

PROPIEDADES ANTIOXIDANTES Y ANTICARIOGÉNICAS DE AZÚCARES DE CAÑA NO REFINADOS.

Laura Almenar, Cristina Barrera, Lucía Seguí.

RESUMEN

El azúcar es un alimento ampliamente consumido y utilizado en la formulación de gran cantidad de alimentos por sus propiedades organolépticas y conservativas. No obstante, su consumo se asocia a desórdenes metabólicos y desarrollo de enfermedades tales como la caries dental, por lo que existe una búsqueda de alternativas más saludables. Los azúcares de caña no refinados pueden contener, en función del grado de procesado, compuestos antioxidantes beneficiosos para la salud. Algunos autores sugieren, además, que determinados compuestos aislados de la caña de azúcar tienen propiedades anticariogénicas. El presente trabajo se plantea con el objetivo principal de completar la caracterización de diversos azúcares de caña no refinados, en concreto: azúcar moreno, miel de caña, panela en bloque y panela granulada. Se han evaluado las propiedades antioxidantes de dichos productos mediante la determinación del contenido en fenoles totales, flavonoides totales, así como capacidad antioxidante por los métodos DPPH y ABTS-TEAC. Asimismo, se han identificado y cuantificado por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) compuestos fenólicos, en particular: ácido clorogénico, ácido cafeico, ácido cumárico y ácido ferúlico, y las flavonas luteolina, tricina y apigenina. El azúcar moreno, producto más refinado de entre los analizados, ha demostrado tener unas propiedades antioxidantes significativamente menores al resto de productos estudiados, entre los que destaca la panela granulada. Se ha comprobado un menor crecimiento de *Streptococcus mutans*, principal microorganismo responsable de la caries dental, en presencia de disoluciones de los azúcares no refinados. Como conclusión general, se desprende que los azúcares de caña no refinados son una alternativa saludable al azúcar blanco, para su consumo directo o en la formulación de alimentos, debido a sus propiedades antioxidantes y anticariogénicas.

PALABRAS CLAVE: azúcares no refinados, caña de azúcar, ingrediente funcional, antioxidantes, fenoles, anticariogénico, *Streptococcus mutans*.

RESUM

El sucre es un aliment àmpliament consumit i utilitzat en la formulació de gran quantitat d'aliments per les seues propietats organolèptiques i conservatives. No obstant, el seu consum s'associa a desòrdens metabòlics i el desenvolupament de malalties com la càries dental, per el que existeix una cerca d'alternatives més saludables. Els sucres de canya no refinats poden contenir, en funció del grau de processat, compostos antioxidants beneficiosos per a la salut. Alguns autors suggereixen, a més, que determinats compostos aïllats de la canya de sucre tindrien propietats

anticariogèniques. El present treball es planteja amb l'objectiu principal de completar la caracterització de diversos sucres de canya no refinats, en concret: sucre bru, mel de canya, panela en bloc i panela granulada. S'han avaluat les propietats antioxidants d'aquests productes mitjançant la determinació del contingut en fenols totals, flavonoids totals, així com la capacitat antioxidant pels mètodes DPPH i ABTS-TEAC. Així mateix, s'han identificat i quantificat per cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC) compostos fenòlics, en particular: àc. clorogènic, àc. cafeic, àc. cumàric i àc. ferúlic, i les flavones luteolina, tricina i apigenina. El sucre bru, producte més refinat de entre els analitzats, ha demostrat tindre unes propietats antioxidants significativament menors a la resta de productes estudiats, entre els quals destaca la panela granulada. S'ha comprovat un menor creixement de *Streptococcus mutans*, principal microorganisme responsable de la càries dental, en presència de dissolucions dels sucres no refinats. Com a conclusió general, es desprén que els sucres de canya no refinats són una alternativa saludable al sucre blanc, per a consum directe o en formulacions d'aliments, per les seues propietats antioxidants i anticariogèniques.

PARAULES CLAU: sucres no refinats, canya de sucre, ingredient funcional, antioxidants, fenols, anticariogènic, *Streptococcus mutans*.

ABSTRACT

Sugar is a widely consumed food, extensively used in food formulation due to its organoleptic and preservative. However, its use is associated with the development of metabolic disorders and diseases such as dental caries, for which there is a search for healthier alternatives. Non-refined cane sugars may contain, depending on the degree of processing, antioxidant compounds which are beneficial to health. Some authors also suggest that certain compounds isolated from sugarcane have anticariogenic properties. The main goal of the present work is completing the characterization of various non-refined cane sugars, in particular: brown sugar, molasses, block jaggery and granulated jaggery. The antioxidant properties of these products have been evaluated in terms of total phenols, total flavonoids and antioxidant capacity by DPPH and ABTS-TEAC assays. Specific phenolic compounds have been identified and quantified by high performance liquid chromatography (HPLC), in particular: chlorogenic, caffeic, coumaric and ferulic acids, and the flavones luteolin, apigenin and tricinin. Brown sugar, the most refined among the products analyzed, has shown the poorest antioxidant properties, whereas granulated jaggery has exhibited the best antioxidant properties. Non-refined sugars have been found to reduce the growth of *Streptococcus mutans*, the main microorganism responsible for dental caries. In conclusion, non-refined sugars appear as a healthier alternative to white sugar, either for direct consumption or for food formulation, due to their antioxidant and anticariogenic properties.

KEY WORDS: non-refined sugars, sugar cane, functional ingredient, antioxidant, phenols, anticariogenic, *Streptococcus mutans*.

INTRODUCCIÓN

El azúcar refinado o azúcar blanco, obtenido a partir de la caña de azúcar (70%) o de la remolacha azucarera (30%) es el azúcar más consumido en todo el mundo, especialmente en los países desarrollados (Nayaka *et al.*, 2009). No obstante, su ingesta excesiva se asocia a problemas de salud tales como desórdenes metabólicos o una mayor incidencia de caries dental, lo que ha llevado a la búsqueda de alternativas menos calóricas y/o acariogénicas, como es el caso de algunos edulcorantes. Sin embargo, a pesar del uso extendido de otro tipo de endulzantes, el azúcar sigue siendo un ingrediente apreciado tanto por sus características organolépticas como por sus propiedades conservativas.

En los lugares donde se cultiva, la caña de azúcar y el jugo extraído a partir de ésta se consume, además, por sus efectos beneficiosos para la salud, los cuales han sido atribuidos fundamentalmente a la presencia de compuestos antioxidantes en esta materia prima (Duarte-Almeida *et al.*, 2006; Kadam *et al.*, 2008; Nayaka *et al.*, 2009). El jugo de caña o los extractos obtenidos a partir de ésta han demostrado potencial anticancerígeno, destacando su actividad estrogénica (Barberán, 2003), habiéndose demostrado disminución de la proliferación de células tumorales (Yoshimoto *et al.*, 2008) en varios tipos de leucemia, cáncer de estómago, pulmón, colon y vejiga (Jaffe, 2012). También se ha demostrado efecto antitóxico y citoprotectivo (Singh *et al.*, 2010), prevención de diabetes e hipertensión (Martín, 2014), efecto inmunológico (Lo *et al.*, 2005) y efecto blanqueante y anticariogénico (Takara *et al.*, 2007). Con respecto a esta última propiedad, diversos estudios (Takara *et al.*, 2007 y Jaffe, 2012) han constatado que determinados compuestos aislados de la caña de azúcar o sus extractos poseen actividad antibacteriana frente a bacterias causantes de la caries dental tales como *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus* (Emanuelsson *et al.*, 2000).

Por otra parte, otros autores han comprobado la presencia de compuestos antioxidantes en productos derivados de la caña de azúcar (Mujica *et al.*, 2008; Hernández *et al.*, 2002; Payet *et al.*, 2005; Naranjo, 2008). En particular, el grupo investigador en el que se ha desarrollado el presente trabajo ha constatado a través de diversos estudios la ausencia de componentes antioxidantes en el azúcar blanco y la presencia de una cantidad significativa de los mismos en los azúcares no refinados disponibles en el mercado, fundamentalmente en la miel de caña y en las panelas (Calabuig, 2012; Hostalet *et al.*, 2011; Ivorra, 2014; Seguí *et al.*, 2015; Soler, 2015). Dichos trabajos se han desarrollado bajo el amparo de los proyectos UPV/PAID2010-2420 y GV/2013/047, en los que se engloba también el presente trabajo. En este contexto, el uso de azúcares no refinados en la formulación de alimentos podría suponer un incremento de las propiedades nutricionales de los mismos sin ocasionar los problemas tecnológicos que puede presentar el empleo de otro tipo de endulzantes.

