



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

**PROYECTO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DE GRADO
ACADÉMICO O TÍTULO DE**

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTOR: ALEXANDRA NATALY REYES MARTÍNEZ-ORBE

**TEMA: EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE
UTILIZANDO DPPH (2,2-DIFENIL-1-PICRILHIDRAZIL) DE RIZOMAS DE
Curcuma longa L. CULTIVADA POR LA COMUNIDAD SHUAR EN LA
PROVINCIA DE PASTAZA, ECUADOR.**

DIRECTORA: KARINA PONCE B. SC.

CODIRECTORA: DRA. BLANCA NARANJO

SANGOLQUÍ, AGOSTO DEL 2014

CERTIFICACIÓN

Karina Ponce B.S.

Dra. Blanca Naranjo

Certifican:

Que el trabajo titulado: EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE UTILIZANDO DPPH (2,2-DIFENIL-1-PICRILHIDRAZIL) DE RIZOMAS DE *Curcuma longa* L. CULTIVADA POR LA COMUNIDAD SHUAR EN LA PROVINCIA DE PASTAZA, ECUADOR, fue realizado en su totalidad por la Srta. ALEXANDRA NATALY REYES MARTÍNEZ-ORBE como requerimiento parcial a la obtención del título de INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA.

22 de Julio del 2014

Dra. Blanca Naranjo
DIRECTORA

Karina Ponce B.S.
CODIRECTORA

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD

ALEXANDRA NATALY REYES MARTÍNEZ-ORBE

Declaro que:

El proyecto de grado denominado EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE UTILIZANDO DPPH (2,2-DIFENIL-1-PICRILHIDRAZIL) DE RIZOMAS DE *Curcuma longa* L. CULTIVADA POR LA COMUNIDAD SHUAR EN LA PROVINCIA DE PASTAZA, ECUADOR, ha sido desarrollado en base a una investigación exhaustiva, respetando los derechos intelectuales de terceros, conforme a las citas que constan en el texto cuyas fuentes se incorporan en la bibliografía.

Consiguientemente este trabajo es de mi autoría.

SANGOLQUÍ, JULIO DEL 2014.

Alexandra Nataly Reyes Martínez-Orbe

AUTORIZACIÓN

ALEXANDRA NATALY REYES MARTÍNEZ-ORBE

Autorizo que:

El proyecto de grado denominado EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE UTILIZANDO DPPH (2,2-DIFENIL-1-PICRILHIDRAZIL) DE RIZOMAS DE *Curcuma longa* L. CULTIVADA POR LA COMUNIDAD SHUAR EN LA PROVINCIA DE PASTAZA, ECUADOR, sea publicado en la biblioteca virtual de la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE.

SANGOLQUÍ, JULIO DEL 2014.

Alexandra Nataly Reyes Martínez-Orbe

DEDICATORIA

Con todo el cariño y amor que mi corazón pueda emanar, para Dios y para las personas que eligió como mis ángeles en la tierra, por hacer todo en la vida para que yo pudiera lograr mis sueños, motivarme, ayudarme, formarme con buenos sentimientos, hábitos, valores y darme la mano cuando el camino se ponía difícil, a ustedes “Papá y mamá” por siempre mi corazón y mi agradecimiento.

Alexandra

AGRADECIMIENTO

A Dios, por poner en mi camino a las personas y circunstancias adecuadas, por guiarme en cada paso que he dado y permitirme el haber llegado hasta este momento tan importante de mi formación.

A mis padres, por ser mi ejemplo de lucha y esfuerzo, por su comprensión, paciencia, ánimo y ayudarme en cada momento.

A mis hermanos, que con sus locuras me han sacado más de una sonrisa, gracias por hacer más fácil este camino.

A Blanquita Naranjo y Kari Ponce, que han colaborado en la realización del presente trabajo, por su motivación, apoyo, ánimo inculcado y la confianza en mí depositada, por compartir conmigo sus lecciones y experiencias, formándome como una persona de bien y preparada para los retos que pone la vida. Gracias por su cariño y amistad.

A ti, porque a pesar de todo, siempre estuviste para mí, fuiste mi apoyo, fortaleza, me ayudaste cuando más te necesitaba, gracias por cuidarme.

A Silvyta, Rodrigo Ávalos, Klever Andrade, por brindarme siempre su apoyo, ayudarme en mi formación, por sus consejos y lecciones.

A mis amigos, porque sin ustedes este largo camino no hubiera sido igual, porque siempre estuvieron listos para brindarme toda su ayuda, por su compañía y toda la alegría compartida.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CERTIFICACIÓN	i
DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD	ii
AUTORIZACIÓN.....	iii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTO	v
SIGLAS Y ABREVIATURAS	xii
RESUMEN	xiii
ABSTRACT.....	xiv
CAPÍTULO 1	1
INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Formulación del Problema	1
1.2 Justificación del Problema	2
1.3 Objetivos.....	4
1.3.1 Objetivo General.....	4
1.3.2 Objetivos Específicos	4
1.4 Marco Teórico	5
CAPÍTULO 2.....	19
MATERIALES Y MÉTODOS.....	19

2.1	Revisión bibliográfica	19
2.2	Recolección de muestras de <i>Curcuma longa</i>	19
2.3	Preparación de muestras de <i>Curcuma longa</i>	20
2.4	Determinación de humedad.....	20
2.5	Extracción de curcuminoides	21
2.6	Determinación del contenido total de curcuminoides por gravimetría.	22
2.7	Determinación de los tipos de curcuminoides por cromatografía en capa fina	22
2.8	Estabilidad de la cúrcuma frente al pH.	23
2.9	Determinación de la capacidad antioxidante en función de la cantidad de alcohol.	23
CAPÍTULO 3		24
RESULTADOS.....		24
3.1	Recolección y preparación de muestras de <i>Curcuma longa</i> L.....	24
3.2	Contenido de humedad promedio de <i>Curcuma longa</i> L.....	25
3.3	Concentración de curcuminoides cuantificados por gravimetría y obtenidos con diferentes solventes.	27
3.1	Curva de calibración	30
3.2	Separación e identificación de curcuminoides a través de cromatografía en capa fina.	31
3.3	Estabilidad de la cúrcuma frente al pH	33

3.4	Espectro de absorción del extracto de curcuminoides.....	37
3.5	Capacidad antioxidante de los curcuminoides, utilizando el método del DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) en el extracto obtenido con metanol como solvente.	38
	CAPÍTULO 4.....	42
	DISCUSIÓN.....	42
	CAPÍTULO 5.....	46
	CONCLUSIONES.....	46
	CAPÍTULO 6.....	48
	RECOMENDACIONES.....	48
	CAPÍTULO 7.....	49
	BIBLIOGRAFÍA.....	49
	ANEXOS.....	55
	ANEXO 1.....	55
	ANEXO 2.....	58
	ANEXO 3.....	59

ÍNDICE DE TABLAS Y CUADROS

Tabla 1: Disolventes puros empleados en cromatografía (Frederic & Reyes, 2005).....	¡Error! Marcador no definido.	16
Tabla 2: Resultados del porcentaje de humedad		27
Tabla 4: Concentración de curcuminoides obtenidos con diferentes solventes		28
Tabla 5: Análisis de varianza de los tres tratamientos usados para la extracción de curcuminoides.....		30
Tabla 3: Absorbancias de las diferentes concentraciones de DPPH		31
Tabla 6: Valores de distancias y Rf obtenidos en las cromatografías.....		33
Tabla 7: Espectros de absorción en un rango de 232 a 499 nm a diferentes pHs del extracto de curcuminoides	34	35
Tabla 8: Porcentaje de DPPH con diferentes concentraciones de solvente		38
Tabla 9: Espectro de absorción del extracto de curcuminoides		58

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: <i>Curcuma longa</i> L. en la provincia de Pastaza, Ecuador.	¡Error! Marcador no definido.8
Figura 2: Curcuminoides del extracto de <i>Curcuma longa</i> L. (Mesa, Ramírez-Tortosa, Aguilera, Ramírez-Boscá, & Gil, 2000).	¡Error! Marcador no definido.9
Figura 3: Equipo Soxhlet usado para la extracción de curcuminoides.....	¡Error! Marcador no definido.13
Figura 4 Regiones ultravioleta y visible del espectro y tipos de bandas de absorción más frecuentes (Olsen, 1990).	18
Figura 5: Rotavapor con extracto de curcuminoides.....	21
Figura 6: Rizomas de cúrcuma cortados y colocados en una bandeja para ser secados	25
Figura 7: Muestra de <i>Curcuma longa</i> L. triturada.....	25
Figura 8: Cápsulas de porcelana y desecador con muestras de cúrcuma.....	26
Figura 9: Cuadro comparativo de concentraciones de curcuminoides extraídos con metanol, etanol y acetona	29
Figura 10: Curva de calibración de las mediciones promedio de DPPH.....	31
Figura 11: Placa de sílica gel observada con luz UV	32
Figura 12: Extracto de curcuminoides a pH ácido, neutro y básico	34
Figura 13: Longitud de onda versus Absorbancias a diferentes pH del extracto de curcuminoides.....	36
Figura 14: Espectro de absorción del extracto de curcuminoides.....	37

Figura 15: Absorbancias en 1 hora y 30 minutos, a diferentes concentraciones de solvente	41
Figura 16: Porcentaje de DPPH frente al tiempo con diferentes concentraciones de solvente	41
Figura 17: Curva de calibración de la primera medición de DPPH	55
Figura 18: Curva de calibración de la segunda medición de DPPH.....	55
Figura 19: Curva de calibración de la tercera medición de DPPH	56
Figura 20: Curva de calibración de la cuarta medición de DPPH	56
Figura 21: Curva de calibración de la quinta medición de DPPH.....	57

SIGLAS Y ABREVIATURAS

DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
nm	Nanómetros
pH	Potencial hidrógeno
ABS	Absorbancia
RPM	Revoluciones por minuto
g	Gramos
°C	Grados centígrados
HPLC	High-performance liquid chromatography
mM	Milimolar
PB	Peso balón
PM	Peso muestra

RESUMEN

Las propiedades de la cúrcuma son muy importantes en la industria alimenticia, posee un alto poder antioxidante, antibacteriano, antifúngico y antimicobacterial, por lo que al adicionarla a preparaciones alimenticias, preserva su frescura, evita el crecimiento de microorganismos no deseados y ofrece un sabor y color característico. Actualmente existe un considerable interés mundial en el desarrollo de colorantes naturales debido a su seguridad y beneficio para el organismo (Surojanametakul, Satmalee, Saengprakai, Siliwan, & Wattanasiritham, 2010). Se han extraído colorantes de una variedad de plantas, y éstos han sido usados en la industria alimenticia, es por este motivo que en la presente investigación se buscó encontrar en *Curcuma longa* L., un recurso diferente para obtener estos colorantes. *Curcuma longa* L. cultivada por las comunidades indígenas Shuar de la provincia de Pastaza presentó un contenido de humedad promedio de $16,58 \pm 0,17$ en muestra seca. Para la obtención de curcuminoides se utilizó como solventes al metanol, etanol y acetona, se los cuantificó por gravimetría obteniendo un mayor porcentaje de curcuminoides en la extracción con metanol. Se identificó a la demetoxicurcumina, bisdemetoxicurcumina y curcumina. Se evaluó la capacidad antioxidante de los curcuminoides totales, resultando un porcentaje de actividad de captación de radicales DPPH del 76.30%.

Palabras claves: DPPH, CAPACIDAD ANTIOXIDANTE, RADICALES LIBRES, ANTIBACTERIANO, ANTIFÚNGICO, ANTIMICOBACTERIAL, COLORANTE.

ABSTRACT

The properties of turmeric are very important in the food industry, has a high antioxidant, antibacterial, antifungal and antimycobacterial power, so add it to the prepared foods, preserves freshness, prevents the growth of undesirable microorganisms and provides a flavor and characteristic color. There is considerable worldwide interest in the development of natural dyes because of its safety and benefit to the organism (Surojanametakul, Satmalee, Saengprakai, Siliwan, & Wattanasiritham, 2010). Dyes were extracted from a variety of plants, and these have been used in the food industry, it is for this reason that in the present investigation sought to find in *Curcuma longa* L., a different resource for these dyes. *Curcuma longa* L. cultivated by indigenous Shuar communities in the province of Pastaza presented an average content of 16.58 ± 0.17 moisture in dry sample. For obtaining curcuminoids was used as solvent methanol, ethanol and acetone, the quantified gravimetrically obtaining a higher percentage of curcuminoids in the methanol extraction. He identified demethoxycurcumin, bisdemethoxycurcumin and curcumin. Antioxidant capacity of total curcuminoids were evaluated, resulting in a percentage of DPPH scavenging activity of 76.30% radicals.

