

**UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOQUÍMICAS FARMACÉUTICAS**  
**Y BIOTECNÓLOGICAS**

**PROGRAMA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA**



**DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS Y CAPACIDAD  
ANTIOXIDANTE DE PRODUCTOS COMERCIALES A BASE DE TÉ VERDE QUE  
SE COMERCIALIZAN EN LA CIUDAD DE AREQUIPA**

**TESIS**

**PRESENTADO POR:**

HILDE BRANDO GALVEZ TAPIA

**PARA OPTAR EL TÍTULO**

**PROFESIONAL DE:**

QUÍMICO FARMACÉUTICO

**ASESOR:**

Dr. Q.F. JAIME CÁRDENAS GARCÍA

**AREQUIPA – PERÚ**

**2013**

## DEDICATORIA

A Dios por haberme permitido llegar hasta este punto y haberme dado salud para lograr mis objetivos, A mis padres y hermanos por su apoyo confianza y amor. Gracias por ayudarme a cumplir mis objetivos como persona y estudiante.

**Brando**



## ÍNDICE

Resumen.....	I
Abstract.....	III
<b>CAPÍTULO I</b>	
Introducción.....	1
Objetivos.....	3
Hipótesis.....	4
<b>CAPÍTULO II</b>	
Marco Teórico.....	5
2.1 Té.....	5
2.2 Clasificación taxonómica.....	7
2.3 Tipos de té.....	8
2.4 Composición química.....	9
2.5 Té verde.....	13
2.6 Estudio químico del té verde.....	14
2.7 Usos del té verde.....	16
2.8 Procesamiento de té verde.....	18
2.9 Radicales libres.....	19
2.10 Estrés oxidativo.....	21
2.11 Antioxidante.....	22
2.12 Clasificación según su origen.....	23
2.13 Clasificación según su modo de actuación.....	25
2.14 Mecanismos de acción de los antioxidantes.....	28
2.15 Capacidad antioxidante.....	29
2.16 Compuestos fenólicos.....	31
2.17 Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos.....	32
2.18 Biosíntesis de compuestos fenólicos.....	36
2.19 Efectos de los compuestos fenólicos.....	37

## CAPÍTULO III

Materiales y Métodos .....	39
3.1 Lugar de Ejecución .....	39
3.2 Materiales .....	39
3.2.1 Material de laboratorio .....	39
3.2.2 Reactivos .....	40
3.2.3 Equipos .....	40
3.3 Métodos .....	41
3.3.1 Caracterización de la muestra .....	41
3.3.2 Preparación de la muestra .....	41
3.3.3 Preparación del extracto para la determinación de compuestos fenólicos Totales y determinación de la capacidad antioxidante .....	42
3.3.4 Determinación de compuestos fenólicos totales .....	42
3.3.5 Determinación de la capacidad antioxidante .....	44
3.3.6 Protocolo de validación del método analítico .....	47
3.3.7 Análisis estadístico .....	49

## CAPÍTULO IV

Resultados y Discusión .....	51
4.1 Caracterización de las muestras .....	51
4.2 Determinación de los compuestos fenólicos totales .....	54
4.3 Determinación de la capacidad antioxidante ..... 66	
4.4 Análisis comparativo de las muestras ..... 71	

## CAPÍTULO V

Conclusiones .....	75
Bibliografía .....	77



## ÍNDICE DE FIGURAS

**Figura 2.1:** Planta de té.

**Figura 2.2:** Estructura de la catequina.

**Figura 2.3:** Estructura del epigalato de catequina (EGC), galato de epigalocatequina (EGCG), galato de galocatequina (GCG), epigalocatequina (EGC), epicatequina (EC)

**Figura 2.4:** Defensa de los antioxidantes contra los radicales libres.

**Figura 2.5:** Biosíntesis de los compuestos fenólicos a partir de la vía del *shikimato* y fenilalanina (Fuente; *Harborne, 1989, cit. por Chirinos et al., 2008*)

**Figura 2.6:** Formación de fenilpropanoides, estilbenos, lignanos, ligninas, suberinas, cutinas, flavonoides y taninos a partir de la fenilalanina. FAL: Fenilalanina amonio liasa. (Fuente: *Shahidi y Naczka 2004.*)

**Figura 2.7:** Mecanismos de preventivos de los polifenoles (*Muñoz y Ramos, 2007*).

**Figura 3.1:** Diagrama de flujo de la preparación de muestras.

**Figura 3.2:** Mecanismo de acción del método CUPRAC (*Apak R., et al, 2007*).

**Figura 4.1:** Curva de calibración para la determinación de los límites de detección y cuantificación de fenoles totales.

**Figura 4.2:** Box and whisker plot.

**Figura 4.3:** Box and whisker plot.

**Figura 4.4:** Curva de calibración.

**Figura 4.5:** Concentración de la capacidad antioxidante.

## ÍNDICE DE TABLAS

**Tabla N° 2.1:** Forma de elaboración del té negro y té verde.

**Tabla N° 2.2:** Clasificación taxonómica del té.

**Tabla N° 2.3:** Tipos de té.

**Tabla N° 2.4:** Componentes del té negro y del té verde.

**Tabla N° 2.5:** Mecanismos de acción de los antioxidantes.

**Tabla N° 2.6:** Distribución de compuestos fenólicos y actividad antiradical.

**Tabla N° 3.1:** Esquema del procedimiento.

**Tabla N° 3.2:** Esquema del procedimiento.

**Tabla N° 4.1:** Descripción del té verde (*Camellia sinensis*).

**Tabla N° 4.2:** Peso de sobres filtrantes de té verde.

**Tabla N° 4.3:** Resumen de datos para la cuantificación de fenoles totales.

**Tabla N° 4.4:** Concentración de fenoles totales, extracto acuoso.

**Tabla N° 4.5:** Concentración de fenoles totales, extracto etanólico.

**Tabla N° 4.6:** Concentración de fenoles totales, extracto acuoso del té verde en 5 muestras expresados como mg de ácidos gálico/g de muestra.

**Tabla N° 4.7:** Concentración de fenoles totales, extracto etanólico del té verde en 5 muestras expresados como mg de ácidos gálico/g de muestra.

**Tabla N° 4.8:** Concentración del extracto acuoso.

**Tabla N° 4.9:** Resumen de datos en análisis de varianza.

**Tabla N° 4.10:** Análisis de varianza.

**Tabla N° 4.11:** Método LSD.

**Tabla N° 4.12:** Concentración extracto etanólico.

**Tabla N° 4.13:** Resumen de datos en análisis de varianza.

**Tabla N° 4.14:** Análisis de varianza.

**Tabla N° 4.15:** Método LSD.

**Tabla N° 4.16:** Prueba *t de student*.

**Tabla N° 4.17:** Absorbancias por triplicado para la curva de calibración.

**Tabla N° 4.18:** Pesos de las muestras.

**Tabla N° 4.19:** Absorbancia de la extracción etanólica.

**Tabla N° 4.20:** Concentración de las muestras.

**Tabla N° 4.21:** Concentración de la capacidad antioxidante (mmol equivalente de ácido ascórbico).

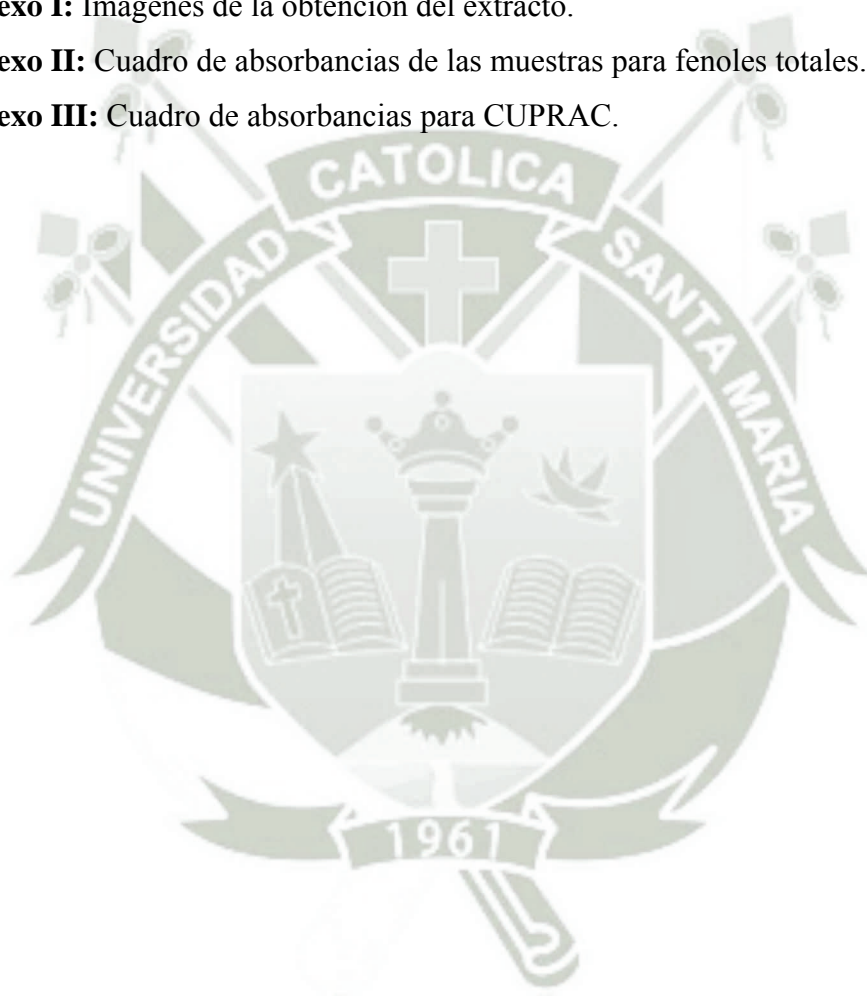
**Tabla N° 4.22:** Comparación de pesos.

## ANEXOS

**Anexo I:** Imágenes de la obtención del extracto.

**Anexo II:** Cuadro de absorbancias de las muestras para fenoles totales.

**Anexo III:** Cuadro de absorbancias para CUPRAC.



## RESUMEN

En la presente investigación se trabajó con 5 diferentes productos comerciales de té verde, 4 de procedencia nacional y 1 de procedencia internacional, los que se caracterizaron en una galería con imágenes y las principales características: nombre de producto comercial, fotografía, número de lote, cantidad, peso y presentación, para luego proceder con la extracción mediante el método de reflujo.

El contenido de los compuestos fenólicos totales por el método de *Folin-Ciocalteu* fue mayor el producto de la marca Lipton 0.16 mg de ácido gálico/g de muestra en extracto acuoso y 0.21 mg de ácido gálico/g de muestra en extracto etanólico, el menor contenido de fenoles totales se dio en el producto de la marca Hornimans 0.13 mg de ácido gálico/g de muestra en extracto acuoso, y 0.17 mg de ácido gálico/g de muestra en extracto etanólico, validando la técnica analítica usando el límite de detección (0.05 ppm) y el límite de cuantificación (0.07 ppm), los resultados fueron evaluados estadísticamente por el método de análisis de varianza (ANOVA), LSD y *t – Student*, este último demostró que las diferencias entre los extractos acuoso y etanólico son significativos.

La capacidad antioxidante por el método CUPRAC se realizó con el extracto etanólico donde la mayor capacidad antioxidante se dio en el producto de la marca Lipton 0.30 mmol equivalente de ácido ascórbico, y la menor capacidad antioxidante se dio en el producto de la marca Hornimans 0.17 mmol equivalente de ácido ascórbico.

La mayor actividad antioxidante se observa en la extracción etanólica, con el producto de la marca Lipton que posee mayor cantidad de compuestos fenólicos totales como mayor capacidad antioxidante, el producto de la marca Hornimans posee menor cantidad de compuestos fenólicos y menor capacidad antioxidante.

## ABSTRACT

In this research we worked with 5 different commercial green tea products, 4 of domestic and 1 international origin, which were characterized on a gallery with images and main features: Commercial product name, photograph, batch number, quantity, weight and appearance, and then proceed with the extraction by reflux method.

The content of total phenolic compounds by the Folin-Ciocalteu method was higher the product of Lipton 0.16 mg gallic acid / g sample in the aqueous extract and 0.21 mg gallic acid / g of ethanol extract shown in the lower Total phenol content was in the brand product Hornimans 0.13 mg gallic acid / g of sample extract, and 0.17 mg of gallic acid / g of sample in ethanol extract, validating the analytical technique using the detection limit (0.05 ppm) and the quantitation limit (0.07 ppm), the results were statistically evaluated by the method of analysis of variance (ANOVA), LSD and *t* - Student latter showed that the differences between the aqueous and ethanol extracts are significant.

The antioxidant capacity CUPRAC method was performed with the ethanol extract where the highest antioxidant capacity was in the Lipton brand product 0.30 mmol ascorbic acid equivalent, and reduced antioxidant capacity was in the brand product Hornimans 0.17 mmol ascorbic acid equivalent.

The greatest antioxidant activity observed in the ethanolic extraction, with the Lipton Brand product which has greater amount of total phenolics as higher antioxidant product Hornimans brand has fewer and smaller phenolic antioxidant.

# CAPÍTULO I

## INTRODUCCIÓN

El presente trabajo constituye un aporte al estudio de las propiedades antioxidantes del té verde, con la finalidad de evaluar el producto y comprobar la presencia de Polifenoles, que poseen propiedades antioxidantes, anticancerígenas e incluso antibióticas.

El té verde *Camellia sinensis* supone entre una cuarta y una quinta parte del total de té producido mundialmente. Los principales países productores de té verde son China, Japón, Vietnam e India. En América los principales productores de té verde son Argentina, Brasil, Perú, Bolivia, Ecuador, Guatemala, Panamá, Estados Unidos. En el Perú la mayor producción de té verde se encuentra en la provincia de la convención del departamento del Cusco (la demanda del té verde en el país es de 12 toneladas al año), (*Asociación Española de Té e Infusiones, 2013*).

En la presente investigación se trabajó con 5 diferentes productos comerciales de té verde, 4 de procedencia nacional y una de proveniente de Chile, se cuantificó el contenido de compuestos fenólicos totales y la capacidad antioxidante, sabiendo que el té verde contiene un numeroso grupo de compuestos, que presentan efectos beneficiosos para la salud como anti cancerígeno e incluso antibiótica. (*Bettuzzi S, Brausi M, Rizzi F, et al., 2006*).

## OBJETIVOS

1. Determinar el contenido de compuestos fenólicos totales.
2. Determinar la capacidad antioxidante.
3. Comparar los compuestos fenólicos totales y la capacidad antioxidante de las diferentes muestras analizadas.



## HIPÓTESIS

Dado que en nuestra ciudad se comercializan diferentes productos conteniendo té verde es probable que existan diferencias entre sus contenidos de compuestos fenólicos y actividad antioxidante.



## CAPÍTULO II

### MARCO TEÓRICO

#### 2.1 TÉ (*Camellia sinensis*)

El té es un árbol procedente de Oriente, denominado botánicamente *Camellia sinensis* o *Thea sinensis*. Presenta follaje perenne, flores blancas y fruto capsular con tres semillas negruzcas. Florece en primavera y fructifica en verano – otoño. Puede alcanzar hasta 10 o 15 metros de altura en estado salvaje, pero la planta bajo cultivo se poda para limitar su altura, favoreciendo la generación de nuevos brotes y hojas y facilitando la cosecha (*The Bio Tea Company S.L.*).



**Figura 2.1: Planta de té**

La especie se originó en los bosques montañosos de las fronteras entre China, India y Birmania. China fue la cuna del té, pero su cultivo no tardó en extenderse por India y Ceylán, gracias al desarrollo del comercio y a las condiciones agroecológicas adecuadas para su crecimiento (*Dirección de industria alimentaria en base a UPASI Tea Research Foundation*).

Aunque el té se cultiva con éxito desde el nivel del mar hasta los 2.200 metros de altitud, los mejores resultados, en términos de calidad de producto, se obtienen en zonas con alturas superiores a los 1.200 metros. El clima óptimo para la especie es el subtropical húmedo, isohídrico, con precipitaciones entre 1800 a 2200 mm anuales. Crece mejor en suelos con pH ácido (4,5 - 5,5), bien drenados, ya que es sensible a la putrefacción de raíces (*Dirección de industria alimentaria en base a UPASI Tea Research Foundation*).

Con estas condiciones el cultivo se desarrolla adecuadamente y la época de cosecha durante el período otoño-invernal, por disminución de las temperaturas medias y de la heliofanía diaria, además del comienzo de ocurrencia de heladas, se inicia un periodo de receso fisiológico que se aprovecha para la realización de las podas anuales, periódicas y de formación (*Dirección de industria alimentaria en base a UPASI Tea Research Foundation*).

Las hojas cosechadas de té atraviesan diversas etapas durante el proceso de industrialización tanto para el té negro y para el té verde, como muestra la Tabla N° 2.1, en la elaboración del té verde se evita el proceso de fermentación (*Dirección de industria alimentaria en base a UPASI Tea Research Foundation*).

**Tabla N° 2.1: Forma de elaboración del té negro y té verde**

TÉ NEGRO	TÉ VERDE
Marchitado	Escaldado
Enrulado	Marchitado
Picado	Enrulado
Zarandeado	Picado
Fermentado	Secado al horno
Secado al horno	Clasificación por tamaño
Clasificación por tamaño	Envasado
Envasado	

Las características que modifican el valor comercial del té son sus propiedades organolépticas, así como la edad, tamaño y condición de la hoja (entera, partida o polvo).

El té se comercializa en lotes o partidas que se usan en mezclas o "*blends*" para mantener las características de cada marca a lo largo del tiempo. Así, un lote puede

aportar poco en cuanto a sabor pero dar un excelente color, otro en cambio puede tener un color muy tenue pero con un exquisito aroma. Cada empresa conoce las expectativas del mercado a que está dirigido para buscar los *blends* apropiados (*Dirección de industria alimentaria en base a UPASI Tea Research Foundation*).

## 2.2 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

El árbol del té pertenece a la familia botánica *teáceas*. La especie comprende diversas variedades diferenciadas en base a características foliares y al desarrollo y tamaño de la planta.

En base a la Fuente del Sistema Integrado de Información Taxonómica - SIIT América del Norte (Canadá, México, Estados Unidos) se muestra en la Tabla N° 2.2 clasificación taxonómica del té.

**Tabla N° 2.2: Clasificación taxonómica del té**

<b>Clasificación</b>	<b>Descripción</b>
Reino	<i>Plantae</i>
Subreino	<i>Viridaeplantae</i>
División	<i>Tracheophyta</i>
Subdivisión	<i>Spermatophytina</i>
Infradivisión	<i>Angiospermae</i>
Clase	<i>Magnoliopsida</i>
Superorden	<i>Asteranae</i>
Orden	<i>Ericales</i>
Familia	<i>Theaceae</i>
Género	<i>Camelia</i>
Especie	<i>Camellia Sinensis</i>

## 2.3 TIPOS DE TÉ

A partir de la misma materia prima: brotes y hojas de la especie *Camellia sinensis*, se obtienen diversos productos finales, según variedades botánicas, formas de

cultivo, época y tipo de cosecha y el método de industrialización utilizado. Los diferentes tipos de té se muestran en la Tabla N° 2.3 (*Dirección de industria alimentaria en base a UPASI Tea Research Foundation*).