La caracterización completa de los derivados de la caña de azúcar requiere no únicamente de la demostración de sus propiedades antioxidantes, sino también de la identificación y cuantificación de los

compuestos fenólicos presentes en los mismos, responsables de dicha actividad. Por ese motivo, además de la determinación de propiedades antioxidantes generales, se plantea la identificación y cuantificación de compuestos específicos por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), así como la comprobación de la existencia de actividad anticariogénica.

Con respecto a esto último, en el trabajo realizado por Ivorra (2014) se comprobó cierto efecto anticariogénico de extractos de azúcares no refinados frente a *S. mutans* y *S. sobrinus*. Se considera que *S. mutans* es el principal microorganismo involucrado en el desarrollo de la caries dental. Es una bacteria cocácea Gram +, anaerobia facultativa del género *Streptococcus* que tiene una temperatura óptima de crecimiento de 36 ± 1 °C (Lemos *et al.*, 2013). Su metabolismo es fermentativo, produciendo ácidos como ácido láctico, ácido propiónico, acético y fórmico a partir de sacarosa, glucosa y fructosa (Fátima, 2008; Rubio, 2013). Dicho microorganismo habita en la boca, la faringe y en el intestino (Forssten *et al.*, 2010). Además de afectar el huésped, también puede afectar la microflora, el sustrato e incluso el tiempo (Núñez *et al.*, 2010).

La caries dental es la patología oral más importante que se puede transmitir de forma directa o indirecta (Liébana, 2008) y es producida por un consumo excesivo de azúcares, sobre todo de sacarosa (Núñez *et al.*, 2010). La facilidad de transmisión de este microorganismo se ha demostrado a lo largo de los años (Martínez, 2009; Martínez-Pabón *et al.*, 2013; Herrera *et al.*, 2007; Castañón, 2014). Otras patologías que puede provocar *S. mutans* son la gingivitis y periodontitis (Estrela *et al.*, 2010), pulpitis o celulitis. Para evitar dicha enfermedad, lo más aconsejable es evitar o reducir el consumo excesivo de azúcar.

Por todo lo expuesto hasta el momento, el presente trabajo tiene como objetivo principal completar la caracterización de diversos azúcares de caña no refinados presentes en el mercado, concretamente azúcar moreno, panela en bloque, panela granulada y miel de caña. Dicha caracterización consistirá en determinar sus propiedades antioxidantes, así como identificar y cuantificar mediante HPLC los principales compuestos responsables de dichas propiedades. Asimismo, se estudiará el efecto de la presencia de dichos azúcares en el cultivo de *Streptococcus mutans*, microorganismo considerado el principal responsable del desarrollo de la caries dental.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materia prima

Los azúcares de caña seleccionados para el presente trabajo fueron: azúcar moreno (AM), panela en bloque (PB), panela granulada (PG) y miel de caña (MC). Todos los productos se adquirieron en supermercados o comercios en la ciudad de Valencia.

Propiedades antioxidantes

Los productos seleccionados se evaluaron en términos de fenoles totales y flavonoides totales, así como con respecto a su capacidad antioxidante por los métodos DPPH y ABTS-TEAC, según se especifica a continuación.

FENOLES TOTALES

La determinación del contenido en fenoles totales se realizó según el método de Folin Ciocalteu (Singleton *et al.*, 1999, Wolfe *et al.*, 2003), que mide la coloración azulada que se obtiene cuando los fenoles presentes en una muestra reaccionan con dicho reactivo. El contenido fenólico se determinó sobre extractos acuosos, empleando agua bidestilada, y sobre extractos metanol:agua (70:30 v/v), realizando extracciones en proporción 1:5 (m/v) para el caso del AM y 1:12,5 (m/v) para el resto de azúcares.

Para la determinación espectrofotométrica se mezclaron 0,125 mL de extracto, 0,5 mL de agua bidestilada y 0,125 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu en una cubeta de espectrofotómetro. La mezcla se dejó reaccionar durante 6 min en oscuridad y, transcurrido dicho tiempo, se añadieron 1,25 mL de una disolución de Na_2CO_3 al 7% (m/v), más 1 mL de agua bidestilada, dejando reaccionar el conjunto durante 90 min más en oscuridad. Transcurrido ese tiempo, se procedió a la lectura de los resultados en un espectrofotómetro Helios Zeta UV/Vis Thermo scientific a una longitud de onda de 760 nm.

Como patrón se empleó ácido gálico, preparándose disoluciones en el intervalo de concentraciones entre 100 y 500 ppm. Los resultados se expresaron en mg equivalentes de ácido gálico por gramo de producto (mg EAG/g).

FLAVONOIDES TOTALES

La determinación de flavonoides totales se realizó según el método colorimétrico modificado del cloruro de aluminio (Luximon-Ramma *et al.*, 2005). Se prepararon disoluciones acuosas 1:25 (m/v) para el caso del AM y 1:100 (m/v) para el resto de azúcares. A continuación, se introdujo en una cubeta 1,5 mL de cada disolución y 1,5 mL de una disolución de AlCl_3 al 2% (m/v) en metanol. Se agitó dicha mezcla y se dejó reaccionar en oscuridad durante 10 min. Transcurrido este tiempo, se midió la absorbancia a 337 nm. Pasados 75 min de reacción, se midió otra vez la absorbancia para comprobar si la reacción había finalizado.

Se empleó apigenina como flavonoide de referencia, por ser una de las flavonas mayoritarias en la caña de azúcar y derivados (Duarte-Almeida *et al.*, 2006; 2011), y por tener un máximo de absorbancia al reaccionar con el AlCl_3 cercano a la tricina, otra de las flavonas mayoritarias en este tipo de muestras. Se construyó una curva patrón en el intervalo de concentraciones entre 6,25 y 200 ppm, expresándose los resultados en miligramos equivalentes de apigenina por gramo de producto (mg EA/g).

CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

Para determinar la actividad antioxidante (AO) de los productos, uno de los métodos empleados, fue el basado en el uso del radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) (Brand- Williams *et al.*, 1995; Molyneux, 2004).

Inicialmente, se preparó una disolución de 100 µM del reactivo DPPH en metanol. Paralelamente, las muestras se disolvieron en agua bidestilada en una relación 1:10 (m/v). Tras la preparación de las muestras y del reactivo, se mezclaron 2 mL de la disolución de DPPH en metanol, 10, 30, 50 ó 70 µL de muestra y metanol hasta completar 3 mL. También se empleó un blanco, en el que el volumen de las muestras fue sustituido por agua bidestilada. Seguidamente, se midió la absorbancia a 517 nm en un espectrofotómetro, cada minuto durante la primera media hora, cada 5 min durante la siguiente media hora y cada 15 min hasta completar un total de 2 h. Los resultados se expresaron en porcentaje de inhibición del radical DPPH, calculado a partir de la siguiente ecuación:

$$I(\%) = \frac{(AB-AA)}{AB} \cdot 100 \quad (1)$$

Donde: I (%)= porcentaje de inhibición del DPPH; AB= absorbancia del blanco; AA= absorbancia de la disolución de la muestra

El otro método empleado para determinar la actividad antioxidante de los azúcares no refinados fue el método ABTS-TEAC (2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline 6-sulfonic acid)-Trolox Equivalent Antioxidant Capacity), basado en la decoloración del radical ABTS al reaccionar con los antioxidantes presentes en la muestra. Se siguió el método desarrollado por Re *et al.*, 1999 y Moura Rufino *et al.*, 2007. En primer lugar, el radical ABTS se liberó en una disolución de persulfato potásico (7 mM ABTS y 2,45 mM persulfato potásico), guardando la mezcla en oscuridad y a temperatura ambiente durante 16 h. Transcurrido dicho tiempo, se diluyó la mezcla con tampón fosfato hasta conseguir una disolución con una absorbancia de 0,7 leída a 734 nm. El tampón fue preparado a partir de dos disoluciones, una disolución 0,2 M de fosfato sódico monobásico (NaH₂PO₄) y una disolución 0,2 M de fosfato sódico dibásico (Na₂HPO₄). Seguidamente, se mezcló en una cubeta 90 µL de una disolución 1:30 (m/v) de los distintos azúcares en agua con 2,91 mL de la disolución de ABTS+ en tampón fosfato. Tras haber transcurrido 1, 3 y 6 min se midió la absorbancia a 734 nm en un espectrofotómetro Helios Zeta UV/Vis Thermo scientific.

