



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA
La universidad católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA Y BIOMÉDICA

TÍTULO DE BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

**Valoración del producto tradicional “siete harinas” como fuente de
antioxidantes y compuestos fenólicos**

TRABAJO DE TITULACIÓN

AUTORA: Vargas Encarnación, Jenny Vanessa

DIRECTORA: Guamán Balcázar, María del Cisne, Mgtr.

LOJA – ECUADOR

2016



Esta versión digital, ha sido acreditada bajo la licencia Creative Commons 4.0, CC BY-NY-SA: Reconocimiento-No comercial-Compartir igual; la cual permite copiar, distribuir y comunicar públicamente la obra, mientras se reconozca la autoría original, no se utilice con fines comerciales y se permiten obras derivadas, siempre que mantenga la misma licencia al ser divulgada. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/deed.es>

Septiembre, 2016

APROBACIÓN DE LA DIRECTORA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Magíster.

María del Cisne Guamán Balcázar.

DOCENTE DE LA TITULACIÓN

De mi consideración:

El presente trabajo de titulación: “**Valoración del producto tradicional siete harinas como fuente de antioxidantes y compuestos fenólicos**” realizado por **Vargas Encarnación Jenny Vanessa**, ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, septiembre del 2016

f).....

Mgtr. María del Cisne Guamán Balcázar

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

“Yo **Vargas Encarnación Jenny Vanessa** declaro ser autora del presente trabajo de titulación “Valoración del producto tradicional siete harinas como fuente de antioxidantes y compuestos fenólicos”, de la Titulación de Bioquímica y Farmacia, siendo Mgtr. María del Cisne Guamán Balcázar directora del presente trabajo y eximo a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales. Además, certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad.

Adicionalmente declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 88 del Estatuto Orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice: “Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado que se realicen a través, o con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la universidad”.

f).....

Autora: Vargas Encarnación Jenny Vanessa

C. I.: 1723783294

DEDICATORIA

A mis padres Rodolfo Vargas & Graciela Encarnación, en especial a mi madre que ha sido el apoyo incondicional; enseñándome con constancia, paciencia, dedicación a ser responsable y el sembrar en mí el deseo de superación personal y profesional, ella es mi ejemplo a seguir, su bondad y palabras sabias me hacen admirarla cada día más.

A mi padre celestial, Dios, por guiarme por el sendero de la verdad y haberme dado una madre extraordinaria.

A mis hermanos, maestros y amigos que me han brindado su confianza y su tiempo.

Gracias por formar parte de mi vida.

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios, por permitirme nacer en una familia que me supo formar espiritual y académicamente, lo cual me motiva a ser un mejor ser humano y cumplir con las metas y objetivos que me proyecte.

A mis hermanos Miguel Ángel Vargas y Ronald Vargas con quienes he pasado los mejores días de mi vida.

A la UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA por brindarme la oportunidad de estudiar en sus aulas y cumplir este anhelado sueño de hoy ser profesional.

A mi directora de tesis, Mgtr. María del Cisne Guamán por su confianza, sus conocimientos, su experiencia, su paciencia y su motivación en el desarrollo de éste proyecto.

Deseo agradecer profundamente a mis maestros, en especial a la Lcda. Graciela Encarnación que es mi maestra y mi madre.

Por último, a mis compañeros y amigos que, aunque ya no estén conmigo, sus recuerdos están en mi mente y corazón, hoy deseo darles las gracias por formar parte de mí y haberme brindado su amistad.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CARÁTULA	i
APROBACIÓN DE LA DIRECTORA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN	ii
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS.....	iii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTO	v
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
ÍNDICE DE TABLAS.....	ix
ÍNDICE DE GRÁFICAS	ix
ÍNDICE DE ANEXOS.....	x
NOMENCLATURA.....	xi
RESUMEN.....	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN.....	3
1 REVISIÓN DE LITERATURA.....	5
1.1 Harinas compuestas	6
1.2 Composición de producto siete harinas	6
1.2.1 Harina de trigo (<i>Triticum aestivum</i> L.).....	7
1.2.2 Harina de maíz (<i>Zea mays</i> L.).....	8
1.2.3 Harina de cebada (<i>Hordeum vulgare</i> L.).....	8
1.2.4 Harina de haba (<i>Vicia faba</i> L.).....	9

1.2.5	Harina de soya (<i>Glycine max</i> L.).....	9
1.2.6	Harina de plátano (<i>Musa paradisiaca</i> L.).	10
1.2.7	Harina de achira (<i>Canna edulis</i> , Ker).....	10
1.3	Radicales libres y Antioxidantes	10
1.4	Compuestos fenólicos y capacidad antioxidante.....	12
1.4.1	Compuestos fenólicos.	12
1.4.2	Capacidad Antioxidante.....	15
2	OBJETIVOS DEL PROYECTO.....	18
2.1	General.....	19
2.2	Específicos	19
3	MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
3.1	Equipos	21
3.2	Reactivos.....	21
3.3	Materia prima.....	22
3.4	Preparación de la materia prima	22
3.5	Obtención de extractos	23
3.6	Cuantificación de fenoles totales	24
3.6.1	Determinación del contenido de Fenoles totales.....	24
3.7	Determinación de la capacidad antioxidante.....	25
3.7.1	Método ABTS.	25
3.7.2	Método FRAP.....	27
3.7.3	Método DPPH.....	28
3.8	Análisis estadístico	29

4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
4.1	Fenoles totales y capacidad antioxidante de “siete harinas”	31
4.1.1	ABTS.....	33
4.1.2	FRAP.....	34
4.1.3	DPPH.	35
	CONCLUSIONES	37
	RECOMENDACIONES.....	38
	BIBLIOGRAFÍA.....	39
	ANEXOS.....	48

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Estructura básica de los compuestos fenólicos.....	12
Figura 2: Clasificación de los antioxidantes fenólicos.....	13
Figura 3: Reacción química por el método de Folin-Ciocalteu	14
Figura 4: Molécula de ABTS luego de la reacción con un antioxidante	16
Figura 5: Reacción generada por el método FRAP	16
Figura 6: Molécula de DPPH durante la reacción con un antioxidante	17
Figura 7: Metodología para obtención de extractos	23
Figura 8: Metodología para fenoles totales mediante el método de Folin-Ciocalteu	24
Figura 9: Metodología para el método ABTS	26
Figura 10: Metodología para el método FRAP	27
Figura 11: Metodología para el método DPPH.....	28

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Características de la muestra 1 y 2 de harinas.....	22
---	----

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1: Concentración de fenoles totales en “siete harinas”.. ..	31
Gráfica 2: Actividad antioxidante ABTS en “siete harinas”.. ..	33
Gráfica 3: Actividad antioxidante FRAP en “siete harinas”.. ..	34
Gráfica 4: Actividad antioxidante DPPH en “siete harinas”.....	35

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO A. Obtención de extractos	49
ANEXO B. Fenoles Totales. Método Folin-Ciocalteu	50
ANEXO C. Método ABTS	55
ANEXO D. Método FRAP	61
ANEXO E. Método DPPH.....	68
ANEXO F. Análisis estadístico ANOVA	74

NOMENCLATURA

ABTS: 2,2 – Azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)

Abs: Absorbancia

ANOVA: Análisis de varianza

BH: Base húmeda

BS: Base seca

CFT: Contenido de Fenoles totales

DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidracilo

EAG: Equivalentes de ácido gálico

ET: Equivalentes de trólox

FRAP: Poder antioxidante de reducción del hierro

Folin-C: Reactivo Folin-Ciocalteu

g: Gramo

HCl: Ácido clorhídrico

H₂O d.d: Agua destilada

% H: Porcentaje de humedad

H₂O: Agua

INEN: Instituto Ecuatoriano de Normalización

L: Litro

M: Molaridad

m: Pendiente

mL: Mililitros

MeOH: Metanol

mg EAG/100g: Micromoles equivalentes de ácido gálico/ 100 gramos de muestra

Min: Minuto

N: Normalidad

nm: Nanómetro

P1R1: Proveedor 1-repetición 1

P2R1: Proveedor 2-repetición 1

PM: Peso molecular

RL: Radicales Libres

rpm: Revoluciones por minuto

SP: Solución patrón

ST: Solución trabajo

% ST: Porcentaje de sólidos totales

TEAC: Capacidad antioxidante equivalente de trólox

TPTZ: 2, 4, 6-tripyridyl-s-triazina

TRÓLOX: Acido 6-hidroxi-2, 5, 7, 8-tetrametilcromo-2-acido carboxílico

μL: Microlitro

μM: Micromol

μmoles EQ. trólox/g: Micromoles equivalentes de trólox/ gramo de muestra

x: Concentración

y: Absorbancia

RESUMEN

En el presente proyecto se evaluó la riqueza del producto tradicional “siete harinas” como fuente de antioxidantes y compuestos fenólicos. Se utilizó muestras de dos proveedores de la provincia Loja. Luego de la obtención de extractos con acetona acuosa al 70%, se cuantificó el contenido total de fenoles mediante el método Folin-Ciocalteu y la actividad antioxidante por los métodos: ABTS, FRAP y DPPH. Los resultados obtenidos mostraron un contenido de fenoles totales de $446 \pm 8,47$ mg EAG/100 g BS y $382 \pm 6,56$ mg EAG/100 g BS. En cuanto a capacidad antioxidante, mediante el ensayo ABTS se obtuvo $37 \pm 1,16$ μ M ET/g BS y $30 \pm 2,15$ μ M ET/g BS, para FRAP $24 \pm 1,12$ μ M ET/g BS, $23 \pm 1,39$ μ M ET/ g BS y DPPH $97 \pm 2,20$ μ M ET/g BS, $101 \pm 1,94$ μ M ET/g BS, tanto para fenoles totales como para ABTS existió diferencia significativa ($p < 0.05$) entre ambos proveedores; sin embargo, para FRAP y DPPH no existió diferencia significativa. Con los resultados obtenidos existe evidencia sobre el importante contenido de compuestos bioactivos y antioxidantes del producto “siete harinas”.

PALABRAS CLAVES: Fenoles totales, capacidad antioxidante, siete harinas, alimento tradicional.

ABSTRACT

In this project the richness of traditional product "seven flours" as a source of antioxidants and phenolic compounds was evaluated. Samples from two suppliers of Loja province were used. After obtaining extracts with 70% aqueous acetone, it quantitated total phenols content by Folin-Ciocalteu method and antioxidant activity by methods: ABTS , FRAP and DPPH . The results showed total phenol content of 446 ± 8.47 mg EAG/100 g BS and $382 \text{ EAG} \pm 6.56$ mg/100 g BS. As for antioxidant capacity by ABTS assay 37 ± 1.16 $\mu\text{M ET/g BS}$ and 30 ± 2.15 $\mu\text{M ET/g BS}$, for FRAP 24 ± 1.12 $\mu\text{M ET/g BS}$, 23 ± 1.39 $\mu\text{M ET/g BS}$ and DPPH 97 ± 2.20 $\mu\text{M ET/g BS}$, 101 ± 194 $\mu\text{M ET/g BS}$ for both total and for ABTS phenols significant difference ($p < 0.05$) between the two suppliers; however, for FRAP and DPPH was no significant difference. With the results there is evidence of the important content of bioactive compounds and antioxidant product "seven flours".

KEYWORDS: Total phenolic, antioxidant capacity, seven flours, traditional food.

INTRODUCCIÓN

Ecuador cuenta con una variedad de alimentos nutritivos y de bajo costo (Espín et al., 2003), sin embargo los ecuatorianos optan por una dieta basada principalmente en productos industriales, ultra procesados (FAO, 2006), elaborados a partir de sustancias derivadas de los alimentos o sintetizadas de otras fuentes orgánicas (Eguren, 2015), los mismos que poseen un alto contenido en sodio, grasas, calorías, azúcares, aditivos artificiales, y cantidades mínimas de antioxidantes, fibra dietaria y micronutrientes (Banegas et al., 2007). La población está olvidando poco a poco el consumo de alimentos tradicionales y ancestrales (Kwik, 2008).

Frente a esta realidad, el producto tradicional de Loja, conocido como “siete harinas”, derivado de “siete semillas” alimento ancestral peruano; compuesto por una mezcla homogénea de cereales (harina de cebada tostada, trigo, maíz), leguminosas (harina de soya y haba), fruta (harina de plátano) y un tubérculo (almidón de achira); rico en nutrientes y antioxidantes, podría constituir una alternativa alimenticia, para el mejoramiento de la calidad de la dieta diaria y coadyuvar a la prevención de enfermedades crónicas no transmisibles.

Los cereales constituyen los alimentos básicos en todo el mundo, siendo buenas fuentes de compuestos antioxidantes (Masisi, Beta, & Moghadasian, 2015); en la harina de trigo destacan compuestos fenólicos como: ácido ferúlico, ácido fítico y flavonoides, además posee antioxidantes entre los cuales están el selenio, tocoferoles y tocotrienoles (León & Rosell, 2007), la de maíz contiene antocianinas como la cianidina-3-b-glucosa (Das & Singh, 2016), en la soya se encuentran isoflavonas (genisteína, daidzeína, equol), su capacidad antioxidante es superior a las vitaminas E y C (Duncan, 2016).

Actualmente se conoce que los radicales libres y el estrés oxidativo favorecen a la aparición de algunas enfermedades coronarias, ciertos tipos de cáncer, Alzheimer, artritis y, principalmente los procesos de envejecimiento (León & Rosell, 2007). El consumo de alimentos que contienen cantidades significativas de antioxidantes, reducen en gran medida la formación de radicales libres (Devi et al., 2009).

Por tal razón el presente estudio pretende favorecer en gran medida a la revalorización del alimento “siete harinas”, con la finalidad de incrementar su consumo local y contribuir en un futuro a su aprovechamiento industrial, mediante la cuantificación de los compuestos fenólicos y la determinación de la capacidad antioxidante.

Para ello la metodología empleada consistió en adquirir la materia prima, “siete harinas”, de dos diferentes proveedores, adquirida en las ferias libres de la Tebaida y las Pitas de la ciudad de Loja. Cada harina fue sometida a un proceso de molienda y luego mezclada en proporciones de 15,5% de harinas de cebada, trigo, maíz, soya, haba, plátano y 7% de almidón de achira. Luego el producto “siete harinas”, se envasó al vacío en fundas de polietileno y almacenó a temperatura ambiente (alrededor de 22 °C), hasta su utilización.

Para preparar los extractos se pesó 0,5 g de “siete harinas” utilizando dos extracciones simultaneas, primero con 20 mL de solución metanol/agua acidificada (50:50 v/v) con HCl 2 N y un pH 2, seguido con 20 mL de solución acetona/agua (70:30 v/v), los sobrenadantes obtenidos de las extracciones se unieron, obteniendo 40 mL de extracto. Al extracto obtenido se le midió la cantidad de fenoles totales por el método colorimétrico Folin-Ciocalteu y la actividad antioxidante por los métodos: ABTS, FRAP y DPPH.

El presente proyecto consta de seis capítulos, los cuales están expuestos de la siguiente manera: revisión de literatura, objetivos, metodología, resultados y discusión de los mismos, conclusiones y finalmente recomendaciones.

1 REVISIÓN DE LITERATURA

1.1 Harinas compuestas

Las harinas consisten en el polvo obtenido de la molienda de alguna semilla, especialmente de trigo (Larousse, 2009).

En 1964 la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), creó el término “harinas compuestas”, cuando reconoció la necesidad de buscar una solución al problema alimentario enfrentado por los países que no producen trigo (Albornoz & Romero, 2004).

Las harinas compuestas son mezclas de varias harinas obtenidas a partir de raíces y tubérculos, cereales, legumbres, etc., con o sin la adición de trigo (Olaniyan SA & Ademola AA, 2015). También puede ser una mezcla de diferentes harinas de cereales, leguminosas o cultivos de raíz que se creó para satisfacer las características funcionales específicas y composición de nutrientes (Ubbor & Akobundu, 2009).

Las harinas de grano entero proporcionan aminoácidos esenciales, vitaminas, minerales, fitoquímicos beneficiosos y componentes de fibra dietética en la dieta humana (Masisi et al., 2015). Sin embargo cuando los cereales son procesados, se pierden algunos de sus compuestos, varios estudios muestran que se puede enriquecer una harina, si se la mezcla con otros productos generalmente leguminosas (garbanzo, guisantes, frijol, habas, lentejas), dándose así la formación de harinas compuestas (Aghamirzaei, Heydari-dalfard, Karami, & Fathi, 2013).

1.2 Composición de producto siete harinas

Tradicionalmente los pueblos indígenas se alimentaban principalmente de productos de origen vegetal, que ellos mismos cultivaban. El uso de aquellos alimentos tradicionales se ha transmitido de generación en generación (Kwik, 2008). Las propiedades nutritivas le dan valor a estos alimentos, siendo consumidos en una variedad de preparaciones, en diferentes lugares del mundo (Villarroel, 2008).

En el Perú se conoce la harina “7 semillas” (algarrobo, kiwicha, cañihua, quinua, linaza, polen y maca), misma que es un alimento ancestral rica en proteínas, vitaminas y minerales, este alimento ayuda a limpiar los riñones, disminuir la tensión arterial, bajar los niveles de colesterol, favorecer al tránsito intestinal, prevenir la anemia, el cáncer, entre otros (Bazar, 2015). La provincia de Loja adoptó este producto peruano; denominándola “siete harinas” la

cual conserva su aporte nutricional; pero modificó sus ingredientes debido sin duda a la disponibilidad de los mismos. Está compuesta por cereales integrales (trigo, cebada, maíz); legumbres (haba, soya); tubérculo (achira) y fruta (plátano). Los agricultores de la etnia Saraguro elaboran artesanalmente este alimento tradicional y lo comercializan en ferias libres y mercados. También se la puede adquirir en supermercados de la ciudad de Loja con el nombre comercial de “las ricas 7 harinas”.

Se la usa generalmente para preparar coladas, papillas, como ingrediente en galletas, pasteles e incluso sopas (Japón, 2015). El principal constituyente de este alimento son los cereales. mismos que son una rica fuente de compuestos nutricionales y fitoquímicos (Bhatt & Gupta, 2015); las harinas elaboradas con base a cereales integrales contienen gran variedad de polifenoles que se han relacionado con beneficios significativos en la salud (Sarwar & Sarwar, 2013).

1.2.1 Harina de trigo (*Triticum aestivum* L.).

Según la Norma INEN 616:2015, la harina de trigo se obtiene de la molienda de los granos de trigo y puede o no tener aditivos alimentarios. Los núcleos del grano de trigo contienen una serie de compuestos fenólicos, a saber, ferúlico, vanillico, gentísico, cafeico, salicílico, ácidos siríngico, p-cumárico y sinápico, así como la vainillina y siringaldehído. De estos, el ácido ferúlico fue el ácido fenólico primario en el grano, que representa hasta un 90% del total de ácidos fenólicos (Shahidi & Ambigaipalan, 2015).

El germen de trigo es rico en sustancias bioactivas, tales como antioxidantes y esteroides. Los antioxidantes incluyen principalmente α -y β -tocoferol y α - y β -tocotrienoles, β -tocotrienol y carotenoides (D'Antuono, 2016).