Keywords: DPPH, ANTIOXIDANT CAPACITY, FREE RADICALS, ANTIBACTERIAL, ANTIFUNGAL, ANTIMYCOBACTERIAL, DYE.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 Formulación del Problema

En la industria de los alimentos, la textura, sabor y apariencia son elementos imprescindibles en sus productos (Pineda, 2012). El color forma parte de la apariencia, su percepción es fundamental en la decisión de escoger un alimento antes de probarlo (Quijano & Kadamani, 2010). Varios estudios demuestran que esta característica influye en el consumidor al momento de aceptar o rechazar el alimento. Esta es la importancia de usar colorantes como aditivos en alimentos procesados, que van desde bebidas, lácteos, carnes, embutidos, productos de procesos fermentativos, entre otros (Pineda, 2012).

En el Ecuador, se utilizan colorantes artificiales, entre ellos el amarillo ocaso FCF, cantaxantina, óxido de hierro (amarillo), en alimentos como quesos, postres lácteos, mermeladas, rellenos de frutas, hortalizas, dulces, salsas, cereales, productos cárnicos, aderezos, bebidas alcohólicas, a base de agua o leche, etc. (INEN, 2011), los que son potencialmente peligrosos para la salud (Carrillo, 2013), cuyo rechazo ha ido aumentando con el paso de los años (Aparecida, 2008). Mientras que los colorantes naturales se relacionan con propiedades benéficas para la salud, entre ellas aportan calidad nutricional, actividad antioxidante, efectos anti inflamatorios, protección contra daños

oxidativos a componentes celulares, prevención de enfermedades crónicas no transmisibles (Volp, Renhe, & Stringueta, 2003), es por este motivo que se ha incrementado la búsqueda de colorantes naturales que puedan sustituir de manera adecuada a los artificiales.

1.2 Justificación del Problema

Las reacciones químicas de los radicales libres se dan continuamente en las células del cuerpo humano y son necesarias para la salud (Avello & Suwalsky, 2006), cada célula padece unos 10000 impactos de radicales libres al día, atacan proteínas, carbohidratos, grasas, ADN, este proceso debe ser controlado con una adecuada protección antioxidante, si el cuerpo no consigue combatirlo de modo efectivo puede causar graves enfermedades, como cáncer, trombosis coronaria, enfermedades renales, cataratas, envejecimiento, apoplejía (Youngson, 1994).

Entre los antioxidantes que se ingieren en la dieta se destacan las vitaminas y compuestos fenólicos que por varios mecanismos neutralizan especies radicalarias (Avello & Suwalsky, 2006). Dentro de los alimentos que contienen compuestos fenólicos está la cúrcuma cuyas propiedades son muy importantes en la industria alimenticia porque además de proporcionar color y sabor agradable a los alimentos, contiene un alto poder antioxidante, antibacteriano, antifúngico y antimicobacterial, por lo que al adicionarla a preparaciones

alimentarias preserva su frescura, evita el crecimiento de microorganismos no deseados y ofrece un sabor característico. La capacidad antioxidante de las moléculas tiene diferentes mecanismos de acción, impiden la formación de los radicales libres, favorecen la reparación y reconstitución de las estructuras biológicas dañadas (Surojanametakul *et al.*, 2010).

Varios suplementos son adicionados a los alimentos con el fin de mejorar su apariencia, sabor y color (Surojanametakul *et al.*, 2010). La comercialización de los colorantes sintéticos, es uno de los más polémicos avances en la industria de los alimentos. Muchos estudios toxicológicos se han hecho para verificar sus efectos nocivos (Prado & Godoy, 2003). Actualmente existe un considerable interés mundial en el desarrollo de los colorantes naturales debido a su seguridad y beneficio para el organismo. Se han extraído colorantes de muchas plantas, y éstos han sido usados a nivel industrial, es por este motivo que se busca encontrar un recurso diferente para obtener colorantes naturales y además, darles un beneficio extra a los alimentos convirtiéndolos en elementos funcionales.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo General

Evaluar la capacidad antioxidante utilizando DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) de rizomas de *Curcuma longa* L. cultivada por la comunidad Shuar en la provincia de Pastaza, Ecuador.

1.3.2 Objetivos Específicos

- Estimar el contenido de humedad promedio de *Curcuma longa* L. cultivada por las comunidades indígenas Shuar de la provincia de Pastaza.
- Estandarizar un método de obtención de curcuminoides utilizando como solventes al metanol, etanol y acetona.
- Cuantificar por gravimetría la concentración de curcuminoides obtenidos con los diferentes solventes.
- Establecer por cromatografía en capa fina, los diferentes componentes de los extractos de curcuminoides obtenidos en el método de extracción con mayor rendimiento.
- Determinar la capacidad antioxidante de los curcuminoides totales obtenidos con el método de extracción de mayor rendimiento, utilizando el método del DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil).

1.4 Marco Teórico

1.4.1 Colorantes alimenticios

Los egipcios adicionaban extractos naturales obtenidos de animales, vegetales o minerales, para colorear sus alimentos y así mejorar su apariencia (Prado & Godoy, 2003). Otra civilización antigua que usaba colorantes fueron los romanos, quienes tenían un dicho: “Las personas comen con los ojos, así como con el paladar”. Está en nuestra naturaleza guiarnos por los colores para aceptar o no los alimentos, por tal razón, se utilizan colorantes naturales o sintéticos para conferir, restituir y mejorar los colores de los productos alimenticios (Altanir, Bento, & Gava, 2009).

1.4.1.1 Colorantes alimenticios naturales

Se obtienen a partir de vegetales, minerales o animales, que han sido aislados con el empleo de un proceso tecnológico adecuado. Son los más antiguos conocidos por el hombre (Pereira, da Silva, & Oliveira, 2007). Existe una gran cantidad de colorantes, que son usados en masas, rellenos, condimentos, lácteos, cárnicos, bebidas, etc. Entre los más comunes está el carmín de cochinilla, que se lo extrae del *Dactylopius coccus* o *Coccus cactis* (cochinilla), da un color rojo-violeta, tiene gran estabilidad al calor, pH y oxidación, se lo usa en dulces, bebidas y lácteos (Altanir, Bento, & Gava, 2009).

La azurita, que es un compuesto del carbonato de cobre, se lo encuentra en la parte superficial de depósitos minerales de cobre oxidado (Pereira, da Silva, & Oliveira, 2007). Otros colorantes muy conocidos son la curcumina (de la cúrcuma), betania (de la remolacha), carotenoides y xantofilas (Altanir, Bento, & Gava, 2009).

Para que un extracto sea usado como colorante debe ser estable y químicamente inerte (Pereira, da Silva, & Oliveira, 2007), siendo los principales problemas que presentan los colorantes naturales, falta de estabilidad en presencia de luz, pH, temperatura, solubilidad y su alto precio (Altanir, Bento, & Gava, 2009).

Las ventajas que traen los colorantes naturales son sus beneficios para la salud, están relacionados con propiedades antioxidantes, protección contra daños oxidativos a componente celulares, efectos antiinflamatorios, entre otros (Volp, Renhe, & Stringueta, 2003).

1.4.1.2 Colorantes alimenticios sintéticos

En los siglos XVIII y XIX se descubrieron los colorantes sintéticos, tuvieron gran aceptación por los consumidores y las industrias se mostraron interesadas al notar que con éstos podían enmascarar alimentos de baja calidad, además que tenían mejor uniformidad, estabilidad e intensidad que los naturales. Desde

aquella época el uso de los colorantes sintéticos fue aumentando hasta la actualidad (Prado & Godoy, 2003).

Hoy por hoy es uno de los más polémicos avances en la industria de los alimentos. Muchos estudios toxicológicos se han realizado para verificar sus efectos nocivos (Prado & Godoy, 2003). Ejemplo, el Amarillo crepúsculo, que es usado en cereales, lácteos, gomas de mascar, coberturas, causa alergias, urticaria, problemas gástricos, angioedema; el Amarillo tartrazina, empleado en licores, lácteos, cereales, frutas, fermentados, produce reacciones alérgicas, afección en la flora gastrointestinal, insomnio, entre otros (Van Wijk, 2009).

1.4.2 Cúrcuma

La cúrcuma es una planta herbácea perteneciente a la familia Zingiberaceae. Nativa del sur de Asia, sin embargo, se la ha cultivado en regiones tropicales y subtropicales (Shiyou *et al.*, 2011). Sus hojas son puntiagudas y alargadas, flores de color amarillo y forma de embudo (figura 1); crece de 90 a 150 cm (Alternative Medicine Review, 2001). En la medicina adyuvética, es principalmente usada para el tratamiento de inflamaciones y en la tradicional es utilizada como estimulante, astringente y diurético (Li *et al.*, 2011).



Figura 1: *Curcuma longa* L. en la provincia de Pastaza, Ecuador.

1.4.3 Clasificación taxonómica

La cúrcuma fue descrita por *Carl Linnaeus*, su clasificación taxonómica es la siguiente:

Clase: Liliopsida

Subclase: Zingiberidae

Orden: Zingiberales

Familia: Zingiberaceae

Género: *Curcuma*

Especie: *Curcuma longa* L.

Curcuma longa es la cúrcuma doméstica, mientras que *C. aromatica* es la silvestre (Chattopadhyay, Biswas, Bandyopadhyay, & Banerjee, 2004).

1.4.4 Curcuminoides

Los curcuminoides son sustancias quimiopreventivas, se encuentran presentes en la cúrcuma, entre los principales están la demetoxicurcumina, bisdemetoxicurcumina y curcumina (figura 2), siendo la curcumina la que se encuentra en mayor proporción (Bengmark, Mesa, & Gil, 2009). Muchas propiedades son atribuidas a los extractos de *Curcuma longa* y a su componente principal la curcumina (Mesa, Ramírez-Tortosa, Aguilera, Ramírez-Boscá, & Gil, 2000), entre éstos, su gran poder antioxidante, lo que la convierte en el compuesto fenólico más estudiado (Bengmark, Mesa, & Gil, 2009).

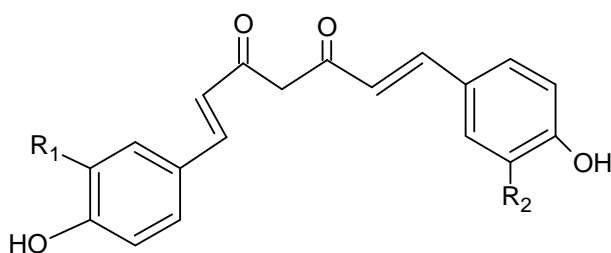


Figura 2: Curcuminoides del extracto de *Curcuma longa* L. (Mesa, Ramírez-Tortosa, Aguilera, Ramírez-Boscá, & Gil, 2000).

	R₁	R₂
Curcumina	OCH ₃	OCH ₃
Demetoxicurcumina	H	OCH ₃
Bisdemetoxicurcumina	H	H

A la curcumina se la conoce químicamente como diferuloilmetano o 1,7-bis-(4-hidroxi-3-metoxifenil) -1,6- heptadieno-3,5-diona, es un compuesto fenólico, con peso molecular bajo (369,37g/mol), punto de fusión de 183°C, coloración amarilla en medio ácido (pH 2,5-7) y rojo en medio básico (pH > 7), soluble en solventes orgánicos como etanol, metanol y acetona (Bengmark, Mesa, & Gil, 2009).

1.4.5 Radicales libres

Los radicales libres son átomos o grupos de átomos que tienen un electrón libre, siendo muy reactivos, tienden a captar un electrón de moléculas estables con la finalidad de alcanzar su estabilidad electroquímica. Una vez que el radical libre ha conseguido quitar el electrón que necesita, la molécula estable que se lo cede se convierte en un radical libre por quedar con un electrón desapareado, de esta manera se inicia una reacción en cadena que destruye a las células. La vida media biológica del radical libre es de microsegundos, pero tiene la capacidad de reaccionar con todo lo que esté a su alrededor

provocando un gran daño a moléculas, membranas celulares y tejidos (Avello & Suwalsky, 2006).

Son un producto del metabolismo normal de cada célula, el organismo humano los inactiva usando mecanismos enzimáticos y otros de atrapamiento. La aterosclerosis, envejecimiento y cáncer, son algunos de la gran lista de problemas fisiológicos y padecimientos que se asocia con una elevada cantidad de radicales libres (Rodríguez, Menéndez, & Trujillo, 2001). Sin embargo, los elementos reactivos no son letales, el cuerpo humano los produce en cantidades moderadas para luchar contra bacterias y virus. Estos procesos deben ser controlados por antioxidantes (Avello & Suwalsky, 2006).

1.4.6 Antioxidantes

y filtrar la disolución, separando el producto extraído y la fracción insoluble que contiene las impurezas (Angurell *et al.*, 2013).