**Tabla N° 2.3: Tipos de té**

Nombre	* Grado de fermentación	Características
Té Negro	Completa	Es el producto que presenta mayores propiedades aromáticas. Su alto contenido en flavonoides protege al sistema cardiovascular.
Té Rojo	Incompleta	<p>Con 50 - 60 % de fermentación se denomina <i>Oolong</i>, con 8 - 25 %, <i>Pouchong</i>.</p> <p>Se secan hojas y yemas. Se le aplica un tratamiento térmico para inactivar las enzimas y detener la fermentación en el momento adecuado y además quitar humedad para evitar la descomposición de las hojas.</p> <p>Presenta propiedades antioxidantes, efecto protector del sistema cardiovascular y se utiliza para el tratamiento de la obesidad. También se le atribuyen propiedades anticancerígenas.</p> <p>Tradicional en China, Japón y Taiwán.</p>
Té Verde	Ausente	<p>Se evita la acción enzimática de la fermentación mediante un escaldado.</p> <p>Presenta elevadas cantidades de antioxidantes, colabora con la nivelación de la insulina en sangre y con la disminución de la grasa corporal. Disminuye el nivel de triglicéridos y colesterol.</p>
Té Blanco	Ausente	Se produce a partir de la recolección de las yemas nuevas antes que abran, Se dejan marchitar para que se evapore la humedad y se desecan.

		La principal propiedad es su elevado contenido en antioxidantes.
--	--	--

\*Según color de la infusión generada

## 2.4 COMPOSICIÓN QUÍMICA

El té contiene más de 600 compuestos químicos que actúan todos juntos sobre el sabor, el gusto, el color, los nutrientes y el efecto médico de esta planta. Las hojas frescas del té contienen entre un 75 a un 78 % de agua. Hacen falta 4 kg. de hojas frescas para hacer un kg. de té terminado. Entre los más de 600 componentes, hay alrededor de 500 compuestos orgánicos, representando aproximadamente del 93 al 96,5 % del té seco, Las principales sustancias orgánicas son las siguientes (*The Bio Tea Company S.L.*):

- Proteínas (20 a 30 %)
- Aminoácidos (1 a 5 %)
- Alcaloides (3 a 5 %)
- Fenoles (20 a 35 %)
- Glúcidos (20 a 25 %)
- Ácidos orgánicos (3 a 5 %)
- Lípidos (4 a 5 %)
- Pigmentos (0,6 a 1 %)
- Sustancias aromáticas (0,005 a 0,03 %)
- Vitaminas (0,6 a 1 %)
- Saponarias (0,07 a 0,1 %)
- Esteroles (0,04 a 0,1 %)

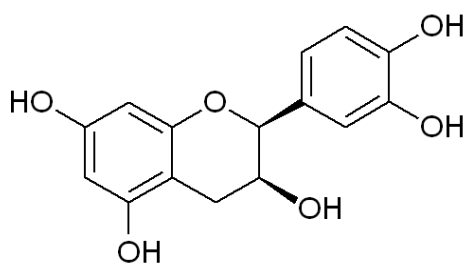
Los principales componentes del té negro y té verde, se muestran en la Tabla N° 2.4 (*Dirección de industria alimentaria en base a UPASI Tea Research Foundation*).

Tabla N° 2.4: Componentes del té negro y del té verde

COMPONENTES	TÉ NEGRO (%)	TÉ VERDE (%)
Catequinas	3 – 10	30 – 42
Teaflavinas	2 – 6	-
Polifenoles Sencillos	3	2
Flavonoles	1	2
Otros Polifenoles	23	6
Teanina	3	3
Aminoácidos	3	3
Péptidos/Proteínas	6	6
Ácidos Orgánicos	2	2
Azúcares	7	7
Otros Carbohidratos	4	4
Cafeína	3 – 6	3 – 6
Potasio	5	5
Otros Minerales/Cenizas	5 - 8	5 - 8

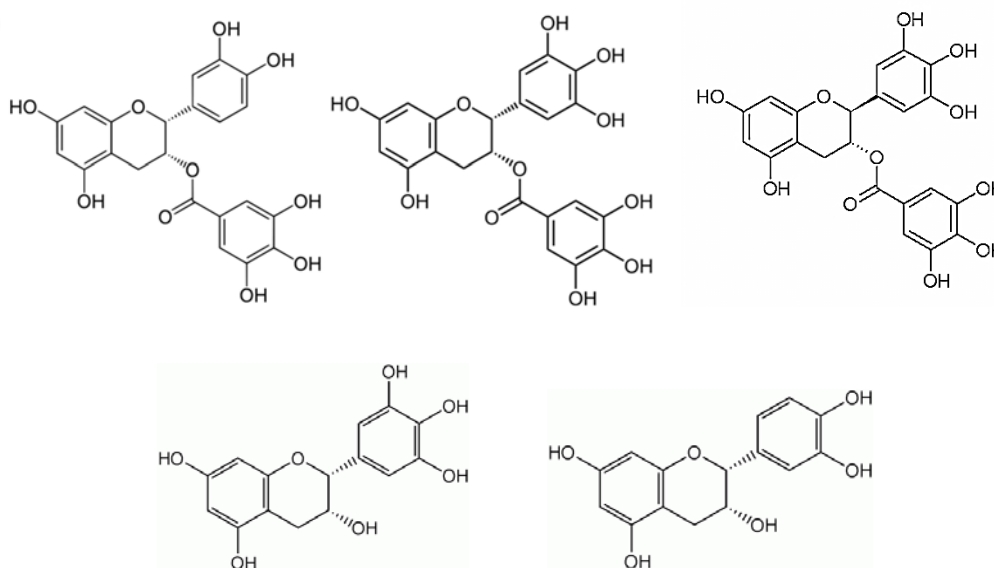
Estas son las sustancias orgánicas que determinan el gusto, el sabor, el color, el alimento y el efecto médico del té. Los alcaloides, aunque no representan más que del 3 al 5 % del té seco, juegan un papel decisivo para el gusto del té. Agrupan sobre todo la cafeína y en menor proporción la teofilina y la teobromina. A causa de estos compuestos, el té puede excitar el sistema nervioso y por ello, ayuda a permanecer activo (*The Bio Tea Company S.L.*).

En cuanto a los aminoácidos, a pesar de su proporción mínima (1 a 5 %), son los responsables del gusto y del sabor fresco del té verde. Los fenoles, principalmente la catequina, actúan sobre el gusto del té y producen efectos preventivos y terapéuticos sobre numerosas enfermedades humanas. (*The Bio Tea Company S.L.*).



**Figura 2.2: Estructura de la Catequina**

Las catequinas son el epigalato de catequina (EGC), galato de epigalocatequina (EGCG), galato de galocatequina (GCG), epigalocatequina (EGC), epicatequina (EC), se encuentran localizadas en las vacuolas citoplasmáticas, jugando un rol fundamental durante el proceso de la fermentación. Algunas propiedades de las Catequinas son: reducción de los triglicéridos y colesterol en la sangre, prevención de la arteriosclerosis, refuerza paredes de las venas, regula la presión sanguínea y previene las caries, limitando el desarrollo de las bacterias causantes de tal afección (*Dirección de industria alimentaria en base a UPASI Tea Research Foundation*).



**Figura 2.3: Estructura del epigalato de catequina (EGC), galato de epigalocatequina (EGCG), galato de galocatequina (GCG), epigalocatequina (EGC), epicatequina (EC)**

Las sustancias aromáticas agrupan de hecho varios centenares de compuestos orgánicos, que actúan por si mismos o todos juntos por interacción, de forma positiva o negativa, sobre el sabor el té. Los glúcidos que representan una gran proporción del té seco y de los que una parte es soluble en agua, pero otra parte mayor no lo es, juegan un papel activo para la salud humana. Las proteínas a pesar de que representan del 20 al 30 % del té seco, no sirven para gran cosa, ya que la mayoría son insolubles en agua. Pero en revancha, tienen una relación muy estrecha con la calidad del té negro. Por supuesto, hay que destacar el papel indispensable de las vitaminas en la salud humana (*The Bio Tea Company S.L.*).

Las sustancias inorgánicas, a pesar de que no representan más que del 3,5 al 7,0 % del té seco, producen una acción no despreciable sobre la capacidad nutritiva, el efecto medicinal y la calidad del té (*The Bio Tea Company S.L.*).

Habiendo sufrido una incineración, el té se ha reducido a lo que se llama normalmente cenizas. El contenido en cenizas de un té es uno de los puntos esenciales del examen del té. La Organización Internacional de Estandarización (ISO) de las Naciones Unidas ha pre-escrito, en sus "ISO 3720" promulgadas en 1977, las normas sobre el té negro, según las que el contenido en cenizas de un té negro destinado a la exportación debe estar entre 4 % y 8 %, mientras que China estipula que este contenido no debe sobrepasar el 6,5%. De forma general, a mayor contenido en cenizas, menor es la calidad del té pues fuera de las sustancias orgánicas contenidas en el té, se mezclan a veces impurezas o polvos que hacen aumentar el contenido en cenizas. Las cenizas son hidrosolubles entre un 50 y 60 %. La hidrosolubilidad es más elevada cuanto mejor es la calidad del té (*The Bio Tea Company S.L.*).

Como resultado de un análisis científico de la composición química del té, se obtiene que contenga 27 elementos minerales, además del carbono, hidrógeno, oxígeno y nitrógeno. Son el fósforo, potasio, magnesio, manganeso, flúor, aluminio, calcio, sodio, azufre, hierro, arsénico, cobre, níquel, silicio, cinc, boro, molibdeno, plomo, cadmio, cobalto, selenio, bromo, yodo, cromo, titanio, cesio y vanadio. El contenido en flúor, potasio, aluminio, yodo, selenio, níquel, arsénico y

manganeso del té, es superior al nivel medio de otras plantas. Los elementos minerales producen una acción reguladora sobre el organismo. Como el té es rico en estos elementos, es suficiente con beber algunas tazas por día para responder a las necesidades del cuerpo humano (*The Bio Tea Company S.L.*).

## 2.5 TÉ VERDE

El té verde es un té no fermentado que sufre un proceso de torrefacción, operación en la cual se calienta el té verde a una temperatura elevada lo más rápido posible para detener la fermentación. El té verde es más suave que otros tipos de té, y tiene un mayor poder antioxidante al no estar fermentado (*The Bio Tea Company S.L.*).

Gracias a su variada composición química, el té verde posee numerosas virtudes. Los polifenoles del té verde son potentes antioxidantes, por lo que su consumo ayuda a frenar el envejecimiento y el avance de algunas enfermedades degenerativas, y puede que incluso algunos tipos de cáncer. La cafeína hace que el té verde actúe como un estimulante del sistema nervioso y que ayude a superar la fatiga física y mental (*The Bio Tea Company S.L.*).

El té verde también presenta acción diurética, broncodilatadora y astringente. Por otro lado, el té verde es capaz de reducir los niveles de LDL-colesterol y de triglicéridos plasmáticos, al tiempo que eleva los niveles de HDL-colesterol, el colesterol bueno. Y gracias a sus propiedades antioxidantes, el té verde evita la oxidación del colesterol y protege contra la arterioesclerosis (*The Bio Tea Company S.L.*).

También el té verde ha demostrado ser capaz de reducir la formación anormal de coágulos sanguíneos. El té verde disminuye los niveles de azúcar en sangre (parece ser que regula la insulina en sangre), por lo cual es óptimo en la lucha contra la diabetes y la obesidad (*The Bio Tea Company S.L.*).

## 2.6 ESTUDIO QUÍMICO DEL TÉ VERDE

Los principales principios activos que entran en la composición del té verde son los siguientes (*Dirección de industria alimentaria en base a UPASI Tea Research Foundation*):

- a. **Agua y sales minerales:** Las hojas contienen entre un 5 y un 6% de agua y entre un 4 y un 7% de sales minerales, en especial potasio y manganeso.
- b. **Ácidos orgánicos:** Otros compuestos minoritarios que también pueden encontrarse en el té son ácidos orgánicos como málico, succínico, oxálico y galoquínico, incluso un pequeño porcentaje de lípidos.
- c. **Compuestos glucídicos:** El té contiene inositol, azúcares reductores, gomas y pectinas.
- d. **Polifenoles:** El té se destaca por su contenido en compuestos polifenólicos (3%) que son los responsables de su actividad terapéutica y de su poder antioxidante. Los polifenoles disminuyen con la edad de la planta y con la época de recolección, para plantas de la misma edad, es menor en primavera y mayor en agosto y septiembre. Entre otros beneficios, los polifenoles del té serían buenos para el cerebro, retrasando la aparición de enfermedades degenerativas como el Alzheimer.

Los polifenoles del té son de tres tipos: flavonoides, catequinas o catecoles y taninos (*Dirección de industria alimentaria en base a UPASI Tea Research Foundation*):

- **Flavonoides:** Entre los flavonoides del té, los más importantes son el kemferol, quercetol (quercitina) y miricetol. Además de aportar propiedades antioxidantes, los flavonoides del té protegen de enfermedades cardiovasculares.
- **Catequinas:** Los catecoles o catequinas son más abundantes en el té verde, que en el té negro y en la planta fresca. Los más activos son el

catecol, epicatecol y sus ésteres con ácido gálico. Las catequinas del té son las responsables de sus efectos anticancerígenos.

- **Taninos:** El té también contiene taninos catéquicos condensados (8-25%). Los taninos se relacionan con las propiedades astringentes del té, útiles tanto para tratar la diarrea, como para por ejemplo, cicatrizar heridas. Sin embargo, dado que interfieren en la absorción de hierro, en ocasiones pueden agravar cuadros de anemia.

- e. **Aceite esencial de té:** Tiene una pequeña cantidad de aceite esencial (0.007-0.014% en las hojas frescas), menor que la del té negro, dado que se forma en el proceso de fermentación de las hojas.

El aceite esencial de té contiene hexenol, y pequeñas cantidades de aldehídos, butiraldehído e isobuteraldehído, así como alcoholes fenólicos, geraniol, linalol y citral.

- f. **Alcaloides:** Los alcaloides del té (2-4%) quizás sean los componentes más conocidos. Se trata de derivados de la purina, conocidos más comúnmente como bases xánticas, las más abundantes son la cafeína y la teofilina.

En la planta fresca, la cafeína se encuentra combinada con los ácidos orgánicos formando un compuesto conocido como “tanoide”. Por tal razón, el té negro tiene una acción más estimulante sobre el sistema nervioso, que el té verde, puesto que durante el proceso de fermentación se rompe este tanoide dejando libre la cafeína.

- g. **Vitaminas y enzimas:** Por último, el té contiene además, vitaminas y enzimas.

## 2.7 USOS DEL TÉ VERDE

El té verde contiene altos niveles de sustancias llamadas polifenoles, conocidas por poseer fuertes antioxidantes, anticancerígenos, antitumoral e incluso propiedades antibióticas, los polifenoles del té serían buenas para el cerebro, retrasando la aparición de enfermedades degenerativas como el Alzheimer (*Cao Y, Cao R. 1999*). Con base en estos hallazgos, así como también en estudios observacionales, el té verde ha llegado a ser popular como una bebida diaria para prevenir el cáncer y la enfermedad cardíaca (*Kohlmeier L., Weterings KGC, Steck S., et al., 1997*), (*Tsubono Y., Nishino Y., Komatsu S., et al., 2001*).

Los estudios preliminares sugieren que ciertos polifenoles del té verde pueden ayudar a prevenir el cáncer de piel si estos son aplicados directamente sobre la piel (*Katiyar SK, Ahmad N., Mukhtar h., 2000*). Además, existe alguna evidencia de que los componentes del té verde pueden ayudar a proteger la piel del daño del sol (*Elmets CA, Singh D., Tubesing K., et al., 2001*). A diferencia de las preparaciones normales bloqueadoras del sol, el té verde no bloquea físicamente la luz ultravioleta. En vez de eso, éste parece proteger las células del daño. Debido a que éste funciona por medio de tan diferente mecanismo de acción, el té verde puede ofrecer beneficios sinérgicos si se combina con bloqueadores solares estándar.

Un pequeño ensayo doble ciego controlado por placebo encontró evidencia extremadamente débil de que el dulce masticable de té verde podría reducir la inflamación de las encías en personas con enfermedad periodontal (gingivitis), (*Krahwinkel T., Willershausen B., 2000*).

El té verde también ha sido propuesto como un medio de prevención para la enfermedad hepática, (*Imai K., Nakachi K., 1995*).

El té verde es algunas veces recomendado para la pérdida de peso, (*Hegarty VM, May HM, Khaw KT. 2000*).

Evidencia muy preliminar sugiere que el té negro, el cual es bastante similar pero no idéntico al té verde, puede ayudar a proteger contra la osteoporosis (*Hegarty VM, May HM, Khaw KT. 2000*), y puede ayudar a prevenir la aterosclerosis (*Geleijnse JM, Launer LJ, Hofman A.et al., 1999*).

**a. Dosis:**

Los estudios sugieren que tres tazas de té verde diariamente proporcionan protección contra el cáncer. Sin embargo, debido a que no todos quieren tomarse el tiempo de tomar el té verde, los fabricantes han ofrecido extractos que pueden ser tomados en forma de pastillas. Una dosis típica es de 100 a 150 mg tres veces al día de un extracto estandarizado de té verde que contiene un 80% de polifenoles totales y un 50% de epigallocatequin gallate. Si estos extractos ofrecen algún beneficio es algo que todavía es desconocido (*Taylor JR, Wilt VM. 2005*).

**b. Efectos secundarios:**

Como una bebida ampliamente consumida, el té verde está generalmente considerado como seguro. Este contiene cafeína, aunque a un nivel más bajo que el té negro o el café y además puede causar insomnio, nerviosismo y otros síntomas bien conocidos de la ingesta de cafeína, dado que las bases xánticas tienen una acción diurética, se puede observar un aumento en la orina (*Taylor JR, Wilt VM. 2005*).

**c. Contraindicaciones:**

El té verde no debe ser dado a bebés o a niños pequeños (*Taylor JR, Wilt VM. 2005*).

**d. Interacciones:**

- **Inhibidores MAO** : La cafeína en el té verde puede causar serios problemas.

- **Coumadin (warfarina)** : Grandes dosis de té verde podrían interferir con su efectividad, debido a que el té verde contiene vitamina K , la cual directamente contrarresta la acción adelgazadora sanguínea de la coumadina pequeños (*Taylor JR, Wilt VM. 2005*).

## 2.8 PROCESAMIENTO DE TÉ VERDE

El té se elabora con las hojas cocidas al vapor y posteriormente secadas, que después se enrollan, se dejan fermentar y se secan. En la preparación del té verde lo primero que se hace con las hojas es inhibir las enzimas oxidantes por el calor, en pailas calientes de 121 °C sobre fuego de carbón vegetal durante 2 horas las hojas frescas se tratan con vapor de agua en un tambor giratorio cilíndrico de madera o metal, a 15 revoluciones por minuto aproximadamente, la carga se hecha en el suelo y se enfría mediante rociado de agua fría. Después se centrifuga para separar de la carga un líquido amarillento en cantidad de unos 28 litros que contiene 60 g de materia solidas por litro de los cuales 18,75g son tanino y 3,75g son cafeína. El té luego es enrollado y seco, es de un color verde oliva oscuro (*ing. Patricia parra, Dirección nacional de alimentos, buenos aires – Argentina, 2013*).

## 2.9 RADICALES LIBRES

Los radicales libres y otras especies reactivas de oxígeno son derivados del proceso metabólico normal en el cuerpo humano o de la exposición a fuentes externas como los rayos X, ozono, cigarro, contaminantes del aire y productos químicos (*Bagchi y Puri, 1998*). Son especies inestables y muy reactivas porque presentan un electrón libre, mientras que en las especies químicas estables, los electrones están dispuestos en parejas que orbitan alrededor del núcleo atómico en direcciones opuestas (*Webb, 2006*).