En la harina de trigo, especialmente en la integral existe una variedad de sustancias fitoquímicas; como el ácido fítico (fosfato de inositol) que es un antioxidante vegetal natural, muy bien conocido por su efecto inhibitorio de la biodisponibilidad de minerales, el cual ha despertado gran interés por su efecto anticancerígeno, también reduce el riesgo de tumores mamarios, especialmente cuando hay un alto contenido de minerales como calcio y hierro en la dieta (Mazza, 1998).

1.2.2 Harina de maíz (*Zea mays* L.).

Según la norma INEN 2051:2013, “La harina de maíz, es el producto obtenido de la molienda de granos *Zea mays* L., que se encuentren en buen estado, exentos de impurezas, moho, semillas de malas hierbas, y otros cereales. En el proceso de elaboración de la harina se pierde gran parte del salvado y del germen”.

Los maíces, en general los pigmentados contienen compuestos fenólicos, los cuales han despertado interés por sus propiedades antioxidantes y bioactivas. Los compuestos fenólicos libres más abundantes en el maíz son el ácido benzóico, el ácido ferúlico, el ácido cumárico y sus derivados (López & García, 2010). Presenta también antocianinas que le confieren la coloración al grano, principalmente 3-galactósido de cianidina, 3-glucósido de cianidina, 3-rútinósido de cianidina, 3-glucósido de peonidina (Pineda, 2009).

Los fenoles en el maíz están compuestos por ácidos fenólicos y flavonoides, mismos que se pueden encontrar en forma libre o soluble, o ligados a biomoléculas como proteínas y carbohidratos estructurales (Salinas, Pérez, Vázquez, Aragón. F., & Velázquez, 2012). Alrededor del 90 % de los ácidos fenólicos se encuentra en forma ligada, principalmente a componentes de pared celular (De La Parra, Serna Saldivar, & Liu, 2007), por su parte los flavonoides están mayoritariamente en forma extraíble o soluble. En el caso de las antocianinas la proporción ligada es bastante baja (Montilla, Hillebrand, Antezana, & Winterhalter, 2011). Se ha estudiado que el maíz es una buena fuente de potentes antioxidantes que se pueden utilizar en la industria de nutracéuticos (Shahidi & Ambigaipalan, 2015).

1.2.3 Harina de cebada (*Hordeum vulgare* L.).

En el Ecuador la cebada es el cereal mejor distribuido después del maíz en las zonas rurales de la serranía (Espín et al., 2003). Los granos de cebada tienen un bajo contenido en grasa 2-3 %, carbohidratos como el almidón 65-68 %, proteínas 10-17 %, además de minerales, vitaminas, antioxidantes principalmente vitamina E y polifenoles, y fibra soluble e insoluble. La fibra total varía entre 11-34 % y la fibra soluble entre 3-20 % (Izydorczyk, Storsley, Labossiere, Macgregor, & Rossnagel, 2000).

Los compuestos fenólicos de la cebada incluyen tirosina, tiramina y sus derivados, ácidos fenólicos, sus ésteres y glucósidos, antocianinas, proantocianidinas, lignanos y sustancias

relacionadas a la lignina. El ácido ferúlico es el ácido fenólico predominante en semillas de cebada (Shahidi & Ambigaipalan, 2015).

Los usos de la cebada en el país son varios, una de las principales es la máchica que es la harina de cebada tostada y como arroz de cebada, que unidas representan el 88,3% del total de la cebada consumida (Poveda, 2006).

La machica se define como una harina elaborada a partir del grano de cebada tostada y posteriormente sometida a un proceso de molienda, aunque también puede ser elaborada de maíz o trigo, dependiendo del país donde se la prepare (Martinez, 2003).

1.2.4 Harina de haba (*Vicia faba* L.).

En las semillas de leguminosas hay una serie de componentes que ejercen un impacto negativo en la calidad nutricional de la proteína. Sin embargo, estos mismos compuestos pueden tener efectos protectores contra el cáncer (Mohan, Tresina, & Daffodil, 2016).

Las habas contienen compuestos antioxidante como flavonoides, flavonoles como la miricetina (2.6 mg/100 g), quercetina (2.0 mg/100 g) y kaempferol (< 0.2 mg/100 g), y flavonas como la luteolina (< 0.1 mg/100 g) y apigenina (< 0.2mg/100 g). Además poseen pequeñas cantidades de isoflavonas (0.03 mg/100 g). Estos compuestos se consideran anti nutrientes que confieren simultáneamente beneficios para la salud (Gutiérrez, Guajardo, & López, 2016).

1.2.5 Harina de soya (*Glycine max* L.).

La harina de soya o soja es un polvo fino que se elabora a partir de los granos tostados y finamente molidos (Salvador, 2006). Es un alimento de alta calidad, ya que contiene proteínas, grasas, aminoácidos esenciales y fitoquímicos, incluyendo iso-flavonas, tocoferoles, saponinas y antocianinas, siendo idóneo incluirla en la dieta alimenticia humana (Correa et al., 2010).

La soya y sus derivados son la mayor fuente de isoflavonas en la dieta. Tiene alrededor de 0,2-0,3 g de isoflavonas, fenoles heterocíclicos de estructura molecular próxima a la del estradiol. Los fitoestrógenos que contiene la soja son la dadzeina y la genisteína, ambos podrían aumentar la producción de hormonas femeninas (Calvo, 2003).

Hay una creciente evidencia de que el consumo de soya y los productos derivados de la misma; podrían proteger contra tipos de cáncer dependientes de hormonas, como el de mama y de próstata, y tener efectos beneficiosos con respecto a las enfermedades cardiovasculares, osteoporosis y síntomas de la menopausia (Devi et al., 2009).

1.2.6 Harina de plátano (*Musa paradisiaca* L.).

La harina de plátano es un producto procesado y precocido que se obtiene de la transformación del plátano, es un polvo de color blanco parduzco, de fácil digestión y susceptible a la humedad (Orozco & Picón, 2011). Es un alimento nutritivo que tiene excelentes propiedades para el tratamiento de ciertas enfermedades, este producto se encuentra entre los más nutritivos de la alimentación humana (Reinoso, 2013). El fruto del plátano tiene compuestos polifenólicos con capacidad antioxidante (Rosales et al., 2014).

1.2.7 Harina de achira (*Canna edulis*, Ker).

La achira es nativa de América del Sur; sin embargo se ha aclimatado a las regiones cálidas de todo el mundo. Es una planta que, según historiadores e investigadores, fue cultivada desde hace siglos por los Incas. Hoy en día, se cultiva en los países andinos como: Colombia, Ecuador, Perú y Bolivia; además de ellos esta Venezuela y Brasil y, otras regiones del mundo como: Asia, África y la Polinesia (González, 2012).

De acuerdo a Idrovo, (2010), en su estudio de factibilidad para la producción y comercialización de harina de achira (*Canna Edulis*, Ker) en el cantón Loja, menciona que en Ecuador, específicamente en la provincia de Loja, la harina de achira se la conoce como “chuno” y es muy usada en aplicaciones culinarias.

1.3 Radicales libres y Antioxidantes

Los radicales libres (RL), o conocidos también como especies reactivas de Oxígeno (ERO), son átomos o grupos de átomos que poseen un electrón libre, por lo cual son muy reactivos y tienden a captar un electrón de las moléculas estables con el fin de alcanzar su estabilidad electroquímica (Avello & Suwalsky, 2006).

Los radicales libres pueden formarse a partir de reacciones metabólicas dentro de la célula, ya que el propio organismo los elabora en cantidades moderadas para luchar contra virus y bacterias, se pueden generar también de forma espontánea si las condiciones del medio son

propicias para ello, por ejemplo la exposición a ciertos compuestos químicos, por estrés oxidativo generado durante el ejercicio físico demasiado intenso, por contaminantes del aire, por radiaciones ionizantes, por drogas, bacterias y virus (Zamora, 2007), (Gutiérrez et al., 2016).

Las reacciones químicas de los radicales libres ocurren constantemente en las células del cuerpo y son importantes para mantener la salud; proceso que está controlado con una adecuada protección antioxidante (Avello & Suwalsky, 2006).

Sin embargo el problema radica cuando se genera un incremento de los radicales libres por encima de la cantidad de sustancias antioxidantes, lo cual ocasiona la destrucción de enzimas como la superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx), y catalasa, ocasionando efectos letales en las células debido a la oxidación de lípidos, proteínas, ácido desoxirribonucleico y enzimas; generando reacciones en cadena que perpetúan la formación de radicales libres, aumentando así el daño en los tejidos (Krishnaiah, Nithyanandam, & Sarbatly, 2012).

Los radicales libres son responsables de causar un gran número de enfermedades como el cáncer, Alzheimer, Parkinson, deterioro cognitivo leve, enfermedades cardiovasculares, enfermedades del hígado inducidas por el alcohol, colitis ulcerosa, envejecimiento prematuro y aterosclerosis (Alam, Bristi, & Rafiquzzaman, 2013)

Los antioxidantes son sustancias capaces de inhibir o retardar el proceso oxidativo producido por los radicales libres (Chand, Kanti, & Mukherjee, 2010). Los antioxidantes son de interés, ya que pueden ayudar a proteger el cuerpo humano contra daños causados por especies de oxígeno reactivas (ROS) (Shahidi & Ambigaipalan, 2015). Facilitan el uso fisiológico del oxígeno por las mitocondrias de las células, lo cual ayuda a disminuir el estrés oxidativo y por consiguiente ayuda en la prevención de enfermedades crónicas no transmisibles (Zamora, 2007).

La poca capacidad del organismo para neutralizar los radicales libres a los que diariamente está expuesto, exige recurrir a nutrientes que tengan la propiedad de neutralizarlos; un nutriente tiene propiedades antioxidantes cuando es capaz de neutralizar la acción de un radical libre sin que pierda su propia estabilidad. Por tal razón se requiere una dieta que contenga antioxidantes generalmente de origen vegetal (Halliwell, 1994).

Los antioxidantes de origen vegetal son un conjunto de fitoquímicos tales como las antocianinas, carotenoides, flavonas, flavonoides, vitaminas (E y C), y ácidos felúricos, entre los más importantes (Guevara & Alvarado, 2014). No hay una recomendación de ingesta diaria para estos compuestos bioactivos; porque no son nutrientes y, aunque asociado con la salud óptima, no ha sido posible identificar la gama o alcance de la ingesta requerida (Griffiths, 2016).

Actualmente los antioxidantes también se están convirtiendo en un elemento indispensable en la industria de los alimentos, siendo usados como aditivos alimentarios, debido principalmente a sus propiedades únicas de extender la vida útil de sensoriales o nutricionales (Shahidi & Ambigaipalan, 2015).

1.4 Compuestos fenólicos y capacidad antioxidante

1.4.1 Compuestos fenólicos.

Los compuestos fenólicos constituyen un gran número de sustancias fuertemente heterogéneas, que se caracterizan por poseer un anillo aromático, con al menos una sustitución hidroxilo y una cadena lateral funcional (Aguilera, 2009).

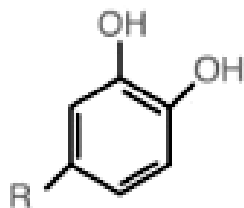


Figura 1: Estructura básica de los compuestos fenólicos.

Fuente: Aguilera (2009)

La mayoría de los fitoquímicos son antioxidantes, importantes compuestos bioactivos para el cuerpo humano (Huang et al., 2014). Los compuestos fenólicos constituyen el mayor tipo de fitoquímicos (Griffiths, 2016).

Los compuestos fenólicos, junto con otros muchos compuestos naturales como terpenos, alcaloides, aminoácidos no proteicos, entre otros, constituyen un amplio conjunto de metabolitos secundarios de las plantas, derivados generalmente por dos principales vías de

la aromagénesis, la del shikimato y la del acetato (Isaza, Veloza, Guevara, Ávila, & Díaz, 2005).

Pueden ser sintéticos o naturales, siendo los más importantes (**figura 2**).

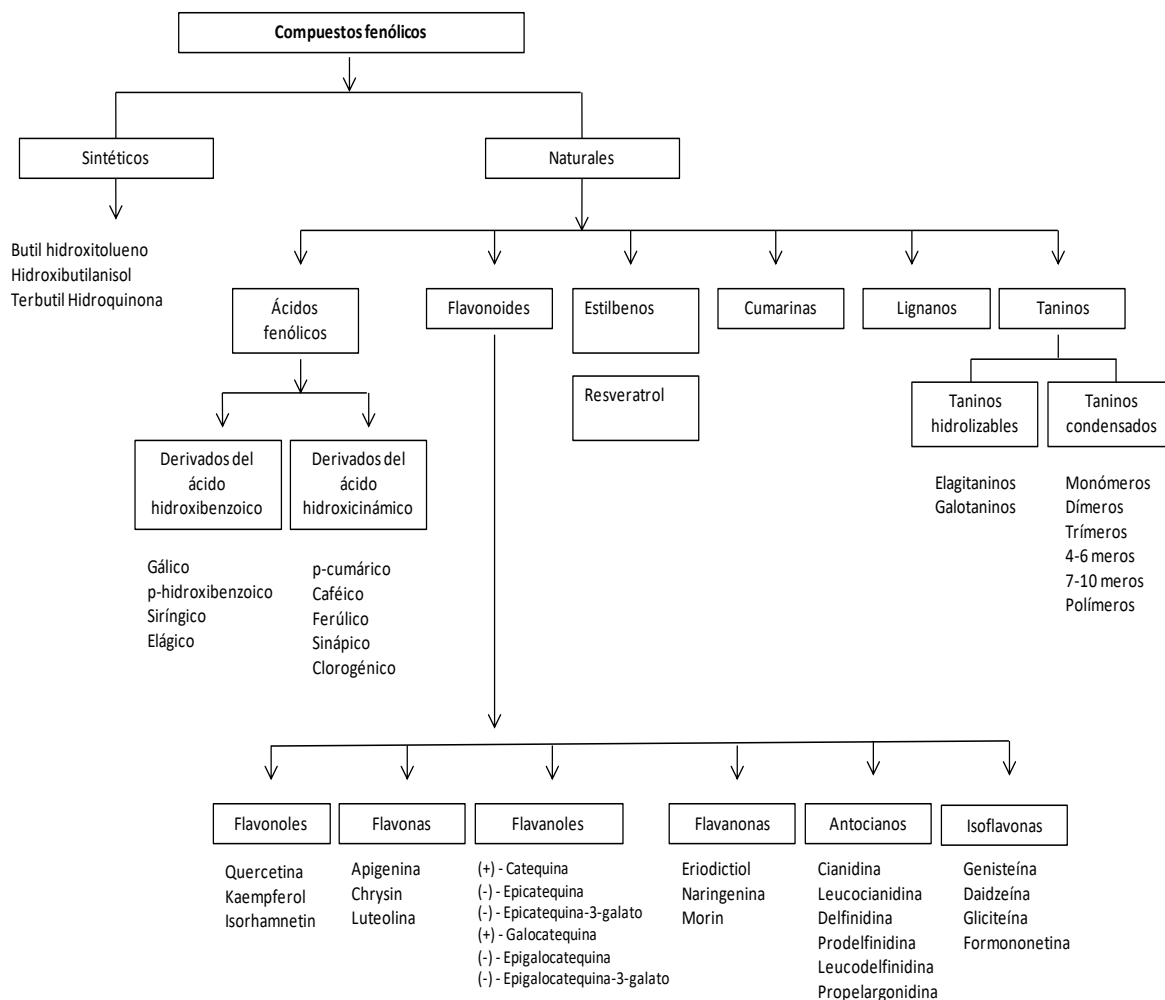


Figura 2: Clasificación de los antioxidantes fenólicos

Fuente: Shahidi & Ambigaipalan (2015)

Elaboración: La autora

En la actualidad, los compuestos fenólicos tienen importancia como compuestos bioactivos, por poseer propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antimutagénicas, anticancerígenas, y antibacterianas (Aguilera, 2009). Los compuestos fenólicos son incluidos generalmente en la categoría de captadores de radicales libres, aunque también pueden ejercer su acción antioxidante a través de otros mecanismos, como quelantes de iones metálicos que catalizan reacciones de oxidación (Martínez, González, Culebras, & Tuñón, 2002).

El consumo alimenticio de los compuestos fenólicos se ve afectado en gran medida por los hábitos y preferencias alimenticias de los individuos. La ingesta diaria promedio de polifenoles en la dieta es de aproximadamente 1 g por persona; las principales fuentes son frutas y, en menor medida, legumbres, verduras y cereales (Shahidi & Ambigaipalan, 2015).

La determinación del contenido total de fenoles es un factor importante ya que ayuda a estimar la actividad antioxidante en función de los compuestos polifenólicos del producto, para lo cual se usa el ensayo colorimétrico de Folin-Ciocalteu cuyo reactivo posee el mismo nombre, descrito por Thaipong et al., (2006), este método tuvo su origen en el año 1927 a partir de los reactivos químicos utilizados para el análisis de tirosina, en donde la oxidación de los fenoles, mediante un reactivo de molibdotungstato, producía un producto coloreado con un máximo de absorbancia a 745-750 nm (Prior et al., 2005). Con el pasar del tiempo Sigletón & Rossi, (1965) mejoraron el ensayo y lo extendieron al análisis de fenoles totales en muestras de vino; desde ese momento hasta la actualidad el ensayo Folin-Ciocalteu ha encontrado variadas aplicaciones (D. Huang, Ou, & Prior, 2005).

El reactivo del ensayo Folin-Ciocalteu, está compuesto por una mezcla de ácidos fosfowolfrámico y fosfomolibdico en medio básico, los que sufren reducción al oxidar los compuestos fenólicos, originando un complejo wolframio-molibdeno de color azul (**Figura 3**), cuya absorbancia es dependiente de la concentración de los polifenoles de la muestra (Kuskoski, Asuero, Troncoso, Mancini-Filho, & Fett, 2005).

La reacción química que se produce es la siguiente:

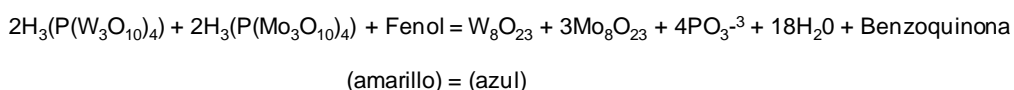


Figura 3: Reacción química por el método de Folin-Ciocalteu
Fuente: Huang et al. (2005); Prior, Wu, & Schaich (2005)

La intensidad del color azul formado se mide por espectrofotometría visible a una longitud de onda de 725 nm y cuya intensidad es proporcional a la cantidad total de fenoles (Kodama, Gonçalves, Lajolo, & Genovese, 2010).

1.4.2 Capacidad Antioxidante.

La capacidad antioxidante celular es dada por mecanismos a través de los cuales la célula anula la reactividad o inhibe la generación de radicales libres (Palamanda & Kehrer, 1992). Existen moléculas endógenas y exógenas con capacidad antioxidante. Los antioxidantes exógenos proceden de los alimentos, y dentro de este grupo se incluyen la vitamina E, la vitamina C y los carotenoides. La vitamina C constituye el antioxidante hidrosoluble más abundante en la sangre, mientras que la vitamina E es el antioxidante lipofílico mayoritario. El selenio junto con la vitamina E actúa como antioxidante (Avello & Suwalsky, 2006).