1.4.8.1.2 Extracción sólido-líquido continua

Este método es necesario cuando se necesita hacer extracciones y el compuesto orgánico es más soluble en el agua, que el disolvente orgánico utilizado o cuando se tenga emulsiones intratables. Para realizar una extracción de un sólido por un líquido se utiliza un equipo Soxhlet (Molina *et al.*, 1991). En la siguiente figura se muestra el equipo usado en el presente estudio.



Figura 3: Equipo Soxhlet usado para la extracción de curcuminoides

1.4.8.2 Extracción líquido-líquido

1.4.8.2.1 Extracción líquido-líquido continua

Cuando la solubilidad del compuesto a extraer en los disolventes de extracción habituales no es muy elevada se suele utilizar un procedimiento que implica una extracción continua de la fase inicial, el cual se realiza en un sistema cerrado, donde el disolvente de extracción se calienta en un matraz, se hacen condensar sus vapores en un refrigerante colocado sobre un tubo o cámara de extracción que contiene la disolución acuosa a extraer. El disolvente condensado caliente pasa a través de la disolución acuosa, para llegar con parte del producto extraído, al matraz inicial, donde el disolvente orgánico se vuelve a vaporizar, repitiendo nuevamente el ciclo de extracción, mientras que el producto extraído, no volátil, se va concentrando en el matraz (Angurell *et al.*, 2013).

1.4.8.2.2 Extracción líquido-líquido simple

Extracción utilizada en mezclas sencillas, donde los componentes presentan valores dispares en sus relaciones de distribución. Se usa un embudo de decantación, se introduce la mezcla de sustancias a separar y los disolventes que forman el sistema extractivo, se cierra y agita vigorosamente para favorecer la transferencia de solutos. Se deja el sistema en reposo hasta la separación de las fases y se recoge la de interés (Valcárcel & Gómez, 1988).

1.4.9 Métodos físicos de separación y purificación

Es necesario conocer los métodos de aislamiento y purificación de un compuesto, permite determinar su estructura, realizar el seguimiento de las reacciones químicas y procesos de síntesis. Existen diferentes métodos de separación:

- Destilación
- Extracción
- Sublimación
- Cristalización
- Cromatografía

Todos están basados en las diferencias que existen en las propiedades físicas de los componentes de una mezcla, como son la densidad, presión de vapor, solubilidad, punto de ebullición, etc. (López, Triana, Pérez, & Torres, 2005). Tomando en cuenta las características de la cúrcuma se usó la cromatografía en capa fina para separar sus compuestos.

1.4.9.1 Cromatografía en capa fina

La cromatografía en capa fina es un método que ayuda a la separación y caracterización de compuestos. En esta técnica existen dos fases: fija y móvil.

La separación de compuestos se logra debido a que las sustancias son retenidas en la fase estacionaria y otras se movilizan en la fase móvil (Bolaños, Lutz, & Herrera, 2003).

- Fase fija: consiste en una capa delgada de gel, sílice o alúmina adherida a un soporte de vidrio, aluminio o materiales plásticos con un grosor que puede oscilar de 1 hasta 0,1 – 0,2 mm (López, Triana, Pérez, & Torres, 2005)
- Fase móvil: para elegir el solvente adecuado hay que tomar en cuenta su polaridad y carácter ácido o básico. Generalmente se usan mezclas de solventes. En la siguiente tabla se muestran diferentes solventes en orden de polaridad decreciente para formar enlaces de hidrógeno (Frederic & Reyes, 2005).

Agua	n-Butanol
Formamida	Acetato de etilo
Metanol	Éter
Ácido acético	Acetato de n-butilo
Etanol	Cloroformo
Isopropanol	Benceno
Acetona	Tolueno
n-Propanol	Ciclohexano

Tert-Butanol	Éter de petróleo
Fenol	

Tabla 1: Disolventes puros empleados en cromatografía (Frederic & Reyes, 2005)

La caracterización de compuestos se obtiene comparando la migración entre el factor de retardo de sustancias desconocidas y compuestos patrón (Bolaños, Lutz, & Herrera, 2003).

Este tipo de cromatografía resulta adecuada para la separación de vitaminas, terpenos, azúcares, esteroides, aminoácidos, pigmentos, nucleótidos, aniones y cationes inorgánicos, entre otros. Sus ventajas son la gran velocidad con la que se puede llevar a cabo y capacidad de separación (Beyer & Wolfgang, 1987).

1.4.10 Espectrofotometría

La espectrofotometría es una técnica que mide la interacción de moléculas con la radiación electromagnética, ayudando a determinar la concentración de compuestos diferentes (Almeida, 2007). Un espectro es obtenido cuando la absorción de luz es medida en función de una frecuencia o longitud. Moléculas con electrones deslocalizados en sistemas aromáticos a menudo absorben la luz a 150-400 nm (ultravioleta) o en la región visible de 400-800 nm (figura 4).

La longitud de absorción y fuerza de absorbancia de una molécula no sólo depende de la naturaleza química, si no del ambiente molecular en donde se encuentre el cromóforo (Arenas & López, 2004).

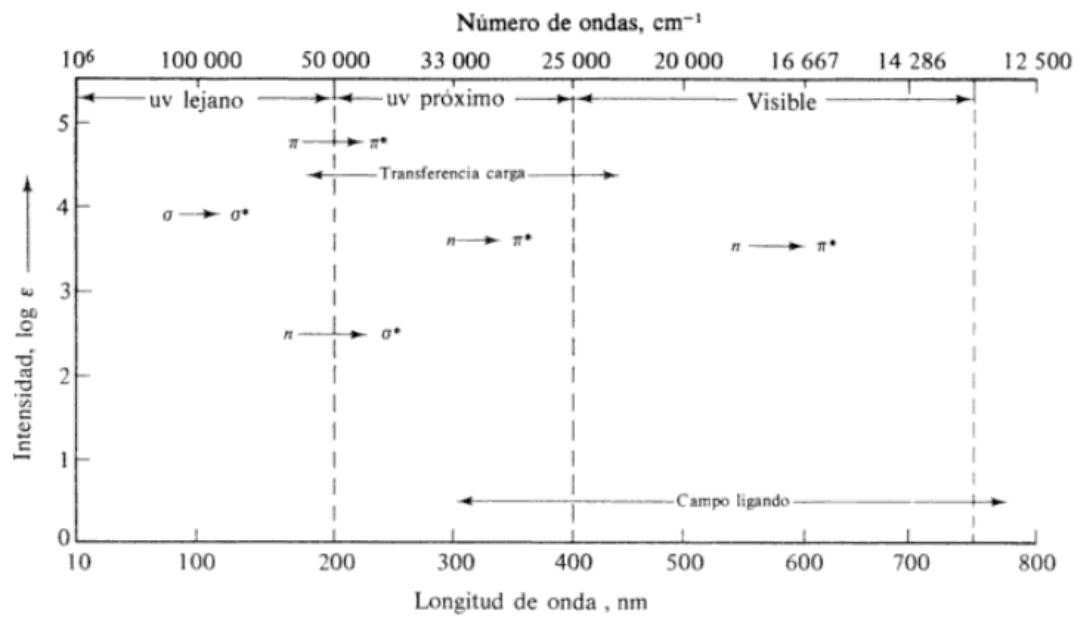


Figura 4 Regiones ultravioleta y visible del espectro y tipos de bandas de absorción más frecuentes (Olsen, 1990).

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Revisión bibliográfica

La investigación se inició con una revisión bibliográfica profunda acerca de los curcuminoides. Se empleó información científica de actualidad disponible en el internet, entre ellas, libros y revistas científicas. Se buscó diferentes procedimientos para extraerlos, cuantificarlos e identificarlos, así como las aplicaciones que se les puede conferir.

2.2 Recolección de muestras de *Curcuma longa*

La muestra se la obtuvo en el mercado de la Parroquia Shell del Cantón Pastaza, de la Provincia de Pastaza. Mediante un proceso minucioso de observación se seleccionaron los rizomas que no presentaron laceraciones, enfermedades, ataque microbiano, y con una coloración anaranjado fuerte. Se recolectó la muestra los días domingo que es cuando los nativos de la zona sacan sus productos frescos, entre ellos la cúrcuma, para ser vendidos en el mercado de la Parroquia Shell.

2.3 Preparación de muestras de *Curcuma longa*

Un día después de su recolección se la llevó al laboratorio. Se retiró cualquier elemento extraño como tierra, se cortaron los rizomas en secciones de aproximadamente 3 mm de largo por 3 mm de ancho. Se colocó el material troceado en una bandeja cubierta con papel film y se dejaron secar por 3 semanas en un lugar fresco, seco y libre de luz. Posteriormente, se trituró toda la muestra en un mortero para homogeneizarla, y se almacenó en un envase hermético en un lugar fresco y oscuro para evitar cualquier deterioro de la misma.

2.4 Determinación de humedad

Se prepararon las cápsulas de porcelana eliminando la mayor cantidad de humedad posible hasta tararlas o mantenerlas a peso constante con ayuda de una estufa y un desecador. Se colocó las cápsulas de porcelana dentro de la estufa por 2 horas a 100°C, posteriormente se las ubicó dentro del desecador y se tomaron pesos cada 3 horas hasta que su valor fuera constante. En cada cápsula de porcelana se colocó 1 g de muestra seca. Luego fueron llevadas a la estufa durante 3 horas y posteriormente se las trasladó al desecador durante 3 horas, se tomaron los pesos hasta que su valor fuera constante. Se anotaron

los datos de pesos iniciales y finales y se procedió a realizar los cálculos del porcentaje de humedad.

2.5 Extracción de curcuminoides

Se realizó la extracción de curcuminoides con tres diferentes solventes: metanol, etanol y acetona, usando el método de extracción continua con un equipo Soxhlet. En el cartucho que va en el interior de la cámara de la muestra se colocó 0,2 gramos de cúrcuma. La extracción terminó cuando el disolvente presente en la cámara de extracción del equipo se encontró totalmente transparente. Posteriormente se pasó el contenido del solvente al rotavapor, donde se separó el solvente de los curcuminoides hasta que no existió vestigio de solvente orgánico (figura 5).



Figura 5: Rotavapor con extracto de curcuminoides

2.6 Determinación del contenido total de curcuminoides por gravimetría

El balón con los curcuminoides extraídos en el paso anterior, fueron llevados a un desecador y se tomaron pesos cada 3 horas hasta que su valor fue constante. Se tomaron los datos de pesos iniciales y finales y se procedió a realizar los cálculos del porcentaje de curcuminoides.

2.7 Determinación de los tipos de curcuminoides por cromatografía en capa fina

Se usaron solventes con diferente polaridad para que actúen como la fase móvil de la cromatografía, la que permitió separar los componentes de cada uno de los extractos preparados (etanol, metanol y acetona.), el eluyente usado fue preparado con cloroformo: metanol (95:5). En una placa de sílica gel y con ayuda de una micropipeta se vertió la disolución de la muestra, a una distancia de 1 cm del borde inferior de la placa. Dentro de la cámara cromatográfica se colocó la mezcla de solventes y la placa con las muestras. Cuando el solvente se encontró a 1 cm de borde superior, se retiró la placa y se dejó secar. Se tomaron los factores de retardo (R_f) de las muestras separadas que se podían observar a simple vista y para las que no, se visualizaron en una cámara ultravioleta.

2.8 Estabilidad de la cúrcuma frente al pH.

Se llevó a cabo con el extracto que presentó mayor capacidad antioxidante. Se tomó 1 mL de extracto y se varió el pH de 1 a 14 con un intervalo de 1, para modificar el pH del extracto se utilizó una solución 1 N de ácido clorhídrico y una solución 1 N de hidróxido de sodio, una vez estabilizado el pH se colocó 1 mL de muestra con pH ajustado en una celda de cuarzo para espectrofotómetro y se midió su absorbancia. La pérdida de color fue monitoreada por la medida de los espectros de absorción en un rango de 232 a 500 nm.

2.9 Determinación de la capacidad antioxidante en función de la cantidad de alcohol.

En este ensayo se utilizó el extracto que presentó mayor cantidad de compuestos fenólicos. Se disolvió 0.01 g de la muestra en 15 mL de solvente (metanol) y se centrifugó a temperatura ambiente por 15 minutos a 4500 rpm. Se realizaron 5 extractos: 0% Agua (solvente puro), 10% Agua (10:90, solvente: agua destilada), 20% Agua (20:80, solvente: agua destilada), 40% Agua (40:60, solvente: agua destilada), 60% Agua (60:40, solvente: agua destilada). Se separó el sobrenadante y se tomó 1500 μL , a los que se añadieron 1500 μL de solución 0,10 mM de DPPH. Se midió la absorbancia a 517nm y se continuaron las mediciones durante una hora y media.

