunas bebidas (té, jugos, vinos) que son ricos en polifenoles previenen o retrasan una serie de muchas enfermedades crónicas, como el cáncer, enfermedades cardiovasculares, inflamación crónica y muchas enfermedades degenerativas. Muchas de las actividades biológicas de los compuestos fenólicos se atribuyen a su capacidad antioxidante.

Los compuestos fenólicos presentan un anillo aromático que tiene uno o más grupos hidroxilos y su estructura puede variar desde la de una molécula fenólica simple (ácidos fenólicos) a la de un complejo de alto peso molecular como un polímero de masa tales como taninos condensados.

3.5.1.1 Principales clases de compuestos fenólicos ⁽¹⁵⁾

Los compuestos fenólicos comprenden una amplia variedad de moléculas que tienen una estructura polifenol (es decir, varios grupos hidroxilo en el anillo aromático), también moléculas con fenol en el anillo tales como ácidos fenólicos.

Los polifenoles se dividen en varias clases de acuerdo con el número de fenoles en el anillo y elementos estructurales que se unen al anillo entre sí. Los principales grupos de compuestos fenólicos son: flavonoides, ácidos fenólicos, taninos (hidrolizables y condensados), estilbenos y lignanos.

Cuadro N° 5: clasificación de compuestos fenólicos ⁽¹⁵⁾

COMPUESTOS FENOLICOS			
FENOLES SIMPLES	POLIFENOLES		
ACIDOS FENOLICOS - Acido benzoico - Acido cinámico	FLAVONOIDES - Antoxantinas Flavona Flavonol Flavanol Isoflavona - Antocianinas	TANINOS Hidrolizables No hidrolizables	ESTILBENOS Y LIGNANOS

3.5.1.2. FLAVONOIDES ⁽⁹⁾

Flavo proviene del latín flavus y significa de color entre amarillo y rojo, y flavonoide, se refiere a un grupo aromático, pigmentos heterocíclicos que contienen oxígeno ampliamente distribuido entre las plantas, constituyendo la mayoría de los colores amarillo, rojo y azul de las plantas y frutas. Por ende se encuentran en abundancia en las uvas, manzanas, cebollas, cerezas, repollos; además de ser parte del árbol ***ginkgo biloba*** y la ***Camellia sinensis*** (té verde). Siendo que al consumirlos obtengamos de

ellos propiedades antiinflamatorias, antimicrobianas, antitrombóticas, antialérgicas, antitumorales, anticancerígenas y antioxidantes. De esta última, principalmente, radica su función en el sistema nervioso, pues se ha visto relación de protección en enfermedades neurodegenerativas ⁽⁹⁾

Estructura y clasificación ⁽⁹⁾

Los flavonoides están compuestos de dos anillos fenilos(A y B), ligados mediante un anillo pirano (C) lo cual nos deja en un esqueleto de difenilpiranos: C6-C3-C6 (figura), común en la mayoría de los flavonoides.

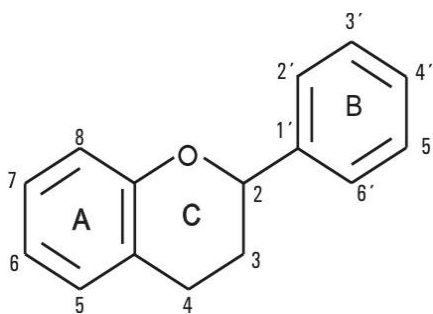


Figura N°4: Estructura de flavonoide con numeración y especificación de cada heterociclo.

Los flavonoides se dividen en antocianinas y antoxantinas. Las antocianinas son las moléculas que poseen algunos pigmentos de color, como rojo, azul y morado. Antoxantinas son moléculas incoloras o de color blanco a amarillo y se subdividen en cinco grupos. Estas son las flavonas, flavonoles, flavanonas (o catequinas), los isoflavonones. Sustituciones a los anillos A y B dan lugar a compuestos diferentes dentro de cada clase de flavonoides. Estas sustituciones pueden incluir la oxigenación, alquilación, glicosilación, la acilación y sulfonación ⁽¹⁵⁾

Cuadro N° 6: Clasificación de flavonoides ⁽⁸⁾

Nombre	Descripción	Ejemplo
Antocianidinas	Tiene un grupo –OH unido en posición 3, pero además poseen un doble enlace entre los carbonos 3 y 4 del anillo C.	Antocianidina
Flavanoles	Con un grupo –OH en posición 3 del anillo C.	Catequina
Flavonas	Poseen un grupo carbonilo en posición 4 del anillo C y carecen del grupo hidroxilo en posición C3	Diosmetina
Flavonoles	Grupo carbonilo en posición 4 y un grupo –OH en posición 3 del anillo C.	Quercitina
Isoflavonas	Tienen el anillo B en la posición 3 del anillo C.	Daidzeina

Localización en los alimentos ⁽⁹⁾

Los flavonoides se encuentran en numerosos frutos, plantas y semillas; logrando más de 5,000 distintos flavonoides. Por lo cual podemos encontrarlos en los siguientes grupos:

- Ácido elágico: se encuentra en frutas como la uva y las verduras.
- Antocianidinas: pigmentos responsables de los colores rojo-azulado y rojo de las cerezas.
- Catequina: se encuentra en el té negro y verde.
- Citroflavonoides: como la Quercitina, limoneno, rutina y naranjina.
- Isoflavonoides: tales como la genisteína y la daidzeína, presentes en los alimentos de soya como tofu, leche, proteína vegetal y harina.
- Kaemferol: encontrándose en brócoles, puerros, remolacha roja y rábanos.
- Proantocianidinas: que aparecen en las semillas de las uvas, en el extracto de corteza de pino marino y en el vino tinto.

El valor medio de la ingesta de flavonoides es de 23 mg al día. Y el principal flavonoide consumido es la Quercitina, siendo el té su principal fuente ⁽⁹⁾

3.5.1.3. ACIDOS FENOLICOS ⁽¹⁵⁾

Los ácidos fenólicos constituyen aproximadamente un tercio de los fenoles dietéticos, que pueden estar presentes en las plantas en formas libres y ligadas. Los ácidos fenólicos se pueden clasificar en dos subgrupos en ácidos hidroxibenzoico y hidroxicinámico. ⁽¹⁵⁾

- **Ácidos hidroxibenzoico:** tienen en común la estructura C6-C1 e incluyen los ácidos: gálico, p- hidroxibenzoico, vanílico entre otros. El ácido gálico es el hidroxibenzoato más importante y se sintetiza a partir de fenilalanina. El té negro y vino tinto proporciona ricas fuentes alimentarias de ácido gálico.
- **ácidos Hidroxicinamicos:** son compuestos aromáticos con una cadena lateral de tres carbonos (C6-C3), cafeico, p-cumárico, y los ácidos sinápico son los representantes más comunes.

3.5.1.4. TANINOS ⁽¹⁴⁾⁽¹⁵⁾

Los taninos son compuestos de alto peso molecular relativamente (peso molecular entre 500 y 3000 Da), que constituyen el tercer grupo más importante de compuestos fenólicos. Ellos pueden subdividirse en hidrolizables y taninos condensados.

- **Taninos hidrolizables** contienen un núcleo central de alcohol polihídrico tal como la glucosa y los grupos hidroxilo, que están esterificados,

ya sea parcial o totalmente por el ácido gálico (galotaninos) o ácido hexahidroxidifenico (elagitaninos).

- **Los taninos condensados:** son estructuralmente más complejos que los taninos hidrolizables. Son principalmente los productos polimerizados de flavan-3-oles y flavan-3,4-dioles o una mezcla de los dos. Los Taninos condensados están ampliamente distribuidos en frutas, vegetales, forraje, plantas, cacao, vino tinto y ciertos granos alimenticios como el sorgo, leguminosas entre otras.

3.5.1.5. ESTILBENOS Y LIGNINAS ⁽¹⁵⁾

- **Estilbenos:** Tienen una estructura C6-C2-C6 y se sabe que son fitoalexinas, un clase de compuestos antibióticos producida como una parte del sistema de defensa en las plantas contra la enfermedad. Pequeñas cantidades de estilbenos están presentes en la dieta humana, y el principal representante es el resveratrol, que existe tanto en las formas cis y trans, sobre todo en formas glicosiladas. Las uvas, cacahuetes y sus productos se consideran las fuentes dietéticas más importantes de resveratrol.

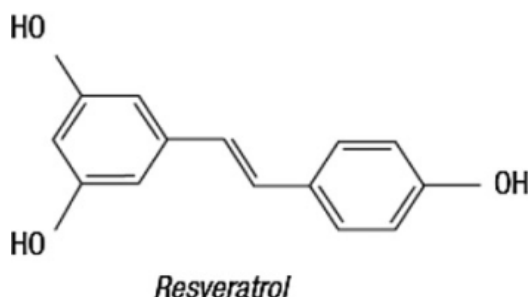


Figura N° 5: Estructura química del resveratrol

- **Lignanos:** Son producidos por dimerización oxidativa de dos unidades de fenilpropano. El interés en lignanos y sus derivados sintéticos están creciendo debido a las posibles aplicaciones en la quimioterapia del cáncer y muchos otros efectos farmacológicos.

3.6. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE ⁽¹⁵⁾

Aunque el cuerpo tiene una serie de defensas endógenas, los antioxidantes de fuentes dietéticas también tienen un papel importante que desempeñar en los radicales libres y prevenir el daño. Además de los antioxidantes dietéticos comunes (vitaminas C y E), los compuestos fenólicos son considerados como potentes antioxidantes en los sistemas biológicos in vitro. La capacidad antioxidante de los flavonoides es mucho más fuerte que la de las vitaminas C y E. Los efectos protectores se han atribuido a su capacidad de transferir electrones a los radicales libres, la quelación de catalizadores metálicos, activar enzimas antioxidantes, inhibir oxidasas, reducir los radicales de la α -tocoferol, mitigar el estrés oxidativo causado por el óxido nítrico, aumentar los niveles de ácido úrico.

MECANISMO DE ACCION ⁽¹⁵⁾

Los polifenoles se han encontrado para ser fuertes antioxidantes primarios, por mecanismo de ruptura de cadena, que puede neutralizar los radicales libres donando átomos de hidrógeno o electrones a los radicales libres resultando la formación de productos más estables. Cuando estos antioxidantes, por ejemplo flavonoides (FI-OH), están presentes en cantidades traza, pueden retardar o inhibir el paso de iniciación al reaccionar con un radical (figura N° 6) y, como consecuencia, reducir los radicales ($R \bullet$) a un no-producto radical (RH), convirtiéndose ellos mismo en un radical oxidado (FI-O \bullet).

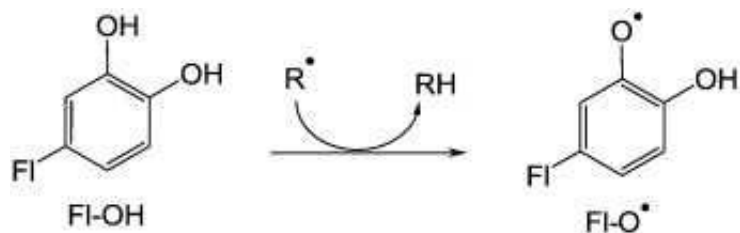


Figura N° 6: Reacción química de un antioxidante con un radical libre.

El radical formado debe tener baja reactividad y, por tanto, ser incapaz de reaccionar con los componentes biológicos. Sin embargo, los radicales libres formados a partir del antioxidante (FI-O •) se puede conectar a otros radicales más reactivos (R •), adquiriendo una estructura quinona estable, es decir, un complejo estable no radical, FI-quinona, (figura N° 7), deteniendo así las reacciones en cadena. Con más frecuencia, actúan como atrapadores de radicales directos de las reacciones en cadena de la peroxidación lipídica.

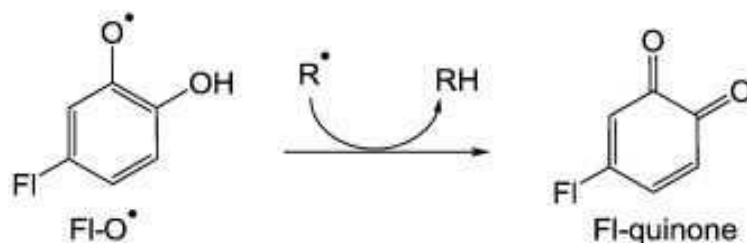


Figura N° 7: Reacción química entre un radical antioxidante y un radical libre.

Los polifenoles son conocidos como quelantes de metales. Los polifenoles pueden actuar por un mecanismo secundario (prevención), al disminuir la velocidad de oxidación de la etapa de iniciación. La quelación de metales de transición tales como Fe^{2+} directamente puede reducir o inhibir las formaciones de radicales libres a través de la reacción de Fenton, evitando así su efecto catalizador en la formación de EROs, así como la oxidación causada por radicales hidroxilo altamente reactivos ⁽¹⁵⁾

Se ha encontrado que los polifenoles en realidad pueden funcionar como un co-antioxidante (sinergista), y están implicados en la regeneración de las vitaminas esenciales. Como un ejemplo, ácido cafeico y p-cumárico puede regenerar la vitamina E mediante la reducción de los radicales α – tocoferilo.

La actividad antioxidante de los polifenoles están relacionados con su estructura, y una serie de importantes factores determinantes estructurales han sido identificados. En el caso de los ácidos fenólicos, la actividad antioxidante depende de los números y las posiciones de los grupos hidroxilo en relación con el grupo carboxilo funcional. ⁽¹⁵⁾

Con respecto a su estructura, los flavonoides con sustituyentes dihidroxílicos en posiciones 3' y 4' en el anillo B se muestran más activos como antioxidantes y es potenciado este efecto por la presencia de un doble enlace entre los carbonos 2 y 3, un grupo OH libre en la posición 3 y un grupo carbonilo en la posición 4. ⁽¹⁵⁾

Conforme a lo anterior mencionado, la Quercitina es el flavonoide que reúne los requisitos para ejercer una efectiva función antioxidante, pues ésta es cinco veces mayor que la de las vitaminas C y E. Existe efecto sinérgico con las vitaminas aludidas. Pues el ácido ascórbico reduce la oxidación de la quercetina, de manera tal que combinado con ella permite al flavonoide mantener sus funciones durante más tiempo. Por su parte la quercetina protege de la oxidación a la vitamina E. Los flavonoides retiran oxígeno reactivo, especialmente en forma de aniones superóxidos, radicales hidroxilos, hidroperóxidos y peróxidos lipídicos. ⁽¹⁵⁾

3.7. PRODUCTOS EN ESTUDIO ⁽²⁷⁾ ⁽⁸⁾ ⁽¹⁹⁾

3.7.1. CAÑA DE AZÚCAR

Nombre científico: ***Saccharum officinarum***

Nombre común: caña de azúcar, caña noble.