En alimentos de origen vegetal la actividad antioxidante se debe principalmente a la presencia de antioxidantes naturales. Cuando estos antioxidantes se hallan presentes en bajas concentraciones en comparación con la del sustrato oxidable, disminuyen significativamente o inhiben la oxidación de un sustrato (Carocho & Ferreira, 2013). Para determinar la capacidad antioxidante de un producto es necesario preparar un extracto y posterior a ello realizar una serie de ensayos en donde se evalúa la capacidad de una sustancia o de una mezcla de sustancias para inhibir procesos de oxidación. A continuación, se exponen los ensayos que fueron empleados en este estudio.

1.4.2.1 ABTS.

El método ABTS (2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico), es uno de los ensayos espectrométricos que han sido ampliamente utilizados para medir la actividad antioxidante de algunas soluciones (Re et al., 1999). Mide la capacidad captadora de los radicales libres, producto de la decoloración del radical ABTS, que se absorbe a una longitud de onda de 734 nm (Arnao, Cano, & Acosta, 2001). El ensayo original ABTS se basó en la activación de la metilmioglobina con H_2O_2 en presencia de ABTS para generar un radical catión, en presencia o ausencia de antioxidantes (Re et al., 1999).

El ABTS se fundamenta en la generación del radical catión ABTS e implica la producción directa del cromóforo ABTS, de verde-azul, a través de la oxidación de ABTS con persulfato de potasio ($K_2S_2O_8$) (**Figura 4**), y se reduce en presencia de antioxidantes donadores de

hidrógeno. De esta manera el ABTS reacciona con el compuesto polifenólico, ocasionando la formación de ABTS incoloro y la oxidación de compuesto polifenólico (Re et al., 1999). La reacción química que se produce es la siguiente:

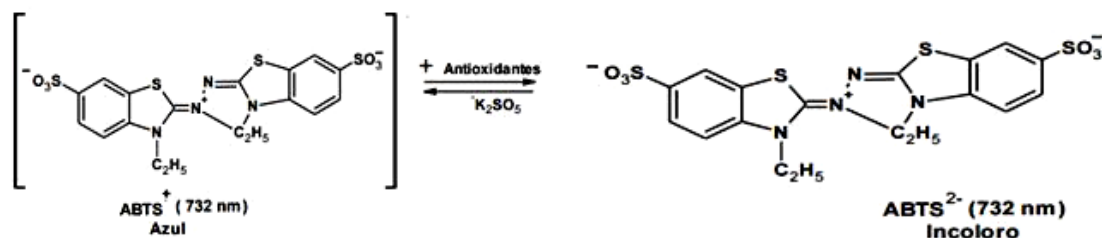


Figura 4: Molécula de ABTS luego de la reacción con un antioxidante
Fuente: Tobar (2013)

1.4.2.2 FRAP.

El ensayo FRAP “Ferric Reducing Antioxidant Power” (Poder antioxidante de reducción del hierro), fue planteado originalmente por Benzie & Strain, (1996) para medir el poder reductor en muestras de plasma. Este método se basa en la reducción del complejo -2,4,6, tripiridil-s-triazina (TPTZ), aquí el hierro férrico (Fe³⁺ - TPTZ) se reduce a ión ferroso a bajo pH, ocasionando la formación de un complejo ferroso-tripiridil triazina coloreado (Fe²⁺ - TPTZ), todo ello por acción de los compuestos antioxidantes (**Figura 5**), resultando una coloración azul que absorbe a 593 nm, cuya intensidad está relacionada proporcionalmente con la capacidad reductora de la muestra estudiada (Oliveira, 2014).

La reacción química que se produce es la siguiente:

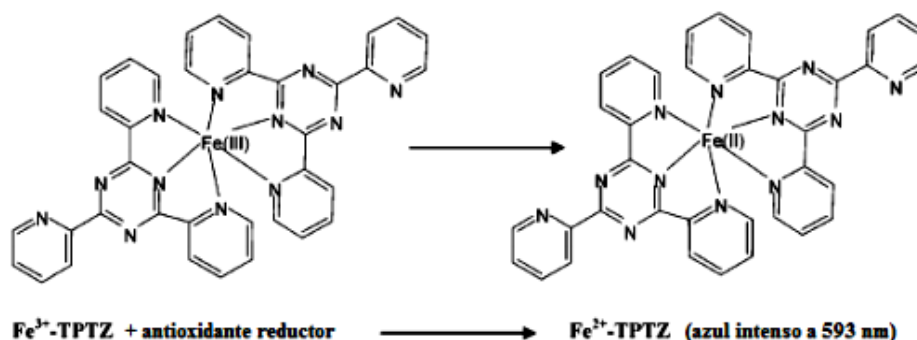


Figura 5: Reacción generada por el método FRAP
Fuente: Prior et al. (2005)

1.4.2.3 DPPH.

El ensayo DPPH (captación del radical 2,2- difenil-1-picrilhidrazilo), descrito por Brand et al., (1995) Con modificaciones realizadas por Thaipong et al., (2006). se basa en que el radical libre estable DPPH de color azul-violeta intenso, quita un átomo de hidrógeno proveniente de una sustancia donadora de electrones, en consecuencia de esto se genera una disminución del color (**figura 6**) del DPPH hacia amarillo-pálido (Oliveira, 2014).

La reacción química que se produce es la siguiente:

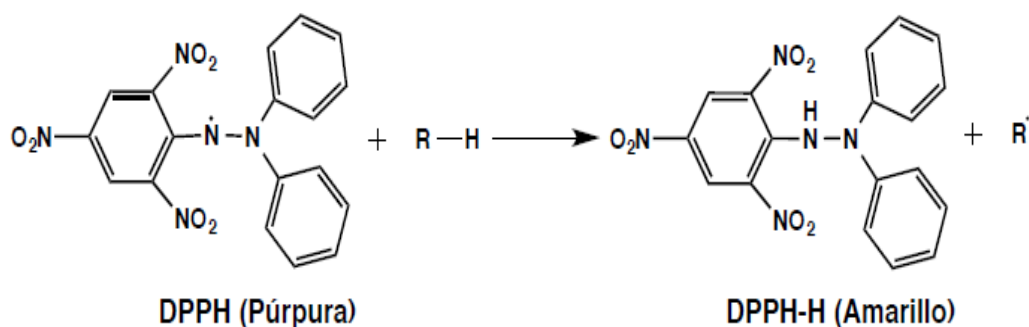


Figura 6: Molécula de DPPH durante la reacción con un antioxidante
Fuente: Tobar (2013)

Esta reacción se puede medir por espectrofotometría a una longitud de onda de 515 nm y se evidencia visiblemente una decoloración de la solución de DPPH, producida por el proceso de reducción originada por el compuesto antioxidante.

El ensayo DPPH, sin lugar a dudas ha sido adoptado por varios laboratorios, pero con modificaciones a conveniencia, el principal determinante es el tiempo que se requiere para que se produzca la reacción redox (Mishra, Ojha, & Chaudhury, 2012).

2 OBJETIVOS DEL PROYECTO

2.1 General

- ✓ Contribuir a la revalorización del producto tradicional “siete harinas” como fuente de antioxidantes y de compuestos fenólicos, favoreciendo el consumo local y su futuro aprovechamiento industrial.

2.2 Específicos

- ✓ Cuantificar los compuestos fenólicos totales.
- ✓ Determinar la capacidad antioxidante.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Equipos

- ✓ Baño maría Precisión Scientific
- ✓ Balanza analítica OHAUS Analytical Plus AP250D
- ✓ Centrifuga CLAY ADAMS Brand DYNAC 0101
- ✓ Espectrofotómetro visible 6400 Jenway
- ✓ Molino vibratorio de discos Retsch
- ✓ Mezclador en "V"

3.2 Reactivos

- **Extracción de antioxidantes**
 - ✓ Ácido clorhídrico (37% PQ)
 - ✓ Acetona
 - ✓ Metanol (99,9% PAI-ACS)
- **Fenoles totales**
 - ✓ Carbonato de sodio (Merk)
 - ✓ Folin-Ciocalteu 2N (Sigma-Aldrich)
 - ✓ Ácido Gálico (97.5 – 102.5% Sigma)
 - ✓ Metanol (99,9% PAI-ACS)
- **ABTS**
 - ✓ 2,2-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (>98% Sigma)
 - ✓ Persulfato de potasio (99 % USP) (Sigma-Aldrich)
 - ✓ Ácido 6-hidroxi-2, 5, 7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico (97%)
 - ✓ Trólox (Aldrich Chemistry)
- **FRAP**
 - ✓ Ácido clorhídrico (37% PQ)
 - ✓ 2, 4,6-tripiridil-s-triazina (<98%)
 - ✓ TPTZ (Sigma)
 - ✓ Acetato de sodio trihidratado (USP) (Merck)
 - ✓ Cloruro férrico hexahidratado (USP) (Merck)
 - ✓ Trólox (Aldrich Chemistry)
- **DPPH**
 - ✓ 2,2-difenil-1-picrihidrazilo (Sigma)
 - ✓ Ácido 6-hidroxi-2, 5, 7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico (97%)
 - ✓ Trólox (Aldrich Chemistry)

3.3 Materia prima

Se utilizó como materia prima el producto denominado “siete harinas”, constituido en un 15.5% de harinas de: cebada tostada (*Hordeum vulgare* L), trigo (*Triticum aestivum* L.), maíz (*Zea mays* L.), soya (*Glycine max* L.), haba (*Vicia faba* L.), plátano (*Musa paradisiaca* L.) y un 7% de almidón de achira (*Canna edulis*, Ker). Se analizaron dos muestras, correspondientes a dos proveedores, que las comercian en las ferias libres de las Pitas y la Tebaida en la ciudad Loja. En la **tabla 1**. Se observa las características de las harinas utilizadas para elaborar “siete harinas”.

Tabla 1: Características de la muestra 1 y 2 de harinas.

MUESTRAS 1 y 2		
Harina	Característica especial	Procedencia
Trigo	Integral	Tenta/Saraguro
Maíz	Integral	Tenta/Saraguro
Cebada	Tostada	Tenta/Saraguro
Soya	Tostada	Los Ríos
Haba	Integral	Tenta
Plátano	-----	Zamora Chinchipe
Achira	Almidón	Masanamaca/Yangana

Elaboración: La autora

3.4 Preparación de la materia prima

Con el fin de que el tamaño de partícula sea homogéneo, a cada harina se le realizó un proceso de molienda, en un molino vibratorio ultra centrífugo Retsch a 12000 rpm; obteniendo partículas $\leq 500 \mu\text{m}$. Posteriormente se pesó 77.5 g de harinas (trigo, cebada, maíz, haba, soya, plátano) y 35 g de harina de achira, esta mezcla fue homogenizada en un mezclador en “V” durante 5 minutos.

El producto “siete harinas”, se envasó al vacío en fundas de polietileno y almacenó a temperatura ambiente (alrededor de 22 °C), hasta su utilización.

3.5 Obtención de extractos

Se desarrolló según lo descrito por Pérez & Saura, (2007), con algunas modificaciones. Se trató la muestra con una solución de metanol y agua acidificada con HCl 2 N a un pH 2, en proporciones (50:50 v/v); posteriormente se sometió el residuo a una nueva extracción con acetona y agua (70:30 v/v). Los sobrenadantes se unieron y almacenaron en la oscuridad a 4 °C. Se detalla el procedimiento en la **figura 7**, y los cálculos realizados en el **Anexo A**.

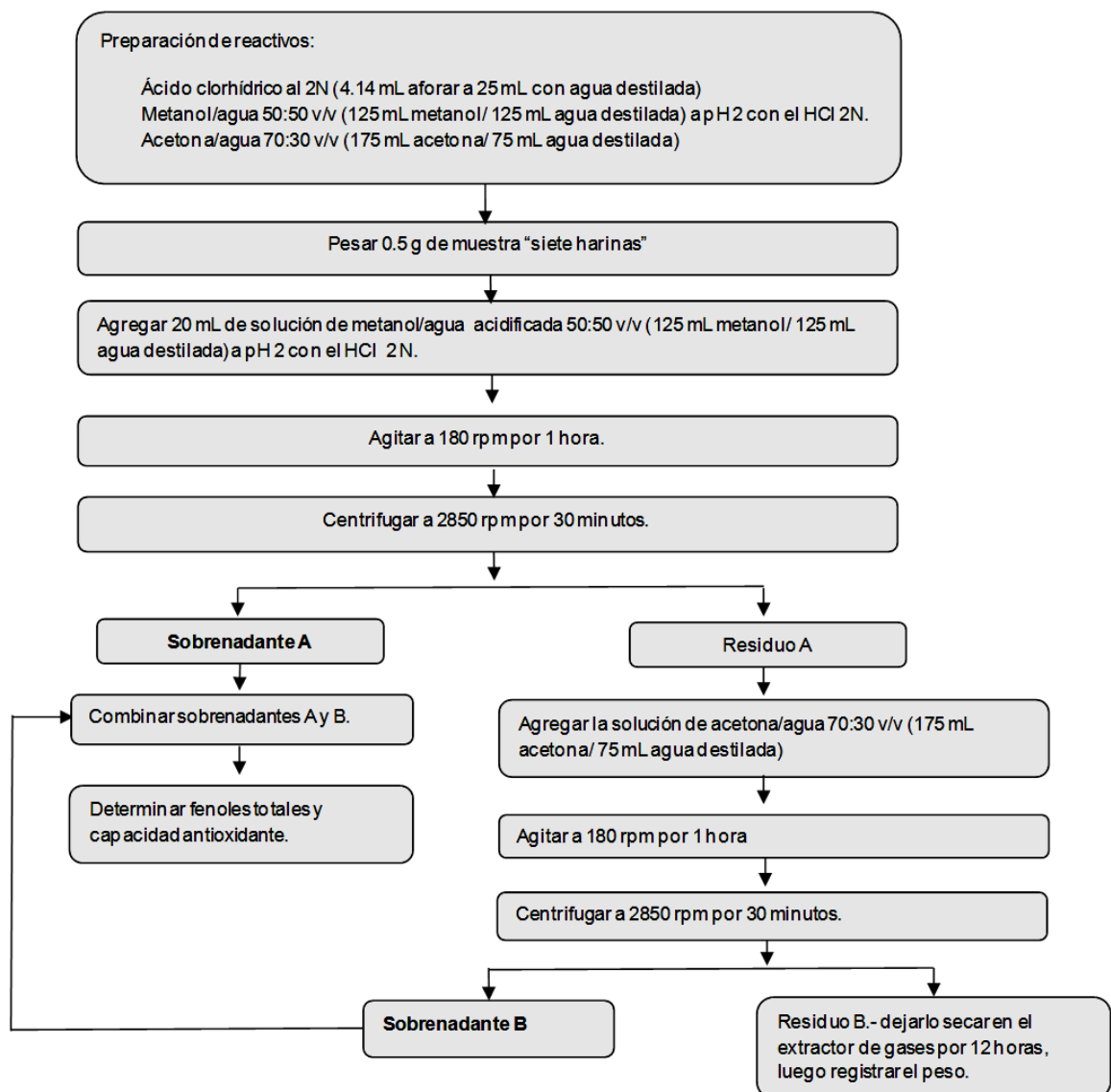


Figura 7: Metodología para obtención de extractos

Fuente: Thaipong et al. (2006)

Elaboración: La autora

3.6 Cuantificación de fenoles totales

3.6.1 Determinación del contenido de Fenoles totales.

Se determinó por el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu, descrito por Thaipong et al., (2006), mismo que se basa en la reducción de fenoles con el reactivo Folin-Ciocalteu y posterior neutralización con bicarbonato de sodio. El ensayo se lo realizó por triplicado para cada muestra, utilizando como blanco MeOH en reemplazo de las muestras. Se construyó una curva patrón usando como estándar ácido gálico (0-0,1 mg/mL). La lectura de la absorbancia se la realizó a 725 nm. Los resultados se expresaron como miligramos equivalentes de ácido gálico para cada 100 gramos de muestra en base seca (mg EAG /100 g BS). Se detalla el procedimiento en la **figura 8**, y los cálculos realizados en el **Anexo B**.

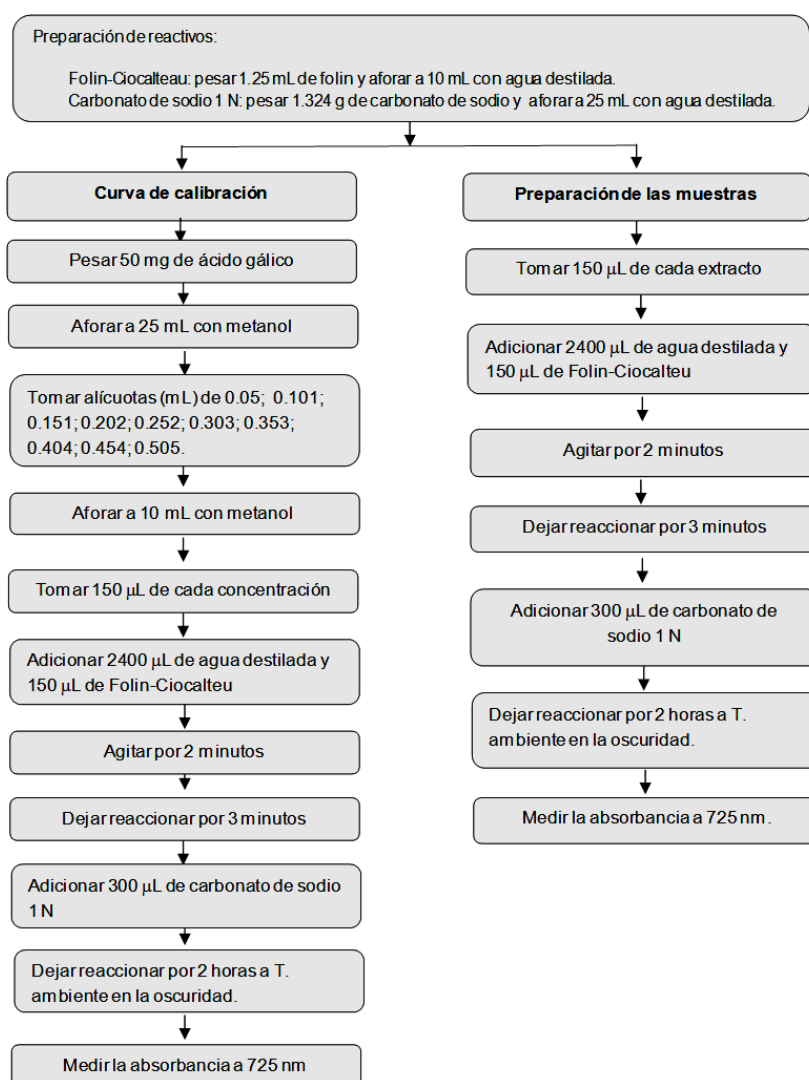


Figura 8: Metodología para fenoles totales mediante el método de Folin-Ciocalteu

Fuente: Thaipong et al. (2006)

Elaboración: La autora

3.7 Determinación de la capacidad antioxidante

Con la finalidad de evaluar el modo de acción e interacciones sinérgicas de los compuestos antioxidantes (Pérez & Saura, 2007), se emplearon tres métodos: ABTS, FRAP y DPPH, para determinar y cuantificar la capacidad antioxidante.