CAPÍTULO 3

RESULTADOS

3.1 Recolección y preparación de muestras de *Curcuma longa* L.

La muestra obtenida en el mercado de la Parroquia Shell del Cantón Pastaza, Provincia de Pastaza, fue llevada al laboratorio un día después de su recolección. Los rizomas fueron limpiados retirando materiales extraños, se cortaron en secciones de aproximadamente 3 mm de largo por 3 mm de ancho, se colocaron en una bandeja cubierta con papel film y se dejó secar por 3 semanas en un lugar fresco, seco y libre de luz (figura 6), la muestra contenía gran cantidad de humedad y aceite esencial, por lo que fue necesario removerla constantemente para obtener un secado homogéneo y evitar su putrefacción. Una vez seca, se trituró toda la muestra en un mortero para homogeneizarla, obteniendo un polvo anaranjado bastante fino (figura 7), el que se usó en los análisis posteriores.



Figura 6: Rizomas de cúrcuma cortados y colocados en una bandeja para ser secados



Figura 7: Muestra de *Curcuma longa* L. triturada

3.2 Contenido de humedad promedio de *Curcuma longa* L.

Se colocaron las cápsulas de porcelana lavadas con agua destilada dentro de la estufa por 3 horas a 100°C. Se las retiró de la estufa y se las ubicó dentro

del desecador y se tomaron pesos cada 3 horas hasta que su valor fue constante. Para este análisis se usó muestra fresca, en cada cápsula de porcelana se colocó 1 g de rizoma finamente cortado y se las llevó a la estufa durante 2 horas, se las trasladó al desecador durante 3 horas, tomando los pesos hasta que su valor fue constante (figura 8). Los datos de pesos iniciales y finales que se tomaron se exhiben en la tabla 2, así como los datos obtenidos en los cálculos del porcentaje de humedad.



Figura 8: Cápsulas de porcelana y desecador con muestras de cúrcuma

Tabla 2: Resultados del porcentaje de humedad

Número	Cápsula	Muestra	Peso (g)		
			C+M seca	% Muestra seca	% Muestra fresca
1	25,69	1,00	25,85	16,52	83,47
2	25,22	1,00	25,38	16,56	83,43
3	26,53	1,00	26,70	16,60	83,39
4	26,65	1,01	26,82	16,64	83,35
5	25,39	1,00	25,56	16,43	83,56
6	25,78	1,00	25,94	16,54	83,45
7	23,19	1,00	23,35	16,67	83,32
8	24,94	1,00	25,10	16,80	83,19
9	25,99	1,00	26,16	16,57	83,42
10	26,25	1,01	26,42	17,03	82,96

Con los datos obtenidos se calculó la mediana y desviación estándar, obteniendo un porcentaje de humedad en muestra seca y muestra fresca de $16,58 \pm 0,17$ y $83,41 \pm 0,17$ respectivamente.

3.3 Concentración de curcuminoides cuantificados por gravimetría y obtenidos con diferentes solventes.

Una vez extraídos los curcuminoides con los diferentes solventes (metanol, etanol, acetona) fueron llevados a un desecador, luego pesados cada 3 horas hasta obtener un valor constante. Se tomaron los datos de pesos iniciales y finales y se realizó los cálculos del porcentaje de curcuminoides detallados en la tabla que se muestra a continuación.

Tabla 34: Concentración de curcuminoides obtenidos con diferentes solventes

	#	Peso balón (PB)	PB + PM	Peso Muestra (PM)	%	Media	Desviación Estándar
Metanol	001	179,64	179,96	1,00	32,60	32,51	0,20
	002	184,15	184,48	1,00	32,28		
	003	179,64	179,70	0,20	32,50		
	004	179,64	179,70	0,20	32,88		
	005	184,15	184,22	0,20	32,52		
	006	184,15	184,22	0,20	32,73		
	007	179,65	179,72	0,20	32,34		
	008	184,15	184,22	0,20	32,27		
	009	184,15	184,22	0,20	32,37		
	010	179,65	179,72	0,20	32,70		
Etanol	011	179,65	179,70	0,20	27,45	27,87	0,39
	012	184,16	184,22	0,20	28,15		
	013	184,16	184,21	0,20	28,35		
	014	179,65	179,71	0,20	27,97		
	015	184,15	184,21	0,20	27,93		
	016	179,66	179,71	0,20	27,92		
	017	179,66	179,71	0,20	27,82		
	018	184,16	184,21	0,20	27,42		
	019	179,65	179,71	0,20	27,32		
	020	184,17	184,22	0,20	27,14		
Acetona	021	179,65	179,70	0,20	23,75	23,37	0,26
	022	179,64	179,69	0,20	23,07		
	023	184,16	184,20	0,20	23,37		
	024	179,65	179,70	0,20	23,81		
	025	184,16	184,21	0,20	23,37		
	026	184,16	184,21	0,20	23,39		
	027	184,16	184,21	0,20	23,36		
	028	179,65	179,70	0,20	23,15		
	029	179,65	179,70	0,20	23,11		
	030	179,66	179,71	0,20	23,09		

En la figura 9 se muestra una comparación de los resultados obtenidos con los tres solventes usados para la extracción. Con cada uno de los solventes se obtuvo 10 extracciones diferentes, obteniendo un porcentaje de curcuminoides del $32,51\% \pm 0,20$, $27,87\% \pm 0,39$ y $23,37\% \pm 0,26$ para el metanol, etanol y acetona respectivamente.

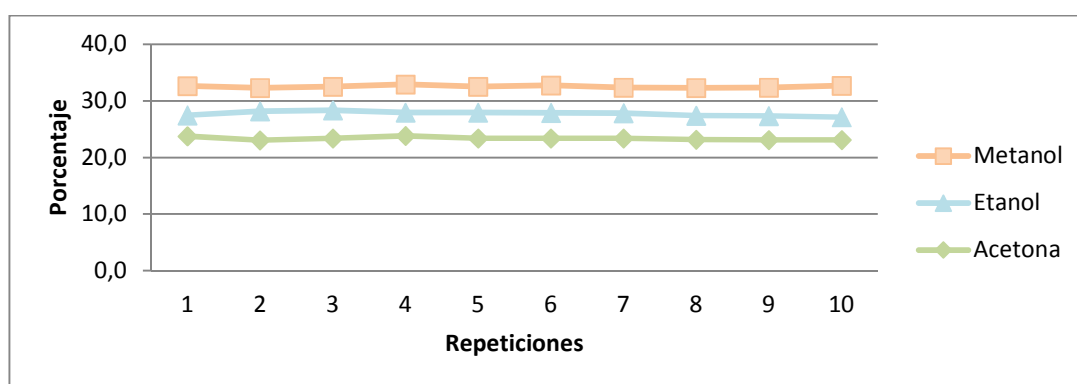


Figura 9: Cuadro comparativo de concentraciones de curcuminoides extraídos con metanol, etanol y acetona

Se realizó el análisis de la varianza con los tres tratamientos de solventes obteniendo los resultados mostrados en la siguiente tabla.

Tabla 45: Análisis de varianza de los tres tratamientos usados para la extracción de curcuminoides

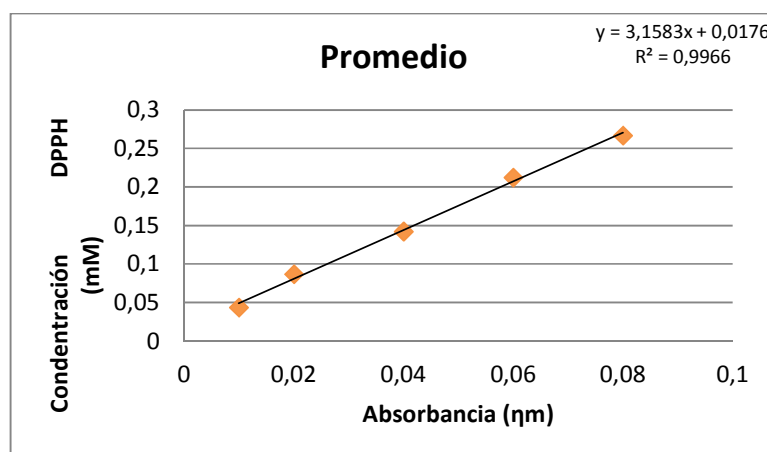
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	420,8484	2	210,4242	2363,487	4,82E-31	3,354131
Dentro de los grupos	2,403844	27	0,089031			
Total	423,2523	29				

3.1 Curva de calibración

Se elaboró 5 soluciones con diferente concentración de DPPH y se midió sus absorbancias. Se repitió este procedimiento 5 veces y se obtuvo un promedio con el que se realizó la curva de calibración, obteniendo un $R^2 = 0,9966$ y una ecuación de la recta $y = 3,1583x + 0.0176$. Las curvas de calibración de cada una de las mediciones se detallan en el anexo 1 y la curva promedio en la figura 10.

Tabla 53: Absorbancias de las diferentes concentraciones de DPPH

Concentración DPPH (mM)	Número de mediciones (Absorbancia)					Promedio
	1	2	3	4	5	
0,01	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
0,02	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08
0,04	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14
0,06	0,21	0,21	0,21	0,21	0,21	0,21
0,08	0,27	0,26	0,26	0,26	0,26	0,26

**Figura 10:** Curva de calibración de las mediciones promedio de DPPH

3.2 Separación e identificación de curcuminoides a través de cromatografía en capa fina.

Se utilizaron solventes con diferente polaridad para que actúen como fase móvil de la cromatografía, permitiendo separar los componentes extraídos con el solvente que proporcionó mayor cantidad de curcuminoides (metanol). Como

fase fija se usaron placas de sílica gel con base de vidrio. Se preparó un eluyente lipofílico, ácido acético: cloroformo (5:95), con pH ácido para estabilizar a las moléculas. En una placa de sílica gel y con ayuda de una micropipeta se vertió el extracto de curcuminoides, se la colocó dentro de la cámara cromatográfica que contenía la mezcla de solventes y al terminar la separación de compuestos se midió las distancias recorridas para calcular los factores de retardo (R_f) de los compuestos separados, los que se encontraron claramente visibles, la figura 11 muestra la placa de sílica gel expuesta a luz UV. Las distancias y valores de R_f se detallan en la tabla 6.

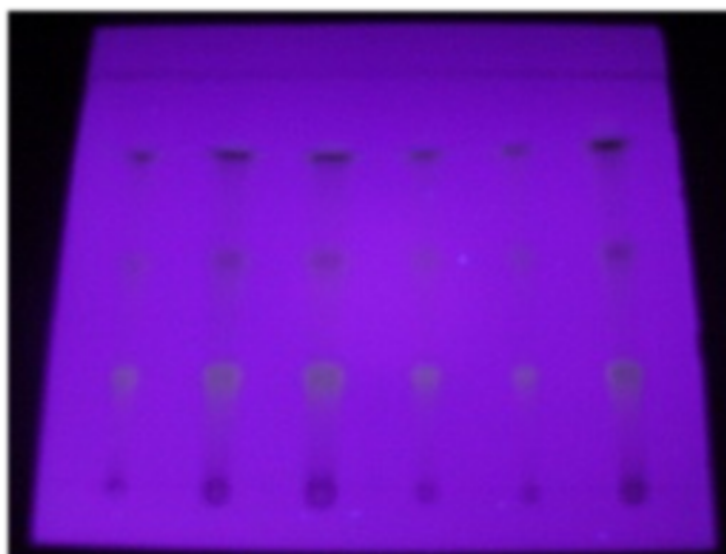


Figura 11: Placa de sílica gel observada con luz UV

Tabla 6: Valores de distancias y Rf obtenidos en las cromatografías

Distancia recorrida por el producto			Distancia recorrida por la fase móvil	Rf		
III	II	I		III	II	I
3,10	5,30	7,40	9,10	0,37	0,63	0,88
3,10	5,30	7,30	9,00	0,37	0,63	0,87
3,10	5,40	7,30	9,00	0,37	0,64	0,87
3,10	5,30	7,30	9,00	0,37	0,63	0,87
3,10	5,30	7,30	9,10	0,37	0,63	0,87
3,10	5,30	7,40	9,10	0,37	0,63	0,88
2,80	4,80	6,50	8,40	0,33	0,57	0,77
2,70	4,70	6,40	8,40	0,32	0,56	0,76
3,10	5,30	7,30	8,40	0,37	0,63	0,87
3,10	5,40	7,30	8,40	0,37	0,64	0,87
3,10	5,30	7,40	8,40	0,37	0,63	0,88
3,10	5,20	7,30	8,40	0,37	0,62	0,87
2,70	4,60	6,50	8,40	0,32	0,55	0,77
2,70	4,60	6,40	8,40	0,32	0,55	0,76
3,20	5,30	7,30	8,40	0,38	0,63	0,87
2,70	4,60	6,40	8,40	0,32	0,55	0,76
2,80	4,70	6,60	8,50	0,33	0,56	0,79
2,80	4,70	6,70	8,60	0,33	0,56	0,80
2,90	5,00	7,10	8,90	0,35	0,60	0,85
2,90	5,00	7,10	8,90	0,35	0,60	0,85
3,00	5,00	7,10	8,90	0,36	0,60	0,85
2,90	5,10	7,10	8,90	0,35	0,61	0,85
2,90	5,10	7,20	8,80	0,35	0,61	0,86
3,00	5,20	7,30	8,70	0,36	0,62	0,87
			Mediana	0,36	0,61	0,86
			Desviación estándar	0,02	0,03	0,04

3.3 Estabilidad de la cúrcuma frente al pH

Se tomó 1 mL de extracto de curcuminoides y se varió el pH de 1,36 a 9,04 con un intervalo de 1, para modificar el pH del extracto se utilizó soluciones 1 N de

ácido clorhídrico e hidróxido de sodio, una vez estabilizado el pH se colocó 1 mL de muestra con pH ajustado en una celda de cuarzo para espectrofotómetro y se midió su absorbancia, obteniendo los resultados mostrados en el anexo 3 y tabla 7. La pérdida de color fue monitoreada por la medida de los espectros de absorción en un rango de 232 a 499 nm, este cambio se muestra en la figura a continuación.