La caña de azúcar pertenece a la familia de las gramíneas y al género *Saccharum*, es una planta tropical perenne con tallos gruesos y fibrosos que pueden crecer entre 3 y 5 metros de altura. Éstos contienen una gran cantidad de sacarosa que se procesa para la obtención de azúcar. La caña de azúcar es uno de los cultivos agroindustriales más importantes en las regiones tropicales llegó al continente americano en el año de 1541. El período vegetativo oscila entre uno y dos años dependiendo de la variedad y características de la zona donde se encuentre.

La caña de azúcar requiere altas temperaturas durante el período de crecimiento y bajas temperaturas durante el período de maduración. Los meses de enero, febrero, marzo y abril, constituyen el período favorable para la maduración de la caña de azúcar.

Tanto las raíces y los tallos de la caña de azúcar se utilizan en la medicina ayurvédica para el tratamiento de la piel y las infecciones del tracto urinario, así como para la bronquitis, enfermedades del corazón, pérdida de la producción de leche, tos, anemia, estreñimiento así como debilidad general. En el género *Saccharum* se conocen cinco clases de flavonoides: antocianinas, catequinas, chalconas, flavonoles y flavonas que poseen todas, una estructura en común C6-C3-C6. Estudios revelan que el jugo de caña es una fuente rica de antioxidantes.

Los productos de la caña de azúcar son el azúcar blanco, azúcar moreno y melaza.

3.7.1.1. Procesos de Obtención de melaza, azúcar blanco y moreno⁽³⁶⁾

- **Almacenamiento:** La caña después de ser cortada es llevada a patios de almacenamiento en el ingenio.

- **Extracción del jugo:** Este proceso se lleva a cabo en una serie de cuchillas desmenuzadoras y molinos extractores. La caña desmenuzada pasa a los molinos donde se efectúa el proceso de extracción del jugo, luego esta caña es rociada con agua caliente de esta forma se extrae más del 90 % del azúcar que hay en la caña quedando una parte remanente en el bagazo, el cual va a las calderas como combustible.

- **Sulfitación:** Proceso que elimina sustancias coloreadas, utilizada solo para la obtención de azúcar blanco.

- **Alcalización:** Proceso que minimiza pérdida de sacarosa y precipita impurezas orgánicas e inorgánicas.

- **Clarificación:** Proceso en el que se separan los sólidos insolubles del jugo diluido. El lodo (sólido) es evacuado por la parte inferior del clarificador mientras que el jugo clarificado, o jugo claro, es extraído por la parte superior.

- **Filtración:** Proceso en el que se separa el jugo de la cachaza contenida en el lodo gracias a la acción de filtros rotatorios de vacío. Estos filtros retienen la cachaza y dejan pasar el jugo filtrado.

- **Evaporación:** Proceso en el que se evapora la mayor cantidad del agua contenida en el jugo claro para obtener meladura.
- **Cristalización:** Proceso en el cual se forman los cristales de sacarosa mediante el uso de material semilla. En los tachos se obtienen masas como diferentes proporciones de cristales y miel, componentes que luego son separados en las centrifugas.
- **Centrifugación:** Proceso a través del cual los cristales de sacarosa contenidos en las masas resultantes de la cristalización son separados de la miel (melaza).
- **Secado:** Proceso que se efectúa con aire caliente para retirar la mayor cantidad de humedad posible del azúcar.

3.7.2. AZUCAR ⁽²²⁾

Con el nombre de azúcar (sacarosa) se designa al producto obtenido industrialmente de la caña de azúcar, (***Saccharum officinarum***), en suficiente estado de pureza para la alimentación humana.

La sacarosa es un hidrato de carbono, es decir, está compuesta de átomos de carbono, hidrogeno y oxígeno, es el edulcorante más universalmente utilizado en toda clase de productos alimenticios (helados, bebidas refrescantes, néctares, productos de confitería, etc.). Su fórmula empírica es $C_{12}H_{22}O_{11}$ y su peso molecular 342. Funde a unos 170-180°C y es muy soluble en agua, se hidroliza en soluciones acidas liberando sus dos componentes (glucosa y fructosa).

El azúcar rubio, moreno o terciado es el azúcar crudo de color amarillento o pardo, pegajoso al tacto, soluble casi totalmente en agua, dando una solución amarillenta y turbia. Este tipo de azúcar contiene un 85-95 % de sacarosa y un 3% de sales, siendo el resto humedad. En cuanto a materias insolubles en agua caliente no contiene más de un 0.15%.

Tabla N° 1: Recopilación de resultados obtenidos de fenoles, flavonoides y capacidad antioxidante en estudios anteriores en azúcar moreno. ⁽²²⁾

Fenoles totales mg GAE/100 g producto	Flavonoides (mg Quercitina/100 mL)	Capacidad antioxidante (μ mol de Trolox/mL)
37.2 ⁽¹⁸⁾	No especifica	No especifica
32'319 (\pm 10'309) ⁽¹⁹⁾	78'14 (\pm 7'91)	35'08 (\pm 1'94)

El azúcar blanquilla o azúcar blanco cristalizado es el procedente de los primeros productos de extracción. Tiene un color blanco o ligeramente amarillento y es totalmente soluble en agua, con más del 99.7 % de su composición como sacarosa pura y el residuo insoluble en agua caliente debe ser inferior al 0.15%. ⁽²²⁾

Tabla N°2: Recopilación de resultados obtenidos de fenoles y capacidad antioxidante en estudios anteriores en azúcar blanco.

Fenoles totales mg GAE/100 g producto	Capacidad antioxidante(μ mol de Trolox/mL)
3'15 mg ⁽¹⁸⁾	No aplica
No aplica	10 mol Trolox/100 g producto ⁽²⁷⁾

3.7.3. MELAZA ⁽²²⁾

- Las melazas o mieles finales, suelen ser definidas, por muchos autores como los residuos de cristalización final del azúcar de los cuales no se puede obtener más azúcar por métodos físicos.
- Miel final o melaza de caña (no cristalizable): jarabe o líquido denso y viscoso separado de la masa cocida final, del cual no es posible cristalizar más azúcar por los métodos usuales.

Su aspecto es similar al de la miel de abeja aunque de color parduzco muy oscuro, prácticamente negro. El sabor es dulce, agradable, según los expertos cuanto más oscura sea, más sabor y nutrientes tendrá.

En el mercado internacional, la melaza de caña tiene cuatro destinos básicos: alimento animal, producción de alcohol, reprocesamiento industrial para extraer el azúcar contenido en ella y producciones industriales como: levadura, ácido cítrico, lisina, entre otros.

COMPOSICION

La composición de las melazas es muy heterogénea y puede variar considerablemente dependiendo de la variedad de caña de azúcar, suelo, clima, periodo de cultivo, eficiencia de la operación de la fábrica, sistema de ebullición del azúcar, tipo y capacidad de los evaporadores, entre otros.

Los fenoles presentes en la melaza, provienen de la parte fibrosa de la caña, estos se derivan de los ácidos hidroxicinámico y parahidroxibenzóico.

Tabla N° 3: Recopilación de datos obtenidos de capacidad antioxidante en estudios anteriores en melaza.

Capacidad antioxidante (μmol de Trolox/mL)
4890 μmol / 100 g ⁽²⁷⁾

3.8. MÉTODOS A UTILIZAR PARA LA DETERMINACION DE COMPUESTOS FENOLICOS, FLAVONOIDES, Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.

3.8.1 Determinación de fenoles totales por el método de Folinciocalteu ^{(15) (10) (31)}

El ensayo espectrofotométrico fue desarrollado por Folinciocalteu (F-C) se utiliza para determinar los compuestos fenólicos totales (TPC: compuestos fenólicos totales). Se fundamenta en una reacción de oxidación / reducción que es el mecanismo básico; gracias al carácter reductor del reactivo F-C. Se utiliza como reactivo una mezcla de ácidos fosfowolfrámico y fosfomolibdico en medio básico, que se reducen al oxidar los compuestos fenólicos, originando óxidos azules de wolframio (W_8O_{23}) y molibdeno (Mo_8O_{23}). La absorbancia del color azul desarrollado se mide a una λ de 765 nm, la intensidad de absorción de luz a esa longitud de onda es proporcional a la concentración de fenoles.

El método consiste en una calibración con un compuesto fenólico puro, la extracción de los fenoles de la muestra, y la medición de la absorbancia después de la reacción de color. El ácido gálico es usualmente utilizado como estándar para producir la curva de calibración. El contenido fenólico total se expresa en equivalentes de ácido gálico (GAE). Para cualquier punto de vista, los resultados siempre deben ser reportados sobre una base equivalente para evitar la percepción de que se está midiendo la cantidad de la sustancia de referencia.

La oficina Internacional de la viña y el vino (OIV), es el único cuerpo internacional que certifica los procedimientos específicos para el análisis de vino, acepta el método de Folinciocalteu como el procedimiento estándar para el análisis de fenoles totales (OIV 1990). Aunque el método fue

desarrollado para la aplicación por primera vez a análisis de vinos y uvas, se pueden adoptar para otros productos alimenticios.

3.8.2. Determinación de flavonoides por el método de tricloruro de Aluminio ^{(21) (34)}

El uso de cloruro de aluminio (AlCl_3) en el diagnóstico de la presencia de determinados grupos químicos se empleó primero para antocianinas. En 1954, Harborne sugirió el uso de cloruro de aluminio para la determinación espectrofotométrica de la presencia de determinados grupos químicos en flavonoides.

Recientemente, se ha propuesto el uso de métodos espectrofotométricos para la determinación de flavonoides totales en las plantas, utilizando AlCl_3 . En 1992 desarrollaron un método para determinar el contenido de flavonoides en una planta mediante la adaptación del método descrito por Dowd en 1959 para quercitina, que se basa en el uso de cloruro de aluminio.

El catión de aluminio forma complejos estables con flavonoides en metanol, que se producen en el análisis espectrofotométrico un desplazamiento hacia longitudes de onda mayores y una intensificación de la absorción. Así, es posible determinar la cantidad de flavonoides, evitando la interferencia de otras sustancias fenólicas, especialmente ácidos fenólicos, que invariablemente acompañan a los flavonoides en los tejidos vegetales.

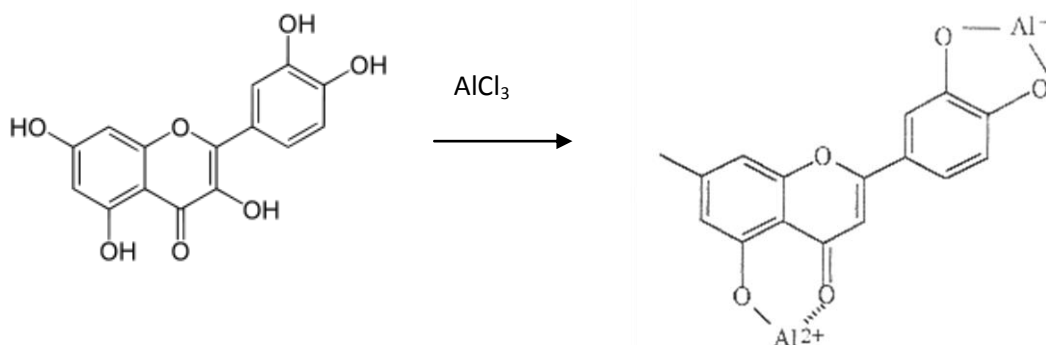


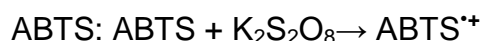
Figura N° 8: Complejo flavonoide-Al

El método es exacto, es decir, que es reproducible, proporcionando desviaciones muy pequeñas o ninguna diferencia entre una prueba y otra sobre la misma muestra.

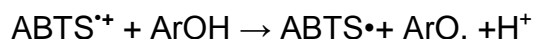
3.8.3. METODO ABTS/TEAC ⁽¹⁰⁾

El ensayo ABTS / TEAC (Capacidad antioxidante en equivalente Trolox) mide la decoloración, de un radical ABTS⁺, el cuál presenta un color verde intenso.

La reacción en la que se basa este ensayo puede resumirse como sigue:



$$\lambda \text{ max} = 734 \text{ nm}$$



Pese a que otras longitudes de onda tales como 415 y 645 nm se han usado en el ensayo ABTS/TEAC, el pico a la longitud de onda 734 nm ha sido preferido debido a la menor interferencia de otros pigmentos de las plantas.

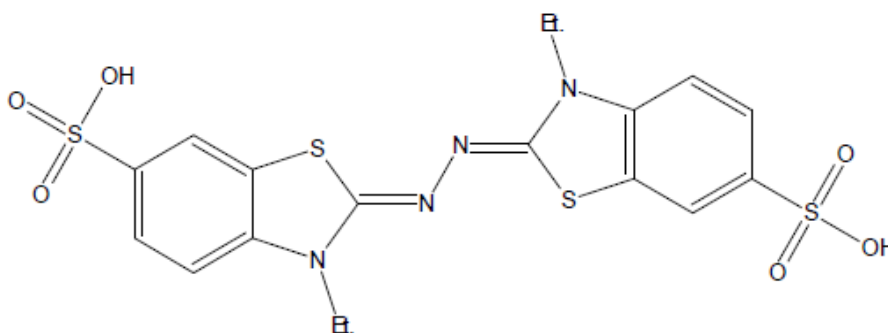


Figura N° 9: Estructura química de ABTS proyectada

El ensayo ABTS mide la capacidad antioxidante en equivalentes de Trolox. Este ensayo fue reportado por primera vez por Miller y Rice-Evans (Miller, 1993). El ensayo ABTS se basa en la capacidad de captura que tiene el anión radical $ABTS^{\bullet+}$ [del ácido 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)] de vida larga. El ABTS es oxidado por los radicales peróxido u otros oxidantes a su forma de radical catión $ABTS^{\bullet+}$ el cual es de color intenso, y la capacidad antioxidante de los compuestos de prueba se mide como inhibición óptica complementaria a la absorbancia (disminución del color), al reaccionar directamente con el radical $ABTS^{\bullet+}$. Los resultados de los compuestos a analizar se expresan en relación con equivalentes de Trolox utilizado como reactivo de calibración.