3.7.1 Método ABTS.

Mide generalmente la capacidad captadora de los radicales libres, producto de la decoloración del radical ABTS, que se absorbe a una longitud de onda de 734 nm (Arnao et al., 2001). De este modo, el ABTS reacciona con el compuesto polifenólico, ocasionando la formación de ABTS incoloro y la oxidación de compuesto polifenólico (Re et al. 1999). Para este método se sigue el procedimiento según Arnao et al. (2001), con algunas modificaciones descritas por Thaipong, (2006).

El ensayo se lo realizó por triplicado para cada muestra, utilizando como blanco MeOH en reemplazo de las muestras. Se empleó una curva estándar (25 – 600 μ M) de trólox. La absorbancia se leyó a 734 nm y el resultado se expresó en μ M equivalentes de trólox/g de materia seca. Se detalla el procedimiento en la **figura 9**, y los cálculos realizados en el **Anexo C**.

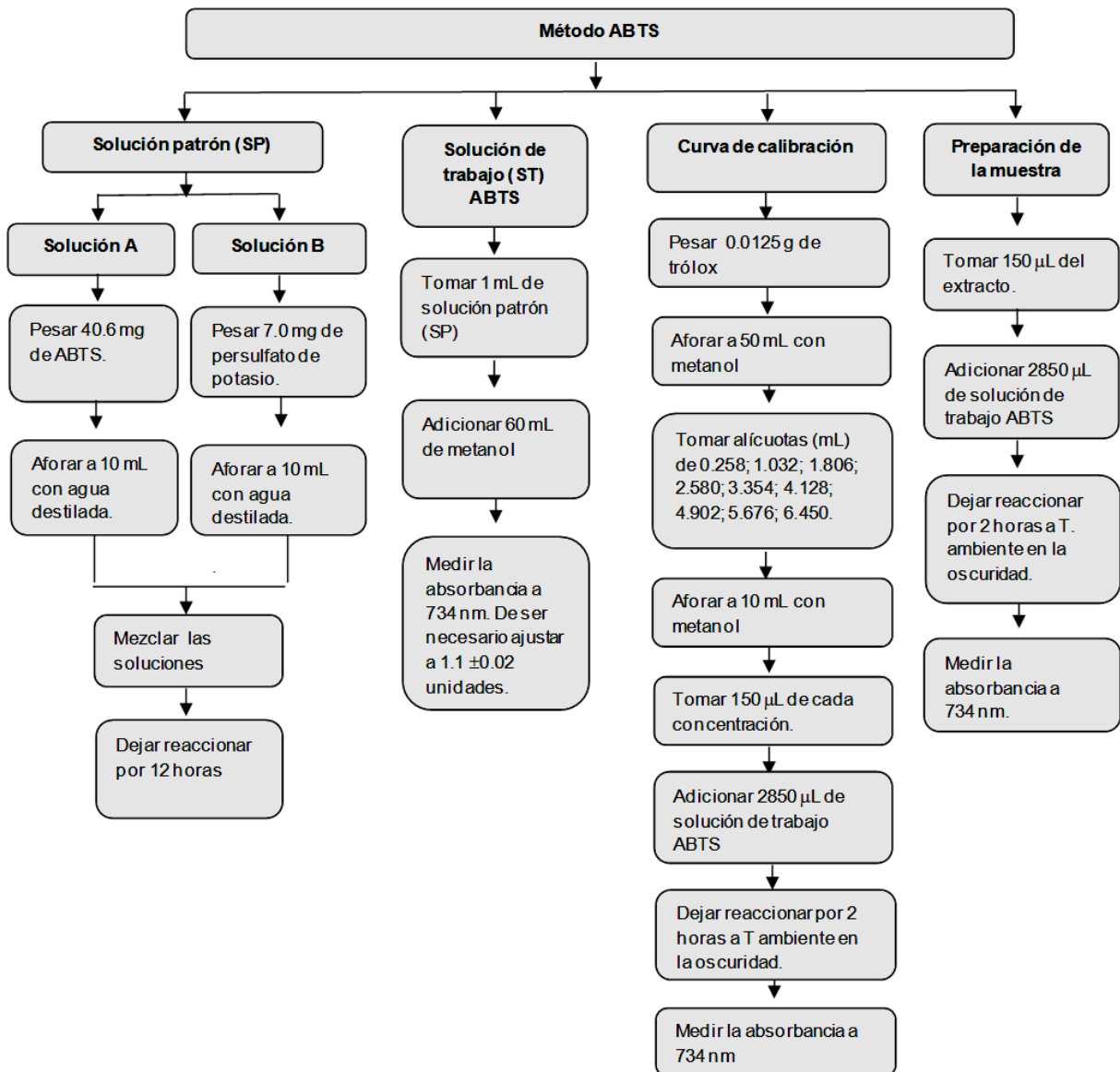


Figura 9: Metodología para el método ABTS

Fuente: Thaipong et al. (2006)

Elaboración: La autora

3.7.2 Método FRAP.

Planteado por Benzie & Strain, (1996), con modificaciones descritas por Thaipong et al., (2006). Este método determina la capacidad que posee una muestra para reducir hierro férrico con la molécula (TPTZ) a su forma ferrosa, formando un complejo de color azul. El ensayo se lo realizó por triplicado para cada muestra, utilizando como blanco MeOH en reemplazo de las muestras. Se empleó una curva estándar de (25 – 800 μM) de trólox. La absorbancia se leyó a 593 nm y el resultado se expresó en μM equivalentes de trólox/g de materia seca. Se detalla el procedimiento en la **figura 10**, y los cálculos realizados en el **Anexo D**.

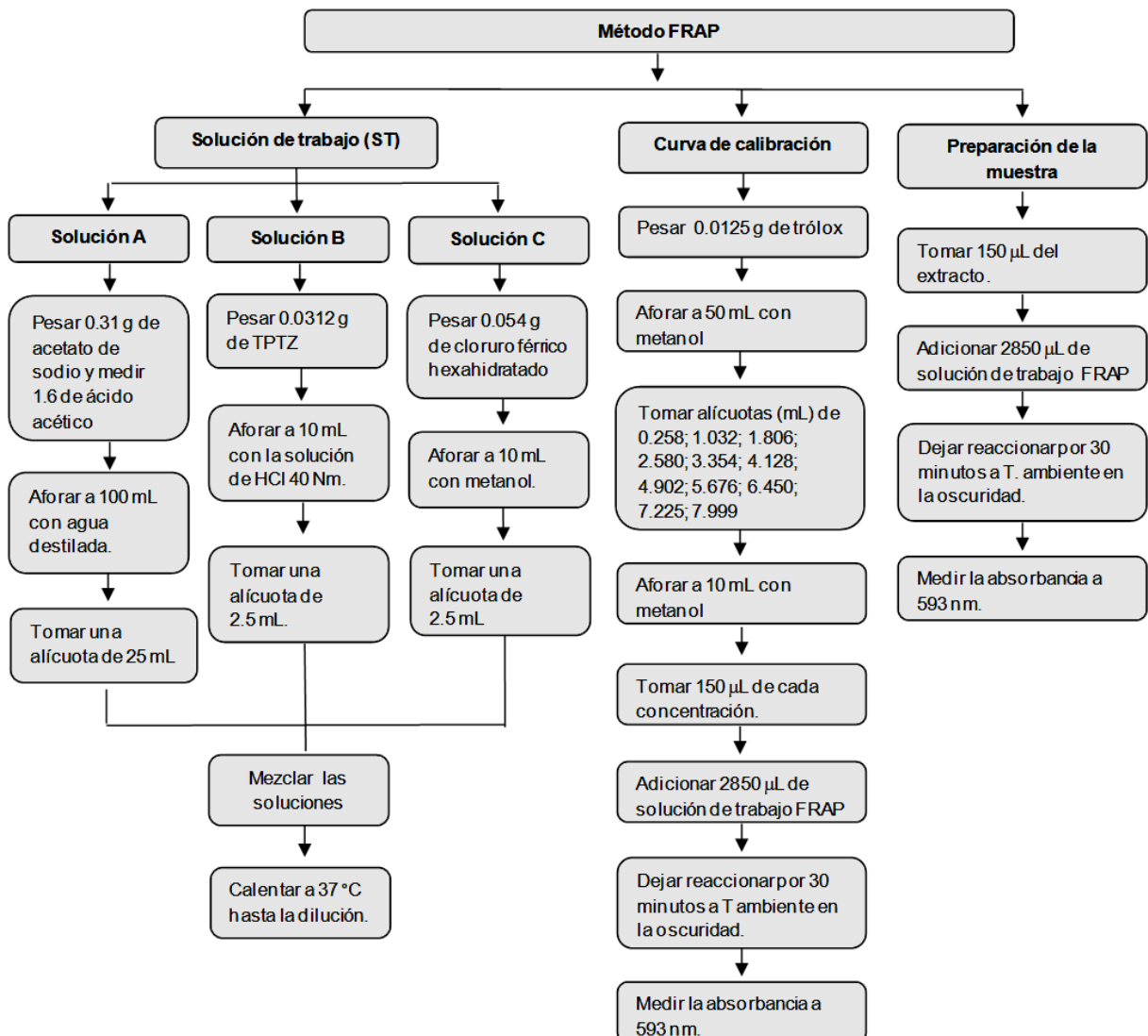


Figura 10: Metodología para el método FRAP

Fuente: Thaipong et al. (2006)

Elaboración: La autora

3.7.3 Método DPPH.

Descrito por Brand et al., (1995), con modificaciones realizadas por Thaipong et al., (2006). Se fundamenta en que el radical DPPH tiene un electrón desapareado de color azul-violeta, y ante una sustancia antioxidante se torna amarillo-pálido. El ensayo se lo realizó por triplicado para cada muestra, utilizando como blanco MeOH en reemplazo de las muestras. Se empleó una curva estándar (25 – 1000 μ M) de trólox. La absorbancia se leyó a 515 nm y se expresó el resultado en μ M equivalentes de trólox/g de materia seca. Se detalla el procedimiento en la **figura 11**, y los cálculos realizados en el **Anexo E**.

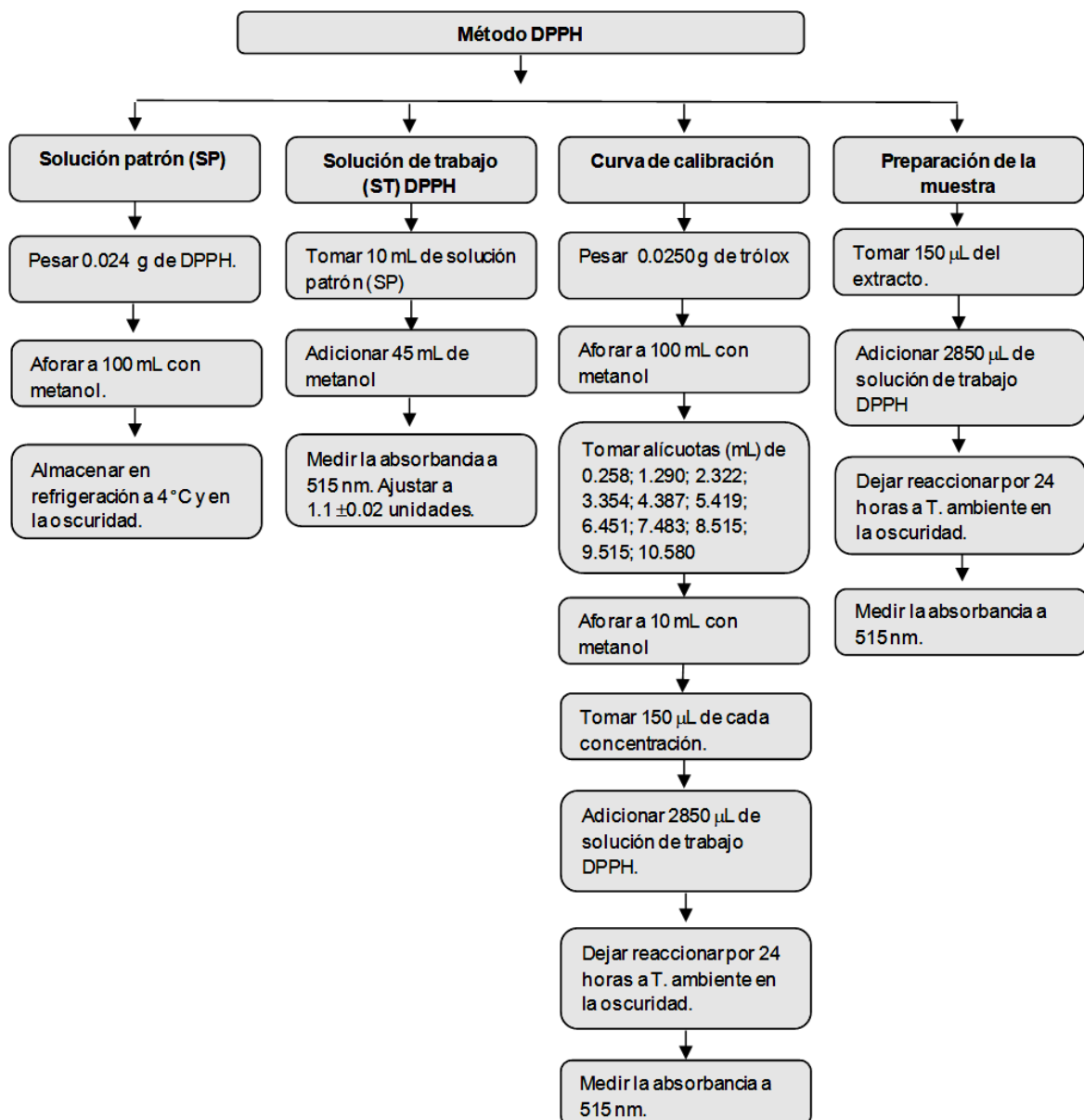


Figura 11: Metodología para el método DPPH
Fuente: Thaipong et al. (2006)
Elaboración: La autora

3.8 Análisis estadístico

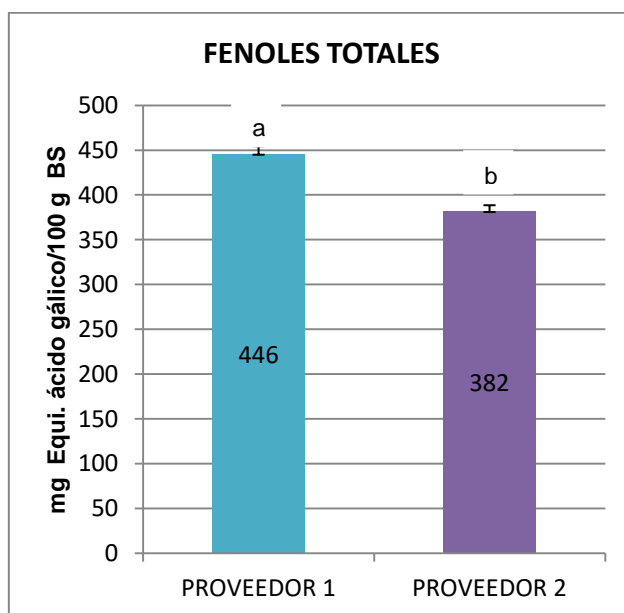
Se analizaron los resultados de fenoles totales y actividad antioxidante (ABTS, DPPH, FRAP), mediante un análisis de varianza ANOVA, a un nivel de significancia de 95%, seguido de un test de rango múltiple (Tukey). Se utilizó el programa estadístico MINITAB 16. Los valores se expresaron como la media \pm desviación estándar de tres repeticiones.

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Fenoles totales y capacidad antioxidante de “siete harinas”

El producto tradicional “siete harinas”, constituyó ser buena fuente de antioxidantes, principalmente de polifenoles, derivados del aporte de los cereales (trigo, maíz, cebada), leguminosas (haba, soya) y fruta (plátano). Como muestran algunos estudios el trigo tiene 53.1 ± 2.8 mg EAG/100 g BS (Alvarez, Wijngaard, Arendt, & Gallagher, 2010), el maíz también es rico en antioxidantes, Ramos et al., (2012) demuestra que una variedad de maíz morado tiene 699 mg EAG/100g de fenoles totales. Los principales antioxidantes en el maíz son los carotenoides: luteína y la zeaxantina, en una concentración de 1.36 mg/100 g de harina en base seca. El maíz es una de las pocas fuentes de estos carotenoides que tienen importancia en la prevención de cáncer, cataratas y la degeneración macular relacionada con el envejecimiento (León & Rosell, 2007). Devi et al., (2009) estudiaron varios productos derivados de la soya, entre ellos la harina obteniendo 2300 mg EGA/100 g de harina de soya.

En la **gráfica 1**. Se observa el contenido de fenoles totales del producto “siete harinas”, $446 \pm 8,47$ mg EAG/100 g BS y $382 \pm 6,56$ mg EAG/100 g BS, correspondientes al proveedor 1 y 2 respectivamente.



Gráfica 1: Concentración de fenoles totales en “siete harinas”. Valores representan la media de tres repeticiones. Letras minúsculas distintas muestran diferencia estadística ($p < 0,05$), entre ambos proveedores.

Elaboración: La autora

En los resultados obtenidos, se evidenció diferencia estadística ($p < 0.05$) en el contenido de fenoles totales, probablemente debido a que la materia prima proviene de diferentes proveedores, como menciona Devi et al., (2009) los niveles de los fitoquímicos dependen en gran medida de muchos factores, tales como el clima, el año de cultivo, la siembra y los genotipos. En otro estudio realizado por Kim, Hahn, & Chung, (2005), mencionan que la temperatura, el tiempo y las condiciones de almacenamiento, pueden influir en la disminución de los niveles de antioxidantes. Alguna de estas condiciones pudo influir, para que se presente variación en la composición fenólica de las muestras analizadas.

Debido a que no existen estudios publicados sobre compuestos fenólicos en siete harinas, se comparará los resultados con harinas de alimentos ancestrales representativos como la quinua y amaranto, considerados fuentes de compuestos fenólicos. Como menciona un estudio realizado por Alvarez et al., (2010), el contenido de fenoles totales en amaranto y quinua es 21.2 ± 2.3 mg EAG/100 g y 71.7 ± 5.5 mg EAG/100 g. Al comparar estas investigaciones con los resultados obtenidos se puede notar que siete harinas supera a lo reportado por Alvarez et al., (2010).