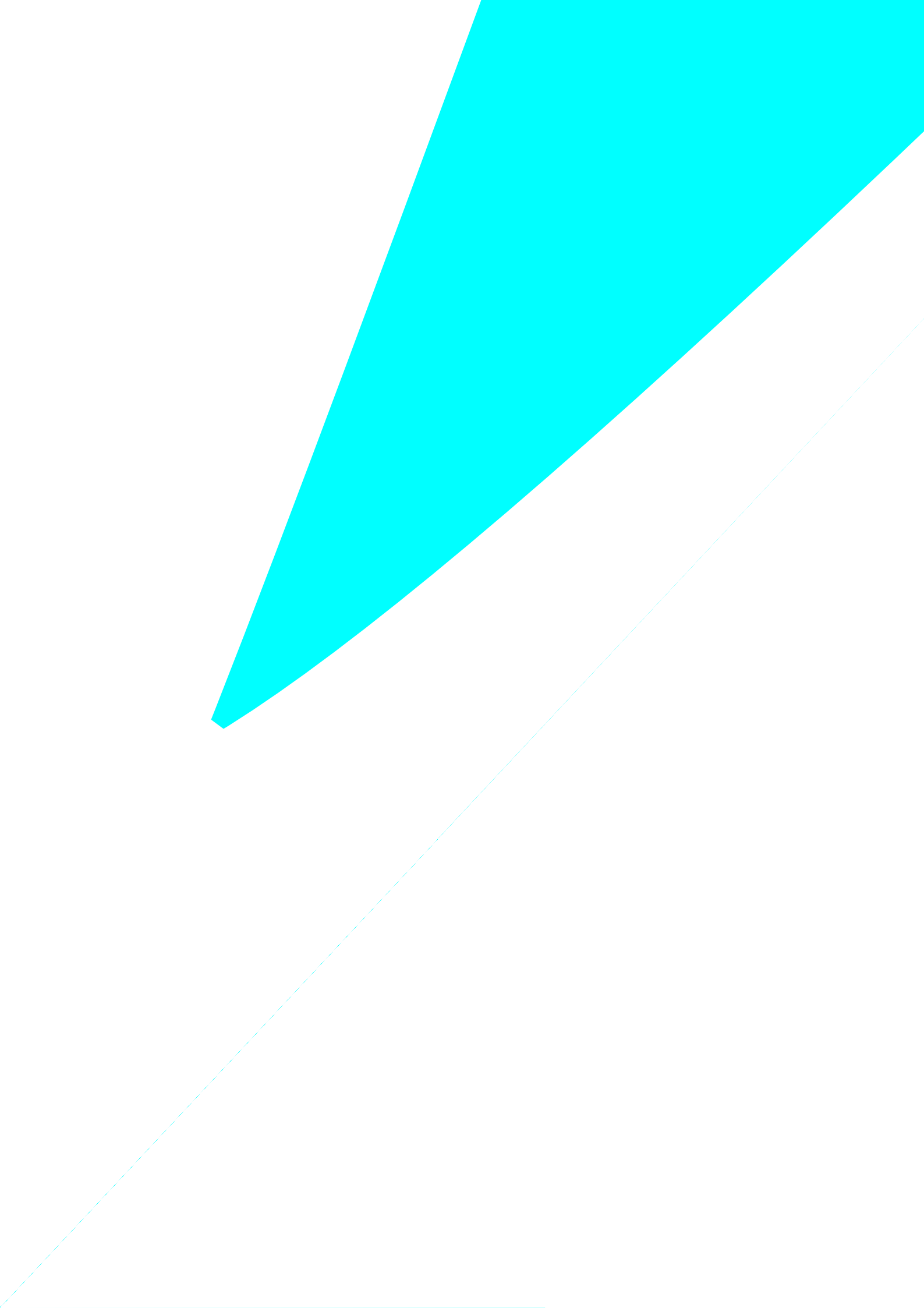
Figura 12: Extracto de curcuminoides a pH ácido, neutro y básico

Tabla 7: Espectros de absorción en un rango de 232 a 499 nm a diferentes pHs del extracto de curcuminoides

Longitud de onda nm	pH								
	1,36	2,15	2,96	4,04	5,150	5,93	7,020	8,04	9,04
	Absorbancia								
232	1,626	1,518	1,765	1,548	1,613	1,653	1,570	1,685	1,683
280	0,455	0,430	0,534	0,432	0,462	0,500	0,448	0,488	0,502
301	0,373	0,357	0,451	0,355	0,387	0,412	0,379	0,410	0,434

Longitud de onda ηm	pH								
	1,36	2,15	2,96	4,04	5,150	5,93	7,020	8,04	9,04
	Absorbancia								
355	0,705	0,686	0,839	0,677	0,730	0,725	0,716	0,779	0,780
358	0,738	0,718	0,877	0,709	0,762	0,756	0,748	0,813	0,814
370	0,892	0,869	1,052	0,861	0,915	0,904	0,900	0,979	0,970
388	1,244	1,217	1,451	1,206	1,270	1,254	1,247	1,358	1,322
391	1,312	1,284	1,529	1,274	1,338	1,321	1,315	1,431	1,390
400	1,514	1,483	1,754	1,471	1,540	1,521	1,513	1,646	1,590
421	1,821	1,786	2,087	1,767	1,839	1,828	1,803	1,972	1,895
436	1,686	1,653	1,926	1,633	1,697	1,695	1,659	1,824	1,765
439	1,626	1,594	1,858	1,574	1,635	1,637	1,597	1,760	1,708
442	1,552	1,521	1,770	1,500	1,558	1,563	1,522	1,679	1,632
445	1,457	1,426	1,660	1,405	1,460	1,468	1,424	1,573	1,537
448	1,357	1,326	1,544	1,306	1,357	1,368	1,323	1,464	1,437
451	1,240	1,211	1,409	1,189	1,237	1,248	1,203	1,336	1,319
454	1,118	1,089	1,268	1,072	1,113	1,126	1,083	1,204	1,197
457	0,984	0,959	1,116	0,942	0,979	0,994	0,949	1,059	1,065
460	0,878	0,854	0,995	0,838	0,872	0,888	0,844	0,944	0,959
487	0,150	0,144	0,182	0,140	0,152	0,173	0,149	0,171	0,257
490	0,120	0,114	0,148	0,112	0,123	0,143	0,120	0,140	0,227
493	0,098	0,093	0,123	0,091	0,101	0,122	0,100	0,117	0,205
496	0,077	0,073	0,101	0,071	0,081	0,102	0,080	0,095	0,184
499	0,063	0,059	0,085	0,058	0,067	0,088	0,067	0,080	0,169

Se elaboró la figura 13 en la que se compara gráficamente los resultados obtenidos de longitud de onda versus absorbancia a diferentes pH.



3.4 Espectro de absorción del extracto de curcuminoides

Al extracto de curcuminoides se le realizó un barrido desde una longitud de onda de 190 nm hasta los 499 nm, obteniendo un espectro de absorción máximo de 421 nm como se detallan en el anexo 2 y figura 14.

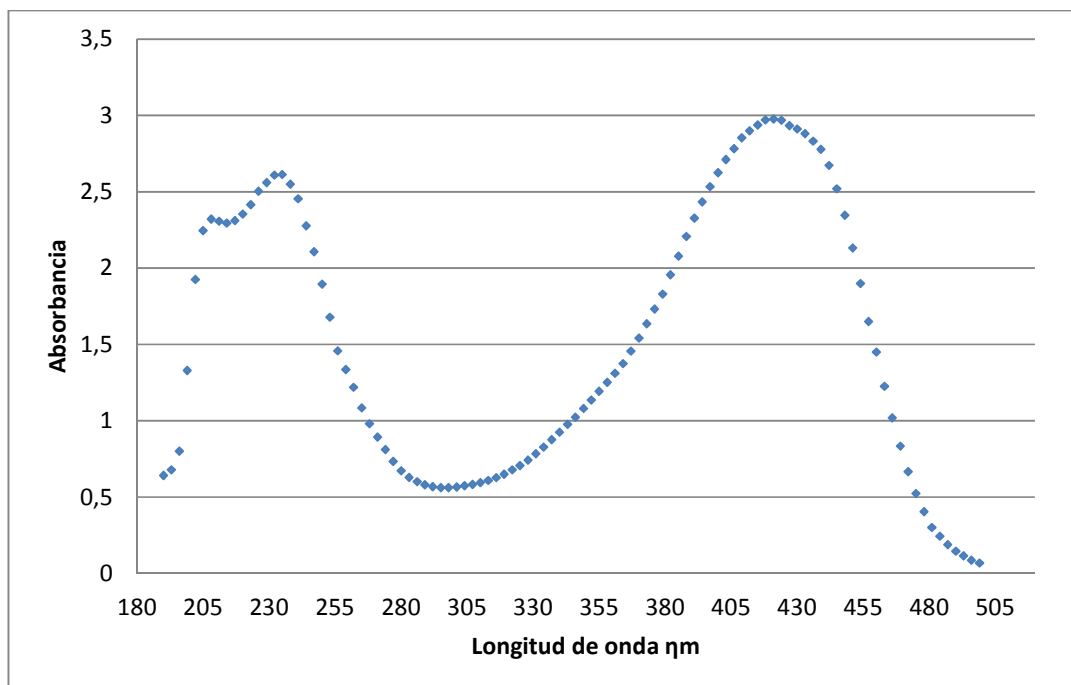


Figura 14: Espectro de absorción del extracto de curcuminoides

3.5 Capacidad antioxidante de los curcuminoides, utilizando el método del DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) en el extracto obtenido con metanol como solvente.

Se realizaron extractos con diferentes proporciones de agua: 0, 10, 20, 40 y 60 %, se midió cada una de estas soluciones a 517nm durante 1 hora con 30 minutos. Con las absorbancias obtenidas se calculó el porcentaje de DPPH obteniendo la tabla 8.