Para realizar la curva patrón, se empleó trólox como antioxidante de referencia con una concentración entre 0 y 800 µM. Los resultados se expresaron en µmol equivalentes de trólox por gramo de muestra (µmol ET/g).

ANÁLISIS DE COMPUESTOS FENÓLICOS MEDIANTE CROMATOGRFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

El análisis por HPLC (High-Performance Liquid Chromatography) de los compuestos fenólicos presentes en los azúcares no refinados se basó en el protocolo desarrollado por Duarte-Almeida *et al.*, (2006; 2011) para muestras de similares características, basado a su vez en los utilizados por Arabbi *et al.*, (2004) y Price *et al.*, (1999), para otro tipo de muestras.

Preparación de la muestra

Se obtuvieron extractos acuosos de los productos preparando disoluciones 10:30 (m/v) en agua bidestilada. Las disoluciones se centrifugaron a una velocidad de 3500 rpm durante 10 min (P-selecta-modelo Medifriger BL-S), recogiendo el sobrenadante tras la centrifugación. La extracción en fase sólida se llevó a cabo en columnas de poliamida CHROMABOND® PA. 6 mL/500 mg, fraccionando alícuotas de 5 mL en dicha columna, previamente acondicionada con 20 mL de etanol y 30 mL de agua bidestilada. A continuación, se procedió al lavado de la columna con 25 mL de agua bidestilada y a la elución de los compuestos fenólicos con 25 mL de metanol seguido de 25 mL de metanol:amoníaco (99,5:0,5). El volumen recogido se rotaevaporó a 40 °C en vacío hasta sequedad y, posteriormente, se redisolvió en 1 mL de metanol.

Identificación y cuantificación de compuestos fenólicos por HPLC

El equipo empleado para la identificación y cuantificación de compuestos fenólicos fue un equipo Agilent 1100 con inyector automático y bomba cuaternaria acoplada a un detector de matriz de diodos, empleando el modelo de columna C18.

Se siguió el protocolo basado en el trabajo de Duarte-Almedia *et al.*, 2011, que comprende una duración de 45 minutos empleándose 5 fases (Tabla 1), siendo A (Agua bidestilada: Tetrahidrofurano: Ácido Trifluoroacético) (98:2:0,1) y B (Acetonitrilo) los eluyentes y C (Metanol), D (Agua bidestilada) y E (Metanol: Agua bidestilada, (20:80)) las fases de acondicionamiento y lavado, respectivamente (Tabla 1). Cada una de las fases fue filtrada con bomba de vacío a través de un filtro de membrana de nylon de diámetro de poro de 0,2 µm antes de su utilización. El volumen inyectado de las muestras fue de 20 µL, inyectándose por duplicado. La longitud de onda de detección se fijó en 370 nm y los espectros de UV se registraron en un rango de 200 a 400 nm.

Para la determinación de los distintos compuestos fenólicos presentes en los azúcares no refinados se eligieron distintos patrones teniendo en cuenta los encontrados por otros autores en caña de azúcar y productos de similares características (Duarte-Almedia *et al.*, 2011), en particular: los ácidos hidroxicinámicos cafeico, cumárico, ferúlico, clorogénico y sinápico; y las flavonas tricina, luteolina y apigenina. Inicialmente, se prepararon mix a distintas concentraciones incluyendo todos los patrones. No obstante, puesto

que los resultados mostraron solapamiento de algunos picos correspondientes a los patrones que se comentarán más adelante, se decidió inyectar por separado un mix de patrones de los ácidos hidroxicinámicos en las concentraciones indicadas en la tabla 2, mientras que las tres flavonas se inyectaron por separado y de manera individual en concentración 4, 8 y 16 ppm.

Además, se prepararon distintas muestras fortificadas con la misma cantidad de patrón que la indicada en el párrafo y tabla anteriores para determinar el porcentaje de recuperación. El porcentaje de recuperación (%R) se calculó teniendo en cuenta la concentración de patrón añadida a la muestra, y la recuperada según la lectura del cromatograma correspondiente.

Por último, la lectura de los distintos cromatogramas obtenidos se realizó mediante el programa informático Empower Pro (Waters), con el que se realizó la identificación y cuantificación de los compuestos fenólicos presentes en las muestras.

TABLA 1. Gradiente de fases A y B empleado en el protocolo para análisis del contenido en compuestos fenólicos por HPLC

| Ø | tiempo (minutos) | A (%) | B (%) |
|---------|------------------|-------|-------|
| 1mL/min | 0-2 | 83 | 17 |
| | 2-7 | 75 | 25 |
| | 7-15 | 65 | 35 |
| | 15-20 | 50 | 50 |
| | 20-25 | 10 | 90 |
| | 25-45 | 83 | 17 |

TABLA 2. Concentración (ppm) de los ácidos hidroxicinámicos utilizados como patrones en cada uno de los Mix.

| | MIX 1 | MIX 2 | MIX 3 |
|-----------------|-------|-------|-------|
| Ác. sinápico | 8 | 16 | 32 |
| Ác. clorogénico | 12 | 24 | 48 |
| Ác. cafeico | 4 | 8 | 16 |
| Ác. p-cumárico | 4 | 8 | 16 |
| Ác. ferúlico | 4 | 8 | 16 |

Evaluación de la capacidad anticariogénica de los azúcares no refinados

Se estudió si los compuestos fenólicos presentes en los distintos azúcares no refinados tienen algún efecto sobre el crecimiento de *S. mutans* mediante el empleo de técnicas espectrofotométricas. Para la evaluación, se realizó un ensayo de inhibición en medio líquido basado en el publicado por Mosquera y Veloz, 2011.

El ensayo de inhibición en medio líquido consistió en incubar el microorganismo en presencia de una determinada cantidad de medio de cultivo BHI Broth (Brain Heart Infusion Broth; Scharlau) y de diferentes concentraciones de cada uno de los azúcares no refinados (AM, PB, PG y

MC), así como de azúcar blanco (AB), empleado como referencia. Se partió de una disolución de cada azúcar en agua bidestilada estéril de 60 g de azúcar/100 mL, obteniéndose a partir de ésta el resto de disoluciones: 45, 30 y 15 g azúcar/100 mL.

PREPARACIÓN DEL INÓCULO

El inóculo se preparó a partir del microorganismo sembrado en placa previamente e incubado a 37 °C durante 48 h. El microorganismo se recuperó por centrifugación (microcentrífuga miniSpin, Eppendorf®) a 3500 rpm durante 20 min y fue resuspendido en medio BHI Broth hasta obtener en una longitud de onda de 665 nm, una medida equivalente a 10⁴ UFC/mL, según recta de calibrado obtenida a tal efecto.

ENSAYO DE INHIBICIÓN EN MEDIO LÍQUIDO

Se prepararon tubos conteniendo 2 mL de BHI Broth y 4 mL de la disolución de azúcar correspondiente, lo que resulta en un total de 4 tubos por tipo de azúcar. A continuación, cada uno de los tubos se inoculó con aproximadamente 10⁴ UFC, mediante la adición de 1 mL del inóculo obtenido anteriormente. Finalmente, se leyó la absorbancia del contenido de cada uno de los tubos a 665 nm (A₀) y se llevaron a incubación en estufa a 37 °C durante 48 h, tiempo tras el cual se volvió a leer la absorbancia (A₁), a la misma longitud de onda. Finalmente, el crecimiento microbiano se estimó a partir de la diferencia de absorbancias, transformada a diferencia de UFC a través de la recta de calibrado obtenida a tal efecto. Los resultados se obtuvieron en términos absolutos y relativos (ecuaciones 2 y 3). El ensayo se realizó por duplicado.

$$\Delta\text{UFC absoluto} = \text{UFC}_1 - \text{UFC}_0 \quad (2)$$

$$\Delta\text{UFC relativo} = (\text{UFC}_1 - \text{UFC}_0) / \text{UFC}_0 \quad (3)$$

Análisis estadístico de los resultados

Los resultados se analizaron estadísticamente mediante el programa Statgraphics Centurión XVI, realizándose análisis de la varianza (ANOVAs) simples y multifactoriales, con un nivel de confianza del 95%.

RESULTADOS

Propiedades antioxidantes

CONTENIDO EN FENOLES TOTALES

En la tabla 3 se muestran los resultados correspondientes al ensayo de Folin-Ciocalteu para la determinación del contenido en fenoles totales, expresados en miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo de

producto (mg EAG/g), para cada uno de los extractos obtenidos (acuoso y metanol:agua).