Re y Rice- Evans en 1999 desarrollaron un ensayo mejorado de decoloración del catión radical $ABTS^{\bullet+}$ usando persulfato como oxidante, compensando con ello las debilidades del ensayo original ferril-mioglobulina/ABTS.

El radical mono catión preformado de 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico) ($ABTS^{\bullet+}$) se genera por la oxidación de ABTS con persulfato de potasio y se reduce en presencia de antioxidantes donadores de hidrogeno. Las influencias de la concentración de antioxidante y la duración de la reacción de inhibición del radical se tienen en cuenta al determinar la actividad antioxidante. Este ensayo mejora claramente el original Ensayo TEAC (la mioglobina ferrilo / ensayo ABTS) para la determinación de la actividad antioxidante en numerosas maneras. En primer lugar, consiste en la generación directa del radical ABTS sin la participación de un radical intermediario. En segundo lugar, es un ensayo de decoloración, por lo que el catión radical es pre-formado antes de la adición de la muestra antioxidante. Tercero, es aplicable tanto a los sistemas acuosos y lipófilo.

El ensayo original del $ABTS^{\bullet+}$ se basa en la activación de la metamioglobina con peróxido de hidrógeno en presencia de ABTS para producir el radical

catiónico, en la presencia o ausencia de antioxidantes. Esto ha sido criticado sobre la base de que cuanto más rápido se da la reacción de los antioxidantes también puede contribuir a la reducción del radical ferrilo de mioglobina. Un formato más apropiado para el ensayo es una técnica de decoloración en la que el radical se genera directamente en una forma estable antes de la reacción con diferentes antioxidantes.

La oxidación con persulfato potásico se lleva a cabo a temperatura ambiente, en ausencia de luz, en un tiempo de 12 a 16 h. El persulfato potásico y el ABTS reaccionan estequiométricamente (1:0.5). Una vez generado el radical la medida se realiza mediante un ensayo de post-adición. La generación del radical catiónico ABTS constituye la base de uno de los métodos espectrofotométricos que se han aplicado a la medición de la actividad antioxidante total de soluciones de sustancias puras, mezclas acuosas y bebidas.

CAPITULO IV
DISEÑO METODOLOGICO

4.0 DISEÑO METODOLOGICO

4.1. Tipo de estudio

Experimental: Durante el desarrollo del proyecto, se realizaron análisis espectrofotométricos para determinar fenoles totales, flavonoides y la capacidad antioxidante de la melaza, azúcar blanco y moreno.

Prospectivo: Por ser el primer estudio realizado en el país, para determinar antioxidantes, en melaza, azúcar blanco y azúcar moreno.

4.2. Investigación bibliográfica

El proyecto se basó en una revisión bibliográfica sobre antioxidantes, con énfasis en fenoles, flavonoides y capacidad antioxidante con su respectivo método de análisis, así como una descripción general de los productos a estudiar con el fin de desarrollar la investigación desde un enfoque teórico y práctico

La investigación ha sido recolectada de las siguientes fuentes:

- Biblioteca “Dr. Benjamín Orozco” Facultad de Química y Farmacia
- Biblioteca de la Universidad Salvadoreña “Alberto Masferrer”
- Biblioteca “ P. Florentino Idoate, S.J” Universidad José Simeón Cañas
- Biblioteca de la Facultad Multidisciplinaria Oriental de la Universidad de El Salvador.
- Internet.

4.3. Investigación de Campo:

Universo y muestra

- 4.3.1.** Universo: Melaza, Azúcar Blanco y Azúcar Moreno, producidos en el Ingenio Chaparrastique el 24 de febrero de 2012, y recolectada el 14 de agosto de 2012.
- 4.3.2.** Muestra: Dirigida y puntual, de referencia compuesta de varios sacos de azúcar y un tanque de melaza, de los que se extrajeron aproximadamente 12 kg tanto de azúcar blanco como de azúcar moreno, y 15 kg de melaza, selecciona de la fecha de producción anteriormente mencionada, y almacenada (Ver anexo N° 4), siendo analizada por el método de Folinciocalteu para determinar fenoles en los meses de Enero a Junio, Tricloruro de Aluminio para determinar flavonoides, durante los meses de Marzo a Junio, y radical catiónico Acido 2,2- Azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS^{•+}) para determinar la actividad antioxidante en los meses de Abril a Junio.

Con el fin de evaluar la variación de la capacidad antioxidante, se realizó el ensayo de ABTS mensualmente, durante tres meses obteniendo un valor por cada mes, para ello se empleó el diseño estadístico de contraste de hipótesis por la t de student de dos colas, con un nivel de significancia del 5% ⁽³⁰⁾

4.4. PARTE EXPERIMENTAL

4.4.1. Muestra: Melaza, azúcar blanco y azúcar moreno producidas en el Ingenio Chaparrastique.

de melaza y se disolvieron en 100 mL de agua destilada obteniendo un grado Brix de 0.42°.

Con el fin de mantener las 3 muestras en el mismo parámetro de 20 ° brix se realizó un factor de corrección en la melaza.

Factor de Corrección de la melaza

4.4.3. Determinación de Fenoles ⁽³⁰⁾

Para la determinación de fenoles totales, se utilizó el método de Folinciocalteu, el cual mide la intensidad del color producido cuando el reactivo de Folinciocalteu, reacciona con los fenoles contenidos en la muestras, el estándar utilizado es ácido gálico y los resultados se expresan en mg equivalentes a ácido gálico por gramo de muestra.

Reactivos. (Ver preparación en ANEXO N° 2)

- Reactivo de Folinciocalteu 2N
- Carbonato de sodio 20%
- Ácido gálico.
- Agua destilada

PROCEDIMIENTO ⁽³⁰⁾

- 1- Colocar 1.0 mL de la solución preparada por muestra, un estándar de calibración de ácido gálico (5 - 500 µg/mL) o de blanco (agua desionizada o destilada) en un balón volumétrico de 100.0 mL.

- 2- Añadir 70 mL de agua destilada, seguido por 5.0 mL de reactivo Folincioalceu, agitar para mezclar e incubar de 1 a 8 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. (El periodo de incubación no debe ser mayor de 8 minutos).
- 3- Añadir 15 mL de solución de carbonato de sodio 20%.
- 4- Aforar con agua destilada. Mezclar e incubar por 2 horas a temperatura ambiente en oscuridad.
- 5- Leer absorbancia a una longitud de onda 765 nm en un espectrofotómetro Ultravioleta-Visible.

* El análisis se llevó por duplicado para cada muestra.

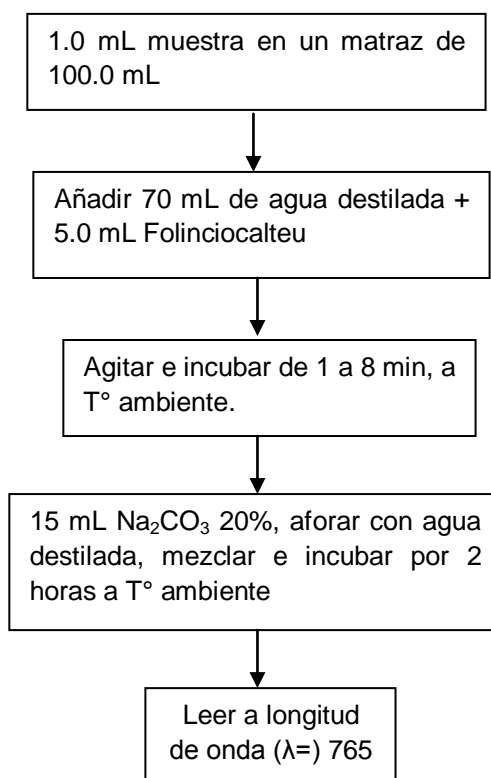
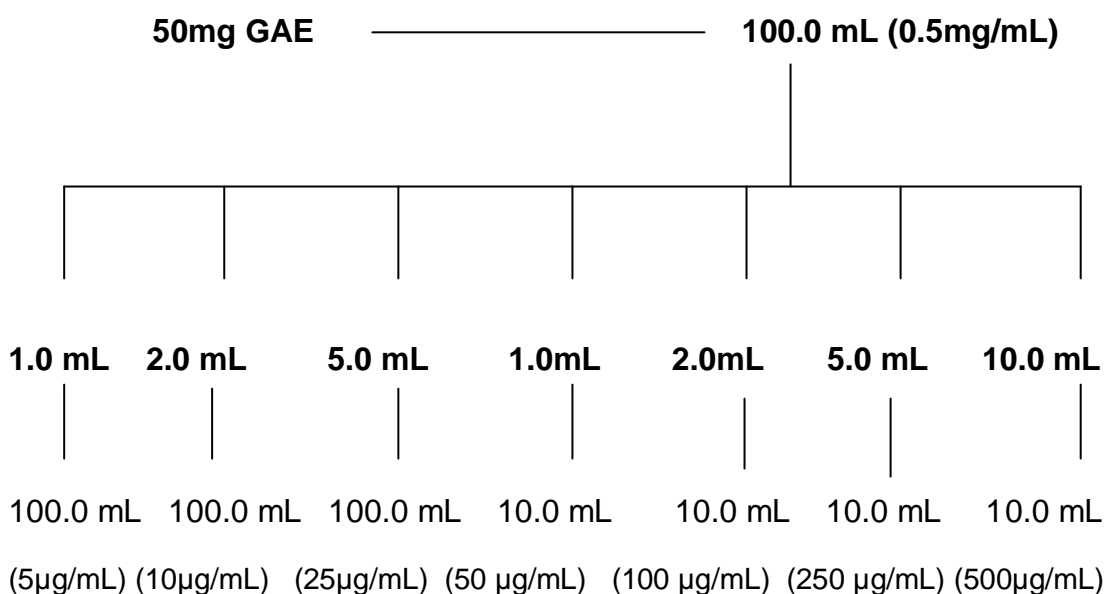


Figura N° 11: Diagrama de flujo, desarrollo del método de Folincioalceu.

Preparación de los estándares de ácido gálico.

Disolver 50 mg de ácido gálico en 10 mL de etanol y luego se diluye con agua destilada hasta 100.0 mL. Diluir 1.0, 2.0, 5.0 y 10.0 mL hasta 10.0 mL con agua destilada para obtener estándares con concentraciones de 50, 100, 250 y 500 $\mu\text{g/mL}$ de ácido gálico. Diluir 1.0, 2.0, 5.0 mL hasta 100.0 mL con agua destilada para obtener concentraciones de 5, 10 y 25 $\mu\text{g/mL}$ de ácido gálico.

Estándar de ácido gálico (Determinación de fenoles)



CALCULOS

1. Restar la absorbancia del blanco de todas las lecturas de las muestras o estándares
2. Elaborar una curva de calibración para determinar la concentración correspondiente de la muestra
3. Calcular la regresión lineal de la curva mediante la ecuación:

Ec. (1)

Dónde:

: Absorbancia de la muestra

: Concentración desconocida de la muestra

: Ordenada del origen

: Pendiente

4. Calcular la pendiente (). (Ecuación 2)

$$\text{-----} \quad \text{Ec. (2)}$$

Dónde:

: Concentración del estándar

: Absorbancia del estándar

: Promedio de la concentración del estándar.

: Promedio de la absorbancia del estándar.

5. Calcular la ordenada en el origen (b_0). (ecuación 3)

$$\text{Ec. (3)}$$

Dónde:

: Promedio de la absorbancia del estándar

: Pendiente

: Promedio de las concentraciones de los estándares

6. Calcular el coeficiente de correlación.(ecuación 4)

$$\frac{\sum (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum (x_i - \bar{x})^2 \sum (y_i - \bar{y})^2}} \quad \text{Ec. (4)}$$

7. Despejar de la ecuación 1 :

$$\frac{A}{B} \quad \text{Ec. (1)}$$

Representa la cantidad de fenoles totales en mg equivalentes de ácido gálico por mL de solución de muestra.

8. Corregir con el factor de dilución empleado.

Nota: utilizar el factor de corrección para la melaza debido a la dilución hecha

9. Dividir este valor final por la masa introducida de la muestra en el momento de hacer la disolución.

4.4.4. Determinación de flavonoides ⁽¹⁷⁾

El contenido de flavonoides se determinó con el método de tricloruro de aluminio, utilizando como estándar la Quercitina, los resultados son expresados como mg equivalentes a Quercitina por gramo de muestra.

Reactivos. (Ver preparación en ANEXO N° 2)

- Solución de AlCl_3 al 2% en etanol
- Solución de Quercitina 0.05%
- Etanol 80%

PROCEDIMIENTO

- 1- Añadir 1.0 mL de muestra, blanco o estándar de Quercitina (0.5-50 $\mu\text{g/mL}$) en 1.0 mL de la solución de AlCl_3 2% en etanol.
 - 2- Reposar 1 hora a temperatura ambiente en oscuridad.
 - 3- Leer la absorbancia a 420 nm
- * El análisis se llevó por duplicado para cada muestra.