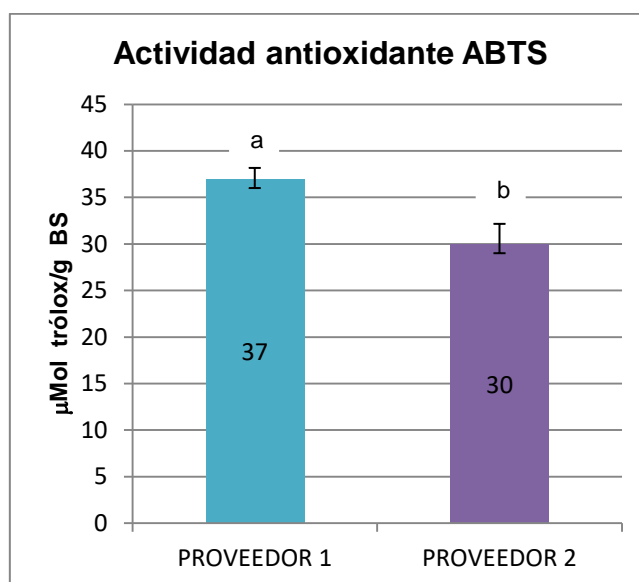
Si lo comparamos con granos de sorgo, una investigación realizada por Ragaei, Abdelaal, & Noaman, (2006), muestra un contenido de fenoles totales de $412,8 \pm 9,3$ mg EAG/100 g, un contenido bastante similar al producto siete harinas.

Por otro lado Pineda, (2009), en un estudio para harina compuesta de trigo y frijol bayo, reporta 144 ± 0.13 mg ácido felúrico/100 g fenoles totales; pero la solución que usa como estándar difiere en cuanto a la utilizada en este estudio.

El rango estimado del consumo de compuestos fenólicos es de 25 mg diarios (Gasztonyi, Tomoskocz, Berki, Petróczi, & Daood, 2011). Como se reportó siete harinas contiene $446 \pm 8,47$ mg EAG/100 g BS, así una porción de 30 g de "siete harinas" aportaría aproximadamente 134 mg de compuestos fenólicos, lo cual se halla dentro de los valores diarios recomendados para los anti nutrientes, aunque sin duda este aporte es inferior al de frutas y bebidas como el té, el vino tinto y el café; sin embargo, las harinas de cereales y leguminosas contienen compuestos antioxidantes únicos (Alvarez et al., 2010), como luteína y la zeaxantina presentes en el maíz, que ayudan a prevenir algunos tipos de cáncer (León & Rosell, 2007).

4.1.1 ABTS.

En la **gráfica 2**, se muestra la actividad antioxidante ABTS del producto “siete harinas”, se puede observar que las muestras presentan $37 \pm 1,16 \mu\text{M ET/g BS}$ y $30 \pm 2,15 \mu\text{M ET/g BS}$, existiendo diferencia significativa ($p < 0.05$), entre muestras de ambos proveedores.



Gráfica 2: Actividad antioxidante ABTS en “siete harinas”. Valores representan la media de tres repeticiones. Letras minúsculas distintas muestran diferencia estadística ($p < 0,05$), entre ambos proveedores.

Elaboración: La autora

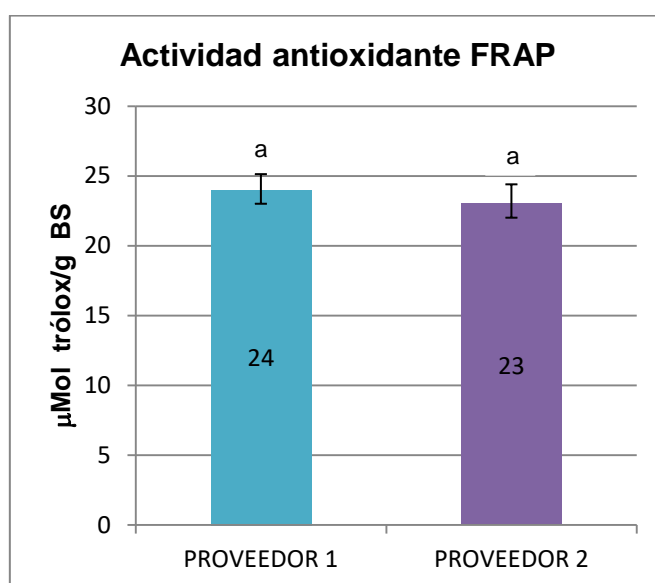
La capacidad antioxidante puede verse afectada debido a varios factores, tales como: genética, procesos agrotécnicas, condiciones ambientales (Alvarez et al., 2010), el suelo, el clima, la tensión y al tratamiento con fertilizantes que sufren los cultivos alimenticios, estos factores pueden influir en la presencia de los compuestos fenólicos (Ologhobo & Fetuga, 1984). Además, una comparación de los resultados de diferentes estudios puede ser difícil, debido a la variabilidad de las condiciones experimentales entre los métodos que hayan sido utilizados.

Conviene decir, que no existen estudios de capacidad antioxidante ABTS para el producto siete harinas, por lo tanto se lo comparará con cereales. Así pues un análisis realizado por Ragae et al., (2006) muestra que el mijo, centeno y sorgo contienen $21.4 \pm 0.43 \mu\text{M ET/g}$, $13.0 \pm 0.48 \mu\text{M ET/g}$ y $51.7 \pm 0.57 \mu\text{M ET/g}$ respectivamente. Así también una investigación realizada por Banu, Vasilean, & Aprodu, (2010), reporta $3.7 \mu\text{mol ET/g}$ para la harina de

centeno. Se observa que tanto el mijo como el centeno presentan valores inferiores al reportado para siete harinas, sin embargo el sorgo tiene un aporte superior de ABTS en relación con el producto analizado.

4.1.2 FRAP.

En la **gráfica 3**, se presenta la actividad antioxidante FRAP del producto “siete harinas”, las muestras contienen $24 \pm 1,12 \mu\text{M ET/g BS}$ y $23 \pm 1,39 \mu\text{M ET/g BS}$, los valores entre los dos proveedores no mostraron diferencia significativa ($p < 0.05$).



Gráfica 3: Actividad antioxidante FRAP en “siete harinas”. Valores representan la media de tres repeticiones. Letras minúsculas distintas muestran diferencia estadística ($p < 0,05$), entre ambos proveedores.

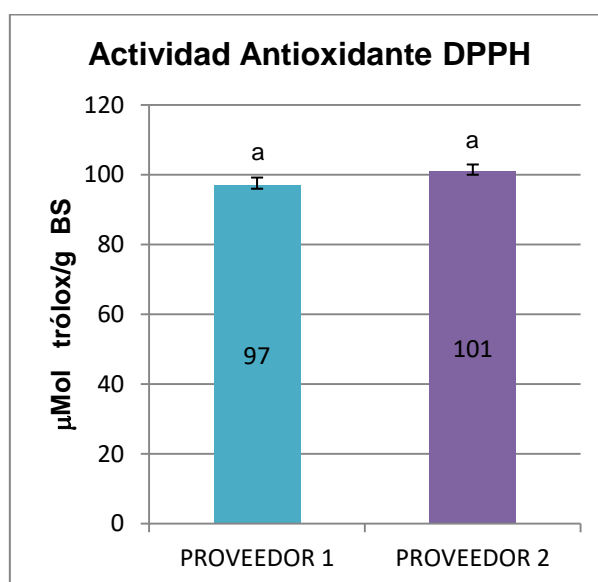
Elaboración: La autora

La actividad antioxidante del ensayo FRAP, proviene generalmente del aporte del trigo y soya. Un estudio realizado por Kumar et al., (2010) muestra una actividad FRAP de $2.70 \pm 0.03 \mu\text{Mol ET/g}$ para un genotipo de soya amarilla.

En el ensayo FRAP, el producto “siete harinas” mostró significativamente mayor capacidad antioxidante en comparación con semillas de pseudocereales como amaranto $2.21 \pm 1.6 \mu\text{Mol ET/g}$ y menor aporte con respecto a la quinua $35.64 \pm 1.7 \mu\text{Mol ET/g}$ (Alvarez et al., 2010).

4.1.3 DPPH.

El método DPPH se relaciona con la capacidad donadora de hidrógeno de fenoles y la estabilidad de los radicales fenoxilo formados (Ren & Sun, 2014). En la **gráfica 4**. Se observa que no existe diferencia significativa ($p < 0.05$), entre los valores de ambos proveedores.



Gráfica 4: Actividad antioxidante DPPH en “siete harinas”. Valores representan la media de tres repeticiones. Letras minúsculas distintas muestran diferencia estadística ($p < 0,05$), entre ambos proveedores.

Elaboración: La autora

En el ensayo DPPH, el producto “siete harinas” mostró significativamente mayor capacidad antioxidante $97,27 \pm 2,20 \mu\text{Mol ET/g BS}$; $101 \pm 1,94 \mu\text{M ET/g BS}$ en comparación con semillas de los pseudocereales como el amaranto $1.13 \pm 1.3 \mu\text{Mol ET/g}$ y la quinua $2.31 \pm 1.7 \mu\text{Mol ET/g}$ (Alvarez et al., 2010).

Por otro lado comparándolo con la harina de centeno, un estudio realizado por Banu et al., (2010), reporta $3.2 \mu\text{mol ET/g}$, como se observa siete harinas tiene un aporte superior en DPPH en relación al centeno.

De todos estos estudios y comparaciones se puede decir que “siete harinas” es un alimento rico en antioxidantes. Aunque los fitoquímicos y antioxidantes presentes en los cereales no han recibido tanta atención como los fitoquímicos contenidos en frutas y verduras. Liu, (2007), manifiesta que el consumo regular de cereales especialmente integrales, se ha asociado con un menor riesgo de desarrollar enfermedades crónicas como diabetes tipo 2,

enfermedades cardiovasculares y algunos tipos de cáncer, además que recalca que los cereales integrales contienen fitoquímicos únicos, que complementan los de frutas y verduras al ser consumidos juntos.

CONCLUSIONES

El producto “siete harinas” contiene antioxidantes, con $446 \pm 8,47$ mg EAG/100 g BS, $382 \pm 6,56$ mg EAG/100 g BS en fenoles totales y $37 \pm 1,16$ μ M ET/g BS, $30 \pm 2,15$ μ M ET/g BS; $24 \pm 1,12$ μ M ET/g BS, $23 \pm 1,39$ μ M ET/g BS, y $97 \pm 2,20$ μ M ET/g BS, $101 \pm 1,94$ μ M ET/g BS en capacidad antioxidante, medida por los ensayos ABTS, FRAP, DPPH respectivamente.

Se evidenció diferencia estadística ($p < 0.05$), para los métodos: fenoles totales y ABTS, la muestra proveniente del proveedor 1, mostró valores superiores de fenoles totales $446 \pm 8,47$ mg EAG/100 g BS y capacidad antioxidante para el radical ABTS $37 \pm 1,16$ μ M ET/g BS, sin embargo no existió tal diferencia para los métodos FRAP y DPPH.

El contenido fenólico y capacidad antioxidante del producto “siete harinas” es superior a harinas formadas por un solo cereal, leguminosas y alimentos ancestrales representativos como quinua y amaranto.

RECOMENDACIONES

Con el fin de facilitar la comparación bibliográfica, se recomienda expresar la actividad antioxidante medida por la captación del radical DPPH como IC50 (gramos de muestra requeridos para inhibir en 50% un gramo de DPPH).

Se debería realizar un análisis cromatográfico HPLC, para profundizar en cuanto a la composición fenólica del producto "siete harinas".

BIBLIOGRAFÍA

- Aghamirzaei, M., Heydari-dalfard, A., Karami, F., & Fathi, M. (2013). Pseudo-cereals as a functional ingredient : effects on bread nutritional and physiological properties- Review. *International Journal of Agriculture and Crop Sciences*, 5(14), 1574 – 1580.
- Aguilera, Y. (2009). Harinas de leguminosas deshidratadas: Caracterización Nutricional y Valoración de sus Propiedades Tecno-Funcionales.
- Alam, M. N., Bristi, N. J., & Rafiquzzaman, M. (2013). Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 21(2), 143–152. <http://doi.org/10.1016/j.jsps.2012.05.002>
- Albornoz, M., & Romero, J. (2004). *Utilización de la harina de guandul (Cajanus cajan Linneo) para incrementar el aporte proteico en la elaboración de pastas alimenticias. Trabajo de Grado presentado como requisito para optar al Título de Ingeniero de Alimentos. Statewide Agricultural Land Use Baseline 2015* (p. 116). <http://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Alvarez, L., Wijngaard, H., Arendt, E., & Gallagher, E. (2010). Polyphenol composition and in vitro antioxidant activity of amaranth, quinoa buckwheat and wheat as affected by sprouting and baking. *Food Chemistry*, 119(2), 770–778. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.07.032>
- Arnao, M. B., Cano, A., & Acosta, M. (2001). The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Food Chemistry*, 73(2), 239–244. [http://doi.org/10.1016/S0308-8146\(00\)00324-1](http://doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00324-1)
- Avello, M., & Suwalsky, M. (2006). Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. *Atenea (Concepción)*, (494), 161–172. <http://doi.org/10.4067/S0718-04622006000200010>
- Banegas, J., Burgos, C., Calvo, S., Moreno, J., Gorgojo, L., Gutiérrez, J., & López, E. (2007). *Nutrición y salud pública. Revista Española de Salud Pública*. Retrieved from http://scielo.isciii.es/scielo.php?pid=S1135-57272007000500012&script=sci_arttext
- Banu, I., Vasilean, I., & Aprodu, I. (2010). Effect of Lactic Fermentation on Antioxidant

- Capacity of Rye Sourdough and Bread. *Food Science and Technology Research*, 16(6), 571–576. <http://doi.org/10.3136/fstr.16.571>
- Bazar, P. (2015). Harina de 7 semillas_ El poderoso Desayuno Inca. Retrieved from <http://bazarperuonline.blogspot.com/2015/04/harina-de-7-semillas-el-poderoso.html>
- Benzie, I. ., & Strain, J. . (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*. <http://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>
- Bhatt, S. M., & Gupta, R. K. (2015). Bread (composite flour) formulation and study of its nutritive , phytochemical and functional properties, 4(2), 254–268.
- Brand, W., Cuvelier, M., & Berset, C. (1995). Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant activity. *Technology/Food Science and Technology*, 28, 25–30.
- Calvo, D. (2003). La Soja: Valor Dietético Y Nutricional. Retrieved from http://www.diodora.com/documentos/nutricion_soja.pdf
- Carocho, M., & Ferreira, I. C. F. R. (2013). A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 51, 15–25. <http://doi.org/10.1016/j.fct.2012.09.021>
- Chand, N. ., Kanti, P., & Mukherjee, A. (2010). International Journal of Current Pharmaceutical Research IN VITRO FREE RADICAL SCAVENGING ACTIVITY OF METHANOL EXTRACT OF RHIZOME OF, 2(3), 39–43.
- Correa, C. R., Li, L., Aldini, G., Carini, M., Oliver Chen, C.-Y., Chun, H.-K., ... Yeum, K.-J. (2010). Composition and stability of phytochemicals in five varieties of black soybeans (*Glycine max*). *Food Chemistry*, 123(4), 1176–1184. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.05.083>
- D’Antuono, L. F. (2016). *Encyclopedia of Food and Health*. *Encyclopedia of Food and Health*. Elsevier. <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00700-5>

- Das, A. K., & Singh, V. (2016). Antioxidative free and bound phenolic constituents in botanical fractions of Indian specialty maize (*Zea mays* L.) genotypes. *Food Chemistry*, 201, 298–306. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.01.099>
- De La Parra, C., Serna Saldivar, S. O., & Liu, R. H. (2007). Effect of processing on the phytochemical profiles and antioxidant activity of corn for production of masa, tortillas, and tortilla chips. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(10), 4177–4183. <http://doi.org/10.1021/jf063487p>
- Devi, M. K. A., Gondi, M., Sakthivelu, G., Giridhar, P., Rajasekaran, T., & Ravishankar, G. A. (2009). Functional attributes of soybean seeds and products, with reference to isoflavone content and antioxidant activity. *Food Chemistry*, 114(3), 771–776. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.10.011>
- Duncan, A. (2016). *Soy Beans: Dietary Importance*. *Encyclopedia of Food and Health*. <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00020-9>
- Eguren, F. (2015). ¿Los industriales vs. la alimentación saludable? Fer. *La Revista Agraria*, 6–9.
- Espín, S., Villacrés, E., Brito, B., Espinosa, P., Monteros, A., Villacrés, E., ... Gerardo, H. (2003). Caracterización físico-química, nutricional y funcional de raíces y tubérculos andinos. In *Conservación y uso de la biodiversidad de raíces y tubérculos andinos* (Vol. 4, pp. 91–116). Retrieved from [http://www.iniap.gob.ec/nsite/images/documentos/Raíces y Tubérculos Alternativas para el uso sostenible en Ecuador.pdf](http://www.iniap.gob.ec/nsite/images/documentos/Raíces_y_Tubérculos_Alternativas_para_el_uso_sostenible_en_Ecuador.pdf)
- FAO. (2006). Seguridad alimentaria. *Informe de Políticas*, 13(4), 1–4. [http://doi.org/10.1016/S1138-0322\(09\)73425-X](http://doi.org/10.1016/S1138-0322(09)73425-X)
- Gasztonyi, M., Tomoskosz, R., Berki, M., Petróczi, I., & Daood, H. (2011). Content of phenols in wheat as affected by varietal and agricultural factors. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24(6), 785–789. <http://doi.org/10.1016/j.jfca.2011.04.011>
- González, M. (2012). *Innovación de postres incorporando raíces andinas con el fin de rescatar su valor gastronómico en la ciudad de Cuenca*. Universidad de Cuenca. Retrieved from

- <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/24477/1/monografía.pdf>
- Griffiths, H. R. (2016). *Encyclopedia of Food and Health*. *Encyclopedia of Food and Health*. Elsevier. <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00037-4>
- Guevara, L., & Alvarado, D. (2014). Importancia, contribución y estabilidad de antioxidantes en frutos y productos de tomate. *Avances De Investigacion Agropecuaria*, 18(1), 51–66.
- Gutiérrez, U., Guajardo, F., & López, B. (2016). *Encyclopedia of Food and Health*. *Encyclopedia of Food and Health*. Elsevier. <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00420-7>
- Halliwell, B. (1994). Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *The Lancet*, 344(8924), 721–724. [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(94\)92211-X](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(94)92211-X)
- Huang, D., Ou, B., & Prior, R. (2005). The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *J. Agric. Food Chem.*, 53(6), 1841–1856. <http://doi.org/10.1021/jf030723c>
- Huang, X., Cai, W., & Xu, B. (2014). Kinetic changes of nutrients and antioxidant capacities of germinated soybean (*Glycine max* L.) and mung bean (*Vigna radiata* L.) with germination time. *Food Chemistry*, 143, 268–76. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.07.080>
- Idrovo, W. (2010). “*Estudio de factibilidad para la producción y comercialización de harina de achira (Canna Edulis) en el cantón Loja.*” Escuela Politécnica Nacional.
- INEN 2051:2013. (2013). Cereales y leguminosas. Maíz molido, sémola, harina, gritz. Requisitos. Primera revisión. Quito - Ecuador.
- INEN 616:2015. (2015). Harina de trigo requisitos. Norma Técnica Ecuatoriana. Cuarta revision. Quito - Ecuador.
- Isaza, J. H., Veloza, L. A., Guevara, C., Ávila, Y., & Díaz, O. (2005). Estimación espectrofotométrica de fenoles totales en especies de la familia melastomataceae. *Actual Biol*, 27(August), 75–79.
- Izydorczyk, M. S., Storsley, J., Labossiere, D., Macgregor, A. W., & Rossnagel, B. G. (2000).