Estos átomos o grupos de átomos tienden a robar un electrón de moléculas estables con el fin de alcanzar su estabilidad electroquímica. Una vez que el radical libre ha conseguido sustraer el electrón que necesita para aparear su electrón libre, la molécula estable que se lo cede se convierte a su vez en un radical libre por quedar con un electrón desapareado, iniciándose así una verdadera reacción en cadena que destruye nuestras células (*Avello y Suwaisky, 2006*).

ROS es un término que incluye a los radicales libres y a otras especies no radicáticas, pero que pueden participar en reacciones que llevan a la elevación de los agentes prooxidantes y son las especies reactivas del oxígeno (EROS) (*Venereo, 2002*). Por lo tanto, todos los radicales de oxígeno son ROS, pero no todos los ROS son los radicales de oxígeno. Estos son agentes oxidantes y/o son fácilmente convertidos a radicales (HOCl, HOBr, O<sub>3</sub>, ONOO<sup>-1</sup>, O<sub>2</sub>, and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (*Halliwell, 2006*).

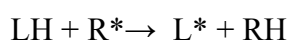
Las principales especies reactivas del oxígeno o sustancias prooxidantes son: Radical hidroxilo (HO)<sup>+</sup>, Peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), Anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>\*-</sup>), Oxígeno singulete (O<sub>2</sub>), Oxígeno nítrico (NO), Peróxido (ROO), Semiquinona (Q) y el Ozono (O<sub>3</sub>) (*Venereo, 2002*).

La ruta clásica de los radicales libres conduce a una iniciación de rápida progresión, las reacciones en cadena destructiva.

Las características esenciales de la oxidación de los radicales libres mediante reacción en cadena son los pasos de iniciación, propagación, ramificación y terminación (*Kooy cit. por Antolovich et al., 2001*).

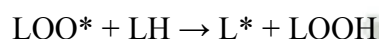
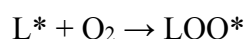
El proceso puede ser iniciado por la acción de agentes externos como el calor, la luz o de radiaciones ionizantes o por iniciación químicas en los iones metales o metaloproteínas. (*Kanner cit. por Antolovich et al., 2001*).

#### **a. Iniciación**



Donde LH representa la molécula sustrato, por ejemplo, un lípido, con R\* como el radical oxidante iniciador. La oxidación de los lípidos genera el altamente reactivo radical alilo (L\*) que rápidamente puede reaccionar con el oxígeno para formar el radical lipídico peroxil (LOO\*) (*Antolovich et al., 2001*).

#### b. Propagación

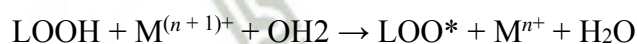
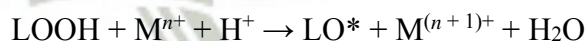


Los radicales peroxilo son los portadores de la cadena de la reacción que más oxida a los lípidos, produciendo hidroperóxidos de lípidos (LOOH), que a su vez se descomponen en una amplia gama de compuestos, como alcoholes, aldehídos, alquilo formiatos, cetonas e hidrocarburos y los radicales incluyendo el radical alcoxilo (LO\*) (*Antolovich et al., 2001*).

#### c. Ramificación:

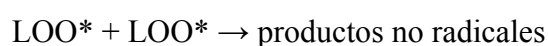


La ruptura de los hidroperóxidos de lípidos implica a menudo iones metálicos de transición catalíticos, en reacciones análogas a la del peróxido de hidrógeno, produciendo radicales peroxilo lipídicos y radicales alcoxilo lipídicos:



Las reacciones de terminación implican la combinación de los radicales para la formación de productos no radicalarios (*Antolovich et al., 2001*).

#### d. Terminación



$LO^* + LOO^* \rightarrow$  productos no radicales

(*Antolovich et al., 2001*)

## 2.10 ESTRÉS OXIDATIVO

El estrés oxidativo es la exposición de la materia viva a diversas fuentes que producen una ruptura del equilibrio que debe existir entre las sustancias o factores prooxidantes y los mecanismos antioxidantes encargados de eliminar dichas especies químicas, ya sea por un déficit de estas defensas o por un incremento exagerado de la producción de especies reactivas del oxígeno (*Ames cit. Venereo, 2002*)

El estrés oxidativo ha sido asociado a la patogénesis de muchas enfermedades humanas, por esto el uso de antioxidantes en farmacología es estudiado de forma intensiva, particularmente como tratamiento para accidentes cerebrovasculares y enfermedades neurodegenerativas. (*Ramos et al., 2008*)

El daño celular producido por las especies reactivas del oxígeno ocurre sobre diferentes macromoléculas:

1. **Lípidos:** aquí se produce el daño mayor denominado peroxidación lipídica, afecta a las estructuras ricas en ácidos grasos poliinsaturados produciendo edema y muerte celular, representa una forma de daño hístico que puede ser desencadenado por el oxígeno, el oxígeno singulete, el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo. (*Venereo, 2002*).
2. **Proteínas:** hay oxidación de un grupo de aminoácidos como fenilalanina, tirosina, histidina y metionina; además se forman entrecruzamientos de cadenas peptídicas, y por último hay formación de grupos carbonilos (*Webb, 2006*).
3. **Ácido desoxirribonucleico (ADN):** Ocurren fenómenos de mutaciones y carcinogénesis, hay pérdida de expresión o síntesis de una proteína por daño a un gen específico, modificaciones oxidativas de las bases, deleciones,

fragmentaciones, interacciones estables ADN-proteínas, reordenamientos cromosómicos y desmetilación de citosinas del ADN que activan genes (*Venero, 2002*).

## 2.11 ANTIOXIDANTE

*Halliwell y Gutteridge (cit. por Young y Woodside, 2001)* definieron como antioxidante a toda sustancia que hallándose presente a bajas concentraciones, con respecto a las de un sustrato oxidable (biomolécula), retarda o inhibe la oxidación de dicho sustrato.

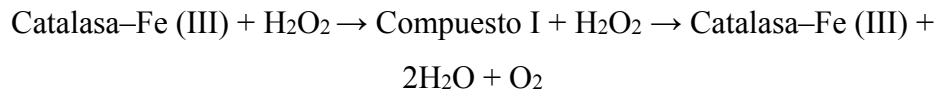
Los antioxidantes son capaces de estabilizar o desactivar los radicales libres antes de que ataquen las células. Los antioxidantes son absolutamente críticos para el mantenimiento celular óptimo y el sistema y bienestar saludable (*Percival 1998*). El antioxidante al reaccionar con el Radical Libre (RL) le cede un electrón oxidándose a su vez y transformándose en un RL débil, con escasos o nulos efectos tóxicos y que en algunos casos como la vitamina E, pueden regenerarse a su forma primitiva por la acción de otros antioxidantes. Tienen diferentes mecanismos de acción; unos impiden la formación de los RL y/o especies reactivas (sistema de prevención), otros inhiben la acción de los RL (sistema barrador) y otros favorecen la reparación y la reconstitución de las estructuras biológicas dañadas (sistema de reparación). Cada antioxidante posee una afinidad hacia un determinado RL o hacia varios, puede actuar en los diferentes procesos de la secuencia oxidativa y tener más de un mecanismo de acción. Los antioxidantes se clasifican en ENDÓGENOS, fabricados por la propia célula, y EXÓGENOS, que ingresan en el organismo a través de la dieta o de suplementos con formulaciones antioxidantes (*Criado y Moya, 2009*).

## 2.12 CLASIFICACION SEGÚN SU ORIGEN

### A. Antioxidantes endógenos

#### a. Las enzimas antioxidantes:

**Catalasa:** fue la primera enzima antioxidante en ser caracterizada y cataliza dos etapas de conversión del peróxido de hidrógeno a agua y oxígeno:



La mayor parte de su actividad está presente en el hígado y eritrocitos, pero también se ha encontrado en todos los tejidos. (*Young y Woodside, 2001*)

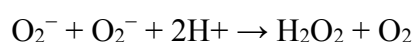
**Glutación peroxidasa y glutatión reductasa:** la glutatión peroxidasa es un importante antioxidante hidrosoluble, requiere selenio en el sitio activo y se encarga de catalizar la oxidación de glutatión a expensas de hidroperóxido, que podría ser el peróxido de hidrógeno u otra especie como hidroperóxido lipídico.



Se distribuye predominante en el citosol y en la mitocondria, la actividad de la enzima depende de la constante disponibilidad de reducción de la glutatión. La relación de reducción a oxidación de la glutatión generalmente se mantiene muy alta, como resultado de la actividad de la glutatión reductasa (*Young y Woodside, 2001*).



**Superóxido dismutasa:** cataliza la dismutación de superóxido a peróxido de hidrógeno y oxígeno:



El peróxido de hidrógeno será removido por la catalasa o la glutatión peroxidasa. Hay tres formas de distribución de la superóxido dismutasa en los tejidos animales:

- Superóxido dismutasa de Cobre y Zinc (CuZn- SOD): se encuentra en el citoplasma y orgánulos de prácticamente todas las células de los mamíferos
- Superóxido dismutasa de Manganeso (MnSOD): se encuentra en las mitocondrias de casi todas las células
- Superóxido dismutasa extracelular (ECSOD): es una secreción de CuZnSOD. EC-SOD es sintetizados por sólo unos cuantos tipos de células, incluyendo los fibroblastos y las células endoteliales, y se expresa en la superficie celular (*Young y Woodside, 2001*).

#### **b. Antioxidantes no enzimáticos**

Los sistemas antioxidantes no enzimáticos endógenos comprenden: (*Percival, 1998*)

- Proteínas intracelulares: lactoferrina y la ferritina
- Proteínas plasmáticas: transferrina, ceruloplasmina y albúmina
- Complejos organometálicos: Quelantes de hierro y cobre como la haptoglobina y hemopexina
- Péptidos de bajo peso molecular: glutatión

#### **B. Antioxidantes exógenos**

Muchas sustancias de origen vegetal, denominados en conjunto "fitonutrientes", o "fitoquímicos", son cada vez más conocido por su actividad antioxidante (*Percival, 1998*), son de bajo peso molecular provenientes de la dieta, como la vitamina C (Ácido Ascórbico), vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol),  $\beta$ -caroteno (provitamina A), flavonoides, polifenoles y algunos elementos traza (selenio, cobre, zinc y manganeso). Estos antioxidantes pueden funcionar como atrapadores o *scavengers* de radicales libres o como coenzimas y cofactores de las enzimas antioxidantes del sistema endógeno (*Percival, 1998*).

Actúan como moléculas suicidas, ya que se oxidan al neutralizar al radical libre, por lo que la reposición de ellos debe ser continua, mediante la ingestión de los nutrientes que los contienen (*Venereo, 2002*). El licopeno, en cambio, no tiene actividad pro vitamina A y corresponde a 21% de los carotenoides; su mayor fuente es el tomate. Es un gran antioxidante y se cree que tiene capacidad de reparar el ADN (*Lozada y García, 2009*).

### 2.13 CLASIFICACION SEGÚN SU MODO DE ACTUACIÓN

Los antioxidantes, tanto endógenos como exógenos, están presentes para proteger los componentes celulares del daño de los radicales libres inducidos, se dividen en tres grupos: (*Young y Woodside, 2001*). En la figura 2.4 se muestra la defensa de los antioxidantes contra los radicales libres.

#### A. Enzimas antioxidantes:

Las enzimas antioxidantes: glutatión peroxidasa y reductasa, catalasa y superóxido dismutasa metabolizan los intermediarios tóxicos oxidativos y requieren cofactores como selenio, hierro, cobre, zinc y manganeso (*Percival, 1998*), son antioxidantes endógenos.

#### B. Antioxidantes de la ruptura de la reacción en cadena:

Constituyen la segunda línea de defensa al inhibir la iniciación de la reacción en cadena y/o romper su propagación (*Pokorny et al., 2004*), los antioxidantes por ruptura de la cadena son pequeñas moléculas que pueden recibir un electrón de un radical o donar un electrón a un radical libre con la formación de un producto estable, se dividen en: (*Young y Woodside, 2001*).

##### - Antioxidantes de la ruptura de la reacción en cadena de la fase lipídica:

Estos antioxidantes atrapan los radicales en las membranas y en las partículas lipoproteicas y son cruciales en la prevención de la peroxidación

lipídica. El antioxidante de la fase lipídica más importante probablemente es la vitamina E. (*Young y Woodside, 2001*).

La vitamina E es un conjunto de compuestos fenólicos conocidos como tocoferoles y tocotrienoles (*Criado y Moya, 2009*). La  $\alpha$ -tocoferol es el más potente antioxidante de los tocoferoles y es también el más abundante en los humanos. (*Young y Woodside, 2001*).

Los carotenoides son un grupo de antioxidantes liposolubles en torno a una estructura carbona de isoprenoides. El más importante de éstos es el  $\beta$ -caroteno, aunque al menos otros 20 pueden estar presentes en las membranas y lipoproteínas. Se encuentran en muchos tejidos y pueden desempeñar un rol de prevención en la lipoperoxidación in vivo, es precursor de la vitamina A (retinol), (*Fennema, 2008*).

Los flavonoides son ubicuos en las plantas, casi todos los tejidos vegetales son capaces de sintetizarlos. Se encuentran en las frutas comestibles, verduras de hoja, raíces, tubérculos, bulbos, hierbas, especies, legumbres, té, café y vino tinto. Pueden clasificarse en siete grupos: flavonas, flavononas, flavonoles, flavononoles, isoflavonas, flavanoles (catequinas) y antocianidinas (*Fennema, 2008*).

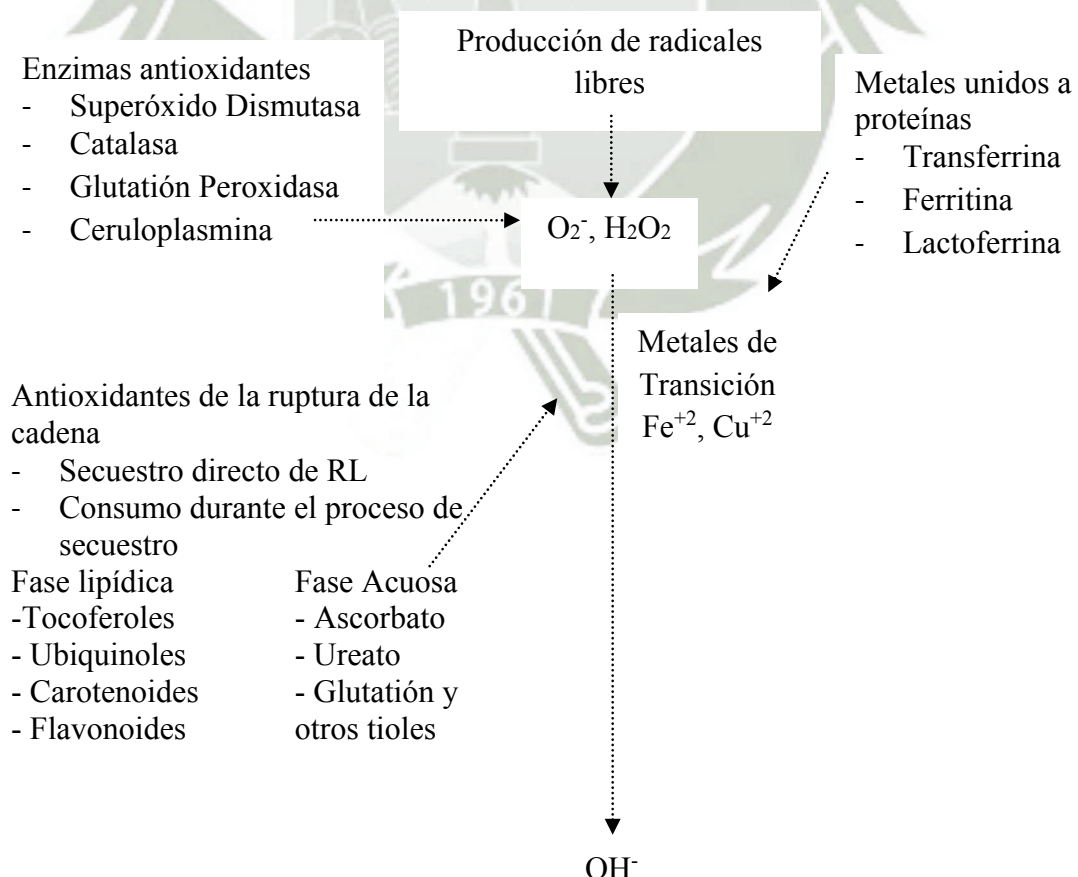
Casi todos poseen diversas propiedades biológicas y químicas comunes: (1) actividad antioxidante, (2) capacidad de desechar las especies activas de oxígeno, (3) poder de eliminación de los electrófilos, (4) la habilidad de inhibir la nitrosaturación, (5) capacidad de quelar metales como el Fe y Cu, (6) poder de producir peróxido de hidrógeno en presencia de ciertos metales, y (7) la capacidad de modular ciertas actividades enzimáticas celulares (*Fennema, 2008*).

- **Antioxidantes de la ruptura de la reacción en cadena de la fase acuosa**

Atrapan los radicales en los compartimientos acuosos. Cualitativamente es más importante es la vitamina C (Ascorbato), En humanos actúa como un cofactor esencial para la catálisis de varias enzimas en reacciones de hidroxilación, otra función importante es la ruptura de la reacción en cadena en medio acuoso, éste ha demostrado atrapar radicales y oxígeno singulete en medio acuoso. Durante su acción antioxidante, se somete a una reducción de dos electrones, en un principio al radical Semidehidroascorbil y posteriormente a dehidroascorbato. Otros antioxidantes están presentes en el plasma en altas concentraciones como el Ácido úrico, la albúmina unida a la bilirrubina y tioredoxina (*Young y Woodside, 2001*).

### C. Metales de transición unidos a proteínas

Unidos a proteínas (ferritina, transferrina, lactoferrina y ceruloplasmina) actúan como un componente crucial del sistema de defensa de antioxidantes por secuestro de hierro y cobre, para que no se encuentre disponible para impulsar la formación del radical hidroxilo (*Young y Woodside, 2001*).



**Figura 2.4: Defensa de los antioxidantes contra los radicales libres**

## 2.14 MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS ANTIOXIDANTES

Los mecanismos de acción de los antioxidantes se muestran en la Tabla N° 2.5.

**Tabla N° 2.5: Mecanismos de acción de los antioxidantes <sup>1</sup>**

<b>Tipo de antioxidante</b>	<b>Mecanismos de acción</b>	<b>Ejemplos de antioxidantes</b>
Antioxidantes propiamente dichos	Inactivando radicales libres lipídicos	Compuestos Fenólicos
Estabilizadores de hidroperóxidos	Previene la descomposición de hidroperóxidos en radicales libres	Compuestos Fenólicos
Sinergistas	Promoviendo la actividad de los antioxidantes propiamente dichos	Ácido cítrico, Ácido ascórbico
Quelantes de metales	Ligando metales pesados a compuestos inactivos	Ácido fosfórico, compuestos de Maillard, Ácido cítrico
Extinguidores de oxígeno singulete	Transformando oxígeno singulete en oxígeno triplete	Carotenos
Sustancias que reducen hidroperóxido	Reduciendo hidroperóxidos por vías no radicalarias	Proteínas y aminoácidos

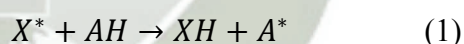
1: Antioxidantes de los alimentos. Aplicaciones prácticas, Pokorny et al., 2004.