Tabla 8: Porcentaje de DPPH con diferentes concentraciones de solvente

		Absorbancia																		
60% Agua	Tiempo (mm:ss)	01:30:00	01:25:00	01:20:00	01:15:00	01:10:00	01:05:00	01:00:00	00:55:00	00:50:00	00:45:00	00:40:00	00:35:00	00:30:00	00:25:00	00:20:00	00:15:00	00:10:00	00:05:00	00:00:00
			0,142	0,140	0,138	0,135	0,134	0,132	0,131	0,130	0,129	0,128	0,127	0,127	0,127	0,126	0,125	0,124	0,121	0,120
		%DPPH																		
		46,456	47,059	48,039	48,944	49,472	50,075	50,679	51,056	51,508	51,810	52,036	52,262	52,564	52,790	53,394	54,223	54,676	55,581	56,109
		Absorbancia																		
		g																		

01:30:00	0,122	53,511	01:30:00	0,107	58,64	01:30:00	0,089
01:25:00	0,120	54,351	01:25:00	0,106	59,03	01:25:00	0,088
01:20:00	0,117	55,267	01:20:00	0,105	59,65	01:20:00	0,087
01:15:00	0,116	55,802	01:15:00	0,103	60,26	01:15:00	0,086
01:10:00	0,114	56,641	01:10:00	0,102	60,8	01:10:00	0,084
01:05:00	0,112	57,099	01:05:00	0,1	61,5	01:05:00	0,082
01:00:00	0,111	57,557	01:00:00	0,099	61,96	01:00:00	0,081
00:55:00	0,111	57,786	00:55:00	0,097	62,65	00:55:00	0,08
00:50:00	0,110	58,092	00:50:00	0,096	63,12	00:50:00	0,079
00:45:00	0,109	58,473	00:45:00	0,094	63,89	00:45:00	0,077
00:40:00	0,108	58,931	00:40:00	0,092	64,43	00:40:00	0,076
00:35:00	0,107	59,237	00:35:00	0,09	65,12	00:35:00	0,074
00:30:00	0,106	59,618	00:30:00	0,089	65,59	00:30:00	0,073
00:25:00	0,105	60,000	00:25:00	0,089	65,82	00:25:00	0,072
00:20:00	0,103	60,534	00:20:00	0,088	66,13	00:20:00	0,071
00:15:00	0,101	61,374	00:15:00	0,087	66,28	00:15:00	0,069
00:10:00	0,100	61,985	00:10:00	0,086	66,9	00:10:00	0,068
00:05:00	0,098	62,595	00:05:00	0,085	67,36	00:05:00	0,067
00:00:00	0,097	62,977	00:00:00	0,083	67,82	00:00:00	0,065
Tiempo (mm:ss)			Tiempo (mm:ss)			Tiempo (mm:ss)	
	%DPPH		Absorbancia		%DPPH	Absorbancia	
				20% Agua			10% Agua

%DPPH		Absorbancia		%DPPH	
65,37		1:30:00	0,08	68,6	
65,82		1:25:00	0,079	69	
66,34		1:20:00	0,078	69,23	
66,77		1:15:00	0,078	69,39	
67,27		1:10:00	0,077	69,78	
68,01		1:05:00	0,076	70,17	
68,59		1:00:00	0,075	70,57	
69,04		0:55:00	0,074	71,04	
69,36		0:50:00	0,072	71,82	
70,05		0:45:00	0,07	72,37	
70,64		0:40:00	0,069	73	
71,24		0:35:00	0,067	73,55	
71,72		0:30:00	0,066	74,1	
72,14		0:25:00	0,065	74,49	
72,53		0:20:00	0,064	74,88	
73,03		0:15:00	0,063	75,43	
73,62		0:10:00	0,062	75,82	
73,94		0:05:00	0,06	76,3	
74,58		0:00:00	0,059	76,77	
		Tiempo (mm:ss)			
			0% Agua		

Tomando en cuenta las absorbancias, se puede evidenciar la diferencia en cantidad de curcuminoides extraídos con los diferentes solventes orgánicos y la influencia del DPPH, para mostrarlo de una manera más clara se elaboró la figura 15, en la que se tiene una mayor absorbancia en el extracto con 60% de agua. En la figura 16 se evidencia el porcentaje de DPPH frente al tiempo, donde se presenta un mayor resultado en la solución con 0% de agua.

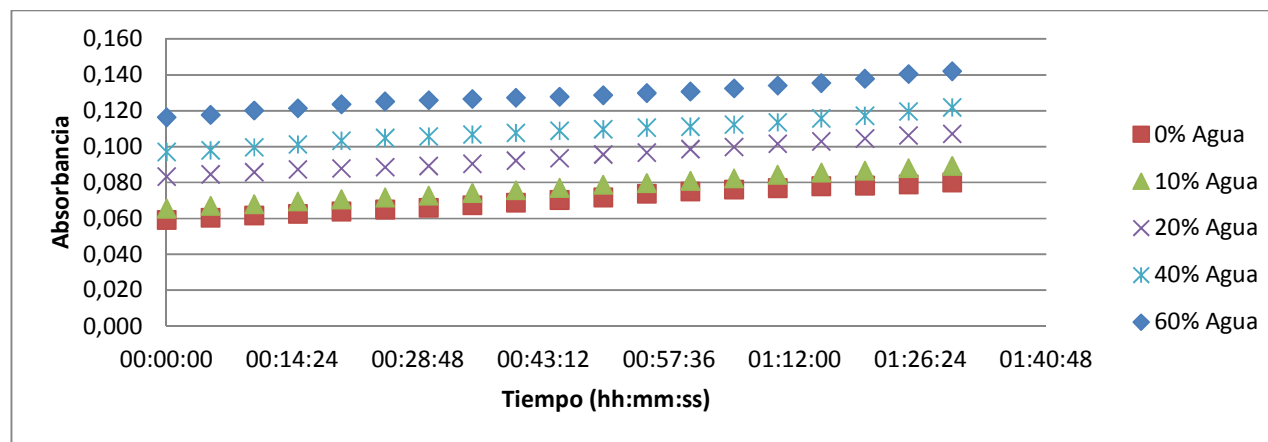


Figura 15: Absorbancias en 1 hora y 30 minutos, a diferentes concentraciones de solvente

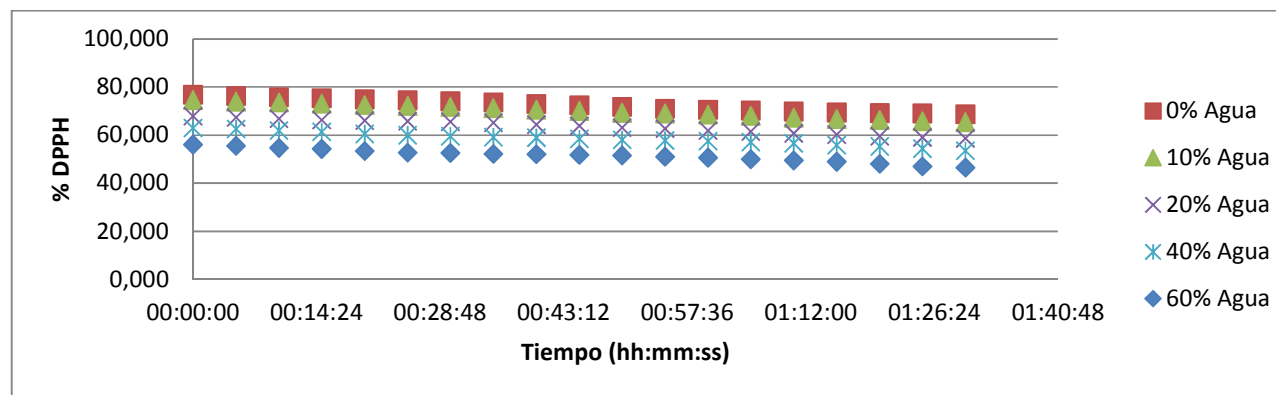


Figura 16: Porcentaje de DPPH frente al tiempo con diferentes concentraciones de solvente

CAPÍTULO 4

DISCUSIÓN

Se realizó el análisis de humedad en la cúrcuma, obteniendo un porcentaje de humedad en muestra seca y muestra fresca de $16,58 \pm 0,17$ y $83,41 \pm 0,17$ respectivamente. En estudios realizados en Colombia y Venezuela se reportó una humedad en muestra fresca de $84,73 \pm 2,99$ y $72,63 \pm 1,34$ correspondientemente (Ríos, Duque, & León, 2009), mientras que (Barrero & Carreño, 1999) reportaron un porcentaje de humedad en muestra seca de $11,47 \pm 0,13$ en Colombia, $11,18 \pm 0,25$ en la India y $9,77 \pm 0,30$ en Venezuela. Esto indica que la muestra recolectada en la Provincia de Pastaza tuvo una humedad más alta que las analizadas en Venezuela, Colombia y la India, lo que la hace propensa a daños por microorganismos, por lo que su vida útil en estado fresco va a ser más corta que las muestras de los otros países antes mencionados (Ríos, Duque, & León, 2009), aunque, se ha demostrado que los curcuminoídes que contiene esta planta inhibe gran cantidad de microorganismos (Castillo, Thorndike, Falco, Fernández, & Roncal, 2012), lo que frenaría un poco la descomposición debida a la humedad. Sin embargo, los resultados de humedad podrían afectar los costos de comercialización en el mercado.

Al analizar la actividad antioxidante con el DPPH se elaboró 5 soluciones con diferente concentración de DPPH y se midió sus absorbancias. Se repitió este procedimiento cinco veces y se obtuvo un promedio con el que se realizó la curva de calibración, obteniendo un $R^2 = 0,9966$ y una ecuación de la recta $y = 3,1583x + 0.0176$. Las curvas de calibración de cada una de las mediciones se detallan en el anexo 1 y la curva promedio en la figura 5. Estas curvas representan las absorbancias en función de las concentraciones (Silva, García, Castillo, Ania, & Gómez, 2006). El número de soluciones elaboradas con diferente concentración de DPPH, indicaron un intervalo de confianza del 95% (Dosal & Villanueva, 2008).

Según (Silva, García, Castillo, Ania, & Gómez, 2006), como criterio de aprobación de la linealidad a partir de la curva de calibración se considera un $R^2 > 0.98$. En los ensayos de laboratorio se obtuvo un $R^2 = 0,9966$ por lo que se encontró dentro del criterio de aprobación.

La ecuación obtenida fue: $y = 3,1583x + 0,0176$, en la que 0,0176 indica la magnitud de la señal estimada del blanco, 3,1583 es la pendiente de la recta de calibrado e indica sensibilidad (Doctorovich, 2011).

Se midió la máxima absorbancia (421nm) dada en un barrido realizado al extracto de 0,5 g en 15 mL de metanol, que fue el usado para realizar los análisis de DPPH. Esta absorbancia estuvo dentro del rango de absorción

máxima de los tres curcuminoides (420-425nm) (Van Wijk, 2009), se la interpoló en la ecuación obtenida de la curva de calibración para obtener el valor de concentración de los curcuminoides (Neira, 2010), obteniendo un resultado de 0,0818 g/mL con lo que se trabajó en los análisis de DPPH. Al estar dentro del rango de concentraciones de la curva de calibración, no fue necesario diluir ni concentrar la muestra.

Se realizó la extracción de curcuminoides con tres solventes diferentes, obteniendo un porcentaje de curcuminoides del $32,51\% \pm 0,20$, $27,87\% \pm 0,39$ y $23,37\% \pm 0,26$ para el metanol, etanol y acetona respectivamente. Usando la misma técnica se han realizado estudios similares en países como la India, donde se ha obtenido porcentajes de curcuminoides que van del 3,15 al 5,37%, Tailandia, del 0,46 al 10,23 %, China: 1,73 %, Indonesia 2,2 % y Estados Unidos con 33,7 % en extractos con metanol (Li *et al.*, 2011), lo que demuestra que en el país se tiene una planta con un considerable contenido de curcuminoides, elevando el interés por la investigación de estos compuestos para su posible uso en la industria de los alimentos, medicinal, cosmética, etc.

Se elaboró el análisis de la varianza con los tres tratamientos de solventes para la extracción de curcuminoides, con la finalidad de comprobar si las medias muestrales fueron diferentes entre sí (Serrano, 2003), obteniendo los resultados mostrados en la tabla 4, en la que se evidencia que F es mayor que el Valor crítico para F, por lo tanto existió una varianza significativa entre los

tres tratamientos, donde destaca la extracción con metanol, solvente que se usó en los demás ensayos.

Los curcuminoides presentan un color amarillo limón en medio ácido, y naranja en medio básico (Van Wijk, 2009), por otro lado, se sabe que son estables a pH básico y ácido (Mesa, Ramírez-Tortosa, Aguilera, Ramírez-Boscá, & Gil, 2000), en el extracto obtenido se obtuvo estabilidad hasta un pH de 9,04. Su absorción en el cuerpo humano es muy importante, en los resultados se obtuvo una estabilidad de los curcuminoides en un rango de 1,36 a 9,04, (figura 7); en el estómago (pH 1-2) y en el intestino delgado (pH 6,5), la curcumina se encontraría estable y su descomposición sería fiable, además de su elevada lipofilia, lo que permitiría una rápida absorción gastrointestinal por difusión pasiva (Mesa, Ramírez-Tortosa, Aguilera, Ramírez-Boscá, & Gil, 2000).

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES

Utilizando DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) en los rizomas de *Curcuma longa* L. cultivada por la comunidad Shuar en la provincia de Pastaza, Ecuador, se obtuvo una capacidad antioxidante máxima de 76,77% con solvente puro (metanol) en un tiempo cero y 68,6% después de una hora con treinta minutos. El porcentaje más bajo se dio usando 40% de metanol y 60% de agua, dando un porcentaje de actividad antioxidante de 56,109% en tiempo cero y 46,456% después de una hora con treinta minutos.

El porcentaje de humedad en *Curcuma longa* L. cultivada por las comunidades indígenas Shuar de la provincia de Pastaza, fue del $16,58 \pm 0,17$ en muestra seca y $83,41 \pm 0,17$ en muestra fresca.

Se realizó la extracción de curcuminoides con tres solventes: metanol, etanol y acetona, usando el método de extracción continua con un equipo Soxhlet, con 0,2 g de la muestra, el solvente con el que se extrajo mayor cantidad de curcuminoides fue el metanol.