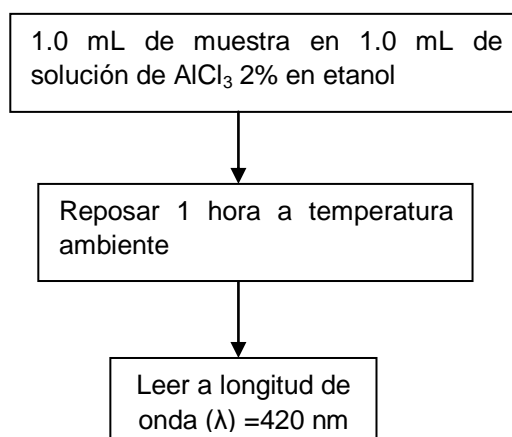
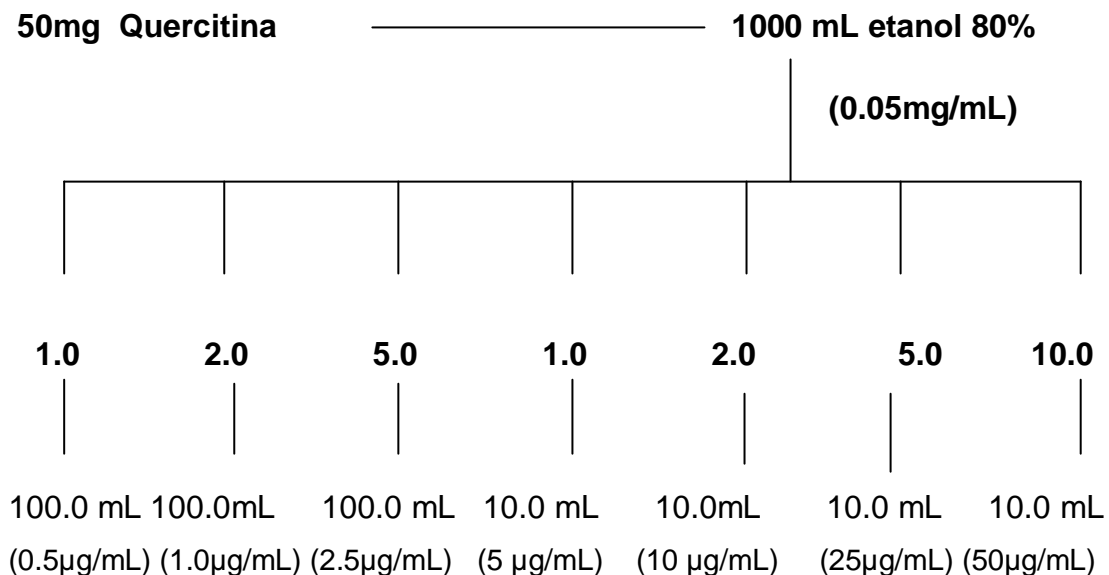


Figura N° 12: Diagrama de flujo, desarrollo del método de Tricloruro de Aluminio.

Preparación de estándares de Quercitina.

Disolver 50mg de Quercitina en etanol al 80% hasta un volumen de 1000.0 mL Diluir 1.0, 2.0, 5.0, 10.0 mL en 10.0 mL con etanol 80% para alcanzar concentraciones de 5, 10, 25, 50 $\mu\text{g/mL}$ equivalentes de quercitina y diluir 1.0, 2.0, 5.0, en 100.0 mL con etanol al 80% para alcanzar concentraciones 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, $\mu\text{g/mL}$ equivalentes de quercitina.

Estándar de Quercitina (Determinación de flavonoides)



CALCULOS

Los cálculos aplicados para determinar flavonoides por el método de tricloruro de Aluminio, son los mismos utilizados en la determinación de fenoles por el método de Folinciocalteu (ver 4.4.3)

4.4.5. Determinación de la capacidad antioxidante ⁽¹⁰⁾

Este ensayo se realizó por el método radical catiónico ABTS. El ensayo ABTS / TEAC (capacidad antioxidante de equivalente ácido 6-hidroxi-2, 5, 7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico (Trolox)) mide la decoloración, de un radical ABTS⁺, el cuál presenta un color azul-verde intenso.

El estándar utilizado es Trolox, los resultados se expresan en mg equivalentes a Trolox por gramo de muestra.

REACTIVOS. (Ver preparación en ANEXO N° 2)

- * ABTS (ácido 2,2'- azinobis (3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico).
- * Persulfato potásico 2.45 mM

- * Etanol absoluto
- * Trolox(ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico)

PROCEDIMIENTO (27)

Preparación del radical ABTS:

1- Mezclar a partes iguales la solución de ABTS 7 mM y la de Persulfato de potasio 2.45 mM.

*la mezcla se mantiene en oscuridad a temperatura ambiente durante 16 horas para la formación del radical

*La solución de ABTS⁺ se diluye con etanol para obtener una absorbancia de 0.7 ± 0.02 a 734nm.

2- Adicionar 0.1 mL de la muestra, blanco o estándar de Trolox (5-500 $\mu\text{g/mL}$) a 10.0 mL de la solución del radical ABTS⁺, mezclar.

3- Leer la absorbancia a 734 nm a una temperatura de 30 °C exactamente 1 min de la lectura inicial hasta 6 min de la lectura final.

- * El análisis se llevó por duplicado para cada muestra.

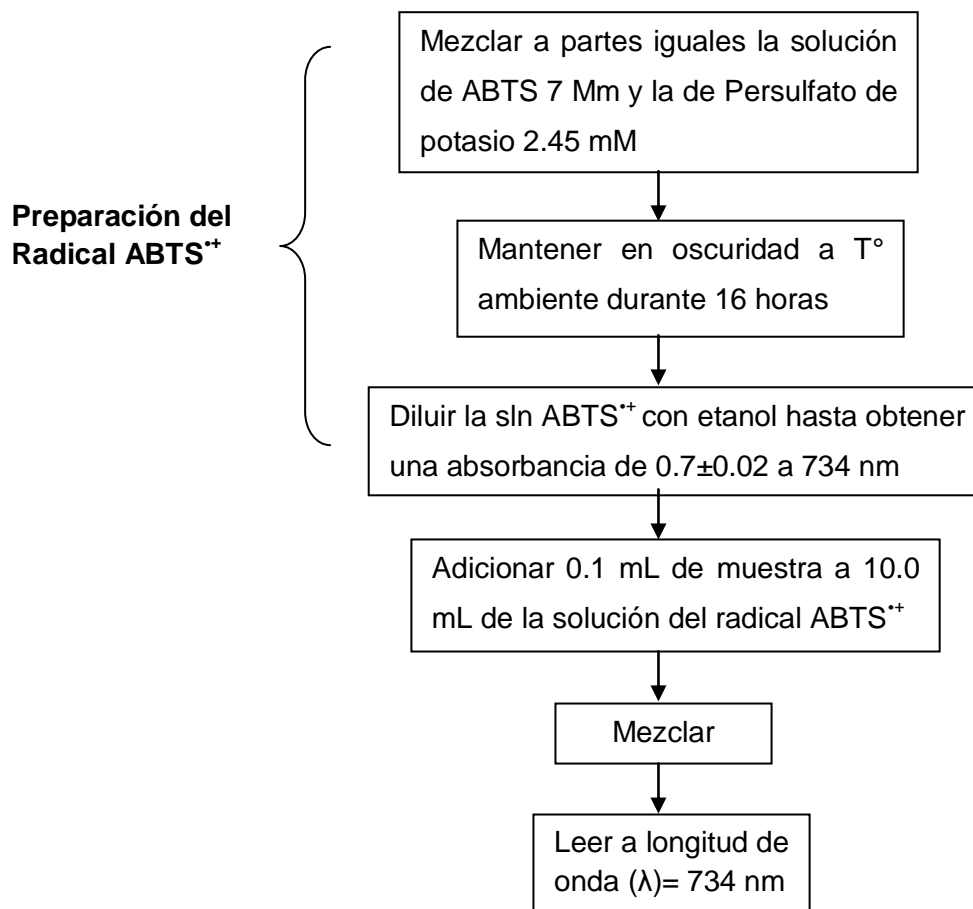
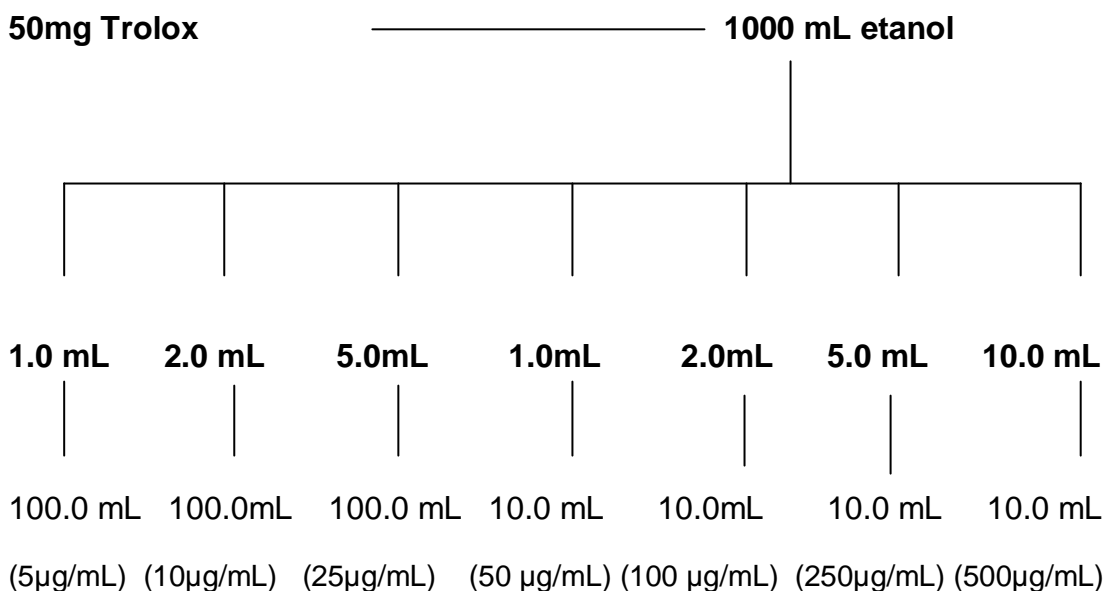


Figura N° 13: Diagrama de flujo, desarrollo del método de ABTS.

Preparación de estándares de Trolox.

Disolver 50 mg en 100.0 mL de etanol, Diluir 1.0, 2.0, 5.0, 10.0 mL en 10.0 mL de etanol para alcanzar concentraciones de 50, 100, 250 y 500 $\mu\text{g/mL}$ equivalentes Trolox. Diluir 1.0 ,2.0 ,5.0, en 100.0 mL de etanol para alcanza concentraciones de 5, 10,25 $\mu\text{g/mL}$ equivalentes Trolox.

Estándar de TROLOX (Determinación de actividad antioxidante)



CALCULOS

1. Restar la absorbancia del blanco de todas las lecturas y crear una curva de calibración.
2. Elaborar una curva de calibración para determinar la concentración correspondiente de la muestra.
3. Calcular la regresión lineal de la curva mediante la ecuación:

Ec. (1)

Dónde:

: Absorbancia de la muestra

: Concentración desconocida de la muestra

: Ordenada del origen

: Pendiente

4. Calcular la pendiente (b_1). (Ecuación 2)

$$\text{_____} \quad \text{Ec. (2)}$$

Dónde:

: Concentración del estándar

: Absorbancia del estándar

: Promedio de la concentración del estándar.

: Promedio de la absorbancia del estándar.

5. Calcular la ordenada en el origen (b_0). (ecuación 3)

$$\text{Ec. (3)}$$

6. Calcular el coeficiente de correlación.(ecuación 4)

$$\text{=====} \quad \text{Ec. (4)}$$

7. Calcular el porcentaje de inhibición del radical con la siguiente ecuación.

$$\text{_____}$$

El % de inhibición corresponde al valor de la ecuación 1.

8. Despejar de la ecuación 1. Ec.(1)

Representa la cantidad en mg equivalentes de Trolox por mL de solución de muestra.

9. Corregir con el factor de dilución empleado.

Nota: utilizar el factor de corrección para la melaza debida a la dilución hecha

10. Dividir este valor final por la masa introducida de la muestra en el momento de hacer la disolución.

4.4.6. Determinación de la variación de la capacidad antioxidante.

- **ANÁLISIS ESTADÍSTICO** ⁽³⁰⁾

El análisis estadístico empleado, para determinar si existe variación significativa en la actividad antioxidante de las muestras analizadas, fue el contraste de hipótesis por la t de student para dos colas.

Una vez obtenidos los valores promedio de cada una de las muestras se emplearon las siguientes ecuaciones:

Cálculo de la Varianza

Dónde:

Porcentaje de inhibición

Promedio de porcentaje de inhibición

Numero de datos

Cálculo del Estadígrafo de contraste

—

Dónde:

Promedio de porcentaje de inhibición

Numero de datos

Varianza

Valor inicial

- HIPOTESIS ESTADISTICAS PLANTEADAS

Hipótesis Nula H_0 : No existe variación significativa en la actividad antioxidante durante los 3 meses analizados

Hipótesis Alternativa H_a : Existe variación significativa en la actividad antioxidante durante los 3 meses analizados.

CAPITULO V
RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS

5.0 RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS

- METODO DE FOLINCIOALTEU PARA LA DETERMINACION DE FENOLES ⁽³¹⁾

A continuación se presenta la cascada de dilución por el método de Folincioaltea, realizada en el azúcar blanco, moreno y melaza para calcular su respectivo factor de dilución:

20 g azúcar blanco o moreno ————— 80 mL H₂O destilada

|

70 mL H₂O dest+5mL
F.C+15 mL Na₂CO₃ 20%

1.0 mL de solución ————— 100mL

0.5g de Melaza ————— 100 mL

|

70 mL H₂O dest+5mL
F.C+15 mL Na₂CO₃ 20%

1 mL ————— 100 mL

Cuando se realizó el método de Folincioaltea en el azúcar blanco, moreno y melaza, estas presentaron un color azul (ver figura N°14) gracias al carácter reductor del reactivo Folincioaltea, que se reduce al reaccionar con los fenoles generando este tipo de coloración.



Figura N° 14: Método de Folincioaltea en azúcar blanco, moreno y melaza.

La absorbancia de color azul desarrollado se midió a una longitud de onda de 765 nm.

En la tabla N°4 podemos apreciar las diferentes absorbancias obtenidas en la melaza, azúcar blanco y moreno, por el método de Folincioaltea, las cuales se leyeron en un espectrofotómetro Ultravioleta-visible Shimadzu UV-Mini-1240, además se presenta los factores de dilución.

Tabla N°4: Absorbancias, Factor de dilución del azúcar blanco, moreno y melaza por el método de Folinciocalteu.

Mes	Azúcar Blanco		Azúcar moreno		Melaza	
	Absorbancia	Promedio de absorbancia por mes	Absorbancia	Promedio de absorbancia por mes	Absorbancia	Promedio de absorbancia por mes
Enero/2013	0.015 0.018	0.017	-----	-----	-----	-----
Febrero/2013	0.020 0.017	0.019	-----	-----	-----	-----
Marzo/2013	0.016 0.010	0.013	0.043 0.052	0.047	-----	-----
Abril/2013	0.017 0.011	0.014	0.049 0.047	0.048	0.099 0.101	0.100
Mayo/2013	0.016 0.012	0.014	0.040 0.036	0.038	0.103 0.107	0.105
Junio/2013	0.020 0.012	0.016	0.047 0.040	0.043	0.110 0.105	0.107
Factor de dilución	8,000		8,000		10,000	

Para encontrar la concentración de fenoles para cada muestra, se realizó una curva de calibración utilizando el estándar de ácido gálico al 100 % de pureza, de la cual se prepararon todas las diluciones de los estándares con concentraciones de 5-500 µg/mL

En el siguiente cuadro se presentan las absorbancias obtenidas por los estándares de ácido gálico.