## 2.15 CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

La capacidad antioxidante es una medida de la cantidad (en moles) de determinados radicales libres atrapados por una muestra. Las mediciones del rendimiento de la capacidad antioxidante son la cantidad de una mezcla heterogénea de antioxidantes la capacidad total o habilidad atrapadora neta de la muestra. La capacidad antioxidante de una muestra será diferente de acuerdo con los diferentes oxidantes con los que se mide. Las reacciones entre diferentes antioxidantes y oxidantes tienen diferentes velocidades constantes, y por lo tanto varía la capacidad antioxidante total. También debe tenerse en cuenta que los métodos de medición analíticos y las condiciones en que se ha producido el análisis, puede conducir a resultados variables para el mismo tipo de alimento. (*MacDonald-Wicks et al., 2006*).

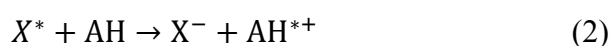
Los antioxidantes pueden desactivar los radicales principalmente por dos mecanismos:

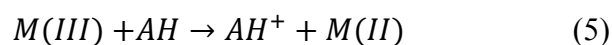
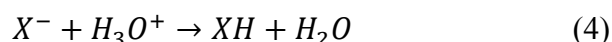
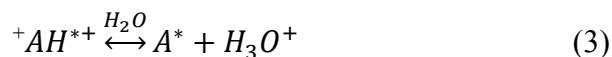
- Transferencia de átomos de hidrógeno (HAT): mide la clásica habilidad de los antioxidantes para reprimir los radicales libres por donación de hidrógeno (AH= cualquier donador de H).



Las reacciones HAT son independientes del solvente y pH y suelen ser bastante rápidas, por lo general completas en cuestión de segundos a minutos. La presencia de agentes reductores, incluyendo metales, es una complicación en los ensayos HAT y puede conducir a errores de reactividad aparentemente altos.

- Transferencia de electrones individuales (SET): detectan la habilidad de un potencial antioxidante para transferir un electrón para reducir cualquier compuesto, incluyendo metales, carbonilos y radicales.





La reactividad en los métodos SET se basa primariamente en una desprotonación y en el potencial de ionización del grupo funcional reactivo, por lo que las reacciones SET son dependientes del pH. En general, los valores IP disminuyen con el aumento del pH, lo que refleja un mayor incremento en la capacidad donadora de electrones con desprotonación. Las reacciones en los métodos SET son usualmente lentas y pueden requerir largos tiempos para completarse, los cálculos de la capacidad antioxidante se basan en el porcentaje de disminución en un producto en lugar de la cinética. Es importante destacar que las trazas de los componentes y contaminantes (en particular los metales) interfieren con los métodos SET y pueden considerar la alta variabilidad y la baja reproducibilidad y consistencia de los resultados (*Prior et al., 2005*).

## 2.16 COMPUESTOS FENÓLICOS

Son un amplio grupo de sustancias con diferentes estructuras químicas y actividad, son constituyentes importantes de las plantas y que a su vez les otorga múltiples efectos benéficos. Están presentes generalmente en forma de glucósidos en los extractos de las frutas, hierbas, vegetales, cereales y otros materiales de plantas ricos en polifenoles lo que ha permitido su utilización por la industria alimentaria no solo por las características organolépticas que le confieren a las frutas y verduras sino que retardan la oxidación de los lípidos y mejoran la calidad nutricional de los alimentos (*Muñoz y Ramos, 2007*).

Sus principales funciones en las células vegetales son las de actuar como metabolitos esenciales para el crecimiento y reproducción de las plantas, y como agentes protectores frente a la acción de patógenos, siendo secretados como mecanismo de defensa (*Butler cit. por Martínez-Valverde et al., 2000*).

Los compuestos fenólicos están relacionados con la calidad sensorial de los alimentos de origen vegetal tanto frescos como procesados (*Martínez-Valverde et al., 2000*).

Desde un punto de vista químico, los compuestos fenólicos constan de un anillo bencénico que contiene uno o diversos grupos hidroxilo. Según su estructura química, estos compuestos se pueden subdividir en flavonoides o no flavonoides, según sean o no derivados de la estructura de básica de fluoroglucinol, caracterizada por un esqueleto de 2 anillos bencénicos unidas por una cadena de 3 átomos de carbono ciclada en un heterociclo oxigenado (*Valls et al., 2000*).

Se presentan en las plantas en forma conjugada con uno o más residuos de azúcar unidos a los grupos hidroxilos, aunque en algunos casos se pueden producir uniones directas entre una molécula de azúcar y un carbono aromático. Por ello la forma más común de encontrarlos en la naturaleza es en forma de glicósidos, siendo solubles en agua y solventes orgánicos. Los azúcares asociados a los polifenoles pueden ser monosacáridos, disacáridos o incluso oligosacáridos. Los compuestos a los que se encuentran unidos con más frecuencia son: glucosa, galactosa, arabinosa, ramnosa, xilosa, y ácidos glucurónico y galacturónico. También pueden encontrarse unidos a ácidos carboxílicos, ácidos orgánicos, aminas, lípidos y a otros compuestos fenólicos (*Martínez – Valverde et al., 2000*).

Los compuestos fenólicos comprenden una gran diversidad de compuestos, como flavonoides, dentro de los cuales tenemos a las antocianinas, flavonoles, flavanoles, flavones y otros, y los no flavonoides dentro de los cuales tenemos a los ácidos fenólicos, lignina y estilbenos (*Harborne, 1989 cit. por Chirinos et al., 2008*).

## 2.17 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS

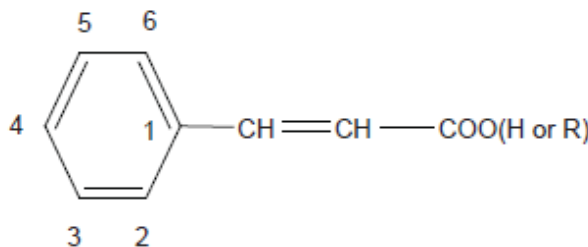
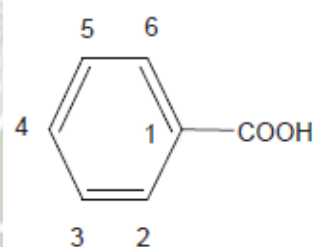
El número y la posición de grupos hidroxilo, la glicosilación y otras substituciones determinan la actividad de secuestro de radicales por los compuestos fenólicos.

Las diferencias que existen entre la actividad de secuestro de radicales están atribuidas a las diferencias estructurales de hidroxilación, glicosilación y methoxilación (*Muñoz y Ramos, 2007*).

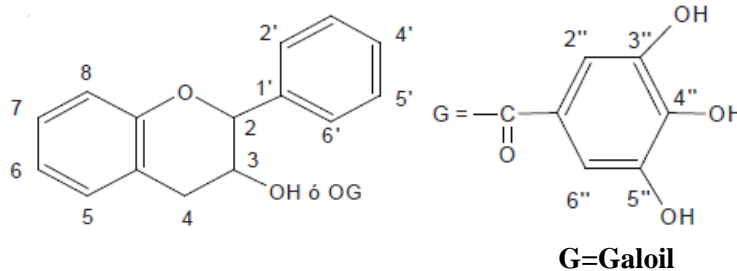
Las disposiciones estructurales que imparten la mayor actividad antioxidante son La sustitución 3' 4' orto dihidroxi en el anillo B, las disposiciones en posición meta en los carbonos 5 y 7, el doble enlace entre los carbonos 2 y en combinación con los grupos 4 ceto y 3 hidroxilo. Los grupos orto-dihidroxi estructuralmente son los más importante por presentar una alta actividad (*Muñoz y Ramos, 2007*).

En la Tabla N° 2.6, se observa la distribución de los representantes de los compuestos fenólicos.

**Tabla N° 2.6: Distribución de compuestos fenólicos y actividad antiradical<sup>1</sup>**

Componentes	Sustituyentes (OH)		Otros sustituyentes
	Posición OH	Número OH	
<b>1. Ácidos Fenólicos</b>			
			
	<b>Ácido Hidroxicinámico</b>		<b>Ácido hidroxibenzoico</b>
<b>Ácido hidroxiciamínico</b>			
-Ácido Cafeico	3,4-OH	2	R=tetrahidroxi-ciclohexano
-Ácido Clorogénico	3,4-OH	2	carboxílico
-Ácido p-cumárico	4-OH	1	3-OCH <sub>3</sub>
-Ácido ferúlico	4-OH	1	
<b>Ácido hidroxibenzoico</b>			
-Ácido Gálico	3,4,5-OH	3	
-Ácido Sirínico	4-OH	1	3,5-OCH <sub>3</sub>
-Ácido Vanílico	4-OH	1	3-OCH <sub>3</sub>

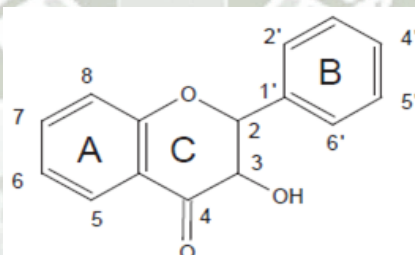
**2. Flavonoides**  
**Flavanoles**



**Flavanoles (Flavan-3-ols-)**

- (-) epigallocatequin galato (EGCG)	5,7,3',4',5',3'', 4'',5''-OH	8	3-OG( G = galoi)
- (-) epicatequin galato (ECG)	5,7,3',3'',4 ,5''-OH	7	3-OG( G = galoi)
- (-) epigallocatequina (EGC)	3,5,7,3',4',5'- OH	6	
- (-) epicatequina (EC)	3,5,7,3',4'-OH	5	
- (+) catequina (C)	3,5,7,3',4'-OH	5	

**Flavonoles**



**Componentes**

**Sustituyentes (OH)**

**Otros sustituyentes**

**Posición OH Número OH**

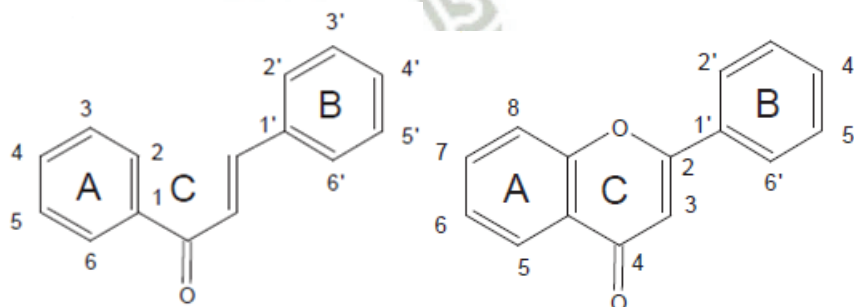
**Flavonoles**

- Miricetina	3,5,7,3', 4'5'- OH	6	
- Quercetina	3,5,7,3', 4'-OH	5	
- Morina	3,5,7,3', 4'-OH	5	
- Kaempferol	3,5,7, 4'-OH	4	
- Quercetina-3-rutinosido	5,7,3', 4'-OH	4	3-O-rutinoso

**Chalconas y Flavonas**

**Chalconas**

**Flavonas**



**Chalconas**

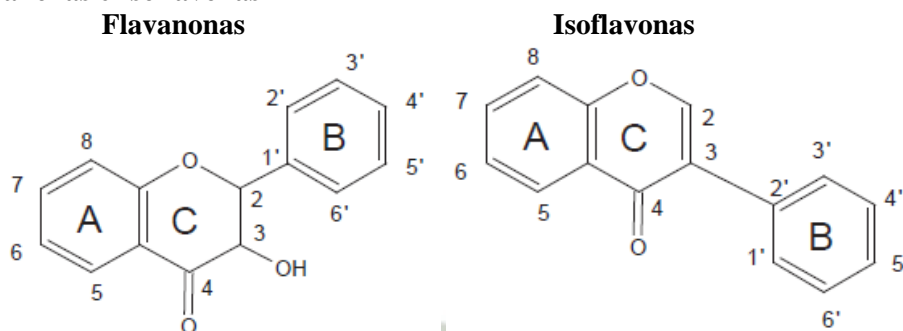
- Buteina	2,4,3',4' -OH	4	
-----------	---------------	---	--

- Floretina	2,4,6,4' -OH	4	
- Cartamina	4,5,4' -OH	3	6-O- glucosa

**Flavonas**

- Luteolina	5,7,3',4' -OH	4	
- Baicaleína	5,6,7-OH	3	
- Apigenina	5,7,4' -OH	3	

**Flavanonas e Isoflavonas**



**Flavanonas**

- Naringenina	5,7,4'-OH	3	4'-OCH <sub>3</sub>
- Hesperetina	5,7,3'-OH	3	7-O-rutinosido
- Naringenina-7- rutinosido	5,4'-OH	2	7-O-rutinosido, 4'- OCH <sub>3</sub>
- Hesperetina-7- rutinosido	5,3'-OH	2	

**Isoflavonas**

- Genisteína	5,7,4'-OH	3	
- Daidzeína	7,4'-OH	2	
- Gliciteína	7,4'-OH	2	6-OCH <sub>3</sub>
- Genisteína-7-glucósido	5,4'-OH	2	7-O-glucosa

**Componentes**

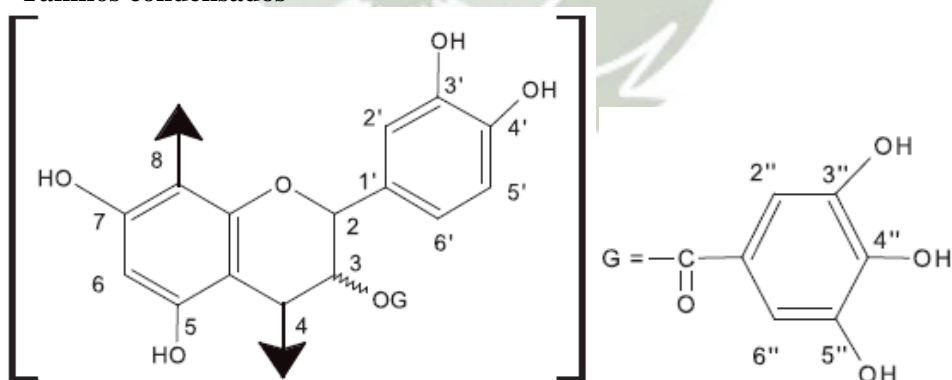
**Sustituyentes (OH)**

**Otros sustituyentes**

Posición OH      Número OH

**3. Taninos**

**Taninos condensados**

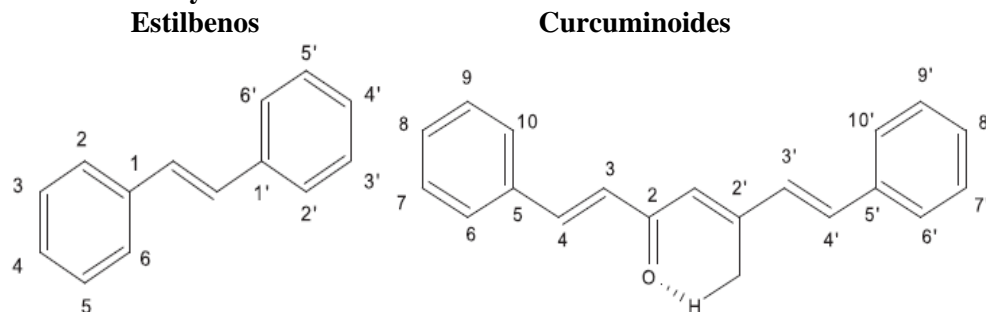


G=Galoiil

- Catequina (monómero)	3-o-galato	5,7,3',4',3'',4'',5' '-OH (n=1)	7*n=7	3-OG( G = galoiil)
- Procianidina (dímero)	B-1	3, 5,7,3',4'-OH (n=2)	5*n=10	3-OG( G = galoiil)
			7*n=14	

- Procianidina digalato (dímero)	B-2	5,7,3',4',3'',4'',5' '-OH (n=2)	5*n=15
- Procianidina (trímero)	C-1	3, 5,7,3',4''-OH (n=3)	

#### 4. Estilbenos y curcuminoides



##### Stilbenos

- Piceatanol	3,5, 3', 4'-OH	4	
- Resveratrol	3,5,4'-OH	3	
- Piceatanol-3'-glucósido	3,5,4'-OH	3	3'-O-glucosa
- Resveratrol-3'-glucósido	5,4'-OH	2	3'-O-glucosa

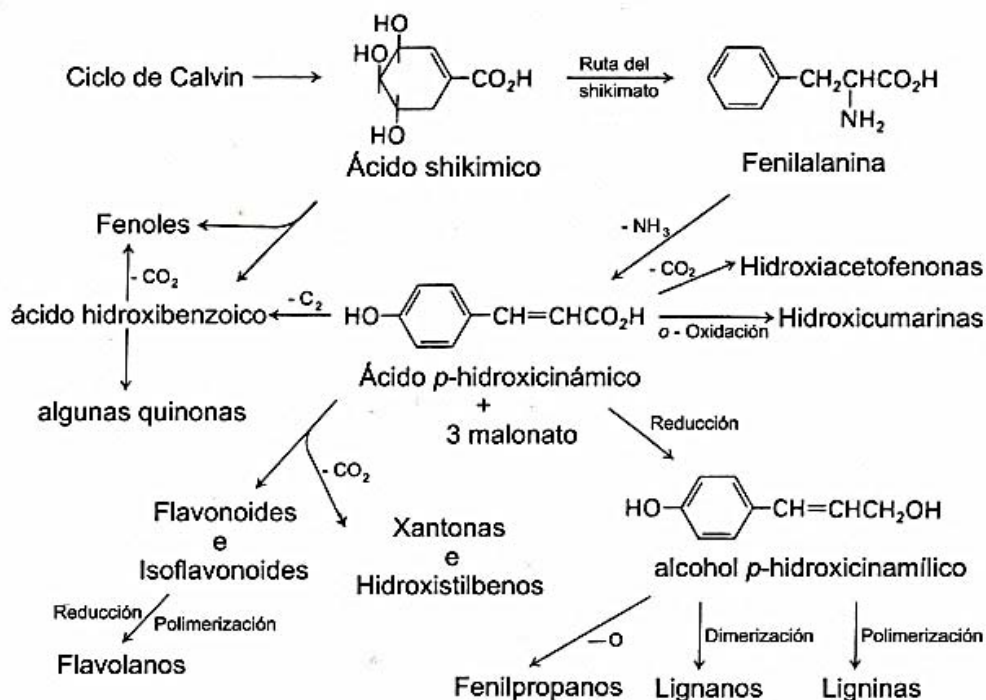
##### Curcuminoides

- Curcumina	8,8'-OH	2	7,7-OCH <sub>3</sub>
- Demetoxicurcumina	8,8'-OH	2	7'-OCH <sub>3</sub>
- Bisdemetoxicurcumina	8,8'-OH	2	

1: Componentes Fenólicos de la dieta y sus propiedades medicinales. Muñoz y Ramos, 2007