TABLA 3. Contenido en fenoles totales (mg EAG/g) de los diferentes productos analizados en función del tipo de disolvente empleado en la extracción. Valores medios \pm desviación estándar.

| Muestra | H ₂ O | MeOH:H ₂ O |
|---------|------------------------------|--------------------------------|
| AM | 0,58 \pm 0,03 ^a | 0,51 \pm 0,07 ^a |
| PB | 2,13 \pm 0,05 ^b | 1,81 \pm 0,04 ^b |
| PG | 3,07 \pm 0,18 ^c | 2,06 \pm 0,10 ^{b,c} |
| MC | 2,8 \pm 0,4 ^c | 2,5 \pm 0,6 ^c |

^{a,b,c...} Letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas con un nivel de confianza del 95% (p-valor < 0,05).

Los resultados obtenidos indican que el extracto acuoso contiene una mayor cantidad de compuestos fenólicos. A pesar de que suele recomendarse el empleo de mezclas metanol:agua para maximizar la extracción de compuestos fenólicos, en este caso, la gran cantidad de compuestos solubles en agua y de alta polaridad presentes en la caña de azúcar y derivados haría más conveniente obtener el extracto acuoso (Li *et al.*, 2010). Por este motivo, para el resto de análisis se decidió utilizar únicamente agua para la extracción.

En relación al tipo de muestra, el azúcar moreno (AM) presentó un contenido en fenoles totales significativamente más bajo (p-valor < 0,05) que el resto de productos analizados. Este resultado, que es consecuencia del mayor grado de refinado experimentado por este azúcar durante su elaboración, indicaría que el azúcar moreno sería el menos apropiado para el consumo desde un punto de vista nutricional y funcional. En el extremo opuesto se encontrarían la panela granulada (PG) y la miel de caña (MC) y, detrás de éstos, la panela en bloque.

En cuanto a los valores mostrados en el presente estudio, cabe resaltar algunas diferencias con respecto a los publicados por otros autores. Por ejemplo, Harish *et al.* (2009) obtuvieron valores en torno a 0,372 mg EAG/g y 3,837 mg EAG/g para el azúcar moreno y un tipo de panela, respectivamente. Por otra parte, Payet *et al.* (2005) concluyeron, tras analizar diferentes tipos de azúcar moreno, que el contenido en fenoles totales oscilaba entre 0,108 mg EAG/g y 0,418 mg EAG/g. Aun existiendo ligeras diferencias con respecto a los valores mostrados por Seguí *et al.* (2015), las tendencias por tipos de producto resultan similares a las obtenidas por estos autores.

FLAVONOIDES TOTALES

En la tabla 4 se muestran los resultados correspondientes a la determinación de flavonoides mediante el método colorimétrico del cloruro de aluminio, expresados en miligramos equivalentes de apigenina por gramo de producto (mg EA/g).

TABLA 4. Contenido en flavonoides totales (mg EA/g) de los diferentes productos, a los dos tiempos de reacción estudiados (t). Valores medios \pm desviación estándar.

| Muestra | t = 10 min | t = 75 min |
|---------|------------------------------|------------------------------|
| AM | 1,67 \pm 0,08 ^a | 1,70 \pm 0,08 ^a |
| PB | 3,89 \pm 0,05 ^b | 3,94 \pm 0,04 ^b |
| PG | 5,79 \pm 0,10 ^c | 5,80 \pm 0,11 ^c |
| MC | 7,36 \pm 0,19 ^d | 7,4 \pm 0,2 ^d |

^{a,b,c...} Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas con un nivel de confianza del 95% (p-valor < 0,05).

Cabe resaltar que todos los productos analizados presentaron un contenido en flavonoides totales superior al de fenoles totales, lo que no resulta coherente teniendo en cuenta que los flavonoides son un tipo de polifenoles. Ante estos resultados cabe mencionar que el método de análisis empleado ha sido cuestionado por algunos autores debido a que diferentes flavonoides presentan picos de absorbancia máxima a distintas longitudes de onda tras reaccionar con el $AlCl_3$ (Denni y Mammen, 2012), lo que se traduce en errores de determinación en función de los flavonoides presentes en la muestra. No obstante, a pesar de las limitaciones expuestas, el método sigue siendo ampliamente utilizado en la actualidad.

Los resultados obtenidos guardan relación con el contenido en fenoles totales de los productos, siendo de nuevo el azúcar moreno (AM) la muestra con menor contenido en flavonoides totales y la PG y la MC los que mayor contenido presentaron. Cabe resaltar que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los valores obtenidos a los 10 min y 75 min, por lo que se deduce que 10 min serían suficientes para completar la reacción.

CAPACIDAD ANTIOXIDANTE POR LOS MÉTODOS DPPH Y ABTS-TEAC

En primer lugar se muestra, para cada una de las muestras analizadas, la evolución en el porcentaje de inhibición del radical DPPH durante un total de 2 h de reacción, utilizando 50 μ L como volumen de muestra (Figura 1).

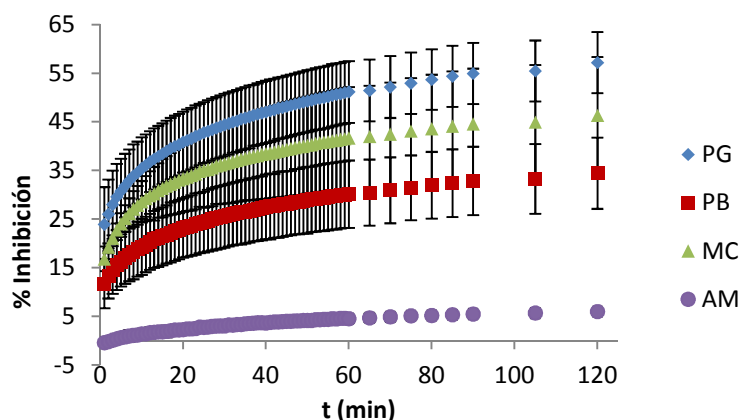


FIGURA 1. Evolución del porcentaje de inhibición del radical DPPH durante 120 min de reacción en función del producto.

Como se puede comprobar, el porcentaje de inhibición del radical DPPH aumentó rápidamente al inicio de la reacción y no alcanzó un valor asintótico transcurridas 2 h. De acuerdo a la forma de las curvas, los azúcares menos refinados (PG, PB y MC) contendrían algunos compuestos de reacción rápida que no estarían presentes en el AM. Por otra parte, a tenor de la forma hiperbólica de las curvas, todos los productos analizados presentarían compuestos de reacción lenta (Brand-Williams, 1995), lo cual concuerda con los resultados obtenidos por Seguí *et al.* (2015) para productos de similares características. Teniendo en cuenta los componentes que podrían estar presentes en los derivados de la caña de azúcar (Duarte-Almeida *et al.*, 2006; Harish-Nayaka *et al.*, 2009), compuestos como los ácidos hidroxicinámicos o la luteolina podrían contribuir a una respuesta rápida+lenta, mientras que otras flavonas tales como la tricina o la apigenina contribuirían únicamente a una respuesta lenta, prolongada en el tiempo.

Teniendo en cuenta que la reducción del radical DPPH se debe a la presencia de compuestos antioxidantes procedentes de la muestra, la panela granulada (PG) sería el azúcar con mayor capacidad antioxidante, seguida de la miel de caña (MC), la panela en bloque (PB) y el azúcar moreno (AM). Estos resultados concuerdan con los análisis del contenido en fenoles totales y flavonoides totales mostrado anteriormente.

Como se ha comentado anteriormente, la capacidad antioxidante de los diferentes productos también se midió por el método ABTS-TEAC, que utiliza en trólox como antioxidante de referencia, cuyos resultados se resumen en la tabla 5, expresados en μ moles equivalentes de trólox por gramo de muestra (μ mol ET/g).

TABLA 5. Capacidad antioxidante expresada en μ moles equivalente de trólox por gramo de muestra tras 6 min de reacción. Valores medios \pm desviación estándar.

| Muestra | μ mol ET/g |
|---------|------------------------------|
| AM | 2,81 \pm 0,04 ^a |
| PB | 7,06 \pm 0,03 ^b |
| PG | 7,52 \pm 0,03 ^c |
| MC | 7,91 \pm 0,01 ^d |

^{a,b,c,d}...Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas con un nivel de confianza del 95% (p-valor < 0,05).

Aunque los valores obtenidos en este trabajo resultaron algo inferiores a los obtenidos en estudios previos y por otros autores (Amaya, 2013; Calabuig, 2012; Seguí, 2015; Soler, 2015), de nuevo se demuestra que productos menos refinados tales como la MC, PG o la PB presentan una actividad antioxidante significativamente superior al AM.