Cuadro N° 7: Concentración vs absorbancia de los estándares de ácido gálico

Concentración (mg/mL) X	Absorbancia Y
0.005	0.004
0.01	0.008
0.025	0.012
0.05	0.038
0.1	0.127
0.25	0.470
0.5	0.745

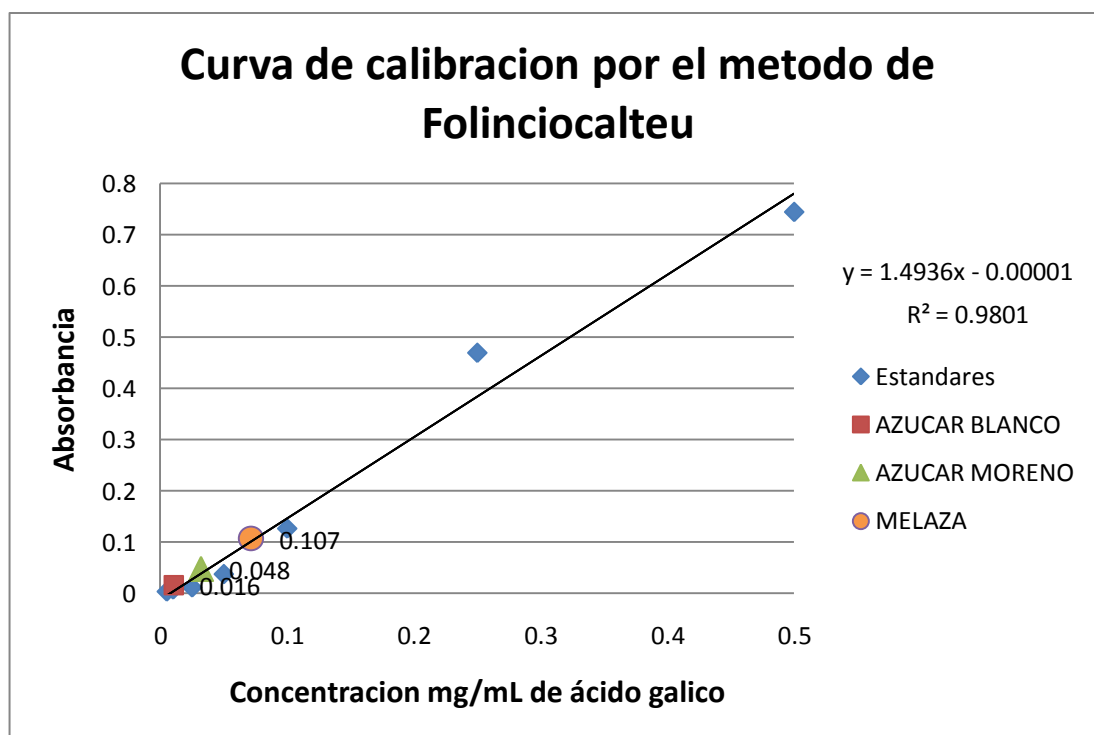


Figura N°15: Curva de calibración del método de Folincioaltea.

Para realizar la curva de calibración se graficó absorbancia vs concentración y se trazó una línea de tendencia entre los puntos, la cual tiene la siguiente ecuación de regresión lineal:

Dónde:

: Absorbancia de la muestra

: Concentración desconocida de la muestra

: Ordenada del origen

: Pendiente

La pendiente se calcula mediante la siguiente ecuación:

: Concentración del estándar

: Absorbancia del estándar

: Promedio de la concentración del estándar.

: Promedio de la absorbancia del estándar.

La ordenada en el origen se calcula mediante la siguiente ecuación:

Dónde:

: Promedio de la absorbancia del estándar

: Pendiente

: Promedio de las concentraciones de los estándares

Obteniendo los valores de la pendiente y la ordenada al origen se sustituyen en la ecuación de regresión lineal.

Para el ejemplo se tomó el valor promedio de absorbancia del azúcar blanco en el mes de abril que es de 0.014 para calcular la concentración de fenoles.

Despejando

0.00936 mg/ mL eq. GAE

0.00936 mg/ mL eq. GAE x FD

FD= 8000

$$0.00936 \text{ mg/ mL} \times 8000 = 74.92\text{mg}$$

Dividir este valor final por la masa introducida de la muestra en el momento de hacer la disolución.

(Análisis de Abril de azúcar blanco)

Para calcular el coeficiente de correlación se utilizó la siguiente ecuación:

RESULTADOS DE FENOLES POR EL METODO DE FOLINCIOALTEU

En la tabla N° 5 se observa el contenido de fenoles en cada una de las muestras de análisis, los resultados se obtuvieron en mg equivalentes de ácido gálico/g de muestra.

Tabla N° 5: Resultados mensuales de fenoles totales, por el método de Folincioaltea en azúcar blanco, moreno y melaza.

Mes	Azúcar blanco Fenoles mg GAE/g	Azúcar moreno Fenoles mg GAE/g	Melaza Fenoles mg GAE/g
Enero	4.55	-----	-----
Febrero	5.08	-----	-----
Marzo	3.47	12.58	-----
Abril	3.74	12.85	796.98
Mayo	3.74	10.17	836.84
Junio	4.28	11.51	852.78
Promedio	4.14	11.77	828.86

En la tabla N° 5 se observa que de los productos analizados, por el método de Folinciocalteu, la melaza posee el mayor contenido de fenoles, seguido por el azúcar moreno y el azúcar blanco. Debido a que durante el proceso de producción del azúcar tras la cristalización (proceso en el cual se forman los cristales de sacarosa ⁽³⁴⁾) hay pérdidas de las sustancias que aportan color (fenoles) ⁽¹⁹⁾ por lo que se ve reflejado en una disminución del contenido antioxidante, sin embargo, estas sustancias permanecen en la melaza por lo tanto es el producto que presenta el mayor contenido de fenoles en este estudio.

En el caso de la producción de azúcar blanco o moreno, para obtener azúcar blanco es necesario llevar a cabo la sulfitación (proceso que elimina sustancias coloreadas), por ello el azúcar blanco es el producto que presenta el menor contenido de fenoles.

Los resultados se expresan en mg equivalente de ácido gálico por gramo de muestra, debido a que el ácido gálico es utilizado como estándar de calibración para cuantificar fenoles, ya que es un compuesto fenólico puro.

Se observa que la diferencia del contenido de fenoles totales en cada muestra con respecto a los meses analizados se mantiene estable.

Basados en la ingesta recomendada de fenoles en la dieta (según Festy D “Antioxidantes Guía Práctica” ⁽¹¹⁾) y en el contenido de fenoles encontrados en el azúcar moreno y blanco en este estudio, a continuación se presentan los cálculos realizados para obtener el aporte de antioxidantes por cucharaditas de azúcar:

La ingesta diaria recomendada de fenoles en la dieta es de 1g/día ⁽¹¹⁾

1 cucharadita de azúcar ⁽⁴⁰⁾ = 4.6 g

Promedio del contenido de fenoles por gramo de azúcar blanco = 0.00414 g

Promedio del contenido de fenoles por gramo de azúcar moreno = 0.01177 g

- Azúcar Blanco

0.00414 g de fenoles ————— 1 g de azúcar blanco

1 g de fenoles ————— X g de azúcar blanco

$$X = 241.54 \text{ g de azúcar blanco}$$

4.6 g de azúcar blanco ————— 1 cucharadita de azúcar blanco

241.54 g de azúcar blanco ————— X cucharaditas de azúcar blanco

$$X = 52.5 = 53 \text{ cucharaditas de azúcar blanco}$$

- Azúcar Moreno

0.01177 g de fenoles ————— 1 g de azúcar moreno

1 g de fenoles ————— X g de azúcar moreno

$$X = 84.96 \text{ g de azúcar moreno}$$

4.6 g de azúcar moreno ————— 1 cucharadita de azúcar moreno

84.96 g de azúcar moreno ————— X cucharaditas de azúcar moreno

$$X = 18.46 = 18 \text{ cucharaditas de azúcar moreno}$$

Obteniendo estos resultados podemos decir:

241.54 g de azúcar blanco = 53 cdtas de azúcar blanco = 1g de antioxidantes

84.96 g de azúcar moreno = 18 cdtas de azúcar moreno = 1g de antioxidantes

METODO DE TRICLORURO DE ALUMINIO PARA LA DETERMINACION DE FLAVONOIDES ⁽²¹⁾

A continuación se presenta la cascada de dilución realizada en el azúcar blanco, moreno y melaza para calcular su respectivo factor de dilución:

20 g azúcar blanco o moreno ——— 80 mL H₂O destilada
|
1 mL de solución

—

0.5g de Melaza ——— 100 mL
|
1 mL de solución de melaza

Cuando se realizó el método de Tricloruro de Aluminio en las muestras, estas presentaron un color amarillo (ver figura N° 16), esto se debe a que el catión de aluminio forma complejos estables con el flavonoide en etanol evitando la interferencia de otras sustancias fenólicas.



Figura N° 16: Método de Tricloruro de Aluminio en azúcar blanco, moreno y melaza.

La absorbancia de color amarillo desarrollado se midió a una longitud de onda de 420 nm en un espectrofotómetro Ultravioleta-visible Shimadzu UV-Mini-1240

En la tabla N° 6 podemos apreciar las diferentes absorbancias obtenidas en la melaza, azúcar blanco y moreno por el método de Tricloruro de Aluminio, además se presenta los factores de dilución.

Tabla Nº 6: Absorbancias, Factor de dilución de azúcar blanco, moreno y melaza por el método de Tricloruro Aluminio

Mes	Azúcar Blanco		Azúcar moreno		Melaza	
	Absorbancia	Promedio de absorbancia por mes	Absorbancia	Promedio de absorbancia por mes	Absorbancia	Promedio de absorbancia por mes
Marzo/2013	0.190 0.194	0.192	0.386 0.388	0.387	-----	-----
Abril/2013	0.102 0.193	0.197	0.339 0.349	0.344	0.694 0.706	0.70
Mayo/2013	0.145 0.141	0.143	0.388 0.380	0.384	0.629 0.641	0.635
Junio/2013	0.163 0.170	0.165	0.332 0.336	0.334	0.615 0.627	0.621
Factor de dilución	80		80		100	

Para encontrar la concentración de flavonoides para cada muestra, se realizó una curva de calibración utilizando el estándar de Quercitina al 95% de pureza (ver anexo N° 3), de la cual se prepararon todas las diluciones de los estándares con concentraciones de 0.5-50 µg/mL

En el siguiente cuadro se presentan las absorbancias dadas por los estándares de Quercitina.

Cuadro N° 8: Concentración vs absorbancia de los estándares de Quercitina

Concentración mg/mL x	absorbancia y
0.0005	0.006
0.001	0.031
0.0025	0.071
0.005	0.224
0.01	0.365
0.025	0.853

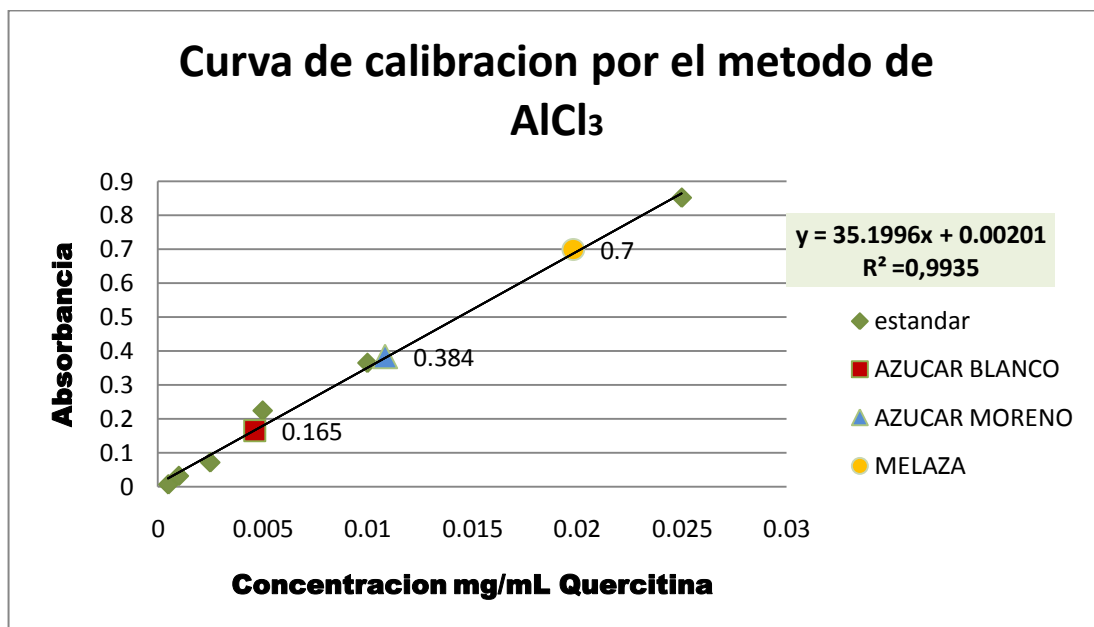


Figura N° 17: Curva de calibración del método de Tricloruro de Aluminio

Para realizar la curva de calibración se graficó absorbancia vs concentración y se trazó una línea de tendencia entre los puntos, la cual tiene la siguiente ecuación de regresión lineal:

Dónde:

: Absorbancia de la muestra

: Concentración desconocida de la muestra

: Ordenada del origen

: Pendiente

La pendiente se calcula mediante la siguiente ecuación:

: Concentración del estándar

: Absorbancia del estándar

: Promedio de la concentración del estándar.

: Promedio de la absorbancia del estándar.

La ordenada en el origen se calculó mediante la siguiente ecuación:

Dónde:

: Promedio de la absorbancia del estándar

: Pendiente

: Promedio de las concentraciones de los estándares

Obteniendo los valores de la pendiente y la ordenada al origen se sustituyen en la ecuación de regresión lineal.

Para el ejemplo se tomó el valor promedio de absorbancia del azúcar blanco en el mes de abril que es de 0.197 para calcular la concentración de flavonoides.