## 2.18 BIOSÍNTESIS DE COMPUESTOS FENÓLICOS

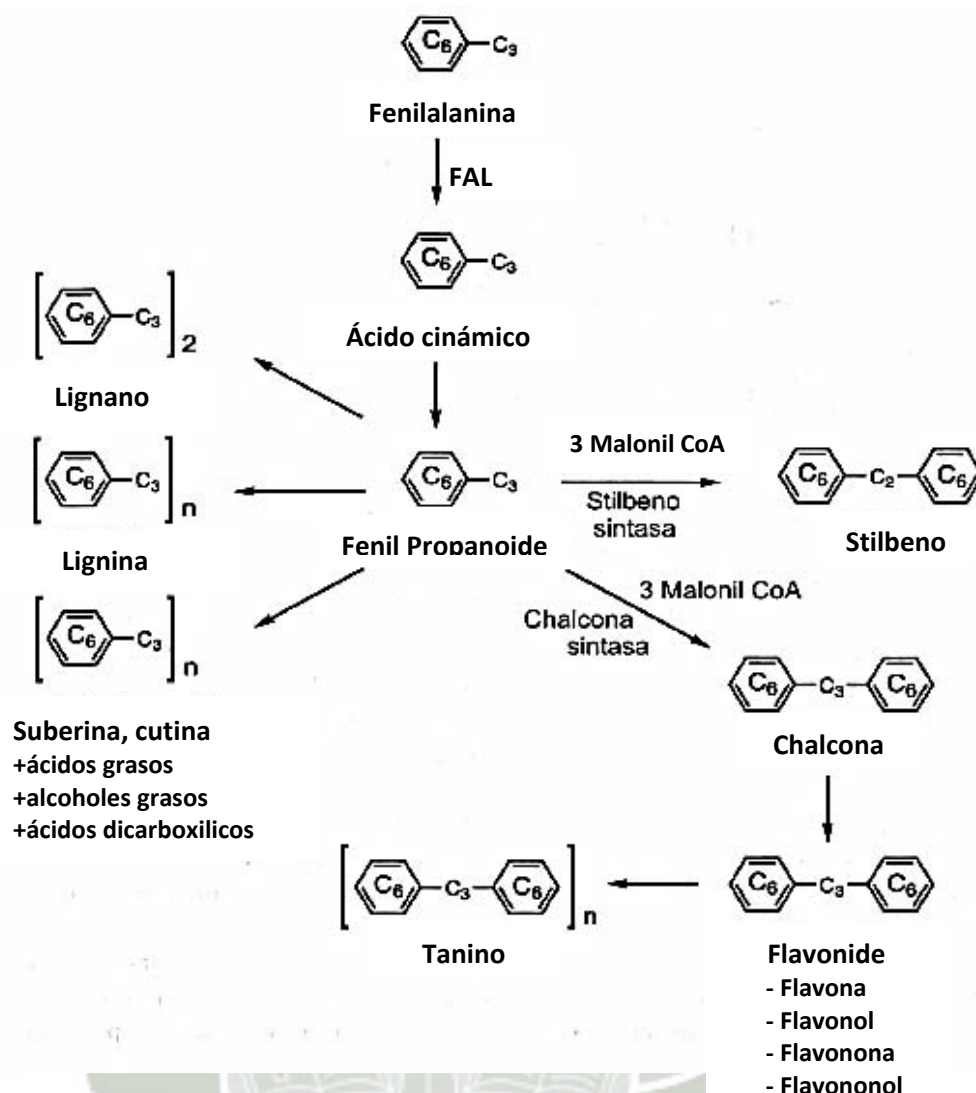
Estos compuestos fenólicos se sintetizan a partir de dos principales rutas metabólicas: la ruta del shikimato la cual origina directamente fenilpropanoides como los ácidos hidroxicinámicos (Figura 2.5 y Figura 2.6); y la ruta del acetato, la cual produce fenoles simples y algunas quinonas (*Decker, 1997, cit. Por harborne 1989*).



**Figura 2.5: Biosíntesis de los compuestos fenólicos a partir de la vía del shikimato y fenilalanina (Fuente; Harborne, 1989, cit. por Chirinos et al., 2008)**

El grupo más importante de los compuestos fenólicos son los flavonoides, incluyendo flavonas, isoflavonas y antocianidinas, las que se forman vía condensación del fenilpropano (C6 – C3), con la participación de 3 moléculas de malonil coenzima A, la cual permite la formación de chalconas, que posteriormente se ciclan en condiciones ácidas. Por lo que los flavonoides tienen la estructura básica de los difenilpropanoides (C6 – C3 – C6) que consiste en dos anillos aromáticos unidos a 3 carbonos que forman un anillo heterocíclico oxigenado. El estado oxidativo de esta cadena de 3 carbonos, determinan las diferentes clases de flavonoides.

Los flavonoides incluyen antocianinas (glucósidos ó acilglucósidos de las antocianidinas), flavanoles (catequinas), flavonoles, flavonas, isoflavonas, flavononoles y sus derivados.



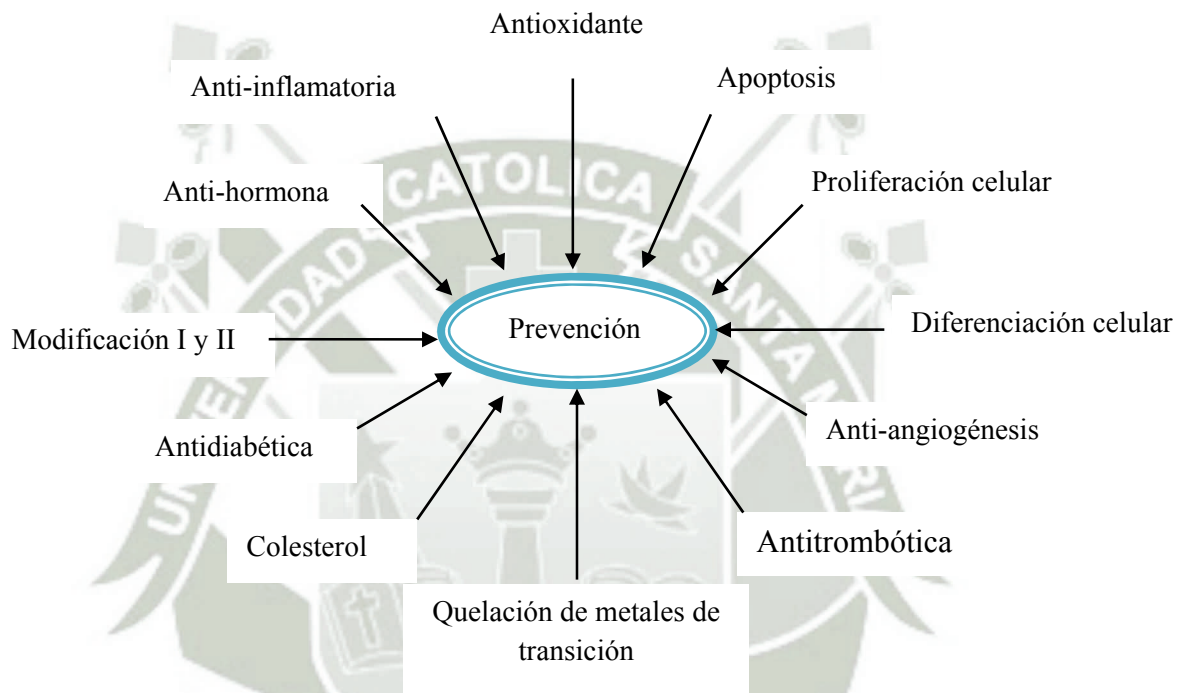
**Figura 2.6: Formación de fenilpropanoides, estilbenos, lignanos, ligninas, suberinas, cutinas, flavonoides y taninos a partir de la fenilalanina. FAL: Fenilalanina amonio liasa. (Fuente: *Shahidi y Naczk 2004.*)**

## 2.19 EFECTOS DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS

La característica principal de los compuestos fenólicos es su habilidad para bloquear la acción de enzimas específicas que causan inflamación, modifican los pasos metabólicos de las prostaglandinas y por lo tanto protegen la aglomeración de plaquetas, inhiben la activación de carcinógenos, son antioxidantes y como tales atrapan radicales libres, y previenen que éstos se unan y dañen las moléculas de DNA, un paso crítico en la iniciación de procesos carcinogénicos, previenen la peroxidación de lípidos, los cuales, siendo radicales libres pueden causar daño

estructural a las células normales. El daño estructural en las membranas de las células normales interfiere con el transporte de moléculas a través de éstas afectando el crecimiento y proliferación celular (*Chasquibol et al., 2003*).

El efecto preventivo atribuido a los polifenoles es amplio, son relevantes para la prevención de cánceres en etapas de iniciación, progresión y promoción. En la figura 2.7, se muestra los efectos preventivos de los componentes naturales.



**Figura 2.7: Mecanismos de preventivos de los polifenoles (Muñoz y Ramos, 2007)**

## CAPÍTULO III

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 LUGAR DE EJECUCIÓN

Este trabajo de investigación se desarrolló en el laboratorio pabellón H – 204, de las instalaciones de la Universidad Católica de Santa María de la ciudad de Arequipa – Perú.

#### 3.2 MATERIALES

##### 3.2.1 Material de Laboratorio

- Fiolas de 25 ml.
- Pipetas graduadas de 0.5, 1.
- Pipetas volumétricas de 5 y 10 ml.
- Probeta graduada de 100 ml.
- Vasos de precipitación 250 y 500 ml.
- Erlenmeyer de 100 y 250 ml.
- Balón de 500 ml.
- Tubo refrigerante.
- Embudo.
- Papel filtro.
- Papel aluminio.
- Propipeta.
- Espátula.
- Bagueta.
- Soporte universal.
- Pinzas.
- Frascos de vidrio ámbar con tapa rosca.

### 3.2.2 Reactivos

- Ácido gálico (Sigma).
- Carbonato de sodio (Sigma).
- Reactivo de fenol según *Folin - Ciocalteu* (Merck).
- Etanol 96% (Delta Química).
- Acetato de amonio (Merck).
- Neocuproína (Merck).
- Cloruro de cobre II (Merck).
- Ácido ascórbico (Sigma).

### 3.2.3 Equipos

- Espectrofotómetro UV – 1700 (*Shimadzu*).
- Balanza analítica PA214 (*Ohaus*).
- Rotavapor R – 114 (*Buchi*).
- Incubadora 516 G (*Fisher Scientific*)
- Cocina Eléctrica.
- pHmetro 827 pHLab (*Metrohm*)

## 3.3 MÉTODOS

### 3.3.1 Caracterización de las muestras

Se seleccionó aquellos productos que se expenden en todos los centros comerciales, siendo estos los más consumidos, productos nacionales como internacionales, de esta manera se elaboró una galería de imágenes con la descripción de cada una de las muestras los cuales se observan en la Tabla N° 4.1, donde se tomó los siguientes puntos.

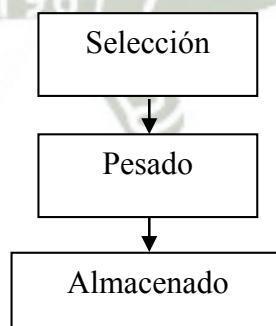
- Descripción: se realizó mediante el número de muestras, nombre del producto, imagen del producto.

- Número: Se copió el número de lote de cada caja.
- Unidades: Se contó el total de sobres por caja.
- Peso: Se anotó de cada una de las cajas.
- Presentación: Se describió a cada muestra.

### 3.3.2 Preparación de la muestra

Para realizar los análisis posteriores, se acondicionó las muestras según el diagrama de flujo de las operaciones que se muestran en la figura 3.1. Las operaciones se describen a continuación:

- Selección:** Se seleccionaron los sobres por separado según la marca comercial.
- Pesado:** Se pesó los sobres para verificar si contenían el indicado en el rotulo de presentación.
- Almacenado:** Se almacenaron a temperatura ambiente hasta su empleo en la preparación de extractos.



**Figura 3.1: Diagrama de flujo de la preparación de muestras**

### 3.3.3 Preparación de extracto para la determinación de Compuestos Fenólicos Totales y determinación de la capacidad antioxidante

Se preparó extracto acuoso y etanólico para la determinación de los compuestos fenólicos totales y extracto etanólico para la determinación de la capacidad antioxidante. Se realizó la extracción mediante el Método de Reflujo, Se pesó 2 sobres por muestra y se colocó en un matraz de 250 ml, donde se adiciono para el extracto acuoso 100 ml de agua destilada, para el extracto etanólico 100 ml de etanol al 96 %, luego se procedió a calentar por 3 horas. Transcurrido el tiempo de extracción se procedió a filtrar para ser llevado al rotavapor hasta concentrar la muestra a 50 ml. las imágenes se observa en el Anexo I.

### 3.3.4 Determinación de compuestos fenólicos totales

El método de *Folin-Ciocalteu* fue originalmente destinado a analizar las proteínas, aprovechándose del grupo fenol de la tirosina. *Singleton y Rossi* (1965) ampliaron este trabajo para medir fenoles totales en el vino (*MacDonald-Wicks et al., 2006*), basándose en la reducción de un complejo fosfotungstenico - fosfomolibdico por los fenoles a un producto de coloración azul (*Prior et al., 2005; Salluca et al., 2008*), bajo condiciones básicas (*Huang et al., 2005*).

En este tipo de reacción ocurre un mecanismo de transferencia de electrones debido a que la disociación de un protón fenólicos conduce a un anión fenolato, que es capaz de reducir el reactivo de *Folin-Ciocalteu*. (*Huang et al., 2005; MacDonald-Wicks et al., 2006*). Para este análisis se empleó ácido gálico como un estándar (*Chirinos et al., 2008, cit. Harborne 1989*).

#### a. Curva de calibración

Se disolvió 500 mg de ácido gálico (estándar) en 10 ml de etanol, luego se llevó a un volumen de 100 ml; de esta solución se tomaron alícuotas de 0, 1, 2, 3, 5 y 10 ml las que fueron llevadas a un volumen de 100 ml.

De cada una de estas soluciones se tomaron alícuotas de 0.25 ml y fueron adicionadas a fiolas de 25 ml se mezclaron con 19.75 ml de agua destilada y 1.25 ml de reactivo de fenol *Folin - Ciocalteu*, para luego ser homogenizadas. Después de 5 minutos se adicionaron 3.75 ml de una solución de carbonato de sodio al 20 % obteniéndose concentraciones de  $3.97 \times 10^{-6}$  M,  $7.34 \times 10^{-6}$  M,  $1.19 \times 10^{-5}$  M,  $1.99 \times 10^{-5}$  M y  $3.97 \times 10^{-5}$  M, el esquema del procedimiento se observa en la Tabla N° 3.1.

Las soluciones se llevaron a una temperatura de  $40^{\circ}$  C por 30 minutos antes de leer la absorbancia contra un blanco a 765 nm.

La curva estándar para el método de *Folin-Ciocalteu*, fue elaborada una sola vez para todas las corridas que se hizo, para lo cual se preparó una solución madre de Ácido Gálico.

**Tabla N° 3.1: Esquema del procedimiento**

	blanco	Std 1	Std 2	Std 3	Std 4	Std 5
<b>Solución patrón de ac. Gálico (ml)</b>	-	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
<b>Agua destilada (ml)</b>	19.75	19.75	19.75	19.75	19.75	19.75
<b>Reactivo de fenol según <i>Folin - Ciocalteu</i> (ml)</b>	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25
<b>Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (ml)</b>	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75

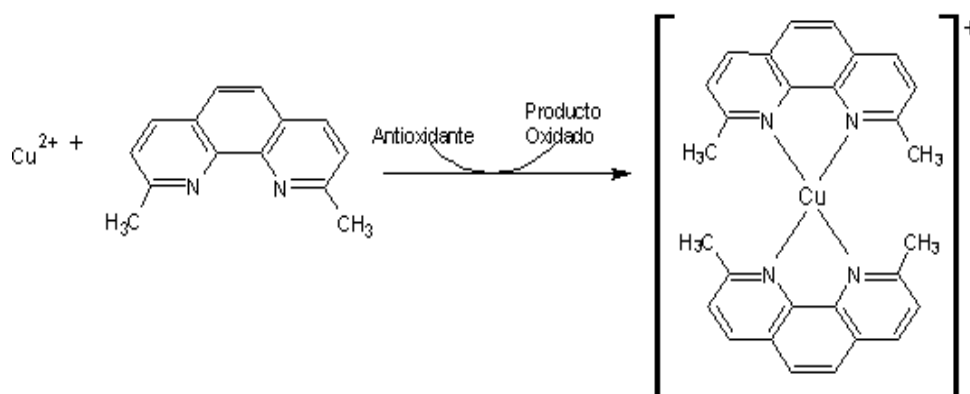
#### **b. Ensayo con los extractos etanólico y acuoso**

Para el tratamiento de las muestras se tomaron 2 ml de los extractos y se llevaron a un volumen de 50 ml de estas soluciones se tomaron alícuotas de 0.25 ml a las que se adicionaron 19.75 ml de agua destilada y 1.25 ml de reactivo de fenol *Folin – Ciocalteu*. Luego de homogenizar y dejar en reposo las soluciones durante 5 minutos, se agregaron 3.75 ml de carbonato de sodio al 20 %. Estas fueron leídas en el espectrofotómetro contra un blanco a 765 nm previa exposición a una temperatura de 40° C por 30 minutos.

### 3.3.5 Determinación de la capacidad antioxidante

Existen diversos métodos que permiten evaluar la capacidad antioxidante de muestras naturales o sintéticas. Se ha elegido el método de CUPRAC (*Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity*) (*Cadenas, Packer, Handbook of Antioxidants, USA et al., 2002*).

Este método utiliza el  $\text{Cu}^{+2}$  y la Neocuproína para reaccionar con el compuesto en estudio formando un quelato coloreado de  $\text{Cu}^{+1}$ :  $[\text{Cu} - \text{Nc}_2]^{+1}$ , el cual es soluble en agua y en medios orgánicos. Esta relación se lleva a cabo a pH 7, controlado por el buffer acetato de amonio. El quelato formado con el cobre reducido es medido a 450 nm Normalmente, la formación de este complejo se completa en 30 minutos. Sin embargo, antioxidantes de reacción lenta necesitan de incubación a temperatura elevada para completar su oxidación (50° C por 20 minutos).



**Figura 3.2: Mecanismo de acción del método CUPRAC (Apak R., et al, 2007)**

El método de CUPRAC presenta ventajas sobre otros métodos para evaluar la capacidad antioxidante:

- El reactivo CUPRAC es lo suficientemente rápido para oxidar antioxidantes que otros métodos no detectan, como son los antioxidantes que poseen grupos Tiol.
- El reactivo CUPRAC usado para la lectura de los resultados está disponible en la mayoría de laboratorios.
- La reacción redox que da lugar al complejo coloreado de  $\text{Cu}^{+1}$  es relativamente insensible a parámetros adversos como el aire, luz solar, tipo de solvente y pH, los cuales afectan a reactivos como DPPH.
- Las gráficas de concentración vs. absorbancias del método CUPRAC son perfectamente lineales dentro de un amplio rango de concentración, a diferencia de otros métodos que generan curvas polinomiales.
- Los valores de Actividad Antioxidante Total (TAC) encontrados por el CUPRAC son perfectamente aditivos. Por ejemplo: la TAC de una mezcla polifenólica es igual a la suma de la TAC de sus constituyentes fenólicos.
- Este método involucra una mínima preparación de muestras, por lo que el procedimiento experimental es flexible para la automatización.
- La reacción redox se lleva a cabo con un pH cercano al fisiológico y a los protones liberados son tamponados por el buffer acetato de amonio.
- El método puede medir simultáneamente antioxidantes hidrofílicos y lipofílicos.

- Dado que el ion  $\text{Cu}^{+1}$  producido como producto de la reacción redox está en estado quelado ( $\text{Cu}^{+1}\text{-Nc}$ ), no puede actuar como un pro-oxidante, por lo tanto no se podría producir un error negativo en la determinación antioxidante por efectos del  $\text{Cu}^{+1}$ . (*Apak R., et al, 2007*).