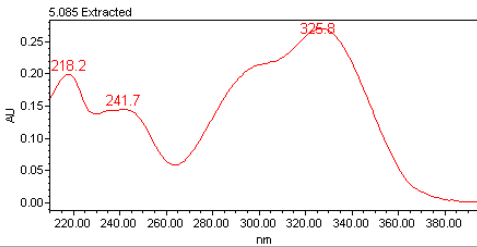
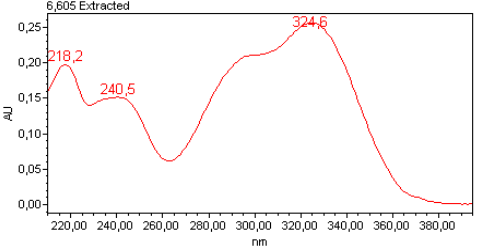
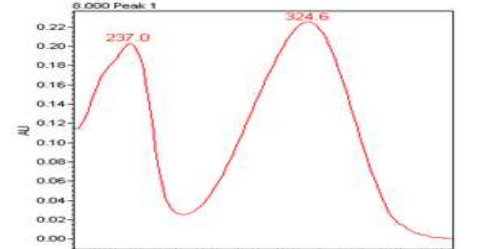
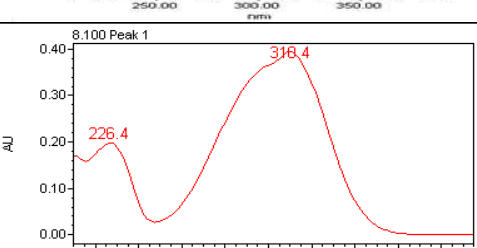
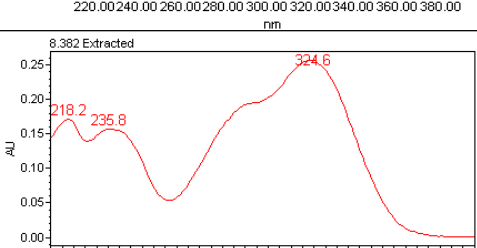
ANÁLISIS DE COMPUESTOS FENÓLICOS MEDIANTE HPLC

A continuación, se muestran los resultados obtenidos por HPLC tanto de los patrones como de los distintos productos estudiados.

Análisis de los patrones por HPLC

En primer lugar, se muestran las características cromatográficas de los patrones (tabla 6), es decir, el tiempo de retención, la longitud de onda de absorción máxima y el espectro de absorbancia correspondiente. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, se decidió leer los ácidos hidroxicinámicos a 323 nm y las flavonas a 348 nm.

TABLA 6. Características cromatográficas de los distintos patrones y espectros individuales de absorbancia de cada uno de ellos.

| PATRÓN | $t_{\text{retención}}$ (min) | $\lambda_{\text{máx}}$ (nm) | Espectro de absorbancia UV-visible |
|--------------------------------|------------------------------|-----------------------------|--|
| Ácidos hidroxicinámicos | | | |
| Ácido clorogénico | 5,1 | 241,7 y 327,0 |  |
| Ácido cafeico | 6,6 | 240,5 y 324,6 |  |
| Ácido sinápico | 8,0 | 237,0 y 323,4 |  |
| Ácido p-cumárico | 8,1 | 226,4 y 310,4 |  |
| Ácido ferúlico | 8,4 | 235,8 y 323,4 |  |

| Flavonas | | | |
|------------------|------|---------------|--|
| Luteolina | 12,0 | 253,5 y 348,5 | <p>11.983 Peak 1</p> <p>The graph shows the absorbance spectrum of Luteolina. The x-axis represents wavelength in nm, ranging from 220.00 to 380.00. The y-axis represents absorbance (AU), ranging from 0.00 to 0.30. Two peaks are identified: one at 253.5 nm and another at 347.3 nm.</p> |
| Tricina | 14,2 | 268,8 y 353,3 | <p>14.184 Extracted</p> <p>The graph shows the absorbance spectrum of Tricina. The x-axis represents wavelength in nm, ranging from 220.00 to 380.00. The y-axis represents absorbance (AU), ranging from 0.010 to 0.050. Two peaks are identified: one at 268.8 nm and another at 352.1 nm.</p> |
| Apigenina | 14,3 | 266,5 y 336,6 | <p>14.267 Peak 1</p> <p>The graph shows the absorbance spectrum of Apigenina. The x-axis represents wavelength in nm, ranging from 220.00 to 380.00. The y-axis represents absorbance (AU), ranging from 0.00 to 0.15. Two peaks are identified: one at 267.7 nm and another at 337.8 nm.</p> |

En la siguiente figura (Figura 2) se presenta uno de los cromatogramas correspondiente al mix de patrones inicialmente inyectado, donde puede observarse que existe solapamiento de dos picos alrededor de los 8 minutos, correspondientes a los ácidos sinápico y cumárico. Del mismo modo, se aprecia la ausencia del pico correspondiente a una de las flavonas, sugiriendo un solapamiento entre éstas. Por lo tanto, tal y como se ha indicado en el apartado de material y métodos, se decidió inyectar por separado los ácidos cumárico y sinápico (Figura 2b y c) así como cada una de las flavonas (Figura 2d, e y f) para proceder a la obtención de las rectas de calibrado correspondientes.

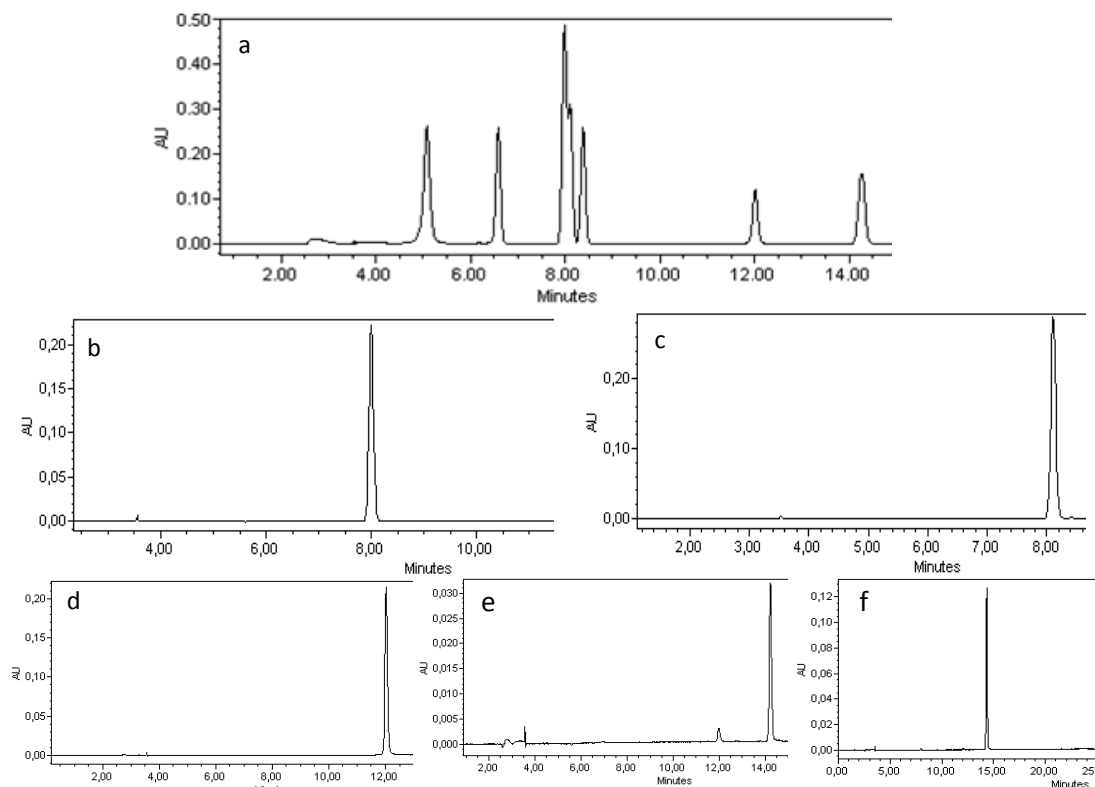


FIGURA 2. (a) Cromatograma correspondiente al mix 3, leído a la longitud de onda de 323 nm. (b) Cromatograma correspondiente al ácido sinápico (323 nm). (c) Cromatograma correspondiente al ácido cumárico (323 nm). (d) Cromatograma correspondiente a la luteolina (348 nm). (e) Cromatograma correspondiente a la tricina (348 nm). (f) Cromatograma correspondiente a la apigenina (348 nm).