Variation in Total and Soluble β -Glucan Content in Hulless Barley : Effects of Thermal , Physical , and Enzymic Treatments.

Japón, M. (2015). *Siete harinas. Revalorización de Alimentos Tradicionales*. Loja.

Kim, J. J., Kim, S. H., Hahn, S. J., & Chung, I. M. (2005). Changing soybean isoflavone composition and concentrations under two different storage conditions over three years. *Food Research International*, 38(4), 435–444. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2004.11.001>

Kodama, D., Gonçalves, A., Lajolo, F., & Genovese, M. (2010). Flavonoids, total phenolics and antioxidant capacity: comparison between commercial green tea preparations. *Ciência E Tecnologia de Alimentos*, 30(4), 1077–1082. <http://doi.org/10.1590/S0101-20612010000400037>

Krishnaiah, D., Nithyanandam, R., & Sarbatly, R. (2012). Phytochemical Constituents and Activities of *Morinda citrifolia* L. *Phytochemicals – A Global Perspective of Their Role in Nutrition and Health*. <http://doi.org/10.5772/26094>

Kumar, V., Rani, A., Dixit, A. K., Pratap, D., & Bhatnagar, D. (2010). A comparative assessment of total phenolic content, ferric reducing-anti-oxidative power, free radical-scavenging activity, vitamin C and isoflavones content in soybean with varying seed coat colour. *Food Research International*, 43(1), 323–328. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.10.019>

Kuskoski, E. M., Asuero, A. G., Troncoso, A. M., Mancini-Filho, J., & Fett, R. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciência E Tecnologia de Alimentos*, 25(4), 726–732. <http://doi.org/10.1590/S0101-20612005000400016>

Kwik, J. C. (2008). Traditional Food Knowledge : Renewing Culture and Restoring Health. *Environment and Resource Studies, Master of*, 1–122. <http://doi.org/978-0-494-54816-5>

Larousse. (2009). *Diccionario enciclopedico escolar Larousse*. (Larousse, Ed.). Madrid.

León, A., & Rosell, C. (2007). *De tales harinas, tales panes: granos, harinas y productos de panificación en Iberoamerica*. *Statewide Agricultural Land Use Baseline 2015* (1era ed.,

- Vol. 1). Córdoba. <http://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Liu, R. H. (2007). Whole grain phytochemicals and health. *Journal of Cereal Science*, 46(3), 207–219. <http://doi.org/10.1016/j.jcs.2007.06.010>
- López, L., & García, H. (2010). Actividad antioxidante de extractos metanólicos y acuosos de distintas variedades de maíz mexicano. *Nova Scientia*, 2(3), 51–65. Retrieved from http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-07052010000100005&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Martinez, H. (2003). *Volvamos al Campo: Manual de Cultivos Orgánicos y Alelopatía*. (G. L. LTDA, Ed.) (1era edici). Colombia.
- Martínez, S., González, J., Culebras, J., & Tuñón, M. (2002). Los flavonoides: Propiedades y acciones antioxidantes. *Nutricion Hospitalaria*, 17(6), 271–278. http://doi.org/10.3305/nutr_hosp.v17in06.3338
- Masisi, K., Beta, T., & Moghadasian, M. H. (2015). Antioxidant properties of diverse cereal grains: A review on in vitro and in vivo studies. *Food Chemistry*, 196, 90–97. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.09.021>
- Mazza, G. (1998). *Alimentos funcionales*. (A. S.A., Ed.). Zaragoza-España.
- Mishra, K., Ojha, H., & Chaudhury, N. (2012). Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH - assay: A critical review and results. *Food Chemistry*, 130(4), 1036–1043. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.07.127>
- Mohan, V. R., Tresina, P. S., & Daffodil, E. D. (2016). *Encyclopedia of Food and Health*. *Encyclopedia of Food and Health*. Elsevier. <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00036-2>
- Montilla, E., Hillebrand, S., Antezana, A., & Winterhalter, P. (2011). Soluble and bound phenolic compounds in different Bolivian purple corn (*Zea mays* L.) cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. <http://doi.org/10.1021/jf201061x>
- Olaniyan SA, B. I., & Ademola AA, A. LO. (2015). Malted Sorghum-Soy Composite Flour: Preparation, Chemical and Physico-Chemical Properties. *Journal of Food Processing & Technology*, 06(08). <http://doi.org/10.4172/2157-7110.1000467>

- Oliveira, G. (2014). *Capacidad antioxidante de Averrhoa carambola L. (carambola) frente a sistemas generadores de radicales*. Nacional, Universidad San, Mayor D E.
- Ologhobo, A. D., & Fetuga, B. L. (1984). Biochemical assessment of some new varieties of soybeans. *Food Chemistry*, 13(2), 103–115. [http://doi.org/10.1016/0308-8146\(84\)90065-7](http://doi.org/10.1016/0308-8146(84)90065-7)
- Orozco, A., & Picón, J. (2011). “*Plan de exportación de harina de plátano de la empresa Brito Vaca Cia. Ltda. Molino el Fenix de la ciudad de Riobamba al mercado de Estados Unidos ciudad de Miami fl.*” Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Retrieved from <http://dspace.espoch.edu.ec/bitstream/123456789/1468/1/34T00246.pdf>
- Palamanda, J. R., & Kehrer, J. P. (1992). Inhibition of protein carbonyl formation and lipid peroxidation by glutathione in rat liver microsomes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 293(1), 103–109. [http://doi.org/10.1016/0003-9861\(92\)90371-3](http://doi.org/10.1016/0003-9861(92)90371-3)
- Pérez, J., & Saura, F. (2007). Metodología para la evaluación de capacidad antioxidante en frutas y hortalizas. *V Congreso Iberoamericano de Tecnología Postcosecha Y Agroexportaciones*, 11. Retrieved from <http://www.horticom.com/pd/imagenes/71/429/71429.pdf>
- Pineda, S. (2009). “Elaboración, evaluación nutrimental y nutracéutica de mezclas de harinas extrudidas maíz/frijol, trigo/frijol y tostadas.” Queretaro. Retrieved from <http://ri.uaq.mx/bitstream/123456789/1747/1/CD100216.pdf>
- Poveda, M. (2006). *Elaboración de cereal de cebada extruido listo para el consumo y estudio de factibilidad de industrialización del producto*. Universidad San Francisco de Quito. Retrieved from <http://repositorio.usfq.edu.ec/bitstream/23000/713/1/82575.pdf>
- Prior, R. L., Wu, X., & Schaich, K. (2005). Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10), 4290–4302. <http://doi.org/10.1021/jf0502698>
- Ragaei, S., Abdelaal, E., & Noaman, M. (2006). Antioxidant activity and nutrient composition of selected cereals for food use. *Food Chemistry*, 98(1), 32–38. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.04.039>

- Ramos, F., Muñoz, A., Alvarado, C., Alvarado, Á. ., & Yáñez, J. (2012). Purple Corn (*Zea mays* L.) Phenolic Compounds Profile and Its Assessment as an Agent Against Oxidative Stress in Isolated Mouse Organs. *J Med Food*, *15*(2), 206–215.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*. [http://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](http://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)
- Reinoso, Y. (2013). “*Estudio de factibilidad para la creación de una microempresa de producción y comercialización de galletas a base de harina de plátano en la ciudad de Ibarra, cantón Ibarra, provincia de Imbabura.*” Universidad Técnica del Norte. Retrieved from http://repositorio.utn.edu.ec/bitstream/123456789/2463/1/02_ICA_585_TESIS.pdf
- Ren, S.-C., & Sun, J.-T. (2014). Changes in phenolic content, phenylalanine ammonia-lyase (PAL) activity, and antioxidant capacity of two buckwheat sprouts in relation to germination. *Journal of Functional Foods*, *7*, 298–304. <http://doi.org/10.1016/j.jff.2014.01.031>
- Rosales, L., Agama, E., Aguirre, A., Bello, L. ., Dufour, D., & Gibert, O. (2014). Physicochemical evaluation of cooking and dessert bananas (*Musa* sp.) varieties. *Agrociencia*, *48*(4), 387–401.
- Salinas, Y., Pérez, J., Vázquez, G., Aragón, F., & Velázquez, G. (2012). Antocianinas y actividad antioxidante en maíces (*Zea mays* L. *Agrociencia*, *46*(7). <http://doi.org/1405-3195>
- Salvador, B. (2006). *Química de los alimentos*. (P. Education, Ed.) (1era ed.). México.
- Sarwar, M., & Sarwar, M. (2013). The importance of cereals (Poaceae: Gramineae) nutrition in human health: A review. *Journal of Cereals ...*, *4*(June), 32–35. <http://doi.org/10.5897/JCO12.023>
- Shahidi, F., & Ambigaipalan, P. (2015). Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects – A review. *Journal of Functional Foods*, *18*, 820–897. <http://doi.org/10.1016/j.jff.2015.06.018>

- Sigletón, V., & Rossi, J. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Amer. J.*, 16(48), 18.
- Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros, L., & Hawkins, D. (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(6-7), 669–675. <http://doi.org/10.1016/j.jfca.2006.01.003>
- Tobar, J. (2013). *Determinación de la actividad antioxidante por DPPH y ABTS de 30 plantas recolectadas en la eco región cafetera*. Universidad tecnológica de Pereira. Retrieved from <http://repositorio.utp.edu.co/dspace/bitstream/handle/11059/3636/54763T736.pdf;jsessionid=0736B751CAB842739593207CD29B8D69?sequence=1>
- Ubbor, S. C., & Akobundu, E. N. T. (2009). Quality Characteristics of Cookies from Composite Flours of Watermelon Seed, Cassava and Wheat. *Pakistan Journal of Nutrition*, 8(7), 1097–1102. <http://doi.org/10.3923/pjn.2009.1097.1102>
- Zamora, J. (2007). Antioxidantes: micronutrientes en lucha por la salud. *Revista Chilena de Nutrición*, 34(1), 17–26. <http://doi.org/10.4067/S0717-75182007000100002>

ANEXOS

ANEXO A. Obtención de extractos

1. Preparación de reactivos

- a. Para preparar 250 mL de solución **metanol/agua destilada (50:50 v/v)**, se midió 125 mL de metanol y 125 mL de agua destilada,
- b. Para preparar 250 mL de solución **acetona/agua destilada (70:30 v/v)**, se midió 175 mL de acetona y 75 mL de agua destilada.

Acetona:

$$\begin{array}{l} 250 \text{ mL} \\ x \end{array} \begin{array}{l} \diagdown \\ \diagup \end{array} \begin{array}{l} 100\% \\ 70\% \end{array} \quad x = 175 \text{ mL}$$

H₂O d.d.:

$$\begin{array}{l} 250 \text{ mL} \\ x \end{array} \begin{array}{l} \diagdown \\ \diagup \end{array} \begin{array}{l} 100\% \\ 30\% \end{array} \quad x = 75 \text{ mL}$$

c. Solución ácido clorhídrico al 2 N

Datos:

Riqueza del HCl	37%
Densidad	1,19 g/mL
Equivalente químico del HCl	36,45 g

$$N = \frac{\text{Densidad del ácido} \times \text{Riqueza}\%}{100 \times \text{Equivalente químico (g)}}$$

$$N = \frac{\frac{1,19 \text{ g}}{\text{mL}} \times 1000 \text{ mL} \times 37\%}{100\% \times 36,45 \text{ (g)}}$$

$$N = 12,08$$

$$C1.V1 = C2.V2$$

$$V1 = (C2.V2) / C1$$

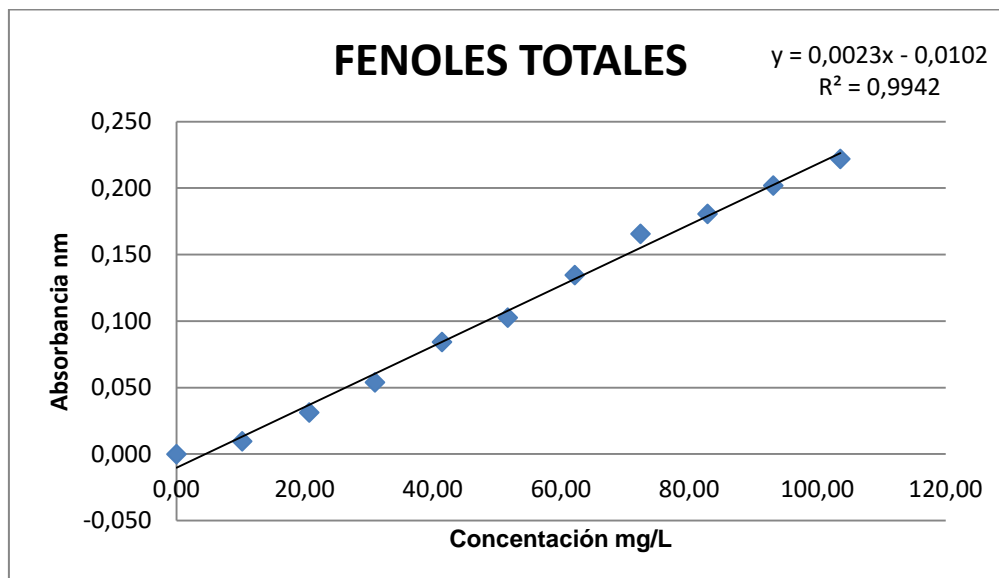
$$V1 = (2 \text{ N} \cdot 25 \text{ mL}) / 12,08 \text{ N}$$

$$V1 = 4,14 \text{ mL}$$

Se midió 4,14 mL de ácido clorhídrico y aforó a 25 mL

ANEXO B. Fenoles Totales. Método Folin-Ciocalteu

1. Curva de calibración con ácido gálico



w. ác. gálico (g)	PM g/mol	Riqueza %	Aforo (mL)	Concentración Patrón (mg/L)	Concentración Patrón (μM)
0,05	170,12	97.5	25	2051,28	12057,85

Alicuota (mL)	Aforo (mL)	C. de AG (mg/L)	C. de AG (μM)	Absorbancia			Promedio
				Señal 1	Señal 2	Señal 3	
0	10	0,00	0,00	0	0	0	0
0,05	10	10,26	60,29	0,009	0,01	0,01	0,010
0,101	10	20,72	121,78	0,032	0,031	0,031	0,031
0,151	10	30,97	182,07	0,054	0,054	0,054	0,054
0,202	10	41,44	243,57	0,085	0,084	0,084	0,084
0,252	10	51,69	303,86	0,102	0,103	0,103	0,103
0,303	10	62,15	365,35	0,135	0,135	0,134	0,135
0,353	10	72,41	425,64	0,166	0,165	0,166	0,166
0,404	10	82,87	487,14	0,18	0,181	0,181	0,181
0,454	10	93,13	547,43	0,202	0,202	0,202	0,202
0,505	10	103,59	608,92	0,221	0,223	0,222	0,222

Pendiente: 0,0023
 Intersección: 0,0102
 R²: 0,9942

2. Datos de la cuantificación en las muestras

Código	Peso de la muestra (g)	Volumen del extracto (L)	% H	% ST	Alicuota (mL)	Abs. (nm)	Concentración preliminar (mg/L)	Concentración (mg EAG/100 g BH)		Concentración (mg EAG/100 g BS)		
P1R1	0.50469	0,04	9,19	90,81		0,108	51,54	408,46	405,83 ± 7,83	449,81	446,48 ± 8,47	
P1R2	0.50455		9,00	91,00		0,15	0,109	51,97		412,02		452,78
P1R3	0.50316		9,12	90,88		0,105	0,105	49,94		397,03		436,86
P2R1	0.50411		9,38	90,62	0,15	0,091	44,14	350,28	345,91 ± 6,82	386,55	381,72 ± 6,56	
P2R2	0.50040		9,10	90,91		0,090	43,71	349,40		384,36		
P2R3	0.50348		9,67	90,33		0,088	42,55	338,05		374,25		

3. Preparación de reactivos

a. Preparación de Folin

$$C1.V1 = C2.V2$$

$$V1 = C2.V2 / C1$$

$$V1 = (0.25 \text{ N}) (10 \text{ mL})$$

$$V1 = 1.25 \text{ mL}$$

Se tomó un volumen de 1.25 mL de Folin y aforó a 10 mL con agua destilada

b. Preparación de carbonato de sodio

Datos:

Volumen a preparar	0.025 L
Normalidad	1 N
Equivalente químico	52,944 g

Se obtiene de la siguiente relación

$$\begin{array}{rclcl} 52,944 \text{ g} & & 1 \text{ N} & - & 1 \text{ L} \\ X & & 1 \text{ N} & - & 0.025 \text{ L} \end{array}$$

$$X = 1,324 \text{ g}$$

Se pesó 1,324 g de carbonato de sodio y aforó en 25 mL de agua destilada.

c. Solución patrón(SP) de ácido gálico

Se la realizó mediante la siguiente fórmula, para determinar la concentración de ácido gálico a la cual se trabajó.