**a. Reactivos a preparar**

- Cloruro de cobre dihidratado: Solución  $1 \times 10^{-2}$  M en agua.
- Neocuproína: Solución  $7.5 \times 10^{-3}$  M en etanol.
- Acetato de amonio: Solución buffer 1M a pH 7.
- Ácido ascórbico: Solución Stock  $2.0 \times 10^{-3}$  M en etanol.

**b. Curva de calibración**

Se dispuso un grupo de 5 tubos a los cuales se les añadió cada uno de las siguientes soluciones en el orden a mencionar, 2 ml. de buffer acetato de amonio, 2ml. de neocuproína, 2 ml. de  $\text{CuCl}_2$ , ácido ascórbico 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, con excepción del blanco, agua destilada 4.0, 3.5, 3.0, 2.0, 1.0, excepto al tubo número 5 (se observa en la Tabla N° 3.2). Posteriormente fueron mezcladas y dejadas en reposo a temperatura ambiente por 30 minutos en oscuridad, y fueron leídas en el espectrofotómetro a 450 nm.

**Tabla N° 3.2: Esquema del procedimiento**

	blanco	Std 1	Std 2	Std 3	Std 4	Std 5
<b>Buffer Acetato (ml.)</b>	2	2	2	2	2	2
<b>Neocuproína (ml.)</b>	2	2	2	2	2	2
<b><math>\text{CuCl}_2</math> (ml.)</b>	2	2	2	2	2	2
<b>Ácido Ascórbico (ml.)</b>	-	0.5	1.0	2.0	3.0	4.0

Agua Destilada (ml.)	4	3.5	3.0	2.0	1.0	-
----------------------	---	-----	-----	-----	-----	---

---

### c. Ensayo con el extracto

Para proceder a determinar la capacidad antioxidante de las muestras se hizo el mismo procedimiento de la Tabla N° 3.2, donde en lugar de adicionar ácido ascórbico se utiliza el extracto de la muestra. Estas fueron leídas en el espectrofotómetro contra un blanco a 450 nm previa exposición a una temperatura ambiente y en oscuridad por 30 minutos.

### 3.3.6 Protocolo de validación del método analítico

- **Límite de detección y límite de cuantificación:**

El límite de detección es la cantidad más pequeña de analito en una muestra que puede ser detectada por una única medición, con un nivel de confianza determinado, pero no necesariamente cuantificada con un valor exacto. Es comúnmente expresado como concentración del analito (*Huber L., 2007*).

El límite de cuantificación es la cantidad más pequeña del analito en una muestra que puede ser cuantitativamente determinada con exactitud aceptable. Es un parámetro del análisis cuantitativo para niveles bajos de compuestos en matrices de muestra y se usa particularmente para impurezas y productos de degradación. Se expresa como concentración del analito (*Huber L., 2007*).

Los límites de detección y cuantificación también pueden estimarse a partir de la curva de regresión, por extrapolación a concentración cero, así (*Eurachem Guide, 1998*).

- Se determina la pendiente de la curva de calibración (concentración vs respuesta) en el rango apropiado:  $b$
- Se extrapola la respuesta a concentración cero, obteniéndose un estimado de la respuesta del blanco:  $Y_{bl}$ .
- Se determina la desviación estándar correspondiente a cada concentración, se calcula la recta correspondiente a concentración vs  $S$  y se extrapola la desviación estándar a concentración cero, obteniéndose el estimado  $S_{bl}$ , correspondiente a la desviación estándar del blanco.

Se calcula el límite de detección (3 desviaciones estándar del blanco) y el límite de cuantificación (10 desviaciones estándar del blanco) para  $n'$  medidas individuales, utilizando las ecuaciones 3.1 y 3.2 respectivamente (Huber L., 2007):

$$\text{Límite de Detección} = \frac{Y_{bl} + 3 S_{bl}}{b} \times \frac{1}{\sqrt{n^1}} \quad (\text{Ecuación 3.1})$$

$$\text{Límite de Cuantificación} = \frac{Y_{bl} + 10 S_{bl}}{b} \times \frac{1}{\sqrt{n^1}} \quad (\text{Ecuación 3.2})$$

### 3.3.7 Análisis estadístico

Los datos fueron presentados como promedios con sus desviaciones estándar respectivas correspondientes a tres repeticiones por muestra. Los análisis estadísticos se hicieron en el programa StatGraphics, y el Microsoft Excel.

Para evaluar las semejanzas y diferencias del contenido de fenoles totales se comparó sus medidas estadísticas para ver la distribución de los datos, para comprobar si las diferencias son o no significativas, mediante ANOVA y método de Fisher (LSD). Para determinar la diferencia entre el extracto acuoso y etanólico se evaluó estadísticamente por el método de  $t$  student para dos muestras independientes.

- El análisis de la varianza (ANOVA), es una técnica estadística de contraste de hipótesis, donde usa las varianzas para evaluar la significación separando, por un lado, la varianza entre muestras y por otro lado, la varianza al interior de las muestras. ANOVA decide o determina si las diferencias que existen entre las medias de tres o más grupos (niveles de clasificación) son estadísticamente significativas (**Rubio Hurtado, M. J. y Berlanga Silvente, V. 2012**).

Cuando el análisis de varianza (ANOVA) indica la existencia de una diferencia significativa, se desea conocer cuál de los pares de medias causa la diferencia. Cuando las muestras son de igual tamaño la Diferencia Significativa Mínima (DSM) de Fisher nos ayuda a localizar esta fuente (**Rubio Hurtado, M. J. y Berlanga Silvente, V. 2012**).

- La mínima diferencia significativa (LSD). Es la diferencia entre dos medias, basadas en la prueba  $t$  de Student, empleando el valor de la varianza del error, donde se realiza las comparaciones de modo simultáneo y consigue detectar diferencias más pequeñas (**Rubio Hurtado, M. J. y Berlanga Silvente, V. 2012**).
- La prueba  $t$  de student se usa para la determinación de las diferencias entre dos medias muestrales y para la construcción del intervalo de confianza para la diferencia entre medias de dos poblaciones cuando se desconoce la desviación típica de una población y esta debe ser

estimada a partir de los datos de una muestra (*Rubio Hurtado, M. J. y Berlanga Silvente, V. 2012*).

## CAPÍTULO IV

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 4.1 CARACTERIZACIÓN DE LAS MUESTRAS

##### a. Descripción de las muestras

Se trabajó con 5 productos de diferentes marcas comerciales de té verde, seleccionando los productos que se expenden en todos los centros comerciales, los cuales serían los más usados, donde 4 productos son de procedencia nacional y 1 producto de procedencia internacional (Chile).

Se elaboró una galería (Tabla N° 4.1) con imágenes y se describe los principales rasgos físicos apreciables de los 5 productos de las diferentes marcas comerciales de té verde, que son: el nombre comercial, el número de lote, la cantidad por envase, el peso que se halla rotulado en el envase, y la presentación del producto.

**Tabla N° 4.1: Descripción del té verde (*Camellia sinensis*)**

Nº	Nombre	Imagen	Nº de lote	Unidades	Peso (por sobre)	Presentación
1	HORNIMANS		950513	25	1.2g	Sobre filtrante
2	SCHAGREEN		100712	25	1.5g	Sobre filtrante
3	SUNKA		077131	21	1.5g	Sobre filtrante
4	WAWASANA		113255	21	1.5g	Sobre filtrante
5	LIPTON (Chile)		260912	20	2g	Sobre filtrante

El contenido de té verde rotulado en cada envase muestra diferencias según la marca comercial, donde el té verde de la marca Lipton posee más contenido de producto, rotulando 2 g por sobre filtrante, el té verde de la marca Hornimans posee menos contenido de producto, rotulando en su envase 1.2 g por sobre filtrante y las demás marcas comerciales de té verde rotulan en su envase el contenido de 1.5 g por sobre filtrante.

Es así que el té verde de la marca Lipton posee presentación agradable tanto en el envase como en el sobre filtrante.

#### **b. Preparación de extractos del té verde**

El contenido de antioxidantes, no puede ser cuantificado en sólido, por ello es necesario transferir estos compuestos presentes a una fase acuosa donde sea más fácil determinarlo, es así que se realizó la elaboración de los extractos.

Al preparar los extractos de cada una de las marcas comerciales de té verde, se utilizó dos sobres filtrantes, se procedió a pesar cada una de ellas (Tabla N° 4.2), para poder comparar si posee la misma cantidad que indica el rotulo de cada envase, donde nos dio:

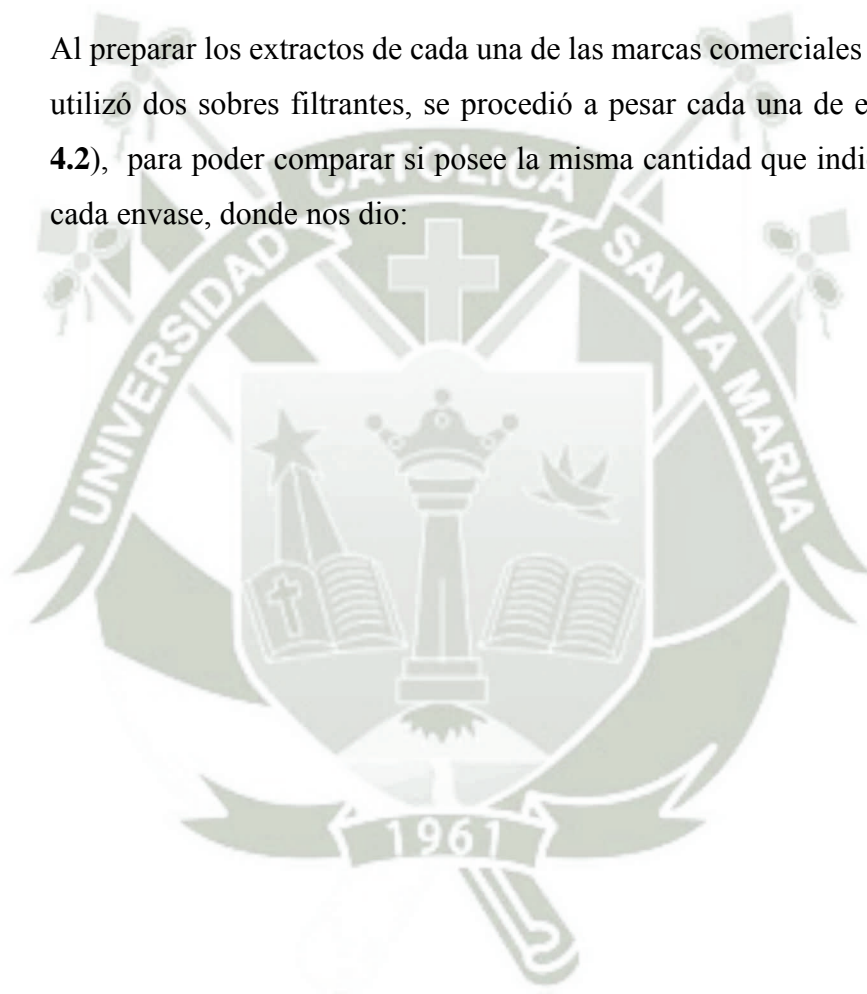


Tabla N° 4.2: Peso de sobres filtrantes de té verde

Muestra	Peso de sobre Rotulado por envase (g)	Peso 2 sobres, para Extracto Acuoso (g)	Peso 2 sobres, para Extracto Etanólico (g)
HORNIMANS	1.2	2.2	2.1
SCHAGREEN	1.5	2.65	2.67
SUNKA	1.5	2.68	2.65
WAWASANA	1.5	2.70	2.65
LIPTON	2.0	3.54	3.52

El contenido de té verde pesado por marca comercial tiene diferencia a la indicada en el rotulado de cada envase, tomando en cuenta dos sobres filtrantes, donde el contenido de té verde por marca comercial no es el adecuado, no coincide con el peso indicado en el rotulo de cada envase.

Para continuar con la extracción se analizó primeramente el modo de consumo, y el uso del solvente orgánico, debido a que es muy usado como filtrante reposando en agua hervida, se realizó la extracción acuosa como primer alternativa, luego se prosiguió a extraer con un solvente orgánico se escogió el etanol, debido a que es ampliamente usado en los diferentes procesos de extracción de compuestos fenólicos en diversas plantas, (*Campos et al., 2007*).

Se preparó extracción acuosa y etanólica para la determinación de los compuestos fenólicos totales y extracción etanólica para la determinación de la capacidad antioxidante mediante el método de reflujo, utilizando el contenido de dos sobres, se llevó a un Matraz de 250 ml, añadiendo 100 ml. agua destilada, de igual manera se hizo con etanol al 96 %, se filtró y se llevó a concentración de 50 ml. por cada marca comercial.

Los extractos obtenidos dieron un color verde oscuro, donde el té verde de la marca Lipton dio un color verde oscuro más intenso en ambas extracciones (acuoso y etanólico), el aroma de los extractos acuosos es característico y propio del té con la diferencia de los extractos etanólicos que emanan muy fuerte el aroma característico del alcohol acompañado del aroma característico y propio del té. Las características de los otros productos comerciales fueron similares, con una variación de color imperceptible del verde oscuro.

#### 4.2 DETERMINACIÓN DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES

Para la determinación de compuestos fenólicos totales por el método de *Folin-Ciocalteu* se preparó la solución de carbonato de sodio 20 %: Se pesó 20 g de carbonato de sodio y se disolvió en 100 ml de agua destilada.

El resumen de los resultados de datos para la cuantificación de fenoles por el método de *Folin-Ciocalteu* se observan en la Tabla N° 4.3.

- **Determinación de los límites de detección y cuantificación**

Se realizó una curva de calibración por triplicado, siguiendo el esquema de procedimiento de la Tabla N° 3.1.

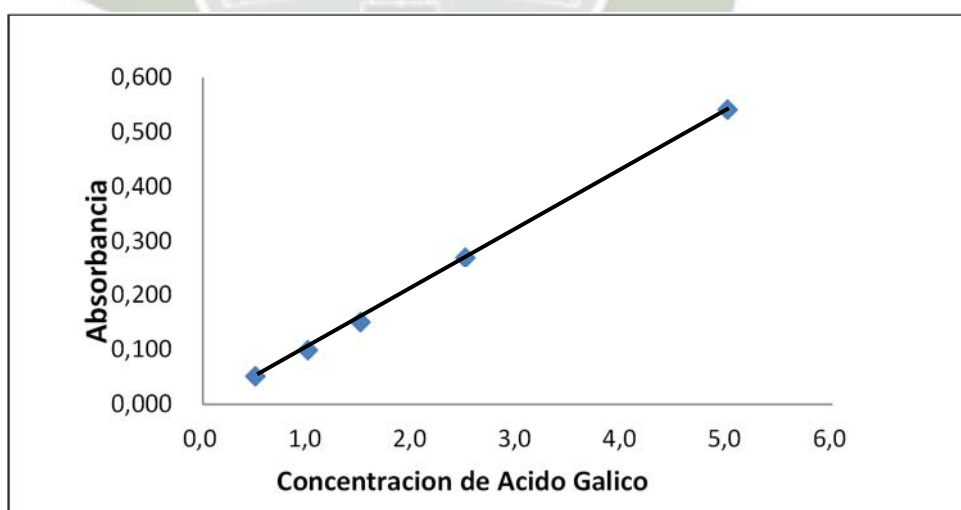
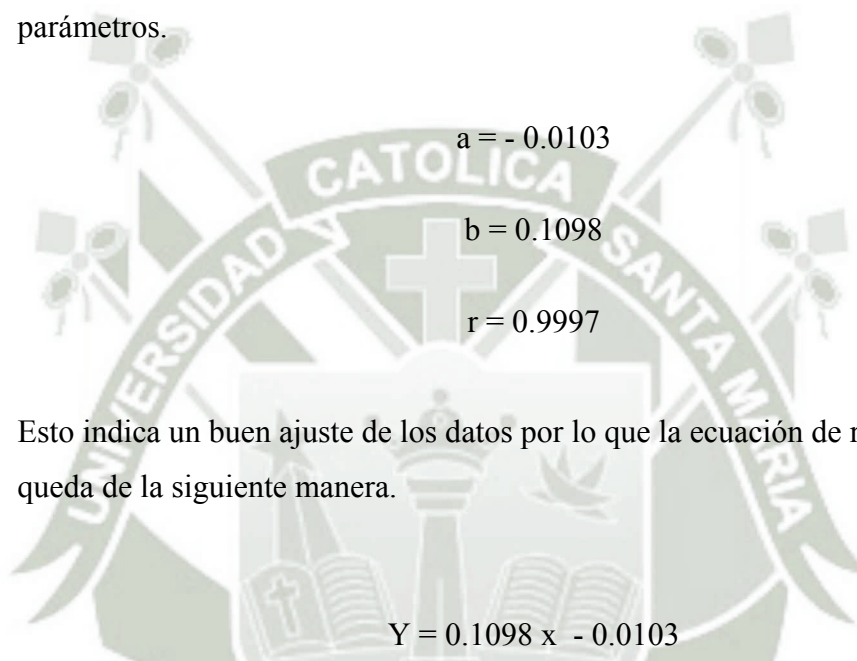
De las absorbancias por triplicado se elaboró el promedio y la desviación estándar (Tabla N° 4.3) para poder determinar los límites de detección y de cuantificación.

**Tabla N° 4.3: Resumen de datos para la cuantificación de fenoles totales**

St.	CC. (ppm)	Abs. 1	Abs. 2	Abs. 3	Promedio	Desv. Estándar
-----	--------------	--------	--------	--------	----------	-------------------

1	0.50	0.054	0.054	0.044	0.0506	0.00577
2	1.0	0.103	0.103	0.090	0.0986	0.00750
3	1.5	0.145	0.155	0.151	0.1503	0.00503
4	2.5	0.250	0.271	0.260	0.2603	0.01001
5	5.0	0.560	0.555	0.510	0.5416	0.02753

Estos datos al ser graficados (Figura 4.1) y luego procesados en Microsoft Excel utilizando el método de los mínimos cuadrados se obtienen los siguientes parámetros.



**Figura 4.1: Curva de calibración para la determinación de los límites de detección y cuantificación de fenoles totales.**

Para la determinación de los Límites de Detección y Cuantificación se procedió como sigue:

Cálculo de la respuesta a la concentración 0:

$$Y = 0.1098 (0) - 0.0103$$

$$\text{Entonces } y_{bl} = 0.0103$$

Cálculo de la desviación estándar de la absorbancia a la concentración 0:

$$a = 0.00076$$

$$b = 0.00500$$

$$y = 0.00500 (0) + 0.00076$$

$$\text{Entonces } S_{bl} = 0.00076$$

Límite de detección para fenoles totales:

$$LDD = \frac{Y_{bl} + 3 S_{bl}}{b} \times \frac{1}{\sqrt{n^1}}$$

$$LDD = \frac{0.0103 + (3 \times 0.00076)}{0.1098} \times \frac{1}{\sqrt{5}} = 0.051 \text{ ppm}$$

Límite de cuantificación para fenoles totales:

$$LDQ = \frac{Y_{bl} + 10 S_{bl}}{b} \times \frac{1}{\sqrt{n^1}}$$

$$LDQ = \frac{0.0103 + (10 \times 0.00076)}{0.1098} \times \frac{1}{\sqrt{5}} = 0.072 \text{ ppm}$$

La curva de calibración obtenida para la cuantificación de fenoles totales muestra un límite de detección de 0.051 ppm y un límite de cuantificación de 0.072 ppm, lo que indica que los valores por debajo de estas concentraciones no son detectables ni cuantificables con el método utilizado.