Análisis de las muestras por HPLC

En la figura 3 se presenta como ejemplo el cromatograma correspondiente a la muestra panela granulada, a las dos longitudes de onda empleadas para la identificación y cuantificación. Como puede observarse, los cromatogramas obtenidos son complejos, con una gran cantidad de picos, muchos de ellos solapados, similares a los obtenidos por otros autores sobre muestras de similares características (Duarte-Almeida *et al.*, 2006; 2011; Li *et al.*, 2010). En muchos casos, aunque coinciden los espectros de absorción, los tiempos de retención no se corresponden con los de los patrones inyectados, por lo que se deduce que se trata de compuestos derivados, según se infiere de los estudios anteriormente citados. No obstante, algunos picos no se consiguieron identificar al no mostrar espectro de absorción o bien no corresponder a ninguno de los patrones empleados en el presente estudio.

Los cromatogramas correspondientes al resto de productos (AM, MC y PB) se muestran a continuación (Tabla 7), leídos a 323 nm y 348 nm según se indica.

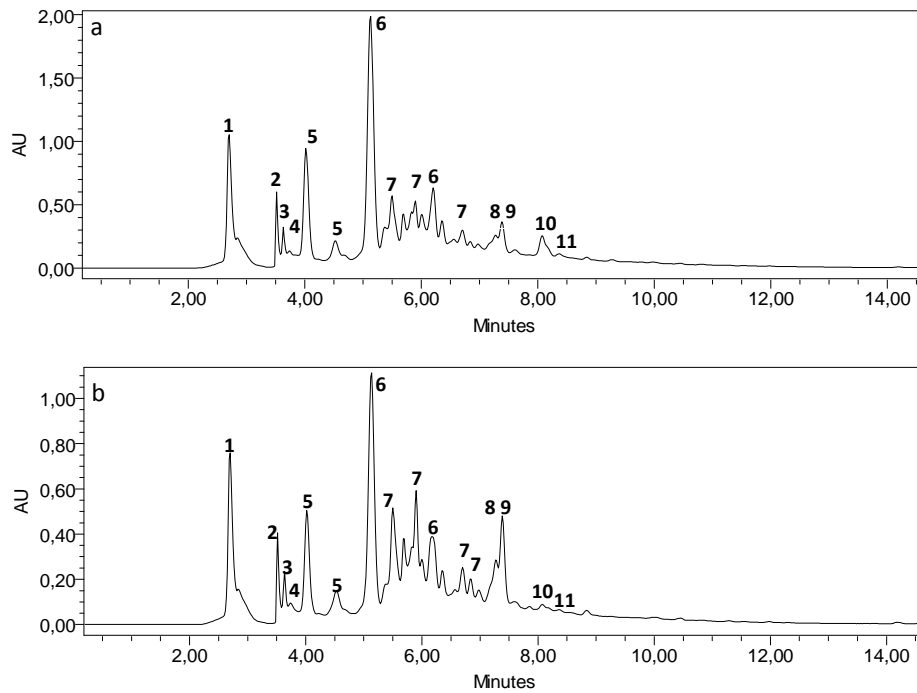


FIGURA 3. Cromatogramas e identificación de los picos de la panela granulada (PG) leídos a ambas longitudes de onda (a) 323 nm y (b) 348nm. Picos (1), (2), (3) y (4) compuestos no identificados (5) ácido clorogénico (6) ácido cafeico (7) apigenina (8) luteolina (9) tricina (10) ácido cumárico (11) ácido ferúlico.

TABLA 7. Cromatogramas correspondientes al resto de azúcares no refinados (azúcar moreno, AM; miel de caña, MC; panela en bloque, PB), obtenidos a 323 nm y 348 nm.

| Producto | $\lambda = 323\text{nm}$ | $\lambda = 348\text{nm}$ |
|----------|--------------------------|--------------------------|
| AM | | |
| MC | | |
| PB | | |

La concentración de cada uno de los compuestos identificados en las muestras analizadas se presenta en la tabla 8. Para su cálculo, se ha tenido en cuenta que el porcentaje de recuperación promedio obtenido fue del $93 \pm 7\%$.

Tabla 8. Compuestos fenólicos identificados en los azúcares de caña no refinados. Cantidades expresadas en mg/100 g de muestra.

| COMPUESTO IDENTIFICADO | AM | MC | PB | PG |
|-----------------------------|-------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| Ác. clorogénico | $0,136 \pm 0,008^a$ | $7,8 \pm 0,4^b$ | $2,0 \pm 0,1^a$ | 38 ± 2^c |
| Ác. cafeico | $0,269 \pm 0,016^a$ | $1,13 \pm 0,08^b$ | $3,15 \pm 0,19^c$ | $7,6 \pm 0,5^d$ |
| Ác. sinápico | nd | nd | nd | nd |
| Ác. cumárico | $0,080 \pm 0,008^a$ | $1,14 \pm 0,12^b$ | $1,00 \pm 0,11^b$ | $1,81 \pm 0,19^c$ |
| Ác. ferúlico | $0,0035 \pm 0,0003^a$ | $3,2 \pm 0,207^b$ | $5,6 \pm 0,3^c$ | $0,79 \pm 0,05^d$ |
| Ác. hidroxicinámicos | $0,49 \pm 0,03^a$ | $13,3 \pm 0,3^b$ | $11,7 \pm 0,7^b$ | 48 ± 3^c |
| Luteolina | nd | nd | $2,2 \pm 0,6^a$ | $2,5 \pm 0,7^a$ |
| Tricina | $0,71 \pm 0,07^a$ | $4,89,5 \pm 0,9^b$ | $13,0 \pm 1,2^c$ | $11,3 \pm 1,061^{b,c}$ |
| Apigenina | $1,7 \pm 0,3^a$ | $11,6 \pm 1,8^b$ | $11,9 \pm 1,9^b$ | 19 ± 3^c |
| Flavonas | $2,4 \pm 0,3^a$ | $21,1 \pm 0,9^b$ | $27 \pm 4^{b,c}$ | $32,9 \pm 4,8^c$ |

^{a,b,c...} Letras diferentes en la misma fila indican diferencias estadísticamente significativas con un nivel de confianza del 95% (p-valor < 0,05).

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto la presencia de ácidos hidroxicinámicos y flavonas en todos los productos analizados. En particular, el contenido en ácidos hidroxicinámicos resulta inferior al de flavonas, excepto para el caso de la PG, en la que el elevado contenido en ácido clorogénico encontrado repercute significativamente sobre el total. Por otra parte, el ácido sinápico no se identificó en ninguna de las muestras estudiadas, mientras que la luteolina estuvo ausente en el AM y la MC.

Para los compuestos identificados, se podría afirmar que los valores obtenidos resultan del orden de los publicados por Duarte-Almeida *et al.* (2006, 2011), aunque se debe tener en cuenta que los productos analizados no fueron exactamente los mismos. En todo caso, los resultados confirman una presencia mayoritaria de tricina y apigenina, de entre las flavonas analizadas, así como una cantidad significativa de ácido clorogénico, sobre todo en el caso de la PG y la MC.

En general, los resultados del análisis por HPLC han confirmado la presencia de compuestos fenólicos responsables de las propiedades antioxidantes analizadas en el presente trabajo. La cantidad de compuestos fenólicos obtenidos mediante este análisis confirma los resultados de fenoles y flavonoides totales, así como de actividad antioxidante. De nuevo, el AM presentaría un contenido en compuestos fenólicos significativamente menor al resto de azúcares no refinados, destacando la PG como producto con mayor contenido en dichos compuestos.

Evaluación de la capacidad anticariogénica de los azúcares no refinados

En la siguiente figura (Figura 4) se representa la estimación del crecimiento microbiano en presencia de los distintos azúcares, calculada a través de la diferencia de UFC (Δ UFC) absoluta y relativa, a partir de las medidas espectrofotométricas, tal y como se explica en el apartado de material y métodos.