Formula:

$$CO_{SP} = \frac{(m) \cdot (p)}{v} = \frac{(50 \text{ mg})(0.975)}{25 \text{ mL}} = 1,95 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}$$

De donde:

CO_{SP} = Concentración de la solución de referencia de ácido gálico (mg/mL)

m = Cantidad pesada de ácido gálico (mg)

p = % riqueza del compuesto (%)

v = Volumen de aforo (mL)

Una vez realizados los cálculos se tuvo que la concentración madre de ácido gálico es $1.95 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}$ a partir de aquella concentración se procedió a calcular los volúmenes de estándares.

d. Preparación de estándares

A partir de la siguiente concentración se calculó el volumen de estándares para obtener las concentraciones deseadas, mediante la aplicación de la siguiente fórmula.

$$C_{\text{SP}} \cdot V_{\text{SP}} = C_{\text{ST}} \cdot V_{\text{ST}}$$

De donde:

C_{SP} = Concentración de la solución patrón (mg/mL)

V_{SP} = Volumen de la solución patrón a tomar para las alícuotas (mL)

C_{ST} = Concentración del estándar (mg/mL)

V_{ST} = Volumen de aforo del estándar (mL)

Despejando

$$V_{\text{SP}} = C_{\text{ST}} \cdot V_{\text{ST}} / C_{\text{SP}}$$

$$V_{\text{SP}} = (0.01 \text{ mg/mL})(10 \text{ mL}) / 1.95 \text{ mg/mL}$$

$$V_{\text{SP}} = 0.05 \text{ mL}$$

Si se tiene una concentración de la solución madre de 1.95 mg/mL y se requiere llegar a una concentración de 0.01 mg/mL , y el volumen de aforo es 10 mL, se tomó 0.05 mL de la solución madre de ácido gálico. Se realizó el mismo proceso para cada estándar.

e. Cálculos para la concentración

La ecuación de la recta está dada por la curva de calibración de ácido gálico y se expresó como mg EAG/100 g de muestra.

$$y = mx \pm b$$

De donde:

y= absorbancia

m= pendiente

x= concentración

b= intersección

Se despeja la concentración obteniendo:

$$x = \frac{y - b}{m}$$

Como explicación, se reemplazó en la fórmula los valores correspondientes a la primera muestra P1R1 en base húmeda, teniendo lo siguiente:

$$co = \frac{0,10833 + 0,0102}{0,0023} = 51,54 \frac{\text{mg}}{\text{L}}$$

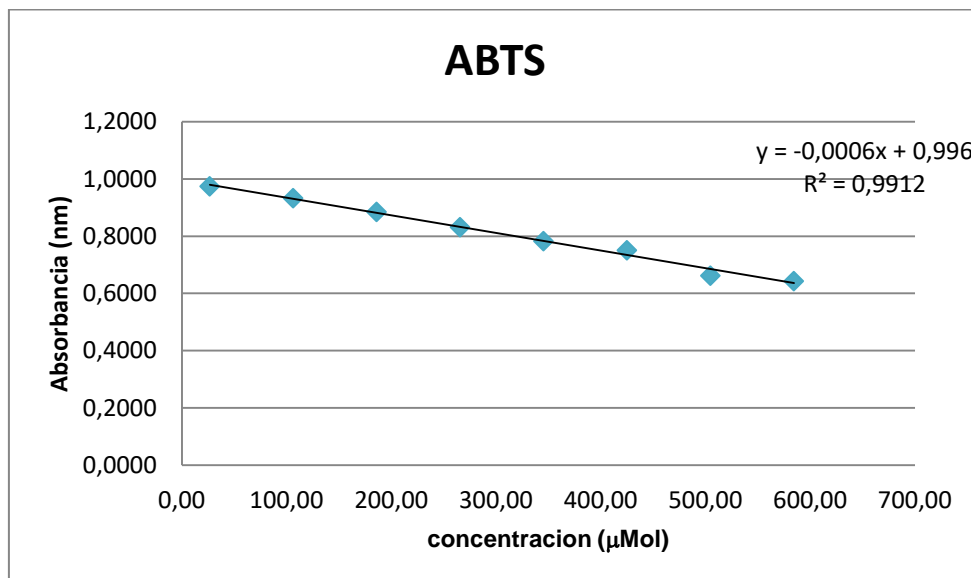
$$51,54 \frac{\text{mg EAG}}{\text{L}} \left(\frac{0,04\text{L}}{0,50469 \text{ g}} \right)$$

$$4,08 \frac{\text{mg EAG}}{\text{g}} (100 \text{ g})$$

$$408.46 \text{ mg EAG}/100 \text{ g BH}$$

ANEXO C. Método ABTS

1. Curva de calibración con trólox



w. Trólox (g)	PM g/mol	Riqueza %	Aforo (mL)	Concentración Patrón (mg/L)	Concentración Patrón (µM)
0,0125	250,29	97	50	25,77	1029,73

Alicuota (mL)	Aforo (mL)	Trólox (µM)	Absorbancia (734 nm)			Promedio
			Señal 1	Señal 2	Señal 3	
0,258	10	26,57	0,974	0,975	0,974	0,9743
1,032	10	106,27	0,934	0,933	0,932	0,9330
1,806	10	185,97	0,884	0,885	0,886	0,8850
2,58	10	265,67	0,833	0,831	0,831	0,8317
3,354	10	345,37	0,785	0,781	0,783	0,7830
4,128	10	425,07	0,751	0,751	0,751	0,7510
4,902	10	504,78	0,662	0,663	0,662	0,6623
5,676	10	584,48	0,644	0,644	0,642	0,6433

Pendiente: - 0.0006
 Intersección: 0,099
 R²: 0,9912

2. Datos de la cuantificación en las muestras

Código	Peso de la muestra (g)	Volumen del extracto (L)	% H	% ST	Alicuota (mL)	Abs. (nm)	Concentración preliminar ($\mu\text{Mol/L}$)	Concentración ($\mu\text{M ET/g BH}$)		Concentración ($\mu\text{M ET/g BS}$)	
P1R1	0.50469	0,04	9,19	90,81		0,752	406,11	33,19		35,45	
P1R2	0.50455		9,00	91,00	0,15	0,744	420,56	33,34	33,28 \pm 1,07	36,64	36,61 \pm 1,16
P1R3	0.50316		9,12	90,88		0,737	431,67	34,32		37,76	
P2R1	0.50411		9,38	90,62		0,806	316,11	25,08		27,68	
P2R2	0.50040		9,10	90,91	0,15	0,788	346,11	27,07	27,19 \pm 1,91	30,43	30,01 \pm 2,15
P2R3	0.50348		9,67	90,33		0,778	362,78	28,82		31,91	

3. Preparación de la Solución Patrón (SP)

Se lo realizó mediante la mezcla de la solución A y solución B; dejando reaccionar por 12 horas a temperatura ambiente y en la obscuridad.

Solución A

Concentración de ABTS: **7.4 mM**

Peso molecular ABTS: **548.68 g/mol**

Se aplicó la siguiente relación

$$\begin{array}{l} 548.68 \text{ g/mol} \\ X \end{array} \begin{array}{c} \diagdown \\ \diagup \end{array} \begin{array}{l} 1 \text{ mol} \\ 0.0074 \text{ mol} \end{array} \quad - \quad \begin{array}{l} 1 \text{ L} \\ 0.010 \text{ L} \end{array}$$

$$x = \frac{\left(\frac{548.68 \text{ g}}{\text{mol}}\right) (0.0074 \text{ mol})(0.010 \text{ L})}{(1 \text{ mol})(1 \text{ L})}$$

$$X = 0.0406 \text{ g}$$

Se pesó 0.0406 g de ABTS y aforó a 10 mL con agua destilada

Solución B

Concentración del persulfato de potasio: **2.6 mM**

Peso molecular del persulfato de potasio: **270.322 g/mol**

Se aplicó la siguiente relación

$$\begin{array}{l} 270.322 \text{ g/mol} \\ X \end{array} \begin{array}{c} \diagdown \\ \diagup \end{array} \begin{array}{l} 1 \text{ mol} \\ 0.0026 \text{ mol} \end{array} \quad - \quad \begin{array}{l} 1 \text{ L} \\ 0.010 \text{ L} \end{array}$$

$$x = \frac{\left(\frac{270.322 \text{ g}}{\text{mol}}\right) (0.0026 \text{ mol})(0.010 \text{ L})}{(1 \text{ mol})(1 \text{ L})}$$

$$X = 0.0070 \text{ g}$$

Se pesó 0.0070 g de persulfato de potasio y aforó a 10 mL con agua destilada.

4. Solución Trabajo (ST)

Se tomó 4 mL de SP, adicionando 45 mL de metanol, o hasta obtener una absorbancia de 1.1 ± 0.02 , a una longitud de onda de 734 nm. Para ajustar el espectrofotómetro a cero se uso metanol.

5. Preparación de solución de referencia con trólox y estándares

a. solución de referencia con trólox

Se la realizó mediante la siguiente formula, para determinar la concentración de trólox a la cual se trabajó.

Formula:

$$CO_{SM} = \frac{(m)(p)}{v}$$

De donde:

CO_{SM} =	Concentración de la solución madre trólox
m =	Cantidad pesada de trólox
p =	% riqueza del compuesto
v =	Volumen de aforo

Reemplazando se obtiene:

Datos:

m:	12,5 mg
Riqueza:	97%
Volumen:	50 mL

$$CO_{SM} = \frac{(m)(p)}{v}$$

$$CO_{SM} = \frac{(12.5 \text{ mg})(0.97)}{50 \text{ mL}} = 0.2425 \text{ mg/mL}$$

Se requiere la concentración de trólox en μM , por lo cual se pasó de mg/mL a μM siguiendo la siguiente relación.

1 M	-	250.29 g	1000 mL
X	-	0.0125 g	50 mL

De donde:

- 1 M: Concentración definida en un mol
- 250.29 g: Peso molecular del trólox
- 0.0125 g: Cantidad pesada de trólox
- 1000 mL: Volumen definido en un mol
- 50 mL: Volumen a preparar

$$x = \frac{(1 \text{ M})(250.29 \text{ g})(50 \text{ mL})}{(0.0125 \text{ g})(1000 \text{ mL})} = 9.9884 \times 10^{-4} \text{ M}$$

$$x = (9.9884 \times 10^{-4} \text{ M}) \frac{1 \mu\text{M}}{10^{-6} \text{ M}} = 998.84 \mu\text{M}$$

Como el reactivo no tiene una pureza de 100%, se debe calcular con la pureza real del reactivo, obteniendo la siguiente relación.

$$\begin{array}{ccc} 998.84 \mu\text{M} & \times & 100\% \\ X & & 97\% \end{array}$$

$$X = 968.88 \mu\text{M}$$

b. Preparación de estándares

Una vez realizados los cálculos se obtuvo que la concentración de la solución madre es 968.88 μM , con este valor, se calculó los volúmenes para preparar los estándares, mediante la aplicación de la siguiente fórmula.

$$C_{\text{SM}} \cdot V_{\text{SM}} = C_{\text{ST}} \cdot V_{\text{ST}}$$

De donde:

C_{SM} = Concentración de la solución madre (μM)

V_{SM} = Volumen de la solución madre a tomar para las alícuotas (mL)

C_{ST} = Concentración del estándar (μM)

V_{ST} = Volumen de aforo del estándar (mL)

Despejando

$$V_{SM} = C_{2ST} \cdot V_{2ST} / C_{0SM}$$

$$V_{SM} = (25 \mu M)(10 \text{ mL}) / (968.88 \mu M)$$

$$V_{SM} = 0.258 \text{ mL}$$

Si se tiene una concentración de la solución madre de 968.88 μM y se requiere llegar a una concentración de 25 μM y el volumen de aforo es 10 mL, se tomó 0.258 mL de la solución madre de trólox. Se realizó el mismo proceso para cada estándar.

6. Cálculos para la concentración

La ecuación es dada por la curva de calibración de trólox, y se expresó en micromoles de equivalentes trólox por gramo de materia seca.

$$y = mx \pm b$$

De donde:

y= absorbancia

m= pendiente

x= concentración

b= intersección

Se despeja la concentración obteniendo:

$$x = \frac{y \pm b}{m}$$

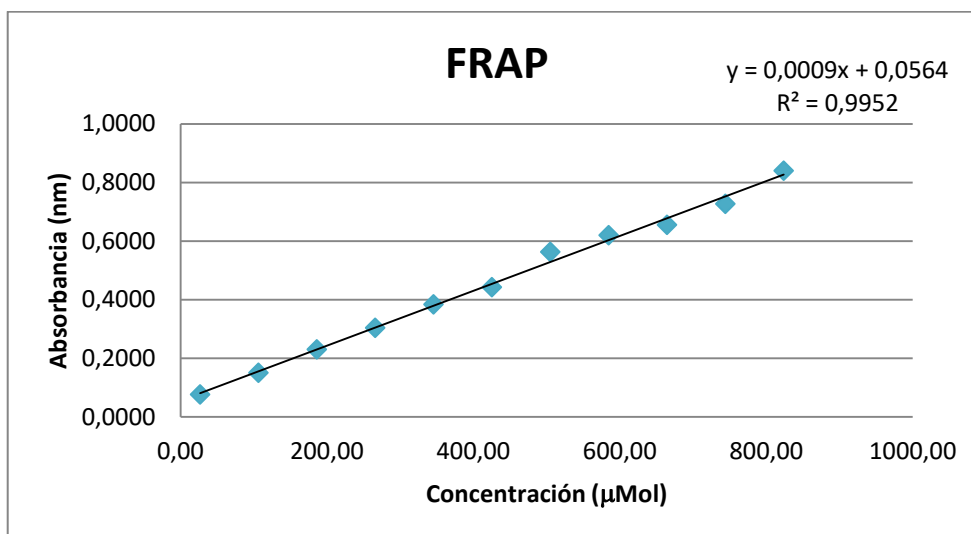
Como explicación, se reemplazará en la fórmula los valores correspondientes a la primera muestra (P1R1), base húmeda, teniendo lo siguiente:

$$CO = \frac{0,752 - 0,996}{-0,0006} = 406,11 \frac{\mu M}{L}$$

$$406,11 \frac{\mu M ET}{L} \left(\frac{0,04 L}{0,50469 g} \right) = 32,19 \frac{\mu M ET}{g}$$

ANEXO D. Método FRAP

1. Curva de calibración con trólox



w. Trólox (g)	PM g/mol	Riqueza %	Aforo (ml)	Concentración Patrón (mg/L)	Concentración Patrón (µM)
0,0125	250,29	97	50	25,77	1029,73

Alicuota (mL)	Aforo (mL)	Trólox (µM)	Absorbancia			Promedio
			Señal 1	Señal 2	Señal 3	
0,258	10	26,57	0,078	0,076	0,077	0,0770
1,032	10	106,27	0,152	0,151	0,15	0,1510
1,806	10	185,97	0,231	0,231	0,23	0,2307
2,58	10	265,67	0,303	0,306	0,304	0,3043
3,354	10	345,37	0,385	0,384	0,384	0,3843
4,128	10	425,07	0,443	0,443	0,443	0,4433
4,903	10	504,88	0,563	0,564	0,563	0,5633
5,677	10	584,58	0,621	0,62	0,62	0,6203
6,451	10	664,28	0,655	0,656	0,656	0,6557
7,225	10	743,98	0,727	0,727	0,728	0,7273
7,999	10	823,68	0,84	0,841	0,84	0,8403

Pendiente: 0,0009
 Intersección: 0,0564
 R²: 0,9952

2. Datos de la cuantificación en las muestras

Código	Peso de la muestra (g)	Volumen del extracto (L)	% H	% ST	Alicuota (mL)	Abs. (nm)	Concentración preliminar ($\mu\text{Mol/L}$)	Concentración ($\mu\text{M ET/g BH}$)		Concentración ($\mu\text{M ET/g BS}$)		
P1R1	0.50469	0,04	9,19	90,81		0,309	281,04	22,27	21,33 \pm 1,00	24,53	23,47 \pm 1,12	
P1R2	0.50455		9,00	91,00		0,15	0,287	255,85		20,28		22,29
P1R3	0.50316		9,12	90,88		0,299	0,299	269,56		21,43		23,58
P2R1	0.50411		9,38	90,62	0,15	0,305	275,85	21,89	20,44 \pm 1,26	24,15	22,55 \pm 1,39	
P2R2	0.50040		9,10	90,91		0,280	248,07	19,83		21,81		
P2R3	0.50348		9,67	90,33		0,278	246,59	19,59		21,69		

3. Solución de Trabajo (ST)

Para la preparación de la ST se emplearon 3 soluciones, de las cuales se tomó las siguientes alícuotas: 25 mL de solución A; 2.5 mL de solución B; 2.5 mL de solución C. se las mezcló y sometió a baño maría a una temperatura de 37 °C, hasta su completa disolución.

Solución A: 300 mM de buffer acetato

Se pesó 0.31 g de Acetato de sodio y se diluyó en 1.6 mL de Ácido acético, aforando en 100 mL de agua destilada.

Acetato de sodio

$$\begin{array}{ccc} 3.1 \text{ g} & \times & 1000 \text{ mL} \\ X & & 100 \text{ mL} \\ & & X = 0.31 \text{ g} \end{array}$$

Acido acético

$$\begin{array}{ccc} 16 \text{ mL} & \times & 1000 \text{ mL} \\ X & & 100 \text{ mL} \\ & & X = 1.6 \text{ mL} \end{array}$$

Solución B: 2,4,6-tripiridin-5-triazina (TPTZ)

Se pesó 0.0312 g de TPTZ y aforó con la solución de HCl 40 mM

TPTZ

$$\begin{array}{ccc} 312.33 \text{ g/mol} & \times & 1 \text{ mol} & - & 1 \text{ L} \\ X & & 0.01 \text{ mol} & - & 0.010 \text{ L} \end{array}$$

$$x = \frac{\left(312.33 \frac{\text{g}}{\text{mol}}\right) (0.01 \text{ mol})(0.010 \text{ L})}{(1 \text{ mol})(1 \text{ L})}$$

$$X = 0.0312 \text{ g}$$

HCl

$$\begin{array}{ccc} 36.5 \text{ g/mol} & \times & 1 \text{ mol} & - & 1 \text{ L} \\ X & & 0.04 \text{ mol} & - & 0.010 \text{ L} \end{array}$$

$$x = \frac{\left(36.5 \frac{\text{g}}{\text{mol}}\right)(0.04 \text{ mol})(0.010 \text{ L})}{(1 \text{ mol})(1 \text{ L})}$$

$$X = 0.0146 \text{ g}$$

Se convirtió de gramos a mililitros.

$$V = \frac{m}{d}$$

$$V = \frac{0.0146 \text{ g}}{1.19 \text{ g/mL}}$$

$$V = 0.0123 \text{ mL}$$

Como el reactivo no tiene una pureza del 100%, hubo que corregir con la pureza real del reactivo.

$$\begin{array}{ccc} 0.0123 \text{ mL} & \times & 3 \% \\ X & & 100 \% \end{array}$$

$$V = 0.033 \text{ mL}$$

Solución C: cloruro férrico hexahidratado 20 mM

Se pesó 0.0541 g de cloruro férrico hexahidratado y aforó en 10 mL de agua destilada.

$$\begin{array}{ccc} 270.3 \text{ g/mol} & \times & 1 \text{ mol} & - & 1 \text{ L} \\ X & & 0.02 \text{ mol} & - & 0.010 \text{ L} \end{array}$$

$$x = \frac{\left(270.3 \frac{\text{g}}{\text{mol}}\right)(0.02 \text{ mol})(0.010 \text{ L})}{(1 \text{ mol})(1 \text{ L})}$$

$$X = 0.0541 \text{ g}$$

4. Preparación solución de referencia de trólox y estándares

a. Solución de referencia de trólox

Se la realizó mediante la siguiente formula, para determinar la concentración de trólox a la cual se trabajó.