Despejando

0.005539 mg/ mL eq. GAE

$$0.005539 \text{ mg/ mL eq. GAE x FD}$$

$$\text{FD} = 80$$

$$0.005539 \text{ mg/ mL} \times 80 = 0.4431 \text{ mg}$$

Dividir este valor final por la masa introducida de la muestra en el momento de hacer la disolución.

(Análisis de Abril de azúcar blanco)

Para calcular el coeficiente de correlación se utilizó la siguiente ecuación:

$$0.9935$$

RESULTADOS DE FLAVONOIDES POR EL METODO DE TRICLORURO DE ALUMINIO

En la tabla N° 7 se observa el contenido de flavonoides en cada una de las muestras de análisis, los resultados se obtuvieron en mg equivalentes de Quercitina/g de muestra.

Tabla N° 7: Resultados mensuales del contenido de flavonoides, por el método de Tricloruro de Aluminio en azúcar blanco, moreno y melaza.

Mes	Azúcar blanco Flavonoides mg Quercitina/g	Azúcar moreno Flavonoides mg Quercitina/g	Melaza Flavonoides mg Quercitina/g
Marzo	0.021	0.043	-----
Abril	0.022	0.038	2.36
Mayo	0.016	0.043	2.14
Junio	0.018	0.037	2.09
Promedio	0.019	0.040	2.196

En la tabla N° 7 se presentan los resultados obtenidos por el método de Tricloruro de Aluminio para determinar flavonoides, se observa que el contenido de flavonoides de cada una de las muestras analizadas es menor en comparación con el contenido de fenoles totales que se presentan en la tabla N° 5, esto se debe a que los fenoles engloban los flavonoides, por lo tanto si existe pérdida de fenoles durante la producción del azúcar también se pierden flavonoides esto se ve reflejado en los resultados de la melaza con el mayor contenido de flavonoides, seguido por el azúcar moreno y blanco.

Los resultados se expresan en mg equivalentes de Quercitina por gramo de muestra, debido que la Quercitina es el flavonoide cuya estructura presenta la posiciones ideales del grupo – OH, posee una potente actividad antioxidante, que llega a ser 5 veces mayor que la vitamina E y C⁽¹⁵⁾.

- METODO DE ABTS PARA LA DETERMINACION DE CAPACIDAD ANTIOXIDANTE ⁽²⁷⁾

A continuación se presenta la cascada de dilución realizada en el azúcar blanco, moreno y melaza para calcular su respectivo factor de dilución:

20 g azúcar blanco o moreno ——— 80 mL H₂O destilada
|
0.1mL de solución ——— Radical ABTS* ——— 10.0mL

0.5g de Melaza ——— 100 mL
|
0.1mL de solución ——— Radical ABTS* ——— 10.0 mL

Durante el desarrollo del método, se observó una decoloración del radical catiónico ABTS^{•+}, debido a que los antioxidantes contenidos en las soluciones de melaza, azúcar blanco y moreno, tienen la capacidad de neutralizar al radical ABTS^{•+}, esto se ve reflejado en un descenso de absorbancia y una disminución de color azul-verde intenso (ver figura N° 18).



Figura N° 18: Método de ABTS en azúcar blanco, moreno y melaza.

El descenso de absorbancia se midió a una longitud de onda de 734nm.

En la tabla N° 8 podemos apreciar las diferentes absorbancias obtenidas en la melaza, azúcar blanco y moreno por el método ABTS, las cuales se leyeron en un espectrofotómetro Ultravioleta-visible Shimadzu UV-Mini-1240, además se presenta los factores de dilución.

Tabla N° 8: Absorbancias, Factor de dilución de azúcar blanco, moreno y melaza por el método ABTS.

Mes	Azúcar Blanco			Azúcar moreno			Melaza		
	Absorbancia Inicial	Absorbancia Final	Promedio de absorbancia final por mes	Absorbancia Inicial	Absorbancia final	Promedio de absorbancia final por mes	Absorbancia inicial	Absorbancia final	Promedio de absorbancia final por mes
Abril/ 2013	0.708	0.627 0.623	0.625	0.708	0.528 0.522	0.525	0.708	0.522 0.500	0.511
Blanco	0.667			0.667			0.646		
Mayo/ 2013	0.715	0.558 0.552	0.555	0.715	0.402 0.397	0.399	0.715	0.418 0.410	0.414
Blanco	0.563			0.563			0.607		
Junio/ 2013	0.704	0.635 0.628	0.631	0.704	0.548 0.540	0.544	0.704	0.456 0.452	0.454
Blanco	0.646			0.646			0.607		
Factor de dilución	8,000			8,000			10,000		

Para encontrar la concentración de la actividad antioxidante para cada muestra, se realizó una curva de calibración utilizando el estándar de Trolox al 97% de pureza (ver anexo N° 3), de la cual se prepararon todas las diluciones de los estándares con concentraciones de 5-500 µg/mL

En el siguiente cuadro se presentan las absorbancias dadas por los estándares de Trolox.

Cuadro N°9: Concentración vs absorbancia de los estándares de Trolox mg/mL.

Concentración mg/ mL x	Absorbancia y
0.005	0
0.01	0.011
0.025	0.026
0.05	0.136
0.1	0.246
0.25	0.454

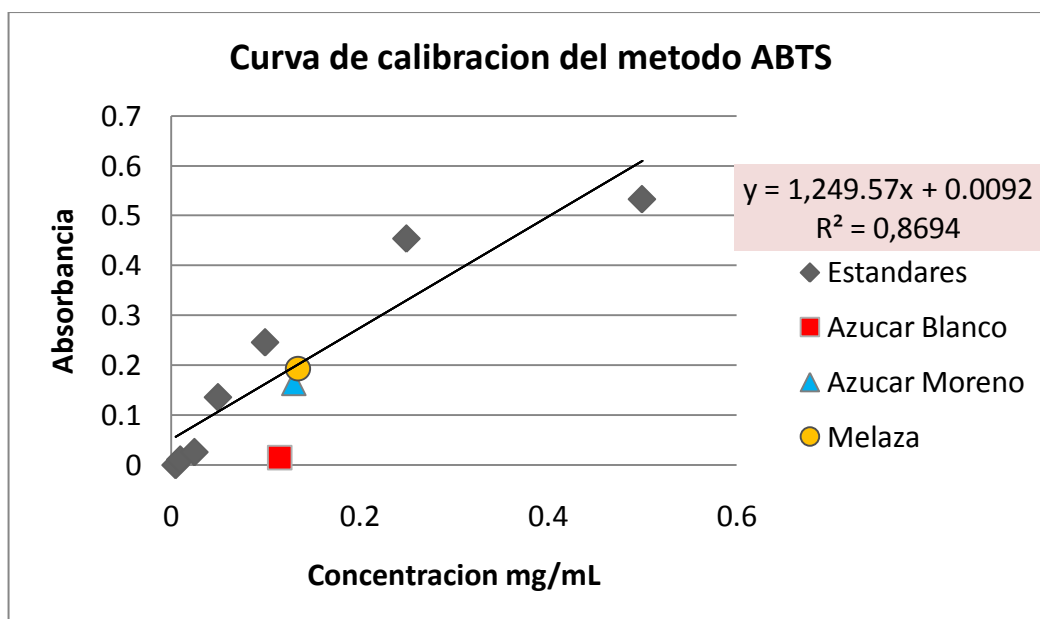


Figura N° 19: Curva de calibración del método radical catiónico ABTS.

Para realizar la curva de calibración se graficó absorbancia vs concentración y se trazó una línea de tendencia entre los puntos, la cual tiene la siguiente ecuación de regresión lineal:

Dónde:

: Absorbancia de la muestra

: Concentración desconocida de la muestra

: Ordenada del origen

: Pendiente

La pendiente se calcula mediante la siguiente ecuación:

: Concentración del estándar

: Absorbancia del estándar

: Promedio de la concentración del estándar.

: Promedio de la absorbancia del estándar.

La ordenada en el origen se calcula mediante la ecuación:

Dónde:

: Promedio de la absorbancia del estándar

: Pendiente

: Promedio de las concentraciones de los estándares

Obteniendo los valores de la pendiente y la ordenada al origen se sustituyen en la ecuación de regresión lineal.

Porcentaje de inhibición se calcula mediante la ecuación:

Para ejemplo se eligió un valor del mes de Abril del azúcar blanco, que es 0.165

147.17 (este valor sustituye _____ en la ecuación de regresión lineal)

En el método ABTS se calcula el porcentaje de inhibición (disminución del color), que sustituye "y" en la ecuación de regresión lineal.

Despejando

0.1177 mg/ mL eq. Trolox x FD (Ver anexo N° 5)

0.1177 mg/ mL x 8,000 = 942.20mg (análisis de Abril de la melaza)

Dividir este valor final por la masa introducida de la muestra en el momento de hacer la disolución.

Para calcular el coeficiente de correlación se utilizó la siguiente ecuación:

=====

=====

0.8695

RESULTADOS DE CAPACIDAD ANTIOXIDANTE POR EL METODO RADICAL CATIONICO ABTS.

En la tabla N° 9 se observa el contenido de capacidad antioxidante en cada una de las muestras de análisis, los resultados se obtuvieron en mg equivalentes de Trolox/g de muestra.

Tabla N° 9: Resultados mensuales del contenido de actividad antioxidante, por el método de ABTS en azúcar blanco, moreno y melaza.

Mes	Azúcar blanco Actividad antioxidante mg Trolox/g	Azúcar moreno Actividad antioxidante mg Trolox/g	Melaza Actividad antioxidante mg Trolox/g
Abril	47.11	51.63	1,535.97
Mayo	45.12	52.11	1,605.33
Junio	46.15	50.10	1,551.51
Promedio	46.13	51.28	1564.27

Como podemos observar la tabla N° 9, la melaza contiene mayor actividad antioxidante seguido por el azúcar moreno y azúcar blanco.

Durante la investigación se ha comprobado que las muestras analizadas contienen fenoles y flavonoides, estos compuestos son capaces de ejercer una actividad antioxidante, por ello decimos que la melaza es la que posee mayor capacidad antioxidante por presentar un alto de contenido de fenoles y flavonoides.

Los resultados se expresan en mg equivalentes de Trolox, que es un análogo de la vitamina E utilizado como estándar para determinar la actividad antioxidante.

RESUMEN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS DE FENOLES, FLAVONOIDES Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE EN MELAZA, AZUCAR BLANCO Y MORENO EN ESTE ESTUDIO.

Tabla N° 10: Promedio de los resultados obtenidos de fenoles, flavonoides y capacidad antioxidante en melaza, azúcar blanco y moreno en este estudio

Muestra	Fenoles	Flavonoides	Capacidad Antioxidante
Azúcar Blanco	4.14	11.77	828.86
Azúcar Moreno	0.019	0.040	2.196
Melaza	46.13	51.28	1,564.27

Según los resultados obtenidos se puede concluir que la melaza es el producto que mayor contenido de antioxidantes posee, seguido por el azúcar moreno y en menor cantidad el azúcar blanco.

- DETERMINACION DE LA VARIACION DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

A continuación se presentan los resultados obtenidos en el análisis de la actividad antioxidante en % de inhibición de la melaza, azúcar blanco y moreno.

Tabla N° 11: Porcentajes de inhibición de azúcar blanco, moreno y melaza

% de inhibición			
Meses	Azúcar blanco	Azúcar moreno	Melaza
Abril	147.17	161.29	161.22
Mayo	140.97	162.79	168.50
Junio	144.17	156.53	162.85

Se presentan los cálculos estadísticos realizados para determinar si existe o no una variación significativa en el contenido de actividad antioxidante en las muestras analizadas.

CONTRASTE DE HIPOTESIS SOBRE LA VARIACION DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE ⁽³⁰⁾

Estudio Estadístico de t de student para dos colas

Formulas Estadísticas

Varianza

$$\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}$$

Dónde:

Porcentaje de inhibición

Promedio de porcentaje de inhibición

Numero de datos

Estadígrafo de contraste

$$\frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{\frac{s^2}{n_1} + \frac{s^2}{n_2}}}$$

Dónde:

Promedio de porcentaje de inhibición

Numero de datos

Varianza

Valor inicial

Contraste de hipótesis sobre la variación de la actividad antioxidante en azúcar blanco.

Cuadro N° 10: Recopilación de datos utilizados en el cálculo del estadígrafo de contraste de la t de student para azúcar blanco

% de inhibición	Abril = 147.17
	Mayo= 140.97
	Junio= 144.17
Media de % de inhibición	144.10
Valor inicial	147.17
Numero de datos	3
Grados de libertad	2

¿Existe variación significativa en la actividad antioxidante del azúcar blanco durante los meses analizados?

Nivel de significación= 0.05 (5%)

Planteamiento de hipótesis

Hipótesis nula H_0 = No existe variación significativa de la actividad antioxidante del azúcar blanco durante los tres meses analizados

$$H_0 = \mu = \mu_0 = 147.17$$

Hipótesis alternativa H_a = Existe una variación significativa de la actividad antioxidante del azúcar blanco durante los tres meses analizados

$$H_a = \mu \neq \mu = 147.17$$

Cálculo de la Varianza

Cálculo del Estadígrafo de contraste

Cuadro N° 11: Resultados del método estadístico de t de student para verificar la variación de actividad antioxidante en azúcar blanco.

AZUCAR BLANCO	
Nivel de significación	5 %
Estadígrafo de contraste	-1.71
Valor crítico para el 5%	4.30 (ver anexo N° 5)
Decisión estadística	El valor del estadígrafo de contraste pertenece a la región de aceptación por lo tanto aceptamos la hipótesis nula
Decisión no estadística	No existe variación significativa de la actividad antioxidante del azúcar blanco durante los meses analizados

Para ejemplo se realizó una gráfica de la campana de Gauss para el azúcar blanco (ver figura N°20), para observar el valor del estadígrafo de contraste, el cual pertenece en la región de aceptación.

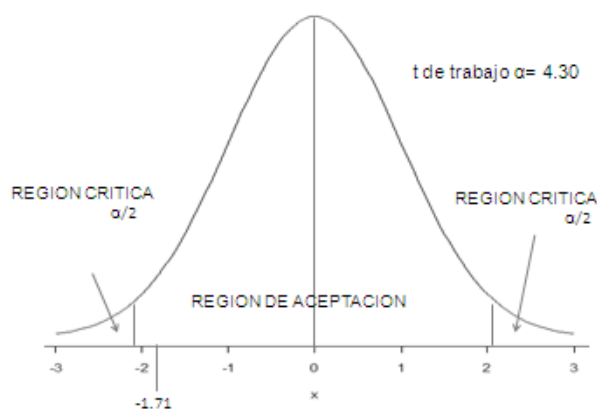


Figura N° 20: Campana de Gauss para el azúcar blanco.