Mediante gravimetría se calculó la concentración de curcuminoides obtenidos con los diferentes solventes, consiguiendo porcentajes del $32,51\% \pm 0,20$,

27,87% \pm 0,39 y 23,37% \pm 0,26 para metanol, etanol y acetona respectivamente.

Usando metanol como solvente para la extracción de curcuminoides, se identificaron tres tipos de polifenoles, la cromatografía en capa fina reveló la presencia de demetoxicurcumina (Rf 0,36 \pm 0,02), bisdemetoxicurcumina (Rf 0,61 \pm 0,03) y curcumina (Rf 0,86 \pm 0,04).

CAPÍTULO 6

RECOMENDACIONES

Realizar estudios similares en diferentes épocas del año y estadios de la planta y establecer las mejores condiciones para una mayor extracción de curcuminoides.

Separar cada uno de los curcuminoides y determinar la capacidad antioxidante de cada uno.

Analizar y obtener resultados de los demás componentes de los rizomas de la cúrcuma, usando técnicas como el HPLC.

Ejecutar pruebas de inhibición bacteriana usando los extractos de curcuminoides de este estudio.

Aplicar métodos espectrofotométricos químicos como ABTS y DMPD y comparar los resultados obtenidos en esta investigación.

CAPÍTULO 7

BIBLIOGRAFÍA

- Abe, L., Da Mota, R., Lajolo, F., & Genovese, M. (2007). Lucile Tiemi ABE1, Renata Vieira DA MOTA2, Franco Maria LAJOLO1, Maria Inés GENOVESE1*. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 394-400.
- Almeida, M. (20 de Junio de 2007). *Universidade Federal do Rio Grande do Sul*.
Obtenido de Universidade Federal do Rio Grande do Sul:
http://www.ufrgs.br/leo/site_espec/
- Altanir, J., Bento, C., & Gava, J. (2009). *Tecnologia de alimentos, princípios e aplicações*. São Paulo: Nobel.
- Alternative Medicine Review. (2001). Curcuma longa. *Alternative Medicine Review Monographs* , 62-66.
- Angurell, I., Casamitjana, N., Caubet, A., Dinarés, I., Llor, N., Muñoz-Torrero, D., . . . Velasco, D. (16 de Septiembre de 2013). *Universitat de Barcelona*.
Obtenido de Operaciones básicas en el laboratorio de química:
http://www.ub.edu/oblq/oblq%20castellano/extraccio_tip.html#10
- Aparecida, V. (2008). *Inclusão de bixina, curcumina e betanina em ciclodextrina para aplicação na indústria de alimentos*. Campinas: UNICAMP Faculdade de Engenharia de Alimentos .

- Arenas, I., & López, J. (1 de Junio de 2004). *Universidad Nacional Autónoma de México*. Obtenido de Instituto de Biotecnología: http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/espectrometria_de_absorcion.pdf
- Armenteros, M., Ventanas, S., Morcuende, D., Estévez, M., & Ventanas, J. (2012). Empleo de antioxidantes naturales en productos cárnicos. *Eurocarne*, 63-73.
- Avello, M., & Suwalsky, M. (2006). Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. *Atenea (Concepción)*, 161-172.
- Barrero, M., & Carreño, R. (1999). Evaluación de los pigmentos de cúrcuma cultivada en Venezuela. *Agronomía Tropical*, 491-504.
- Bengmark, S., Mesa, M., & Gil, A. (2009). Efectos saludables de la cúrcuma y de los curcuminoides. *Nutrición Hospitalaria*, 264-272.
- Beyer, H., & Wolfgang, W. (1987). *Manual de química orgánica*. Barcelona: Editorial Reverté, S.A.
- Bolaños, N., Lutz, G., & Herrera, C. (2003). *Química de Alimentos: Manual de laboratorio*. Costa Rica: Editorial de la Universidad de Costa Rica.
- Braverman, J. (1978). *Introducción a la Bioquímica de los Alimentos*. Barcelona: Ediciones Omega.
- Carrillo, A. (2013). Consumo y consecuencias de comida chatarra en los adolescentes. *ECOS desde las fronteras del conocimiento*, 56-76.

- Castillo, A., Thorndike, I., Falco, S., Fernández, D., & Roncal, E. (2012). Higroscopicidad de cúrcuma (*Curcuma longa*) molida. *Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 45-50.
- Chattopadhyay, I., Biswas, K., Bandyopadhyay, U., & Banerjee, R. (2004). Turmeric and curcumin: Biological actions and medicinal applications. *CURRENT SCIENCE*, 44-53.
- Doctorovich, F. (8 de Agosto de 2011). *Universidad de Buenos Aires*. Obtenido de Facultad de Ciencias Exactas y Naturales: <http://www.qi.fcen.uba.ar/materias/ai/laboratorio/calibracion.pdf>
- Dosal, M., & Villanueva, M. (20 de Marzo de 2008). *CURVAS DE CALIBRACIÓN EN LOS MÉTODOS ANALÍTICOS*. Obtenido de Introducción a la metrología química: http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/CURVASDECALIBRACION_23498.pdf
- Frederic, H., & Reyes, J. (2005). *Moderno e instrumentales Análisis Químico*. Barcelona: Editorial Reverté.
- INEN. (2011). *Aditivos alimentarios permitidos para consumo humano. Listas positivas. Requisitos*. Quito: Instituto Ecuatoriano de Normalización.
- Li, S., Yuan, W., Deng, G., Wang, P., Yang, P., & Aggarwal, B. (2011). Chemical Composition and Product Quality Control of Turmeric (*Curcuma longa* L.). *Pharmaceutical Crops*, 28-54.

- López, M., Triana, J., Pérez, F., & Torres, M. (2005). *Métodos físicos de separación y purificación de sustancias orgánicas*. Gran Canaria: Servicio de Reprografía, Encuadernación y Autoedición de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria (ULPGC) .
- Mesa, M., Ramírez-Tortosa, M., Aguilera, C., Ramírez-Boscá, A., & Gil, A. (2000). Efectos farmacológicos y nutricionales de los extractos de *Curcuma longa* L. y de los cucuminoides. *Ars Pharmaceutica*, 307-321.
- Molina, P., Gómez, L., Velasco, M., Tarraga, A., Alajarin, M., Espinosa, J., & Moya, G. (1991). *Prácticas de química orgánica*. Murcia: Compobell, S.A.
- Neira, M. (23 de Agosto de 2010). *Universidad de Chile*. Obtenido de Facultad de odontología : https://www.u-cursos.cl/odontologia/2010/2/OD0903/1/material_docente/previsualizar?id_material=566977
- Olsen, E. (1990). *Métodos ópticos de análisis*. Barcelona: Editorial Reverté.
- Pereira, A., da Silva, M., & Oliveira, J. (2007). Análise química de pigmentos minerais naturais de Itabirito (MG). *Cerâmica*, 35-41.
- Pineda, D. (30 de Mayo de 2012). *Célula de Alimentos y bebidas*. Obtenido de Ministerio de Economía de El Salvador: http://www.innovacion.gob.sv/inventa/attachments/article/3860/articulo%20junio%20david_Aplicaci%C3%B3n.pdf

- Prado, M., & Godoy, H. (2003). Corantes artificiais em alimentos. *Alimentos e Nutrição Araraquara*, 237-250.
- Quijano, A., & Kadamani, S. (2010). Comida colorida, experiencia y sensación. En Varios, *IX Congraso Nacional de Color Alicante* (págs. 351-354). Alicante: Universidas de Alicante.
- Ríos, E., Duque, A., & León, D. (2009). Caracterización espectroscópica y cromatográfica de curcumina extraída de los rizomas de Cúrcuma (curcuma longa L.) Cultivada en el departamento del Quindío. *Revista de Investigación Universidad de Quindio*, 18-22.
- Rodríguez, J., Menéndez, J., & Trujillo, Y. (30 de Marzo de 2001). Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativo. Ciudad de la Habana, Ciudad de la Habana, Cuba. Obtenido de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0138-65572001000100007
- Serrano, R. (2003). *Introducción al análisis de datos experimentales*. Castelló: Universidad de Jaume.
- Shiyu, L., Wei, Y., Guangrui, D., Ping, W., Peiying, Y., & Bharat, A. (2011). Chemical Composition and Product Quality Control of Turmeric. *Pharmaceutical Crops*, 28-54.
- Silva, M., García, M., Castillo, L., Ania, J., & Gómez, D. (2006). *Técnicos Especialistas en Laboratorio*. Sevilla: Editorial MAD.

- Surojanametakul, V., Satmalee, P., Saengprakai, J., Siliwan, D., & Wattanasiritham, L. (2010). Preparation of Curcuminoid Powder from Turmeric Root (*Curcuma longa* Linn) for Food Ingredient Use. *Natural Science*, 123-130.
- Valcárcel, M., & Gómez, A. (1988). *Técnicas analíticas de separación*. España: Editorial Reverté, S. A.
- Van Wijk, J. (2009). Corantes. *Food Ingredients Brasil*, 40-47.
- Volp, A., Renhe, I., & Stringueta, P. (2003). Pigmentos naturais bioativos. *Alimentos e Nutrição Araraquara*, 157-166.
- Youngson, R. (1994). *Antioxidantes y radicales libres*. Londres: Editorial EDAF, S.A.