El extracto acuoso y etanólico de té verde se trabajó por triplicado por cada una de las marcas comerciales, donde se utilizó para hallar la concentración de fenoles totales las absorbancias por triplicado usando la ecuación de la recta, se muestran en la Tabla N° 4.4 y 4.5.

El cuadro general de absorbancias de las muestras se encuentra en el Anexo II.

**Tabla N° 4.4: Concentración de fenoles totales, extracto acuoso**

Muestras	Conc. Abs 1	Conc. Abs 2	Conc. Abs 3	Promedio
HORNIMANS	0.6078	0.6244	0.5995	0.6106
SCHAGREEN	0.7910	0.8326	0.8159	0.8132
SUNKA	0.8076	0.8409	0.8492	0.8326
WAWASANA	0.8159	0.7743	0.7910	0.7937
LIPTON	1.1407	1.1656	1.1573	1.1545

**Tabla N° 4.5: Concentración de fenoles totales, extracto etanólico**

Muestras	Conc. Abs 1	Conc. Abs 2	Conc. Abs 3	Promedio
HORNIMANS	0.7993	0.7743	0.7910	0.7882
SCHAGREEN	1.0407	1.0158	1.0324	1.0296
SUNKA	1.0990	1.1407	1.1240	1.1212
WAWASANA	1.0324	1.0158	1.0241	1.0241
LIPTON	1.4820	1.4987	1.4904	1.4904

Como se puede observar en las Tablas N° 4.4 y 4.5, las concentraciones de fenoles totales hallada en el extracto acuoso y etanólico de té verde (*Camellia sinensis*) demuestran que son detectables y cuantificables en su totalidad por el método empleado.

Cabe resaltar que las concentraciones de fenoles totales son las consideradas antes de la aplicación del factor de conversión correspondiente a las diluciones hechas durante el tratamiento de la muestra.

Reemplazando en la ecuación de la recta ponderada de los valores de las absorbancias, se obtuvieron las concentraciones de fenoles totales expresados en mg de ácido gálico/g de muestra, las que se muestran en las Tablas N° 4.6 y 4.7.

**Tabla N° 4.6: Concentración de fenoles totales, extracto acuoso del té verde en 5 muestras expresadas como mg de ácido gálico/g de muestra**

Muestras	Conc. 1	Conc. 2	Conc. 3	Promedio	Desv. Estándar
Hornimans	0.13	0.14	0.13	0.13	0.002
Schagreen	0.14	0.15	0.15	0.15	0.003
Sunka	0.15	0.15	0.15	0.15	0.004
Wawasana	0.15	0.14	0.14	0.14	0.003
Lipton	0.16	0.16	0.16	0.16	0.001

**Tabla N° 4.7: Concentración de fenoles totales, extracto etanólico del té verde en 5 muestras expresadas como mg de ácido gálico/g de muestra**

Muestras	Conc. 1	Conc. 2	Conc. 3	Promedio	Desv. Estándar
Hornimans	0.18	0.17	0.17	0.17	0.002
Schagreen	0.19	0.19	0.19	0.19	0.002
Sunka	0.20	0.21	0.20	0.20	0.003
Wawasana	0.19	0.18	0.18	0.18	0.001
Lipton	0.20	0.21	0.21	0.21	0.001

- **Aplicando las pruebas estadísticas ANOVA, LSD:**

Los resultados fueron evaluados estadísticamente por el método de ANOVA para las dos muestras independientes, realizado en Microsoft Excel, para

probar las diferencias de forma estadística con un nivel de confianza, luego se determinó la diferencia significativa mínima con el método de Fisher (LSD), procesado en StatGraphics.

Se trabajó con 4 decimales para poder determinar el análisis de varianza (ANOVA) y el método de Fisher (LSD), una vez procesado en Microsoft Excel nos dio los siguientes resultados:

**Tabla N° 4.8: Concentración extracto acuoso**

<b>Hornimans</b>	<b>Schagreen</b>	<b>Sunka</b>	<b>Wawasana</b>	<b>Lipton</b>
0.1381	0.1492	0.1507	0.1511	0.1611
0.1419	0.1571	0.1569	0.1434	0.1646
0.1363	0.1540	0.1585	0.1465	0.1635

**Tabla N° 4.9: Resumen de datos en análisis de varianza**

RESUMEN					
<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>	
Hornimans	3	0.41631973	0.13877324	8.3558E-06	
Schagreen	3	0.46030824	0.15343608	1.5631E-05	
Sunka	3	0.46602956	0.15534319	1.6892E-05	
Wawasana	3	0.44099053	0.14699684	1.5058E-05	
Lipton	3	0.48923449	0.16307816	3.2272E-06	

**Tabla N° 4.10: Análisis de varianza**

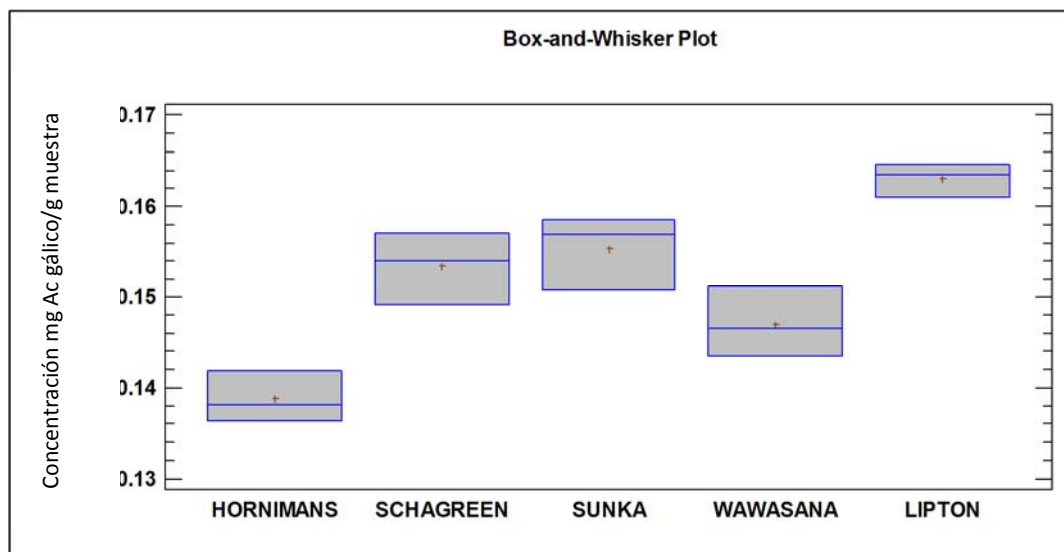
ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0.00100445	4	0.00025111	21.2218056	7.1153E-05	3.47804969
Dentro de los grupos	0.00011833	10	1.1833E-05			
Total	0.00112278	14				

Para conocer la diferencia significativa mínima según los resultados de ANOVA usamos el método de Fisher (LSD), una vez procesados en StatGraphics, nos dio los siguientes resultados:

**Tabla N° 4.11: Método LSD**

Method: 95.0 percent LSD

	Count	Mean	Homogeneous Groups
HORNIMANS	3	0.138767	X
WAWASANA	3	0.147	X
SCHAGREEN	3	0.153433	X
SUNKA	3	0.155367	X
LIPTON	3	0.163067	X



**Figura 4.2: Box and whisker plot**

Se procedió a trabajar de la misma manera con el extracto etanólico.

**Tabla N° 4.12: Concentración extracto etanólico**

Hornimans	Schagreen	Sunka	Wawasana	Lipton
0.1817	0.1964	0.2051	0.1912	0.2093
0.1760	0.1917	0.2128	0.1881	0.2117
0.1798	0.1948	0.2097	0.1897	0.2105

**Tabla N° 4.13: Resumen de datos en análisis de varianza**

RESUMEN				
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Hornimans	3	0.53743093	0.17914364	8.3557E-06
Schagreen	3	0.58284762	0.19428254	5.7589E-06
Sunka	3	0.62758646	0.20919549	1.5283E-05
Wawasana	3	0.5689703	0.18965677	2.3775E-06

Lipton 3 0.63153587 0.21051196 1.3831E-06

**Tabla N° 4.14: Análisis de varianza**

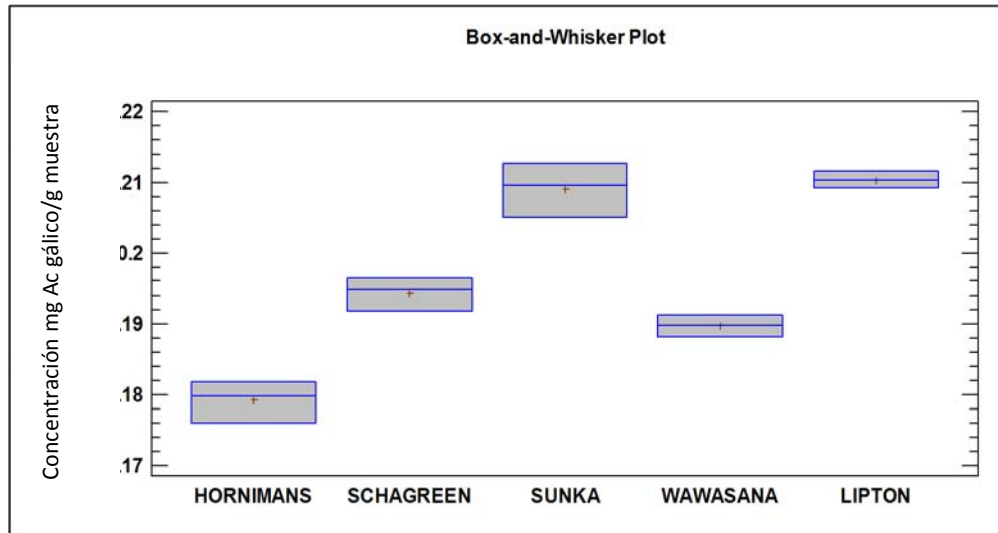
ANÁLISIS DE VARIANZA						
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	0.00213145	4	0.00053286	80.3507865	1.4632E-07	3.47804969
Dentro de los grupos	6.6317E-05	10	6.6317E-06			
Total	0.00219777	14				

Para conocer la diferencia significativa mínima según los resultados de ANOVA usamos el método de Fisher (LSD), una vez procesados en StatGraphics, nos dio los siguientes resultados:

**Tabla N° 4.15: Método LSD**

Method: 95.0 percent LSD

	<i>Count</i>	<i>Mean</i>	<i>Homogeneous Groups</i>
HORNIMANS	3	0.179167	x
WAWASANA	3	0.189667	x
SCHAGREEN	3	0.1943	x
SUNKA	3	0.2092	x
LIPTON	3	0.2105	x



**Figura 4.3: Box and whisker plot**

Interpretando el análisis de varianza de los resultados del extracto acuoso, sacamos el test  $F = 21.2218$  al que corresponde un valor  $-p$  de  $7.115 \text{ E-}05$ , este valor  $p$  es menor que el nivel de significancia de  $0.05$ , por lo tanto rechazamos la hipótesis nula y concluimos que existen diferencias significativas entre las medias de las muestras de té verde en extracto acuoso.

De igual manera realizamos para el extracto etanólico y sacamos el test  $F = 80.3507$  al que corresponde un valor  $-p$  de  $1.463 \text{ E-}07$ , este valor  $p$  es menor que el nivel de significancia de  $0.05$ , por lo tanto rechazamos la hipótesis nula y concluimos que existen diferencias significativas entre las medias de las muestras de té verde en extracto etanólico.

La diferencia significativa mínima usando el método de Fisher (LSD) en el extracto acuoso, nos dio como el de menor concentración al producto de la marca Hornimans, y el de mayor concentración el producto de la marca Lipton, de igual manera se aprecia en el extracto etanólico.

En las figuras 4.2 y 4.3 del método de Fisher (LSD) se muestran claramente la diferencia de concentración de fenoles totales por marca comercial.

- **Aplicando  $t$  de student:**

La diferencia entre el extracto acuoso y etanólico se evaluó mediante el método de  $t$  de student, realizado en Microsoft Excel, para probar las diferencias de forma estadística con un nivel de confianza.

Una vez procesados en Microsoft Excel nos dio los siguientes resultados expresados en la Tabla N° 4.16:

**Tabla N° 4.16: Prueba de  $t$  de student**

	Variable 1	Variable 2
Media	0.146	0.19
Varianza	0.00013	0.00025
Observaciones	5	5
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	7	
	-	
Estadístico $t$	5.04714615	
$P(T \leq t)$ una cola	0.00074228	
Valor crítico de $t$ (una cola)	1.89457861	
$P(T \leq t)$ dos colas	0.00148455	
Valor crítico de $t$ (dos colas)	2.36462425	

Interpretando la Tabla N° 4.16, podemos decir que los resultados procesados en el Microsoft Excel nos dio el valor del estadístico  $t = 5.04$  y el valor crítico de  $t$  (dos colas) de la tabla es 2.36 por lo tanto rechaza la hipótesis nula lo que significa que la diferencia entre el extracto acuoso y el extracto etanólico son significativas, también se puede interpretar tomando en cuenta el valor  $P(T \leq t)$  dos colas, para rechazar la hipótesis nula este valor debe ser menor de 0.05, en nuestros resultados nos dio 0.0014 que es menor a 0.05 y de igual manera se rechaza la hipótesis nula, lo que significa que las diferencias entre el extracto acuoso y etanólico son significativos.

### 4.3 DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

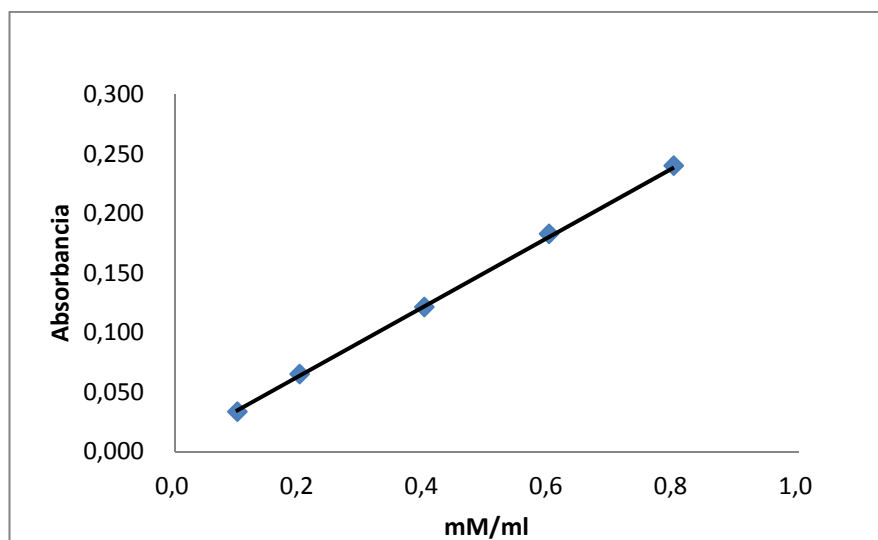
Para la determinación de la capacidad antioxidante del té verde mediante la técnica de CUPRAC, se realizaron por triplicado.

De este modo, se dispone de una serie de 6 tubos (incluyendo al blanco) cuyas absorbancias se leen a 450 nm, para la construcción de la curva de calibración. Todos estos puntos contienen una solución de Ácido Ascórbico  $2.0 \times 10^{-3}$  M, Cloruro de Cobre II  $1.2 \times 10^{-2}$  M y Neocuproína  $7.5 \times 10^{-3}$  M (el blanco no contiene ácido ascórbico).

Las absorbancias por triplicado se muestran en la Tabla N° 4.17.

**Tabla N° 4.17: Absorbancias por triplicado para la curva de calibración**

St.	CC. (ppm)	Abs. 1	Abs. 2	Abs. 3	Promedio	Desv. Estándar
1	0.1	0.035	0.033	0.033	0.03366	0.0011547
2	0.2	0.064	0.067	0.065	0.06533	0.00152753
3	0.4	0.129	0.119	0.117	0.12166	0.0064291
4	0.6	0.187	0.192	0.170	0.183	0.01153256
5	0.8	0.246	0.239	0.236	0.24033	0.0051316

**Figura 4.4: Curva de calibración**

Estos datos (Tabla N° 4.17) al ser graficados (Figura 4.4) fueron procesados en Microsoft Excel utilizando el método de los mínimos cuadrados se obtienen los siguientes parámetros.

$$a = 0.00499$$

$$b = 0.29477$$

$$r = 0.9999$$

De este modo se halla la ecuación de regresión lineal de la gráfica de calibración preparada:

$$y = 0.29477 x + 0.00499$$

Las muestras utilizadas fueron 2 sobres por producto, pesadas respectivamente (Tabla N° 4.18), donde la extracción procedió como indica en el punto 3.3.3.

**Tabla N° 4.18: Pesos de las muestras**

<b>Muestra</b>	<b>Peso 2 sobres, Extracto Etanólico (g)</b>
<b>HORNIMANS</b>	2.1
<b>SCHAGREEN</b>	2.66
<b>SUNKA</b>	2.67
<b>WAWASANA</b>	2.70
<b>LIPTON</b>	3.57

Al ser extraídas por el método de reflujo por tres horas, utilizar la muestra extraída según el procedimiento expresado en la Tabla N° 3.2, reemplazando el Ácido Ascórbico por la muestra, proceder a determinar la absorbancia de cada una de ellas, las absorbancias se hicieron por triplicado utilizando la extracción Etanólica según se observan el Anexo III.

Deducimos que las absorbancias halladas en la extracción etanólica fueron extrapoladas en la curva de calibración, donde las absorbancias de la muestra N° 3 de las diferentes marcas comerciales son las correctas, Tabla N° 4.19.

**Tabla N° 4.19: Absorbancia de la extracción etanólica**

<b>Muestra</b>	<b>Abs. 1</b>	<b>Abs. 2</b>	<b>Abs. 3</b>	<b>Promedio</b>
<b>HORNIMANS</b>	0.122	0.125	0.123	0.123
<b>SCHAGREEN</b>	0.126	0.125	0.127	0.126
<b>SUNKA</b>	0.124	0.129	0.127	0.125
<b>WAWASANA</b>	0.125	0.129	0.127	0.127
<b>LIPTON</b>	0.130	0.129	0.128	0.129

Reemplazando en la ecuación se halló la concentración de las muestras:

$$y = a + b x$$

$$a = 0.00499$$

$$b = 0.29477$$

$$y = 0.00499 + 0.29477 x$$

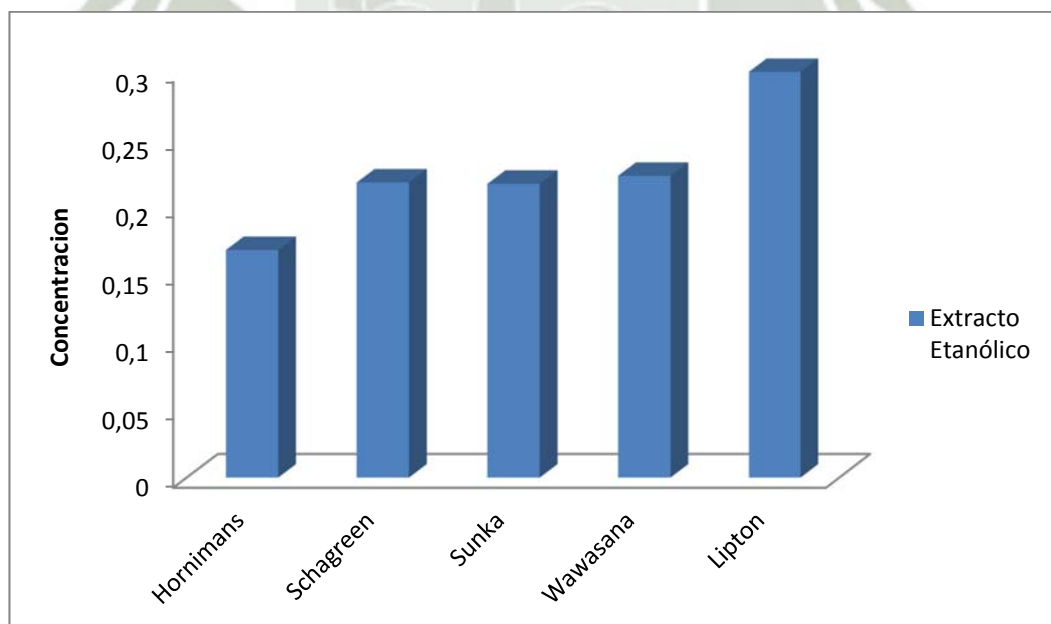
**Tabla N° 4.20: Concentración de las muestras**

Muestra	1	2	3	Promedio
Hornimans	0.407	0.417	0.410	0.411
Schagreen	0.420	0.417	0.423	0.420
Sunka	0.413	0.417	0.423	0.418
Wawasana	0.417	0.430	0.423	0.423
Lipton	0.433	0.430	0.427	0.430

Se determinó la capacidad antioxidante aplicando lo correspondiente a las diluciones hechas durante el tratamiento de las muestras, se obtuvieron las concentraciones de la capacidad antioxidante expresadas en mmol equivalentes de Ácido Ascórbico se muestra en la Tabla N° 4.21.