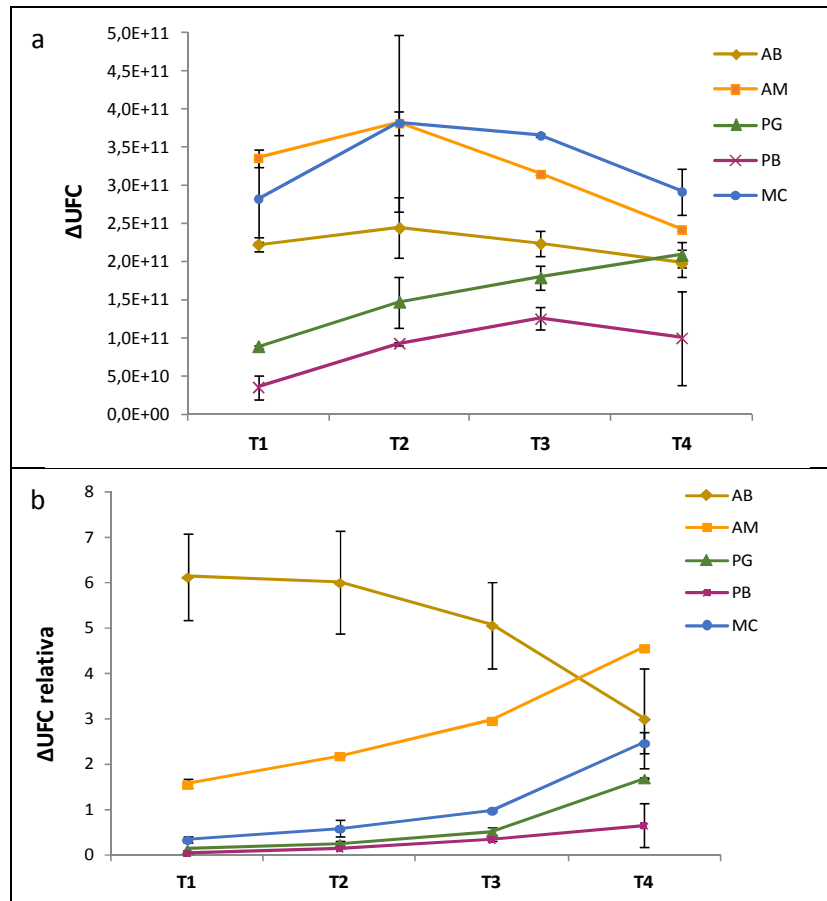


FIGURA 4. Crecimiento del microorganismo *S. mutans* estimada por diferencia de UFC absoluta (a) y relativa (b) en función del producto y de la concentración de azúcar en cada tubo (T_i). Cada tubo contiene 2 mL de medio de cultivo BHI broth más 2 mL de una disolución de azúcar a las siguientes concentraciones: $T_1 = 60$ g/100 mL, $T_2 = 45$ g/100 mL; $T_3 = 30$ g/100 mL y $T_4 = 15$ g/100 mL. AB: azúcar blanco, AM: azúcar moreno, PG: panela granulada, PB: panela en bloque y MC: miel de caña.

Los resultados obtenidos demuestran que existen diferencias al cultivar el microorganismo *S. mutans* en presencia de uno u otro tipo de azúcar, y en función de la concentración del mismo. El análisis estadístico realizado demuestra la significancia estadística de ambos factores, así como de su interacción (p -valor $< 0,05$), tanto para los valores absolutos como para los relativos.

Según puede apreciarse en la figura 4a, la presencia de azúcares no refinados del tipo PG o PB disminuye el crecimiento microbiano frente al

hecho de incluir en el medio azúcar blanco u otros azúcares no refinados tales como AM y MC. No obstante, a pesar esta cuantificación del incremento de UFCs, se cree que estos resultados pueden estar influidos por la diferente absorbancia inicial exhibida por cada una de las muestras de azúcares, debida a la diferente coloración de los mismos. Este hecho podría afectar de manera más notable a productos más coloreados tales como la MC. Por este motivo, se calculó también el incremento relativo de absorbancias (o equivalente incremento relativo de UFCs), dando lugar a los resultados presentados en la figura 4b. En esta figura, se observa claramente cómo el hecho de incubar en presencia de los azúcares no refinados supone un descenso significativo del crecimiento de *S. mutans*, más acusado conforme mayor es la concentración del azúcar en el tubo correspondiente. Por otra parte, las diferencias entre algunos tipos de azúcar (AB, AM, MC) dejan de ser significativas en el tubo 4, en el que la concentración de compuestos fenólicos sería menor a la mínima inhibitoria. Los resultados aquí obtenidos concuerdan con la cantidad de compuestos antioxidantes identificados en los distintos productos derivados de la caña de azúcar, así como con la actividad antioxidante exhibida por los mismos.

Cabe destacar que en estudios publicados por otros autores (Takara *et al.*, 2007) y en un estudio realizado por el grupo investigador (Ivorra, 2014), se había demostrado la inhibición del crecimiento *S. mutans* y *S. sobrinus* cuando se utilizaban extractos concentrados y/o purificados de los derivados de la caña de azúcar. No obstante, en este caso se ha conseguido demostrar un menor crecimiento de *S. mutans* en presencia del azúcar no refinado en la forma en que se comercializan, sin haber extraído y concentrado los compuestos fenólicos presentes en éstos.

CONCLUSIONES

Los resultados del presente trabajo de investigación confirman la presencia de compuestos fenólicos con propiedades antioxidantes en todos los productos derivados de la caña de azúcar analizados. Se ha constatado además que dichos compuestos se conservan en mayor medida en los productos menos refinados, tales como las panelas o la miel de caña.

Por otra parte, se han conseguido identificar y cuantificar diversas flavonas y ácidos hidroxicinámicos en los productos estudiados, confirmando la predominancia de las flavonas tricina y apigenina, así como del ácido clorogénico, este último presente marcadamente en la panela granulada.

Con respecto a la actividad anticariogénica, se ha demostrado inhibición del crecimiento de *S. mutans*, microorganismo responsable de la caries dental, cuando el cultivo se realiza en presencia de azúcares no refinados, principalmente panelas y miel de caña, en comparación con el azúcar blanco.

Por tanto, al finalizar el estudio se concluye que las propiedades antioxidantes y anticariogénicas demostradas tanto la miel de caña como en las panelas, convierten a estos azúcares no refinados en buenos candidatos para sustituir el azúcar blanco para consumo directo o en la formulación de alimentos.

BIBLIOGRAFÍA

- Amaya, L.M. 2013. Determinación de fenoles, flavonoides y capacidad antioxidante en melaza, azúcar blanco y moreno en el ingenio chaparrastique por el método de espectrofotometría ultravioleta-visible. Trabajo final de carrera. Facultad de Química y Farmacia. Universidad de El Salvador.
- Arabbi, P.R., Genovese, M.I., Lajolo, F.M. 2004. Flavonoids in vegetable foods commonly consumed in Brazil and estimated ingestion by the Brazilian population. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 1124-1131.
- Barberán, T. 2003. Los polifenoles de los alimentos y la salud. Grupo de investigación en calidad, seguridad y bioactividad de alimentos de origen vegetal.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E. and Berset, C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie*, 28: 25-30.
- Calabuig, L. Evaluación de las propiedades fisicoquímicas y antioxidantes de azúcares comerciales de caña no refinados. 2012. Trabajo Final de Carrera. Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural. Universitat Politècnica de València.
- Castañón, I. 2014. Fenotipos de *Streptococcus mutans* en párvulos chilenos de bajo nivel socioeconómico, con y sin experiencia de caries. Trabajo de Investigación. Facultad de Odontología. Universidad de Chile.
- Cebas (CSIC). Murcia. Alimentación, nutrición y salud, 1136-4815/03/41-53.
- Denni, M., Mammen, D. 2012. A critical evaluation on the reliability of two aluminium chloride chelation methods for quantification of flavonoids. *Food Chemistry*, 135:1365–1368.
- Duarte –Almedia, J.M., Vidal Novoa, A., Fallarero, A., Lajolo, F.J. And Genovese, M.I. 2006. Antioxidant Activity of Phenolics Compounds From Sugar Cane (*Saccharum officinarum* L.) Juice. *Plant Foods for Human Nutrition* 61, 187-192.
- Duarte-Almeida, J.M., Salatino, A., Genovese, M.I., Lajolo, F.M. 2011. Phenolic composition and antioxidant activity of culms and sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) products. *Food Chemistry*, 125(2): 660-664.
- Emanuelsson, I. y Thornqvist, 2000. E. Genotypes of *mutans streptococci* tend to persist in their host for several years. *Caries Res*; 34:133-139.
- Estrela, C.R.; Pimenta, F.C.; Alencar, A.H.; Ruiz, L.F. y Estrela, C. Detection of selected bacterial species in intraoral sites of patients with chronic periodontitis using multiplex polymerase chain reaction. *J Appl Oral Sci*. 2010; 18:426-31.
- Fátima, R.S. 2008. Algunas consideraciones sobre caries dental, fluoruros, su metabolismo y mecanismos de acción. *Acta Odontológica Venezolana*. 46 No 4: 1-11.
- Forssten, S.D., Björklund, M. y Ouwehand, A.C. 2010. *Streptococcus mutans*, Caries and Simulation Models. *Nutrients*, 2, 290-298.
- Goh, L. M., Barlow, P.J. and Young, C.S. 2003. Examination of antioxidant activity of *Ginkgo biloba* leaf infusions. *Food Chem.*, 82, 275-282.
- Guerra, M.J., Mujica, M.V. 2009. Physical and chemical properties of granulated cane sugar panelas. *Ciencia y tecnología de los alimentos*.
- Harish, M.A. 2009. Cytoprotective and antioxidant activity studies of jaggery sugar. *Food Chemistry*, v.115, Nº 1: 113-118.
- Harish-Nayaka, M.A.; Sathisha, U.V.; Manohar, M.P.; Chandrashekar, K.B. y Dharmesh, S.M. 2009. Cytoprotective and antioxidant activity studies of jaggery sugar. *Journal of food chemistry*. 115 (113-118).
- Hernández, E.; Amaya, F.; Galeano, V.; Ramírez, F.; Cortés, R. 2002. Alternativas tecnológicas para la producción de caña panelera. INIA-DAINCO. Táchira, Venezuela. 169.
- Herrera, C.L.; Pantoja, P., De la Maza, T., Sanhueza, A. and Salazar, L.A. 2007. Diagnóstico microbiológico y molecular de bacterias cariogénicas en mujeres embarazadas de la Región de La Araucanía, Chile. *Rev. Chil. Infect.* 24 (4): 270-275.
- Hostalet, A., Betoret, N. y Seguí, L. 2011. Determinación de las propiedades antioxidantes del zumo de caña, panela y azúcar moreno. Tesis de Máster. Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural. Universitat Politècnica de València.