Contraste de hipótesis sobre la variación de la actividad antioxidante en azúcar moreno

¿Existe variación en la actividad antioxidante del azúcar moreno durante los meses analizados?

Nivel de significación= 0.05 (5%)

Planteamiento de hipótesis

Hipótesis nula H_0 = No existe variación significativa de la actividad antioxidante del azúcar moreno durante los tres meses analizados

$$H_0 = \mu = \mu_0 = 161.29$$

Hipótesis alternativa H_a = Existe una variación significativa de la actividad antioxidante del azúcar moreno durante los tres meses analizados

$$H_a = \mu \neq \mu = 161.29$$

Cuadro N° 12: Recopilación de datos utilizados en el cálculo del estadígrafo de contraste de la t de student para azúcar moreno.

% de inhibición	Abril = 161.29
	Mayo= 162.79
	Junio= 156.53
Media de % de inhibición	160.20
Valor inicial	161.29
Numero de datos	3
Grados de libertad	2

Cálculo de la Varianza

Cálculo del Estadígrafo de contraste

-

-

Cuadro N° 13: Resultados del método estadístico de t de student para verificar la variación de actividad antioxidante en azúcar moreno.

AZUCAR MORENO	
Nivel de significación	5 %
Estadígrafo de contraste	- 0.5797
Valor crítico para el 5%	4.30 (ver anexo N°5)
Decisión estadística	El valor del estadígrafo de contraste pertenece a la región de aceptación por lo tanto aceptamos la hipótesis nula
Decisión no estadística	No existe variación significativa de la actividad antioxidante del azúcar moreno durante los meses analizados

Para ejemplo se realizó una gráfica de la campana de Gauss para el azúcar moreno (ver figura N° 21), para observar el valor del estadígrafo de contraste, el cual pertenece en la región de aceptación.

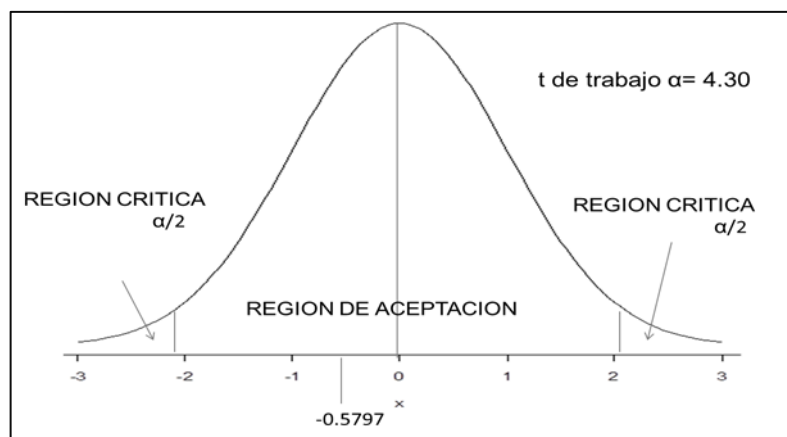


Figura N° 21: Campana de Gauss para el azúcar moreno

Contraste de hipótesis sobre la variación de la actividad antioxidante en melaza

¿Existen variaciones en la actividad antioxidante de la melaza durante los meses analizados?

Nivel de significación= 0.05 (5%)

Planteamiento de hipótesis

Hipótesis nula H_0 = No existe variación significativa de la actividad antioxidante de la melaza durante los tres meses analizados

$$H_0 = \mu = \mu_0 = 161.22$$

Hipótesis alternativa H_a = Existe una variación significativa de la actividad antioxidante de la melaza durante los tres meses analizados

$$H_a = \mu \neq \mu = 161.22$$

Cuadro N° 14: Recopilación de datos utilizados en el cálculo del estadígrafo de contraste de la t de student para melaza.

% de inhibición	Abril = 161.22
	Mayo= 168.50
	Junio= 162.85
Media de % de inhibición	164.19
Valor inicial	161.22
Numero de datos	3
Grados de libertad	2

Cálculo de la Varianza

Cálculo del Estadígrafo de contraste

-

-

Cuadro N° 15: Resultados del método estadístico de la t de student para verificar la variación de actividad antioxidante en melaza.

MELAZA	
Nivel de significación	5 %
Estadígrafo de contraste	1.34
Valor crítico para el 5%	4.30 (ver anexo N° 5)
Decisión estadística	El valor del estadígrafo de contraste pertenece a la región de aceptación por lo tanto aceptamos la hipótesis nula
Decisión no estadística	No existe variación significativa de la actividad antioxidante de la melaza durante los meses analizados

Para ejemplo se realizó una gráfica de la campana de Gauss para la melaza (ver figura N° 22), para observar el valor del estadígrafo de contraste, el cual pertenece en la región de aceptación.

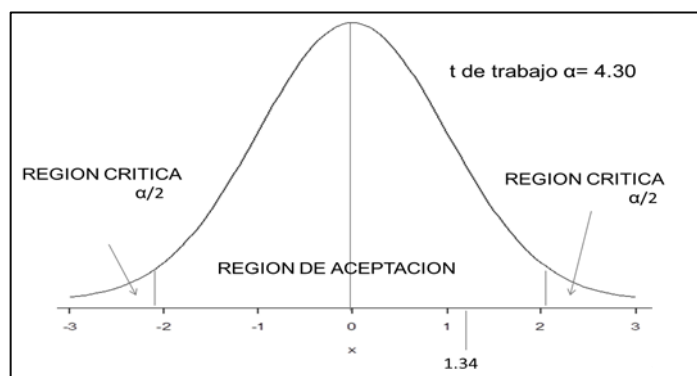


Figura N° 22: Campana de Gauss para la melaza.

Con el fin de comparar los valores obtenidos en esta investigación, con otros alimentos conocidos por su actividad antioxidante ⁽¹⁹⁾, y que son consumidos por la población Salvadoreña se realizó una búsqueda bibliográfica, cuyo resultado se resume en la tabla N° 12.

Tabla N° 12: Comparación de la cantidad de fenoles, flavonoides y capacidad antioxidante determinados por distintos autores en distintos productos vs los resultados obtenidos de las muestras analizadas ⁽¹⁹⁾

Alimento	Fenoles totales mg GAE /100g	Flavonoides mg Quercitina/100g	Capacidad Antioxidante µmoles Trolox /100g
Mora	118.9	-	125.8
Manzana	129.7	61	-
Tomate	15	1	-
Uva	117.1	-	161.5
Naranja	-	-	113,000
Panela	383.7	-	-
Vino tinto	-	-	5,000-15,000
*Azúcar Blanco	414	1.9	18,822
*Azúcar Moreno	1,170	4.0	20,628
*Melaza	73,226	236	613,676

* Muestras analizadas

Nota: La melaza posee un color oscuro que ocasiona interferencia al momento de obtener los resultados, por lo tanto se realizaron diluciones para corregir las interferencias.

En la tabla N° 12 podemos observar las diferencias en el contenido de fenoles, flavonoides y actividad antioxidante, que poseen diferentes alimentos y que han sido analizados por diferentes autores, y los productos que se analizaron en esta investigación.

Las diferencias ocurren dependiendo del tipo de fenoles y flavonoides contenidos en los alimentos y de acuerdo a la potencia de la actividad antioxidante que estos posean.

CAPITULO VI
CONCLUSIONES

6.0 CONCLUSIONES

- 1- Por medio de la cuantificación de fenoles, por el método de Folinciocalteu se determinó que las muestras analizadas poseen una cantidad nutricionalmente importante de fenoles.
- 2- La determinación de flavonoides por el método de Tricloruro de Aluminio demostró que el azúcar moreno, blanco y melaza contienen pequeñas cantidades de flavonoides, comparado con el contenido de fenoles encontrados, esto se debe a que los fenoles engloban tanto los flavonoides como otras sustancias fenólicas.
- 3- En el desarrollo del método radical catiónico ABTS, se demostró que las muestras estudiadas, poseen una actividad antioxidante debido a la presencia de fenoles y flavonoides
- 4- De los productos azucareros analizados, la melaza es el producto más rico en fenoles, flavonoides y actividad antioxidante, esto se debe a que la melaza sufre menor pérdida de sustancias que aportan color (fenoles y flavonoides), durante su proceso de obtención, seguido por el azúcar moreno y el azúcar blanco.
- 5- La variación de la actividad antioxidante se verificó mediante el contraste de hipótesis de la t de student con un nivel de significancia del 5%, demostrando que no existe variación significativa en la actividad antioxidante en la melaza, azúcar blanco y moreno durante los 3 meses analizados.

- 6- La ingesta diaria recomendada bibliográficamente de antioxidantes es de 1 gramo, lo que de acuerdo a los resultados de esta investigación equivale a 18 cucharaditas de azúcar moreno o 53 cucharaditas de azúcar blanco.

CAPITULO VII
RECOMENDACIONES

7.0 RECOMENDACIONES

- 1- Divulgar a la población a través de la entidad correspondiente que el azúcar moreno contiene más antioxidantes que el azúcar blanco.
- 2- Realizar en estudios posteriores, determinaciones de antioxidantes en muestras que tengan características de color similar a la melaza, diluciones que ayuden a evitar la interferencia por el color de la muestra, al momento de obtener los resultados.
- 3- Evitar la luz durante la cuantificación de antioxidantes, ya que los reactivos utilizados en los métodos aplicados son fotosensibles.
- 4- Emplear el presente estudio como guía base para determinaciones similares de fenoles, flavonoides y actividad antioxidante en diversos alimentos de consumo Salvadoreño, y así investigar otros alimentos que contribuyen con el bienestar y fortalecimiento de la salud humana.
- 5- Realizar estudios a largo plazo sobre la estabilidad de la capacidad antioxidante en productos azucareros.
- 6- Llevar a cabo estudios de la capacidad antioxidante en cada una de las etapas del proceso de obtención de melaza, azúcar blanco y moreno.
- 7- Investigar el tipo específico de fenoles y flavonoides presentes en la melaza, azúcar blanco y moreno, considerando el presente estudio.

8.0 BIBLIOGRAFIA

1. Agudo Medina, L. Técnicas para la determinación de compuestos antioxidantes en Alimentos, Revista de la educación en Extremadura, 27-34.
2. Baizabal Castillo, R.H Evaluación de la capacidad antioxidante y antimicrobiana del aceite esencial y del polvo de romero (*Rosmarinus officinales L.*) en queso fresco de vaca, México, 2010, pág. 90, 91, 98,99.
3. Belles V.V El papel antioxidante de los alimentos de origen vegetal: vitaminas y polifenoles pág. 1-2.
4. Cadenas R. Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide by NADPH-Ubiquinone reductase and ubiquinolol-cytochrome c reductase from bee-heart mitochondria, Editorial Arch, Biochem Biophys pág. 180, 248-257.
5. Ceron Bonilla, M Extracción, caracterización y estabilidad de antocianinas y otros compuestos antioxidantes obtenidos a partir de zarzamora, México, 2008.
6. Coirini, H Toxicidad del oxígeno y radicales libres pág. 2, 6.
7. Dabrowska Criado, C, Moya Mir M Vitaminas y antioxidantes, Saned y ediciones S.L, 2009 pág. 10
8. Dirección general de investigación y extensión agrícola Costa Rica; Aspectos técnicos sobre cuarenta y cinco cultivos agrícolas de Costa Rica, San José Costa Rica, 1991.
9. Escamilla Jiménez C.I, Cuevas Martínez E.Y, Guevara Fonseca J: Flavonoides y sus acciones antioxidantes, Vol. 22 N° 2, México, Marzo-Abril, 2009, pág. 73-75.

- 10.** Fernández Pinto J.V Barrido sistemático de la actividad antioxidante total y el contenido de compuestos fenólicos (flavonoides y fenoles totales) de alimentos vegetales del departamento de la Paz, Bolivia, 4 de agosto del 2011 pág. 52-54, 56. Disponible en: biblioteca digital,umsa.bo:8080/rddu/bitstream/123456789/1389/1/T193.pdr.
- 11.** Festy D., Antioxidantes guía práctica, 1 edición, Barcelona, España, Robín Book, 2007, pág. 96
- 12.** Freeman B.A. and Crapo J Biology of disease. Free radicals and tissue injure, Laboratory investigation, 1982 pág. 412-426.and 47
- 13.** García M.Y Estudio de la actividad antioxidante de pétalos de rosa, España, 2011, pág. 35 y 37.
- 14.** Gil de Albuquerque, DBiosensor evaluation of the Antioxidant activity of wines and teas. Interference studies and comparison with other methods, Universidad de Lisboa, 29 de Abril de 2011 pág. 17-2,35 y 41.
- 15.** Guisado R., Guisado B., Bordes González, García Morales MC, Fernández T., Universidad de Granada Oxidación y producción de radicales libres.
- 16.** Haliwell B, Gutteridge J Free Radicals in biology and Medicine, 3 edition, Oxford Science Publications, Oxford, 1998, pag. 936.
- 17.** Hamasaka T., Kumasawa Sh., Fijimoto T and Tsutomo Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of Japan, Japan, Food Sc. Techno Res, 2004 pag. 86-92.

- 18.** Harish M.A, Nayaka, Sathisha M.P M, Chandrashekar K.B, Shylaja M. Dharsmesh Citopotectores y estudio de la actividad antioxidante en azúcar morena (palmera), 2009.
- 19.** Hostalet A, Betoret N, Segui L Determinación de las propiedades antioxidantes del zumo de caña, panela y azúcar morena, 2009.
- 20.** Kadam U.S., Ghosh S.B, Strayo De, Suprasanna P, Devasagayam T.P.A, Bapat V.A, 2008 Actividad antioxidante en el jugo de la caña de azúcar y su función protectora contra daño en el ADN inducido por radiación.
- 21.** Marcucci M. C, Woisky R. G, Salatino A y Facultad de Farmacia de la Universidad Bandeirante. Uso de Cloruro de aluminio en la medición de flavonoides en muestras de propoleo, San Paulo, Brasil, 2003. Disponible en: www.depacame.org.br/mensagemdou/46/artigo.htm.
- 22.** Madrid V .A: Confitería y pastelería. Manual de formación, España, Mundi-prensa Ediciones, S.A, 1999 pag. 46.
- 23.** Phillips M.K, Carlsen M. H, Blomhof Rune. contenido total de antioxidantes de alternativas de azúcar refinado, Virginia EUA, Journal of the American dietetic association, 2009 pag. 64-71
- 24.** Prior R. L. Standarized methods for the determination of Antioxidant capacity and phenolics in food dietary supplements, vol. 53 J.Agric food chemistry, 2005.
- 25.** Pryor W.A. Biological effects of cigarette smoke, Wood smoke from plastics: The use of electron spin resonance, Free Radic biol med pag. 659-676.