ANEXOS

ANEXO 1

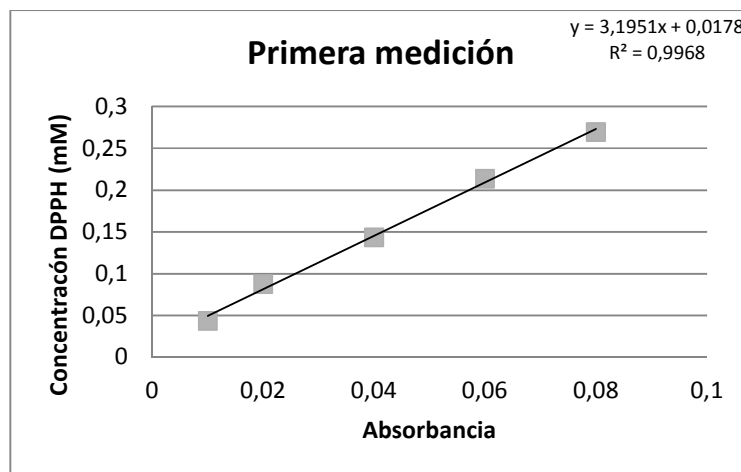


Figura 17: Curva de calibración de la primera medición de DPPH

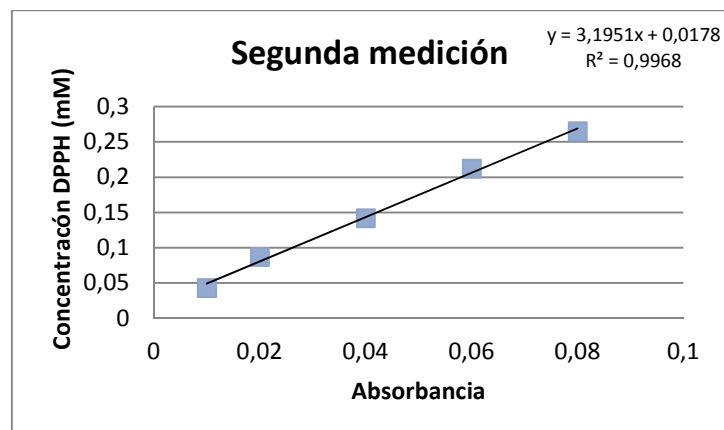


Figura 18: Curva de calibración de la segunda medición de DPPH

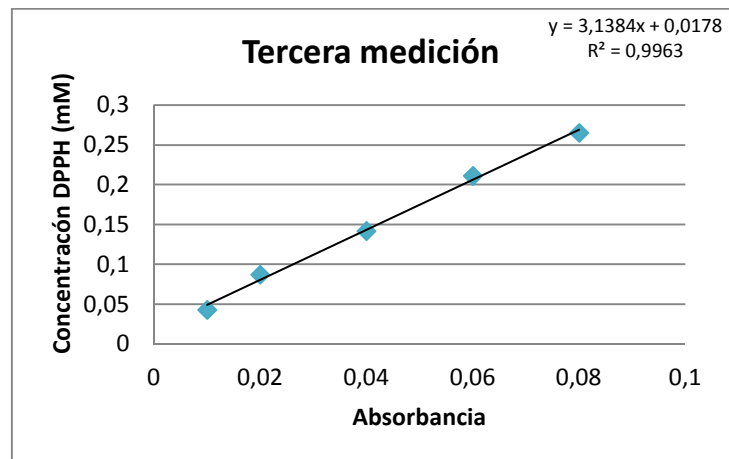


Figura 19: Curva de calibración de la tercera medición de DPPH

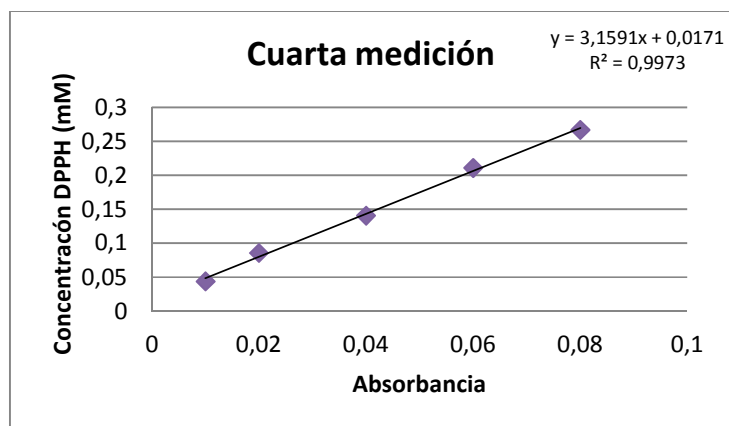


Figura 20: Curva de calibración de la cuarta medición de DPPH

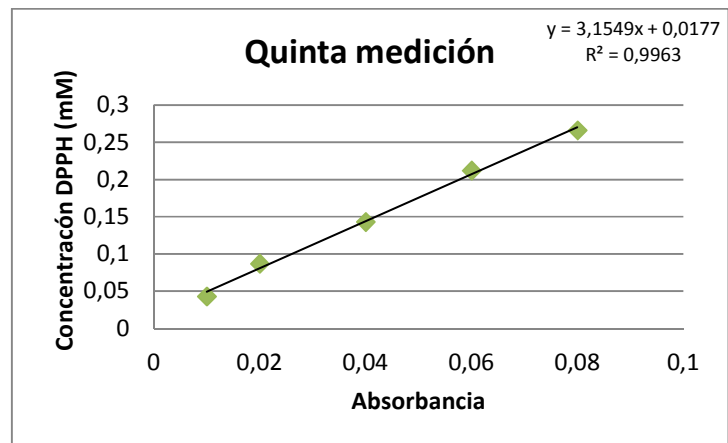


Figura 21: Curva de calibración de la quinta medición de DPPH

ANEXO 2

Tabla 9: Espectro de absorción del extracto de curcuminoides

Longitud de onda	Abs	Longitud de onda	Abs	Longitud de onda	Abs	Longitud de onda	Abs
190	0,644	289	0,582	388	2,208	487	0,191
193	0,68	292	0,569	391	2,329	490	0,147
196	0,803	295	0,563	394	2,435	493	0,116
199	1,331	298	0,564	397	2,535	496	0,088
202	1,927	301	0,568	400	2,625	499	0,071
205	2,247	304	0,576	403	2,711		
208	2,323	307	0,585	406	2,783		
211	2,307	310	0,596	409	2,854		
214	2,296	313	0,611	412	2,899		
217	2,312	316	0,629	415	2,938		
220	2,354	319	0,652	418	2,97		
223	2,415	322	0,68	421	2,976		
226	2,504	325	0,708	424	2,969		
229	2,56	328	0,744	427	2,934		
232	2,61	331	0,786	430	2,911		
235	2,614	334	0,829	433	2,881		
238	2,551	337	0,877	436	2,833		
241	2,454	340	0,927	439	2,778		
244	2,278	343	0,977	442	2,672		
247	2,107	346	1,025	445	2,52		
250	1,895	349	1,081	448	2,346		
253	1,679	352	1,137	451	2,132		
256	1,459	355	1,194	454	1,9		
259	1,336	358	1,253	457	1,65		
262	1,221	361	1,312	460	1,45		
265	1,086	364	1,375	463	1,227		
268	0,981	367	1,457	466	1,021		
271	0,894	370	1,542	469	0,834		
274	0,813	373	1,636	472	0,668		
277	0,736	376	1,732	475	0,525		
280	0,674	379	1,83	478	0,407		
283	0,631	382	1,957	481	0,302		
286	0,603	385	2,08	484	0,245		

ANEXO 3

Tabla 10: Espectros de absorción en un rango de 232 a 499 nm a diferentes pHs del extracto de curcuminoides

Longitud de onda nm	pH								
	1,36	2,15	2,96	4,04	5,150	5,93	7,020	8,04	9,04
	Absorbancia								
232	1,626	1,518	1,765	1,548	1,613	1,653	1,570	1,685	1,683
235	1,580	1,502	1,749	1,517	1,596	1,604	1,559	1,675	1,675
238	1,518	1,453	1,693	1,464	1,540	1,542	1,507	1,621	1,623
241	1,447	1,392	1,622	1,398	1,469	1,473	1,441	1,551	1,554
244	1,343	1,293	1,509	1,298	1,363	1,368	1,336	1,439	1,440
247	1,243	1,199	1,400	1,203	1,262	1,270	1,237	1,335	1,336
250	1,133	1,090	1,277	1,094	1,146	1,160	1,125	1,213	1,211
253	1,011	0,972	1,145	0,975	1,020	1,037	1,002	1,083	1,080
256	0,889	0,854	1,012	0,857	0,895	0,919	0,877	0,951	0,948
259	0,821	0,785	0,937	0,787	0,824	0,850	0,806	0,876	0,876
262	0,760	0,725	0,869	0,729	0,763	0,792	0,745	0,810	0,811
265	0,683	0,652	0,785	0,655	0,687	0,718	0,670	0,729	0,731
268	0,626	0,596	0,722	0,598	0,628	0,664	0,613	0,667	0,671
271	0,578	0,549	0,669	0,551	0,581	0,618	0,565	0,617	0,623
274	0,534	0,506	0,621	0,508	0,537	0,577	0,523	0,571	0,579
277	0,490	0,464	0,573	0,466	0,495	0,533	0,481	0,525	0,535
280	0,455	0,430	0,534	0,432	0,462	0,500	0,448	0,488	0,502
283	0,427	0,404	0,505	0,406	0,435	0,474	0,424	0,462	0,477
286	0,405	0,385	0,485	0,387	0,417	0,455	0,407	0,442	0,460
289	0,389	0,371	0,468	0,372	0,403	0,438	0,393	0,427	0,447
292	0,379	0,362	0,458	0,362	0,394	0,425	0,385	0,416	0,438
295	0,373	0,357	0,452	0,357	0,388	0,417	0,380	0,411	0,433
298	0,371	0,356	0,450	0,355	0,386	0,413	0,378	0,409	0,432
301	0,373	0,357	0,451	0,355	0,387	0,412	0,379	0,410	0,434
304	0,375	0,359	0,453	0,357	0,389	0,413	0,381	0,413	0,438
307	0,379	0,362	0,457	0,360	0,393	0,416	0,385	0,417	0,441
310	0,384	0,367	0,462	0,365	0,398	0,420	0,391	0,422	0,445
313	0,392	0,376	0,471	0,372	0,407	0,427	0,399	0,431	0,452
316	0,401	0,384	0,480	0,381	0,416	0,436	0,408	0,440	0,461

319	0,413	0,395	0,494	0,392	0,429	0,448	0,420	0,453	0,472
322	0,427	0,409	0,511	0,405	0,444	0,461	0,435	0,469	0,484
325	0,442	0,424	0,528	0,419	0,460	0,475	0,451	0,485	0,498
328	0,461	0,443	0,550	0,437	0,480	0,493	0,470	0,507	0,518
331	0,482	0,464	0,577	0,458	0,503	0,513	0,493	0,531	0,542
334	0,503	0,487	0,603	0,480	0,526	0,534	0,516	0,556	0,566
337	0,529	0,513	0,635	0,506	0,554	0,558	0,543	0,586	0,596
340	0,557	0,540	0,667	0,532	0,581	0,584	0,570	0,617	0,625
343	0,585	0,567	0,701	0,559	0,610	0,610	0,598	0,648	0,655
346	0,612	0,594	0,732	0,586	0,637	0,636	0,625	0,677	0,684
349	0,642	0,624	0,767	0,616	0,668	0,665	0,655	0,710	0,716
352	0,674	0,655	0,803	0,646	0,699	0,695	0,686	0,744	0,748
355	0,705	0,686	0,839	0,677	0,730	0,725	0,716	0,779	0,780
358	0,738	0,718	0,877	0,709	0,762	0,756	0,748	0,813	0,814
361	0,770	0,749	0,913	0,740	0,794	0,787	0,779	0,847	0,846
364	0,805	0,783	0,953	0,774	0,828	0,820	0,813	0,885	0,882
367	0,847	0,825	1,001	0,816	0,871	0,860	0,855	0,931	0,924
370	0,892	0,869	1,052	0,861	0,915	0,904	0,900	0,979	0,970
373	0,941	0,918	1,108	0,909	0,965	0,953	0,948	1,032	1,019
376	0,991	0,966	1,164	0,958	1,015	1,001	0,997	1,086	1,070
379	1,043	1,018	1,222	1,009	1,066	1,052	1,048	1,141	1,121
382	1,108	1,084	1,298	1,074	1,133	1,118	1,114	1,213	1,187
385	1,173	1,148	1,372	1,138	1,199	1,182	1,179	1,283	1,253
388	1,244	1,217	1,451	1,206	1,270	1,254	1,247	1,358	1,322
391	1,312	1,284	1,529	1,274	1,338	1,321	1,315	1,431	1,390
394	1,377	1,347	1,601	1,336	1,403	1,385	1,378	1,500	1,455
397	1,444	1,415	1,677	1,404	1,471	1,454	1,446	1,574	1,523
400	1,514	1,483	1,754	1,471	1,540	1,521	1,513	1,646	1,590
403	1,579	1,546	1,827	1,533	1,604	1,585	1,575	1,717	1,655
406	1,643	1,610	1,897	1,597	1,668	1,648	1,637	1,785	1,719
409	1,705	1,673	1,966	1,658	1,731	1,712	1,700	1,852	1,782
412	1,758	1,724	2,021	1,709	1,781	1,765	1,749	1,907	1,833
415	1,796	1,761	2,063	1,745	1,818	1,804	1,784	1,946	1,870
418	1,817	1,782	2,085	1,765	1,838	1,825	1,802	1,968	1,891
421	1,821	1,786	2,087	1,767	1,839	1,828	1,803	1,972	1,895
424	1,813	1,776	2,074	1,757	1,828	1,817	1,791	1,960	1,886
427	1,792	1,756	2,050	1,738	1,807	1,796	1,769	1,937	1,866
430	1,767	1,731	2,020	1,712	1,780	1,770	1,740	1,910	1,842
433	1,732	1,697	1,980	1,678	1,744	1,738	1,705	1,872	1,810
436	1,686	1,653	1,926	1,633	1,697	1,695	1,659	1,824	1,765

439	1,626	1,594	1,858	1,574	1,635	1,637	1,597	1,760	1,708
442	1,552	1,521	1,770	1,500	1,558	1,563	1,522	1,679	1,632
445	1,457	1,426	1,660	1,405	1,460	1,468	1,424	1,573	1,537
448	1,357	1,326	1,544	1,306	1,357	1,368	1,323	1,464	1,437
451	1,240	1,211	1,409	1,189	1,237	1,248	1,203	1,336	1,319
454	1,118	1,089	1,268	1,072	1,113	1,126	1,083	1,204	1,197
457	0,984	0,959	1,116	0,942	0,979	0,994	0,949	1,059	1,065
460	0,878	0,854	0,995	0,838	0,872	0,888	0,844	0,944	0,959
463	0,758	0,737	0,859	0,722	0,751	0,770	0,728	0,814	0,841
466	0,643	0,626	0,732	0,613	0,638	0,657	0,617	0,693	0,732
469	0,538	0,523	0,613	0,513	0,535	0,555	0,517	0,582	0,630
472	0,443	0,430	0,507	0,421	0,441	0,461	0,426	0,482	0,538
475	0,360	0,349	0,414	0,340	0,358	0,379	0,346	0,391	0,457
478	0,288	0,278	0,334	0,272	0,288	0,308	0,278	0,316	0,388
481	0,223	0,215	0,262	0,210	0,224	0,244	0,217	0,247	0,326
484	0,186	0,178	0,221	0,175	0,188	0,208	0,182	0,209	0,291
487	0,150	0,144	0,182	0,140	0,152	0,173	0,149	0,171	0,257
490	0,120	0,114	0,148	0,112	0,123	0,143	0,120	0,140	0,227
493	0,098	0,093	0,123	0,091	0,101	0,122	0,100	0,117	0,205
496	0,077	0,073	0,101	0,071	0,081	0,102	0,080	0,095	0,184
499	0,063	0,059	0,085	0,058	0,067	0,088	0,067	0,080	0,169