Formula:

$$CO_{SM} = \frac{(m)(p)}{v}$$

De donde:

CO_{SM} = Concentración de la solución madre trólox

m= Cantidad de trólox pesada

p= % riqueza del compuesto

v= Volumen de aforo

Reemplazando se obtiene:

Datos:

m: 12.5 mg

Riqueza: 97 %

Volumen: 50 mL

$$CO_{SM} = \frac{(m)(p)}{v}$$

$$CO_{SM} = \frac{(12.5 \text{ mg})(0.97)}{50 \text{ mL}} = 0.2425 \text{ mg/mL}$$

Se requiere la concentración de trólox en μM , por lo cual se pasó de mg/mL a μM siguiendo la siguiente relación.

$$\begin{array}{l} 1 \text{ M} \\ X \end{array} \begin{array}{c} \times \\ \times \end{array} \begin{array}{l} 250.29 \text{ g} - 1000 \text{ mL} \\ 0.0125 \text{ g} - 50 \text{ mL} \end{array}$$

De donde:

1 M: Concentración definida en un mol

250.29 g: Peso molecular del trólox
 0.0125 g: Cantidad pesada de trólox
 1000 mL: Volumen definido en un mol
 50 mL: Volumen a preparar

$$x = \frac{(1 \text{ M})(250.29 \text{ g})(50 \text{ mL})}{(0.0125 \text{ g})(1000 \text{ mL})} = 9.9884 \times 10^{-4} \text{ M}$$

$$x = (9.9884 \times 10^{-4} \text{ M}) \frac{1 \mu\text{M}}{10^{-6} \text{ M}} = 998.84 \mu\text{M}$$

Como el reactivo no tiene una pureza de 100%, hubo que calcular con la pureza real del reactivo, obteniendo la siguiente relación.

$$\begin{array}{ccc} 998.84 \mu\text{M} & \times & 100\% \\ X & & 97\% \end{array}$$

$$X = 968.88 \mu\text{M}$$

b. Preparación de estándares

Una vez realizados los cálculos se obtuvo que la concentración de la solución madre es 968.88 μM , con este valor, se calculó los volúmenes para preparar los estándares, mediante la aplicación de la siguiente fórmula.

$$C_{\text{SM}} \cdot V_{\text{SM}} = C_{\text{ST}} \cdot V_{\text{ST}}$$

De donde:

C_{SM} = Concentración de la solución madre (μM)

V_{SM} = Volumen de la solución madre a tomar para las alícuotas (mL)

C_{ST} = Concentración del estándar (μM)

V_{ST} = Volumen de aforo del estándar (mL)

Despejando

$$V_{SM} = C_{2ST} \cdot V_{2ST} / C_{0SM}$$

$$V_{SM} = (25 \mu\text{M})(10 \text{ mL}) / (968.88 \mu\text{M})$$

$$V_{SM} = 0.258 \text{ mL}$$

Si se tiene una concentración de la solución madre de 968.88 μM y se requiere llegar a una concentración de 25 μM y el volumen de aforo es 10 mL, se tomó 0.258 mL de la solución madre de trólox. Se realizó el mismo proceso para cada estándar.

5. Cálculos para la concentración

La ecuación es dada por la curva de calibración de trólox, y se expresa en micromoles de equivalentes trólox por gramo de materia seca.

$$y = mx \pm b$$

De donde:

y= Absorbancia

m= Pendiente

x= Concentración

b= Intersección

Se despeja la concentración obteniendo:

$$x = \frac{y \pm b}{m}$$

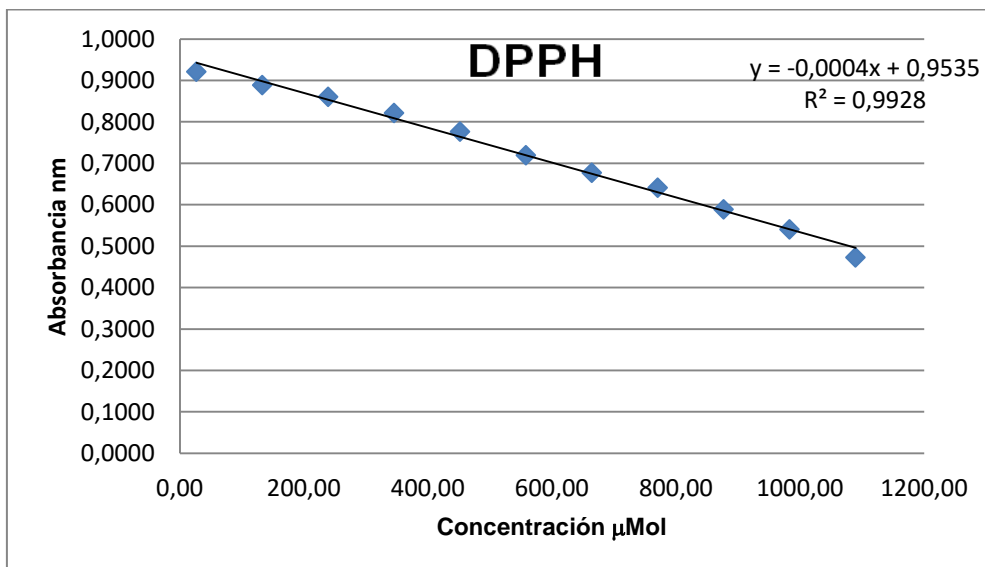
Como explicación, se reemplazó en la fórmula los valores correspondientes a la primera muestra P1R1, base húmeda teniendo lo siguiente:

$$CO = \frac{0,309 - 0,0564}{0,0009} = 281,04 \frac{\mu\text{M}}{\text{L}}$$

$$281,04 \frac{\mu\text{M ET}}{\text{L}} \left(\frac{0,04\text{L}}{0,50469 \text{ g}} \right) = 22,27 \frac{\mu\text{M ET}}{\text{g}} \text{ BH}$$

ANEXO E. Método DPPH

1. Curva de calibración con trólox



w. Trólox (g)	PM g/mol	Riqueza %	Aforo (ml)	Concentración Patrón (mg/L)	Concentración Patrón (μM)
0,025	250,29	97	100	25,77	1029,73

Alicuota (mL)	Aforo (mL)	Trólox (μM)	Absorbancia			Promedio
			Señal 1	Señal 2	Señal 3	
0,258	10	26,57	0,921	0,92	0,923	0,9213
1,29	10	132,84	0,888	0,889	0,89	0,8890
2,322	10	239,10	0,86	0,861	0,861	0,8607
3,354	10	345,37	0,821	0,822	0,822	0,8217
4,387	10	451,74	0,777	0,777	0,776	0,7767
5,419	10	558,01	0,719	0,72	0,72	0,7197
6,451	10	664,28	0,676	0,679	0,677	0,6773
7,483	10	770,55	0,641	0,642	0,641	0,6413
8,515	10	876,82	0,589	0,589	0,589	0,5890
9,547	10	983,09	0,541	0,54	0,541	0,5407
10,58	10	1089,46	0,473	0,473	0,473	0,4730

Pendiente: 0,0004
Intersección: 0,9535
R²: 0,9928

2. Datos de la cuantificación en las muestras

Código	Peso de la muestra (g)	Volumen del extracto (L)	% H	%S T	Alicuota (mL)	Abs. (nm)	Concentración preliminar ($\mu\text{Mol/L}$)	Concentración ($\mu\text{M ET/g BH}$)		Concentración ($\mu\text{M ET/g BS}$)	
P1R1	0.50469	0,04	9,19	90,81		0,515	1097,08	86,95	88,41 \pm 2,09	95,75	97,27 \pm 2,20
P1R2	0.50455		9,00	91,00	0,15	0,495	1145,42	90,81		99,79	
P1R3	0.50316		9,12	90,88		0,513	1100,42	87,48		96,26	
P2R1	0.50411		9,38	90,62		0,499	1137,08	90,23	91,37 \pm 2,01	99,57	100,83 \pm 1,94
P2R2	0.50040		9,10	90,91	0,15	0,484	1172,08	93,69		103,07	
P2R3	0.50348		9,67	90,33		0,499	1135,42	90,21		99,86	

3. Solución patrón (SP)

Se pesó 0.024 g de DPPH, diluyéndolos en 100 mL de metanol, y de ser necesario almacenar a -20 °C.

4. Solución Trabajo(ST)

Se tomó 24 mL de SP, adicionó 46 mL de metanol, hasta obtener una absorbancia de 1.1 ± 0.02 , a una longitud de onda de 515 nm. Para ajustar el espectrofotómetro a cero se uso metanol.

5. Preparación de solución de referencia de trólox y estándares

a. Solución de referencia de trólox

Se la realizó mediante la siguiente formula, para determinar la concentración de trólox a la cual se trabajó.

Formula:

$$CO_{SM} = \frac{(m)(p)}{v}$$

De donde:

CO_{SM} =	Concentración de la solución madre trólox
m =	Cantidad de trólox pesada
p =	% riqueza del compuesto
v =	Volumen de aforo

Reemplazando se obtiene:

Datos:

m:	12,5 mg
Riqueza:	97%
Volumen:	50mL

$$CO_{SM} = \frac{(m)(p)}{v}$$

$$CO_{SM} = \frac{(12.5 \text{ mg})(0.97)}{50 \text{ mL}} = 0.2425 \text{ mg/mL}$$

Se requiere la concentración de trólox en μM , por lo cual hay que pasar de mg/mL a μM siguiendo la siguiente relación.

$$\begin{array}{l} 1 \text{ M} \\ X \end{array} \quad \begin{array}{l} \diagdown \\ \diagup \end{array} \quad \begin{array}{l} 250.29 \text{ g} - 1000 \text{ mL} \\ 0.0250 \text{ g} - 100 \text{ mL} \end{array}$$

De donde:

- 1 M: Concentración definida en un mol
- 250.29 g: Peso molecular del trólox
- 0.0250 g: Cantidad pesada de trólox
- 1000 mL: Volumen definido en un mol
- 100 mL: Volumen a preparar

$$x = \frac{(1\text{M})(250.29 \text{ g})(100 \text{ mL})}{(0.0250 \text{ g})(1000 \text{ mL})} = 9.9884 \times 10^{-4}\text{M}$$

$$x = (9.9884 \times 10^{-4}\text{M}) \frac{1 \mu\text{M}}{10^{-6}\text{M}} = 998.84 \mu\text{M}$$

Como el reactivo no tiene una pureza de 100%, se calculó con la pureza real del reactivo, obteniendo la siguiente relación.

$$\begin{array}{l} 998.84 \mu\text{M} \\ X \end{array} \quad \begin{array}{l} - \\ - \end{array} \quad \begin{array}{l} 100\% \\ 97\% \end{array}$$

$$X = 968.88 \mu\text{M}$$

b. Preparación de estándares

Una vez realizados los cálculos se obtuvo que la concentración de la solución madre es $968.88 \mu\text{M}$, con este valor, se calculó los volúmenes para preparar los estándares, mediante la aplicación de la siguiente fórmula.

$$C_{O_{SM}} \cdot V_{SM} = C_{2_{ST}} \cdot V_{2_{ST}}$$

De donde:

$C_{O_{SM}}$ = Concentración de la solución madre (μM)

V_{SM} = Volumen de la solución madre a tomar para las alícuotas (mL)

$C_{2_{ST}}$ = Concentración del estándar (μM)

$V_{2_{ST}}$ = Volumen de aforo del estándar (mL)

Despejando

$$V_{SM} = C_{2_{ST}} \cdot V_{2_{ST}} / C_{O_{SM}}$$

$$V_{SM} = (25 \mu\text{M})(10 \text{ mL}) / (968.88 \mu\text{M})$$

$$V_{SM} = 0.258 \text{ mL}$$

Si se tiene una concentración de la solución madre de $968.88 \mu\text{M}$ y se requiere llegar a una concentración de $25 \mu\text{M}$ y el volumen de aforo es 10 mL, se tomó 0.258 mL de la solución madre de trólox. Se realizó el mismo proceso para cada estándar.

6. Cálculos para la concentración

La ecuación es dada por la curva de calibración de trólox, y se expresó en micromoles de equivalentes trólox por gramo de materia seca.

$$y = mx \pm b$$

De donde:

y= absorbancia

m= pendiente

x= concentración

b= intersección

Se despeja la concentración obteniendo:

$$x = \frac{y \pm b}{m}$$

Como explicación, se reemplazó en la formula los valores correspondientes a la primera muestra P1R1 base húmeda, teniendo lo siguiente:

$$co = \frac{0,515 - 0,9535}{-0,0004} = 1097,08 \frac{\mu\text{M}}{\text{L}}$$
$$1097,08 \frac{\mu\text{M ET}}{\text{L}} \left(\frac{0,04 \text{ L}}{0,50469 \text{ g}} \right) = 86,95 \frac{\mu\text{M ET}}{\text{g}}$$

ANEXO F. Análisis estadístico ANOVA

ANOVA unidireccional: Fenoles totales vs. Tratamiento (base seca)

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Tratamiento	1	6291,4	6291,4	109,69	0,000
Error	4	229,4	57,4		
Total	5	6520,9			

S = 7,573 R-cuad. = 96,48% R-cuad. (ajustado) = 95,60%

Nivel	N	Media	Desv.Est.	ICs de 95% individuales para la media basados en Desv.Est. agrupada
P1	3	446,48	8,47	(-----*-----)
P2	3	381,72	6,56	(-----*-----)

-----+-----+-----+-----
375 400 425 450

Desv.Est. agrupada = 7,57

Agrupar información utilizando el método de Tukey

Tratamiento	N	Media	Agrupación
P1	3	446,483	A
P2	3	381,720	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Intervalos de confianza simultáneos de Tukey del 95%
Todas las comparaciones de dos a dos entre los niveles de Tratamiento

Nivel de confianza individual = 95,00%

Tratamiento = P1 restado de:

Tratamiento	Inferior	Centro	Superior
P2	-81,932	-64,763	-47,595

Tratamiento	Intervalo de confianza
P2	(-----*-----)

-----+-----+-----+-----
-75 -50 -25 0

ANOVA unidireccional: Fenoles totales vs. Tratamiento (base húmeda)

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Tratamiento	1	5386,8	5386,8	99,88	0,001
Error	4	215,7	53,9		
Total	5	5602,5			

S = 7,344 R-cuad. = 96,15% R-cuad. (ajustado) = 95,19%

Nivel	N	Media	Desv.Est.	ICs de 95% individuales para la media basados en Desv.Est. agrupada
P1	3	405,84	7,83	(-----*-----)
P2	3	345,91	6,82	(---*---)

-----+-----+-----+-----+-----
 350 375 400 425

Desv.Est. agrupada = 7,34

Agrupar información utilizando el método de Tukey

Tratamiento	N	Media	Agrupación
P1	3	405,837	A
P2	3	345,910	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Intervalos de confianza simultáneos de Tukey del 95%
 Todas las comparaciones de dos a dos entre los niveles de Tratamiento

Nivel de confianza individual = 95,00%

Tratamiento = P1 restado de:

Tratamiento	Inferior	Centro	Superior
P2	-76,575	-59,927	-43,278

Tratamiento	Intervalo
P2	(-----*-----)

-----+-----+-----+-----+-----
 -75 -50 -25 0

ANOVA unidireccional: ABTS vs. Tratamiento (base seca)

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Tratamiento	1	65,54	65,54	22,06	0,009
Error	4	11,88	2,97		
Total	5	77,42			

S = 1,724 R-cuad. = 84,65% R-cuad.(ajustado) = 80,81%

ICs de 95% individuales para la media
basados en Desv.Est. agrupada

Nivel	N	Media	Desv.Est.	
P1	3	36,617	1,155	(-----*-----)
P2	3	30,007	2,147	(-----*-----)

-----+-----+-----+-----+-----
28,0 31,5 35,0 38,5

Desv.Est. agrupada = 1,724

Agrupar información utilizando el método de Tukey

Tratamiento	N	Media	Agrupación
P1	3	36,617	A
P2	3	30,007	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Intervalos de confianza simultáneos de Tukey del 95%
Todas las comparaciones de dos a dos entre los niveles de Tratamiento

Nivel de confianza individual = 95,00%

Tratamiento = P1 restado de:

Tratamiento	Inferior	Centro	Superior
P2	-10,517	-6,610	-2,703

Tratamiento	
P2	(-----*-----)

-----+-----+-----+-----+-----
-8,0 -4,0 0,0 4,0

ANOVA unidireccional: FRAP vs. Tratamiento (base seca)

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Tratamiento	1	1,26	1,26	0,79	0,424
Error	4	6,38	1,59		
Total	5	7,64			

S = 1,262 R-cuad. = 16,51% R-cuad. (ajustado) = 0,00%

Nivel	N	Media	Desv.Est.	ICs de 95% individuales para la media basados en Desv.Est. agrupada
P1	3	23,467	1,124	(-----*-----)
P2	3	22,550	1,387	(-----*-----)
				-----+-----+-----+-----+-----
				21,0 22,5 24,0 25,5

Desv.Est. agrupada = 1,262

Agrupar información utilizando el método de Tukey

Tratamiento	N	Media	Agrupación
P1	3	23,467	A
P2	3	22,550	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Intervalos de confianza simultáneos de Tukey del 95%
 Todas las comparaciones de dos a dos entre los niveles de Tratamiento

Nivel de confianza individual = 95,00%

Tratamiento = P1 restado de:

Tratamiento	Inferior	Centro	Superior
P2	-3,779	-0,917	1,945

Tratamiento	Intervalo
P2	(-----*-----)
	-----+-----+-----+-----+-----
	-2,0 0,0 2,0 4,0

ANOVA unidireccional: FRAP vs. Tratamiento (base húmeda)

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Tratamiento	1	1,19	1,19	0,92	0,393
Error	4	5,19	1,30		
Total	5	6,38			

S = 1,139 R-cuad. = 18,62% R-cuad. (ajustado) = 0,00%

Nivel	N	Media	Desv.Est.	ICs de 95% individuales para la media basados en Desv.Est. agrupada
P1	3	21,327	0,999	-----+-----+-----+-----+----- (-----*-----)
P2	3	20,437	1,264	(-----*-----) -----+-----+-----+-----+-----
				19,2 20,4 21,6 22,8

Desv.Est. agrupada = 1,139

Agrupar información utilizando el método de Tukey

Tratamiento	N	Media	Agrupación
P1	3	21,327	A
P2	3	20,437	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Intervalos de confianza simultáneos de Tukey del 95%
Todas las comparaciones de dos a dos entre los niveles de Tratamiento

Nivel de confianza individual = 95,00%

Tratamiento = P1 restado de:

Tratamiento	Inferior	Centro	Superior
P2	-3,473	-0,890	1,693

Tratamiento	Inferior	Centro	Superior
P2	-3,2	-1,6	1,6

ANOVA unidireccional: DPPH vs. Tratamiento (base húmeda)

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Tratamiento	1	13,17	13,17	3,14	0,151
Error	4	16,78	4,20		
Total	5	29,96			

S = 2,048 R-cuad. = 43,97% R-cuad. (ajustado) = 29,96%

ICs de 95% individuales para la media
basados en Desv.Est. agrupada

Nivel	N	Media	Desv.Est.
P1	3	88,413	2,092
P2	3	91,377	2,003

-----+-----+-----+-----+-----+
 (-----*-----)
 (-----*-----)
 -----+-----+-----+-----+-----+

87,5 90,0 92,5 95,0

Desv.Est. agrupada = 2,048

Agrupar información utilizando el método de Tukey

Tratamiento	N	Media	Agrupación
P2	3	91,377	A
P1	3	88,413	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Intervalos de confianza simultáneos de Tukey del 95%
 Todas las comparaciones de dos a dos entre los niveles de Tratamiento

Nivel de confianza individual = 95,00%

Tratamiento = P1 restado de:

Tratamiento	Inferior	Centro	Superior
P2	-1,680	2,963	7,607

Tratamiento	Inferior	Centro	Superior
P2	-3,5	0,0	3,5

-----+-----+-----+-----+-----+
 (-----*-----)
 -----+-----+-----+-----+-----+

-3,5 0,0 3,5 7,0