- Ivorra, L. 2014. Azúcares no refinados como ingrediente funcional: propiedades antioxidantes y anticariogénicas. Trabajo final de carrera. Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural. Universitat Politècnica de València.
- Jaffe, W.R. 2012. Health of Non-Centrifugal Sugar (NCS): A Review. Sugar Tech. An International Journal of Sugar Crops and Related Industries. V.14, Nº 2.
- Kadam, U.S.; Ghosh, S.B.; Strayo, De; Suprasanna, P.; Devasagayam, T.P.A. and Bapat, V.A. 2008. Antioxidant activity in sugar cane juice and its protective role against radiation induced DNA damage. Food Chemistry 106,1154-1160.
- Lemos, J.A; Quivey, R.G. Jr.; Koo, H y Abranches, J. 2013. Streptococcus mutans: a new Gram-positive paradigm? Microbiology 159, 436–445.
- Li, X., Yao, S., Tu, B., Li, X., Jia, C., Song, H. 2010. Determination and comparison of flavonoids and anthocyanins in Chinese sugarcane tips, stems, roots and leaves. J. Sep. Sci., 33: 1216-1223.
- Liébana, J.M. 2008. Tesis doctoral: "Estabilidad de genotipos de Streptococcus mutans en escolares usando la técnica AP-PCR y el cebador OPA-2. Facultad de Odontología. Universidad de Granada.
- Lo, D.Y., Chen, T.H., Chien, M.S., Koge, K., Hosono, A., Kaminogawa, S. and Lee, W.C. 2005. Effects of Sugar Cane Extract on the modulation of immunity in pigs. Journal of Veterinary Medicine Sci. 67(6). 591-597.
- Luximon-Ramma, A., Bahorun, T., Soobrattee, M.A. and Aruoma, O.I. 2005. Antioxidant Activities of phenolic, proanthocyanidin, and flavonoid. components in extracts of Cassia fistula. Journal of Agricultural and Food.
- Martínez, M.C. 2009. Estudio de las cepas de Estreptococos del grupo mutans presentes en binomios madre-hijo, Revista Facultad de Odontología. Universidad de Antioquia. 21(2): 177-85.
- Martínez-Pabón, M., Morales, S.M y Martínez-Delgado, C.M. 2013. Caries dental en adultos jóvenes en relación con características microbiológicas y fisicoquímicas de la saliva. Rev. Salud Pública. 15 (6): 867-877.
- Molyneux, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for stimating antioxidant activity. 2004. Songklanakarín J. Sci. Technol. 26: 211-219.
- Mosquera, T.A. y Veloz, T.M. 2011. Eficacia in-vitro de un colutorio elaborado con aceite esencial de la hoja de ishpingo Ocotea quixos (Lam.) Kostern. Ex O.C.Schmidt y clavo de olor Syzygium aromaticum (L.) Merr. & L.M.Perry. La granja 13 (1).
- Moura Rufino, M. S; Elesbão Alves, R; Sousa de Brito, E; Maia de Moraes, S; Goes Sampaio, C; Pérez- Jiménez, J; Saura- Calixto, F. D. 2007. Metodologia científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS+. Comunicado técnico, 128. Ministério da agricultura, Pecuária e abastecimento. Brasil.
- Mujica, M.V.; Guerra, M. y Soto, N. 2008. Efecto de la variedad, lavado de la caña y temperatura de punteo sobre la calidad de la panela granulada. Interciencia. Vol 33, número 008.
- Naranjo, W.D. 2008. Caracterización reológica y térmica de miel de dos variedades de caña. Trabajo de grado. Facultad de Ciencia e Ingeniería de Alimentos. Universidad Técnica de Ambato.
- Nayaka, M.A., Sathista, U.V., Manohar, M.P., Chandrashekar, K.B., Dharmesh, S. 2009. Cytoprotective and antioxidant activity studies of jaggery sugar. Food Chemistry, 115: 113-118.
- Núñez, D.P. y García, L. 2010. Biochemistry of dental caries. Instituto de Ciencias Básicas y preclínicas Victoria de Girón. Universidad de Ciencias Médicas de La Habana. Revista Habanera de Ciencias Médicas; 9(2) 156-166.
- Payet, B.; Shum Cheong Sing, A. y Smadja, J.2005. Assesment of antioxidant activity of cane brown sugars by ABTS and DPPH radical scavenging assays: Determination of their polyphenolic and volatile constituents. Journal of agricultural and food chemistry. 53 (10074-10079).
- Price, K.R., Prosser, T., Richetin, A.M.F., Rhodes, M.J.C. 1999. A comparison of the flavonol content and composition in dessert, cooking and cider-making apples; distribution within the fruit and effect of juicing. Food Chemistry, 66: 489-494.

- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. and Rice-Evans, C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization.
- Rechner, A. R., Kuhnle, G., Bremner, P., Hubbard, G. P., Moore, K. P. and Rice-Evans, C. A. 2002. The metabolic fate of dietary polyphenols in humans. *Free Radical Biology and Medicine*, 33, 220-235.
- Recurso electrónico, página web: www.sediabetes.com Gema Sebastián Martín: Reportaje sobre Diabetes e hipertension. 06/06/15.
- Rubio, D. 2013. Estudio de la capacidad de inhibición del crecimiento bacteriano de los adhesivos autograbantes frente a gérmenes de la cavidad oral. Grado de Doctor. Facultad de Odontología. Universidad Complutense de Madrid.
- Seguí, L.; Calabuig, L.; Betoret, N y Fito, P. 2015. Physicochemical and antioxidant properties of non-refined sugarcane alternatives to White sugar. *International Journal of Food Science and Technology*. Doi: 10.1111/ijfs.12926.
- Singh, N., Kumar, D., Lal, K., Raisuddin, S.; Sahu, A.P. 2010. Adverse health effects due to arsenic exposure: modification by dietary supplementation of jaggery in mice. *Elsevier, Toxicology and Applied Pharmacology* 242, 247-255.
- Singleton, V., Orthofer, R. and Lamuela-Raventós, R.M. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in enzymology*, 299: 152-178.
- Soler, C. 2015. Propiedades antioxidantes de productos derivados de la caña de azúcar. Identificación y cuantificación de compuestos fenólicos por HPLC. Trabajo Final de Carrera. Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural. Universitat Politècnica de València.
- Takara, K., Otsuka, K., Wada, K., Iwasaki, H. and Yamashita, M. 2007. 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl Radical Scavenging Activity and Tyrosinase Inhibitory Effects of Constituents of Sugarcane Molasses. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 71 (1), 183-191.
- Wolfe, K., Wu, X. y Liu, R.H. 2003. Antioxidant activity of apple peels. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51: 609-614.
- Yoshimoto, M., Kurata, R., Fuji, M., Hou, D.-X. 2008. In vitro and in vivo anticarcinogenesis of sugar cane vinegar. *Acta Horticulturae* 765, 17-22.