- 26.** Ramírez M.A. Cultivos para la producción sostenible de biocombustibles: Una alternativa para la generación de empleos e ingresos modulo V: Caña de azúcar, primera edición, Tegucigalpa Honduras, Julio 2008 pag. 5.
- 27.** Re R, Pellegrini N, Protegente A, Pannala A, Yan M. y Rice Evans C. Antioxidant activity applying and improved ABTS radical cation decolorization assay, Vol. 26, London, ELSEVIER, Mayo 1999, pag. 1231-1237.
- 28.** Romagnoli M. Mecanismo de producción de radicales libres en la diabetes: Importancia de la xantina oxidasa e implicación del factor nuclear KB, ELSEVIER publicaciones, 2008 pág. 61 y 65.
- 29.** Saavedra O.M, Vásquez Jiménez E.N, Guapillo Vargas M.R, Ceballos Reyes G., Bolaina Méndez E. Radicales libres y sus papel en la enfermedades crónico-degenerativas, Rev. Med. UV, 2010 pag. 33.
- 30.** Vicente Villardon J.L. Introducción a los contrastes de hipótesis, Departamento de Estadística, Universidad de Salamanca, pág. 3-11, disponible en <http://biplot.usal.es/problemas/confianza/CONTRASTES.pdf> , (Consultado 11.9.13)
- 31.** Waterhouse A. L. Current protocols in food analytical chemistry California, John Wiley & Sons Inc., 2002 pag. 1.1.1-1.1.8
- 32.** webdelprofesor.ula.ve/forestal/amora/Estadistica21/tabla_t_student.pdf (Consultado 11.9.13)
- 33.** World Food Program. Breaking out of the Poverty Trap. How We Use Food Aid (Consultado 14.8.12)

34. www.bichoonline.com.br/artigos/apa0014htm (Consultado 4.4.12)
35. www.boletinagrario.com/ap-6,xenobiotico,823.html(Consultado 14.8.12)
36. www.cenicana.org/pop_up/fabrica/diagrama_obtencion.php (Consultado 30.3.12) Obtención de azúcar.
37. www.chem.qmul.ac.uk/iupac/carot/car1t7.html(Consultado 14.8.12)
38. www.dietcan.net/docs/QUERCETINALabMerck.pdf (Consultado 17.9.13)
39. www.wordreference.com/definicion/fagocitosis (Consultado 14.8.12)
40. www.rocoto.shapado.com/questions/a-cuanto-equivale-una-cucharada-y-una-cucharadita-en-gramos (Consultado 18.6.13)
41. Z. and Haupt Y., Haupt, S., Berger, M., Goldberg, 2003. Apoptosis – the p53 network. *The Journal of Cell Science*. 116:4077-4085.

GLOSARIO

Alimento: El alimento es cualquier sustancia normalmente ingerida por los seres vivos con fines: nutricionales y psicológicos ⁽³¹⁾

Anticancerígeno: Previene el agente físico, químico o biológico que induce al desarrollo del cáncer ⁽²⁰⁾

Antimicrobiano: es una sustancia que mata o inhibe el crecimiento de microbios, tales como bacterias, hongos, parásitos o virus. ⁽²⁾

Apoptosis: es el conjunto de reacciones bioquímicas que ocurren en las células cuando se diferencian y ejercen funciones normales, concluyendo tras un cierto número de divisiones celulares con la muerte celular de una forma ordenada y silenciosa; por lo que a la apoptosis se le conoce como muerte celular programada ⁽⁴¹⁾

Carotenoides: son compuestos químicos responsables de la gran mayoría de los colores amarillos, anaranjados o rojos presentes en los alimentos vegetales, y también de los colores anaranjados de varios alimentos animales ⁽³⁾

Célula: Es la unidad morfológica y funcional de todo ser vivo ⁽³⁶⁾

Cristalización: Es un proceso por el cual se forma un sólido cristalino, ya sea a partir de un gas, un líquido o una disolución. La cristalización es un proceso en donde los iones, átomos o moléculas que constituyen la red cristalina crean enlaces hasta formar cristales ⁽²⁶⁾

Fagocitosis: Capacidad de algunas células de destruir las bacterias o agentes nocivos para el organismo ⁽³⁹⁾

Oxidación: La oxidación es una reacción química donde un metal o un no metal ceden electrones, y por tanto aumenta su estado de oxidación ⁽¹⁴⁾

Peroxidación lipídica: hace referencia a la degradación oxidativa de los lípidos. Es el proceso a través del cual los radicales libres capturan electrones de los lípidos en las membranas celulares ⁽²⁸⁾

Quercetina: Es un flavonoide ampliamente distribuido en el reino vegetal, se trata de un compuesto polifenólico, entre las principales virtudes de la quercetina destaca su poder removedor sobre los radicales libres, ejerciendo un papel citoprotector en situación de peligro de daño celular ⁽³⁸⁾

Reducción: Es una reacción química donde un metal o un no metal acepta electrones ⁽¹⁴⁾

Xenobiótico: La palabra xenobiótico deriva del griego "xeno" ("extraño") y "bio" ("vida"). Se aplica a los compuestos cuya estructura química en la naturaleza es poco frecuente o inexistente debido a que son compuestos sintetizados por el hombre en el laboratorio ⁽³⁵⁾

ANEXOS

ANEXO N°1

LISTADO DE CRISTALERIA Y EQUIPO

CRISTALERIA	EQUIPO
- Pipeta volumétrica de 1.0 mL	- Espectrofotómetro Ultravioleta-Visible
- Pipeta volumétrica de 2.0 mL	Shimadzu UV-Mini-1240
- Pipeta volumétrica de 5.0 mL	- Refractómetro ATAGO rx5000
- Pipeta volumétrica de 10.0 mL	
- Balón volumétrico de 10.0 mL	- Balanza semianalítica
- Balón volumétrico de 100.0 mL	
- Vaso de precipitados de 50 mL	
- Vaso de precipitados de 250 mL	
- Bureta de vidrio de 25.0 mL	
- Agitador de vidrio	
- Tubos de ensayo graduados	

ANEXO N° 2

PREPARACION DE REACTIVOS ⁽¹⁾

Solución de Na₂CO₃

- Pesar en balanza semianalitica 20 g de carbonato de sodio
- Disolver en 25 mL de agua destilada
- Trasferir a un balón volumétrica de 100.0 mL y llevar a volumen con agua destilada.

Solución Stock de Acido Gálico

- Pesar en balanza analítica 0.05 g de ácido gálico.
- Disolver en 10 mL de etanol
- Trasferir a balón volumétrico de 100.0 mL y llevar a volumen con agua destilada.

Solución de AlCl₃

- Pesar en balanza analítica 2 g de Tricloruro de Aluminio
- Disolver en 25 mL de etanol
- Transferir a un balón volumétrico de 100.0 mL y llevar a volumen con etanol.

Solución Stock de Quercitina

- Pesar en balanza analítica 0.05 g de estándar de quercitina
- Disolver en 25 mL de etanol a 80%
- Trasferir a un balón volumétrico de 100.0 mL y aforar con etanol al 80%

Solución de ABTS 7mM

- Pesar en balanza analítica 0.0384 g de sal amónica cristalizada de ABTS
- Disolver en 5 mL de agua destilada

- Transferir a un balón volumétrico de 10.0 mL y llevar a volumen con agua destilada

Solución de $K_2S_2O_8$ 2.45 mM

- Pesar en balanza analítica 0.0662 g de Persulfato de potasio
- Disolver en 25 mL de agua destilada
- Transferir a un balón volumétrico de 100.0 mL y llevar a volumen con agua destilada

Solución Stock de TROLOX:

- Pesar en balanza analítica 0.050 g de reactivo de Trolox
- Disolver en 25 mL de etanol
- Transferir a un balón volumétrico de 100.0 mL y aforar con etanol.

ANEXO N° 3

Pureza de los estándares

Ácido gálico: 100%

LOGIN REGISTER CHANGE COUNTRY

SIGMA-ALDRICH® 200,000+ PRODUCTS 512+ SERVICES 24/7 SUPPORT Search

ORDER CENTER ADVANCED SEARCH

El Salvador Home > G7384 - Gallic acid

G7384 SIGMA

Gallic acid

97.5-102.5% (titration)

◆ DOWNLOAD MSDS (PDF)

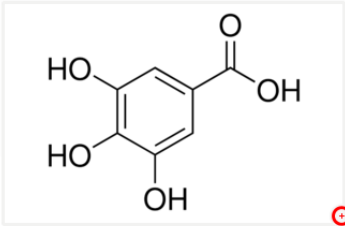
Synonym: 3,4,5-Trihydroxybenzoic acid

CAS Number [149-91-7](#) | Linear Formula (HO)₃C₆H₂CO₂H | Molecular Weight 170.12

Beilstein Registry Number 2050274 | EC Number 205-749-9 | MDL number [MFCD00002510](#)

PubChem Substance ID [24895304](#)

POPULAR DOCUMENTS: [SPECIFICATION SHEET \(PDF\)](#) | [FTNMR \(PDF\)](#)



Quercitina: 95%

50mg ——— 95%

X ——— 100%

X= 52.6 mg 50 mg

LOGIN REGISTER CHANGE COUNTRY

SIGMA-ALDRICH® 200,000+ PRODUCTS 512+ SERVICES 24/7 SUPPORT Search

ORDER CENTER ADVANCED SEARCH

El Salvador Home > Q4951 - Quercetin

Q4951 SIGMA

Quercetin

≥95% (HPLC), solid

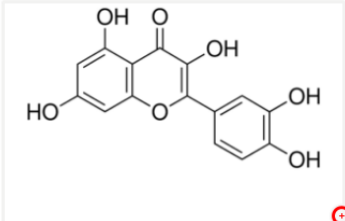
◆ DOWNLOAD MSDS (PDF)

Synonym: 2-(3,4-Dihydroxyphenyl)-3,5,7-trihydroxy-4H-1-benzopyran-4-one, 3,3',4',5,6-Pentahydroxyflavone, Quercetin-3-O-rhamnoside

CAS Number [117-39-5](#) | Empirical Formula (Hill Notation) C₁₅H₁₀O₇ | Molecular Weight 302.24

Beilstein Registry Number 317313 | EC Number 204-187-1 | MDL number [MFCD00006828](#)

POPULAR DOCUMENTS: [SPECIFICATION SHEET \(PDF\)](#)



Trolox: 97 %

50mg ——— 97%

X ——— 100%

X= 51.5mg 50 mg

El Salvador Home > 238813 - (±)-6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid

SIGMA-ALDRICH® 200,000+ PRODUCTS 512+ SERVICES 24/7 SUPPORT Search

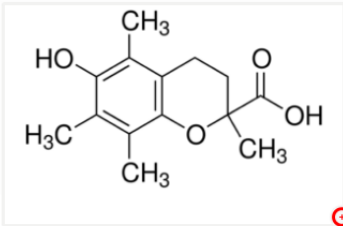
ORDER CENTER ADVANCED SEARCH

238813 ALDRICH
(±)-6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid
97%

◇ [DOWNLOAD MSDS \(PDF\)](#)
Synonym: Trolox

CAS Number [53188-07-1](#) Empirical Formula (Hill Notation) $C_{14}H_{18}O_4$ Molecular Weight 250.29
Beilstein Registry Number 1384051 EC Number 258-422-8 MDL number [MFCD0006846](#)
PubChem Substance ID [24854347](#)

POPULAR DOCUMENTS: [FTNMR \(PDF\)](#)



ANEXO N° 4

Tabla N° 13: Condiciones de almacenamiento (temperatura y humedad), de azúcar blanco y moreno.

	Enero	Febrero	Marzo	Abril	Mayo	Junio
Temperatura °C	31.5	31.7	30.5	33.0	30.6	28
Humedad	47.4	50.5	49.3	53.8	59.3	68

Melaza

Temperatura °C: 29

Humedad: 81

Condiciones de trabajo

Temperatura °C: 21

Humedad: 32

ANEXO N° 5

Distribución t. (32)

Tabla N° 14: Valores críticos de la distribución t de Student.

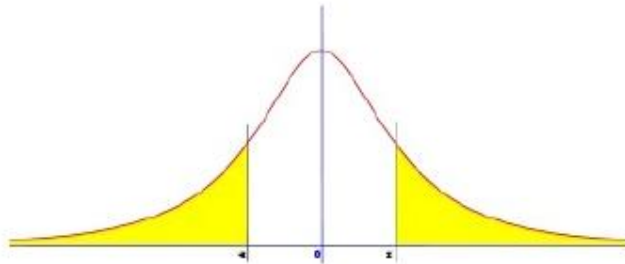


Tabla distribución t. Dos colas, probabilidad dentro(%) / fuera(0.00) del intervalo $\mu \pm t_{n-1} \sigma / \sqrt{n}$

<i>Valor de t para un intervalo de confianza de Valor crítico de t para valores de P de número de grados de libertad</i>	<i>90%</i>	<i>95%</i>	<i>98%</i>	<i>99%</i>
	<i>0.10</i>	<i>0.05</i>	<i>0.02</i>	<i>0.01</i>
1	6.31	12.71	31.82	63.66
2	2.92	4.30	6.96	9.92
3	2.35	3.18	4.54	5.84
4	2.13	2.78	3.75	4.60
5	2.02	2.57	3.36	4.03
6	1.94	2.45	3.14	3.71
7	1.89	2.36	3.00	3.50
8	1.86	2.31	2.90	3.36
9	1.83	2.26	2.82	3.25
10	1.81	2.23	2.76	3.17
12	1.78	2.18	2.68	3.05
14	1.76	2.14	2.62	2.98
16	1.75	2.12	2.58	2.92
18	1.73	2.10	2.55	2.88
20	1.72	2.09	2.53	2.85
30	1.70	2.04	2.46	2.75
50	1.68	2.01	2.40	2.68
∞	1.64	1.96	2.33	2.58