**Tabla N° 4.21: Concentración de la capacidad antioxidante (mmol equivalente de ácido ascórbico)**

<b>Muestra</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>Promedio</b>	<b>Desv. Estándar</b>
Hornimans	0.17	0.17	0.17	0.17	0.002
Schagreen	0.22	0.22	0.22	0.22	0.002
Sunka	0.22	0.22	0.22	0.22	0.003
Wawasana	0.22	0.23	0.22	0.22	0.004
Lipton	0.30	0.30	0.30	0.30	0.002



**Figura 4.5: Concentración de la capacidad antioxidante**

#### 4.4 ANÁLISIS COMPARATIVO DE LAS MUESTRAS

- Con respecto a la presentación el producto de la marca Lipton posee una mejor presentación física, tanto en el envase como el sobre filtrante, en cuanto a los pesos, el producto de la marca Lipton tiene más contenido de té verde la cual es 2 g. por sobre filtrante, el de la marca Hornimans posee menor contenido de té verde la cual es 1.2 g. por sobre filtrante, en su mayoría el contenido de té verde rotulado es de 1.5 g. por sobre filtrante.

Referente a los pesos realizados y comparados con el rotulado de los envases podemos deducir que existe diferencias notorias del peso A y el peso B con el peso rotulado en el envase de las diferentes marcas comerciales (Tabla N° 4.22).

**Tabla N° 4.22: Comparación de pesos**

<b>Muestra</b>	<b>Peso Rotulado g</b>	<b>Peso A (Sobre g)</b>	<b>Peso B (Sobre g)</b>
<b>Hornimans</b>	1.2	1.1	1.05
<b>Schagreen</b>	1.5	1.32	1.33
<b>Sunka</b>	1.5	1.34	1.32
<b>Wawasana</b>	1.5	1.36	1.32
<b>Lipton</b>	2	1.77	1.76

- Los compuestos fenólicos se analizaron mediante el método de *Folin-Ciocalteu*, determinando los compuestos fenólicos totales en el té verde de diferentes marcas comerciales, encontrando un margen significativo en cuanto al producto internacional, donde el té verde de la marca comercial Lipton posee mayor cantidad de compuestos fenólicos, tanto con la extracción acuosa y etanólica.

La menor concentración de fenoles totales se apreció en el té verde de la marca comercial Hornimans, tanto en la extracción acuosa y etanólica como lo muestran los valores obtenidos en las Tablas N° 4.6 y 4.7.

El modo más habitual de uso en la población del té verde es mediante el reposo en agua hervida por unos minutos, dando así a conocer que es menor el contenido de fenoles totales, si se trataría de utilizar el té verde en etanol, habría mayor cantidad de fenoles totales, pero el consumo del té verde en etanol no es agradable ni recomendable puesto que tendría gran cantidad de etanol en la extracción y el sabor sería desagradable produciendo otros efectos.

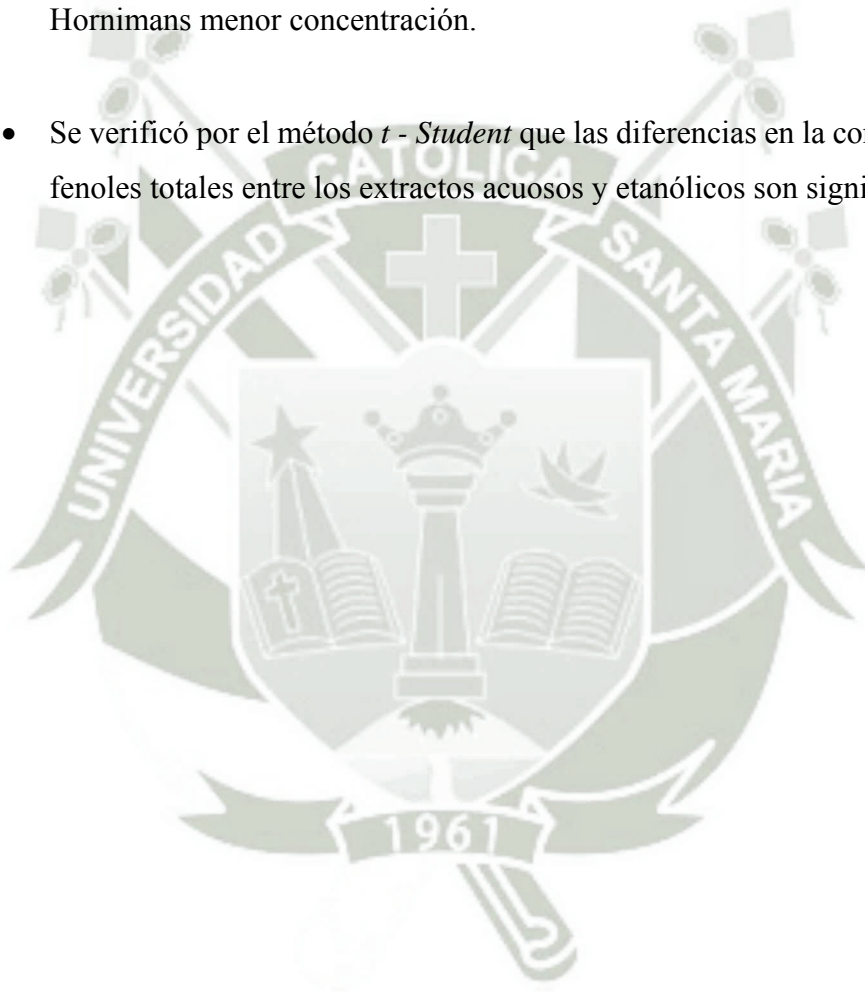
- La capacidad antioxidante se analizó mediante el método de CUPRAC, usando la extracción etanólica, ya que posee mayor cantidad de compuestos fenólicos.

Según muestra la Tabla N° 4.21, el producto que posee mayor capacidad antioxidante es el té verde de la marca Lipton y el de menor capacidad antioxidante es el té verde de la marca Hornimans.

- Comparando en general las muestras de té verde de diferentes marcas comerciales, el producto de la marca Lipton posee mayor cantidad de compuestos fenólicos como mayor capacidad antioxidante, y el producto de la marca Hornimans posee menor cantidad de compuestos fenólicos y menor capacidad antioxidante, donde el producto de la marca Lipton es muy buena para su consumo, así mismo el uso de este es más adecuado dejando en reposo

por unos minutos en agua hervida que haciéndolo en medio alcohólico, así tenga mayor actividad antioxidante con este último.

- Los resultados mediante el método de *Folin-Ciocalteu* fueron evaluados estadísticamente usando el análisis de la varianza (ANOVA), para conocer la diferencia significativa mínima según los resultados de ANOVA usamos el método de Fisher (LSD), donde se pudo demostrar que el té verde de la marca Lipton posee mayor concentración de fenoles totales, y el de la marca Hornimans menor concentración.
- Se verificó por el método *t - Student* que las diferencias en la concentración de fenoles totales entre los extractos acuosos y etanólicos son significativos.



## CONCLUSIONES

1. El contenido de los compuestos fenólicos totales por el método de *Folin-Ciocalteu* fue mayor el producto de la marca Lipton 0.16 mg de ácido gálico/g de muestra en extracto acuoso y 0.21 mg de ácido gálico/g de muestra en extracto etanólico, el menor contenido de fenoles totales se dio en el producto de la marca Hornimans 0.13 mg de ácido gálico/g de muestra en extracto acuoso, y 0.17 mg de ácido gálico/g de muestra en extracto etanólico, validando la técnica analítica usando el límite de detección (0.05 ppm), límite de cuantificación (0.07 ppm), los resultados fueron evaluados estadísticamente por el método de análisis de varianza (ANOVA), LSD y *t* de student, este último demostró que las diferencias entre los extractos acuoso y etanólico son significativos.
2. La capacidad antioxidante por el método CUPRAC se realizó con el extracto etanólico donde la mayor capacidad antioxidante se dio en el producto de la marca Lipton 0.30 mmol equivalente de ácido ascórbico, y la menor capacidad antioxidante se dio en el producto de la marca Hornimans 0.17 mmol equivalente de ácido ascórbico.
3. La mayor actividad antioxidante se observa en la extracción etanólica, con el producto de la marca Lipton que posee mayor cantidad de compuestos fenólicos totales como mayor capacidad antioxidante, el producto de la marca Hornimans posee menor cantidad de compuestos fenólicos y menor capacidad antioxidante, de la misma manera ocurre en la extracción acuosa, donde el producto de la marca Lipton posee mayor concentración de fenoles totales y el menor es el de la marca Hornimans.

## BIBLIOGRAFÍA

AETI, Asociación Española de Té e Infusiones, 2013. <http://asociacionteinfusiones.es/>

Antolovich M., Prenzler P., Patsalides E., McDonald and S. y Robards K., 2001.

Apak R., et al, Comparative Evaluations of Various Total Antioxidant Capacity Assays Applied to Phenolic Compounds with the CUPRAC Assay, *Molecules* 12, 1496-1547, 2007

Avello M. y Suwalsky M. Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. *Scielo Atenea* N° 494– II Sem. 2006: 161-172.

<http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0718-04622006000200010&script=sciarttext&tlng=en>

Bagchi K. y Puri S. Free radicals and antioxidants in health and disease. *Eastern Mediterranean Health Journal*. **Volume 4, Issue 2, Page 350-360.** 1998. <http://www.emro.who.int/publications/emhj/0402/21.htm>

Bettuzzi S, Brausi M, Rizzi F, et al. Chemoprevention of human prostate cancer by oral administration of green tea catechins in volunteers with high-grade prostate intraepithelial neoplasia: a preliminary report from a one-year proof-of-principle study. *Cancer Res.* 2006 Jan 15; 66(2):1234-1240.

Cao Y, Cao R, Angiogenesis inhibited by drinking tea (letter). *Nature* 1999.

Campos D., Chirinos, R., Rogez H., Pedreschi, R., Larondelle, Y. Optimization of extraction conditions of antioxidant phenolic compounds from Mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavón) tubers. *Journal Sci Food Agric* 55 (217–225). 2007.

Campos D., Chirinos R., Costa N., Arbizu C., Pedreschi R. y Larondelle Y. Phenolic profiles of andean mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavón) tubers: Identification by HPLC-DAD and evaluation of their antioxidant activity. *Food Chemistry* 106:1285–1298. 2008.

Cadenas, Packer, *Handbook of Oxidants and Antioxidants*, Second Edition, Marcel Dekker, USA, 2002.

Chasquibol N., Lengua L., Delmas I., Rivera D., Bazan D., Aguirre R. Y Bravo M. Alimentos Funcionales Fitoquímicos: Clasificación e Importancia. *Rev. Per. Quim. Ing. Quim* Vol 5 N°2, Pags 9-20. 2003.

Coultate, Tom P. *Manual de química y bioquímica de los alimentos*”. 2002.

Criado Dabrowska C. y Moya Mir M. Vitaminas y antioxidante. *Servicios de medicina interna y urgencias. Hospital Puerta de Hierro-Majadahonda. Madrid. 2009*

Dirección general de industria alimentaria, Buenos Aires - Argentina. Sustainable cultivation of tea, N. Muraleedharan, UPASI tea research foundation, 2005.

[http://64.76.123.202/site/economias\\_regionales/producciones\\_regionales/01\\_origen\\_vegetal/05\\_infusiones/\\_cadenas/te\\_sinensis\\_05\\_06.htm](http://64.76.123.202/site/economias_regionales/producciones_regionales/01_origen_vegetal/05_infusiones/_cadenas/te_sinensis_05_06.htm)

Elmets CA, Singh D, Tubesing K, et al. Cutaneous photoprotection from ultraviolet injury by green tea polyphenols. *J Am Acad Dermatol.* 2001;44:425 - 432.

Eurachem Guide, *The fitness for purpose of analytical Methods*, First Edition, 1998

Fennema, O. *Química de los alimentos*. Editorial Acribia S.A. Zaragoza España. Tercera edición. 2008.

Geleijnse JM, Launer LJ, Hofman A, et al. Tea flavonoids may protect against atherosclerosis: the Rotterdam Study. *Arch Intern Med.* 1999;159:2170 - 2174.

Harborne, 1989. General procedures and measurement of total phenolics. *Methods in plant biochemistry: Volume 1 Plant Phenolics*, Academic Press, London, pp: 1-28.

Halliwell B. Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life. Update on Reactive Species and Antioxidants, *Plant Physiology*, June, Vol. 141, pp. 312–322. 2006.  
<http://www.plantphysiol.org/content/141/2/312.full.pdf+html>

Hegarty VM, May HM, Khaw KT. Tea drinking and bone mineral density in older women. *Am J Clin Nutr*. 2000;71:1003 - 1007.

Huang D., Ou B. y Prior R. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *J. Agric. Food Chem*. 53, 1841-1856. 2005.

Huber L., *Validation and Qualification in Analytical Laboratories*, Second Edition, Informa Healthcare, USA, 2007.

Imai K, Nakachi K. Cross sectional study of effects of drinking green tea on cardiovascular and liver diseases. *BMJ*. 1995;310:693 - 696.

Kahkonen MP, Hopia AI, Vuorela HJ, Rauha JP, Pihlaja K, Kujala TS, Heinonen M. 1999. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47: 3954 – 3962.

Katiyar SK, Ahmad N, Mukhtar H. Green tea and skin. *Arch Dermatol*. 2000;136:989 - 994.

Kohlmeier L, Weterings KGC, Steck S, et al. Tea and cancer prevention: an evaluation of the epidemiologic literature. *Nutr Cancer* . 1997;27:1 - 13.

Krahwinkel T, Willershausen B. The effect of sugar-free green tea chew candies on the degree of inflammation of the gingiva. *Eur J Med Res.* 2000;5:463 - 467.

Lozada S. y García L. Estrés oxidativo y antioxidantes: cómo mantener el equilibrio. *Rev Asoc Colomb Dermatol.* 17:172-9.2009.

MacDonald-Wicks L., Wood L. y Garg M. Review Methodology for the determination of biological antioxidant capacity in vitro: a review. *J Sci Food Agric* 86:2046–2056.2006.

Martínez- Valverde I., Periago M.J. y Ros G. Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. *Scielo. ALAN Vol.50 N°1 Caracas mar. 2000.*  
[http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=S000406222000000100001&script=sci\\_artt\\_ext](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=S000406222000000100001&script=sci_artt_ext)

Muñoz Jáuregui A. y Ramos Escudero F., Componentes fenólicos de la dieta y sus propiedades biomedicinales. *Revista Horizonte Médico. Volumen 7, N° 1, Junio 2007.*

Parra, Patricia ing. Dirección Nacional de alimentos – Dirección de industria alimentaria, buenos aires – Argentina, 2013.

Percival M. Antioxidants. *Clinical Nutrition Insights.* 1998.

Pokorny J., Yanishlieva N. y Gordon M. Antioxidante de los Alimentos: Aplicaciones prácticas. Editorial Acriba S.A. Zaragoza España.2004.

Prior R., Wu X. y Schaich K. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *J. Agric. Food Chem.* 53, 4290-4302. 2005.

Ramos Llica E., Castañeda Castañeda B. y Ibáñez Vásquez L. Evaluación de la capacidad antioxidante de plantas medicinales peruanas nativas e introducidas. *Rev. Acad. Perú Salud* 15(1). 2008.

Rubio Hurtado, M. J. y Berlanga Silvente, V., 2012. Aplicando las pruebas paramétricas bivariadas análisis estadísticos *t* de Student , tukey, LSD y ANOVA en SPSS y Microsoft Excel. Caso práctico. *REIRE, Revista d'Innovació i Recerca en Educació*, Vol. 5, núm. 2, 83-100. <http://www.ub.edu/ice/reire.htm>

Salluca T., Peñarrietaabc J., Alvarado J. y Bergenstählc B. Determination of total phenolic compounds content and the antioxidant capacity of andean tubers and roots (isaño, oca, ulluco and arracacha). *Revista Boliviana de Química*. Volumen 25, No.1 – 2008.

Shahidi F., and Naczki, M, 2004. *Phenolics in Food and Nutraceuticals*. CRC Press, Inc. Boca Raton, Fl. EUA.

Sistema Integrado de Información Taxonómica, - SIIT \* América del Norte, 17-Septiembre-2013.

[http://www.cbif.gc.ca/pls/itisca/next?v\\_tsn=506801&p\\_ifx=&p\\_lang=es](http://www.cbif.gc.ca/pls/itisca/next?v_tsn=506801&p_ifx=&p_lang=es)

Taylor JR, Wilt VM. Probable antagonism of warfarin by green tea. *Ann Pharmacother*. 1999;33:426 - 428.

The Bio Tea Company S.L. <http://biotea.es/cms.php?id cms=24>

Tsubono Y, Nishino Y, Komatsu S, et al. Green tea and the risk of gastric cancer in Japan. *N Engl J Med*. 2001;344:632 - 666.

Valls J., Lampreave M., Nadal M. y Arola L. Importancia de los compuestos fenólicos en la calidad de los vinos tintos de crianza. *Revista Alimentacion Calidad y*

Tecnología. Vol 15. Nº1. 119-124. 2000.

<http://www.alcion.es/DOWNLOAD/ArticulosPDF/al/gratis/11articulo.pdf>

Venereo Gutiérrez J. Daño Oxidativo, Radicales Libres y Antioxidantes. Instituto Superior de Medicina Militar “Dr. Luis Diaz Soto”. Rev. 31 (2): 126-3. Cuba. 2002.

Webb G. Complementos Nutricionales y Alimentos Funcionales. Editorial Acribia S.A. Zaragoza España. 2006.

Young I. y Woodside J. Antioxidants in health and disease. J. Clin. Pathol. Vol 54:176–186. 2001.



## ANEXOS

### Anexo I: Obtención del extracto, soluciones estándar para la curva, de calibración de fenoles totales y capacidad antioxidante

**Foto N° 1: Muestra antes de la extracción**



**Foto N° 2: Obtención del extracto por el método reflujo**



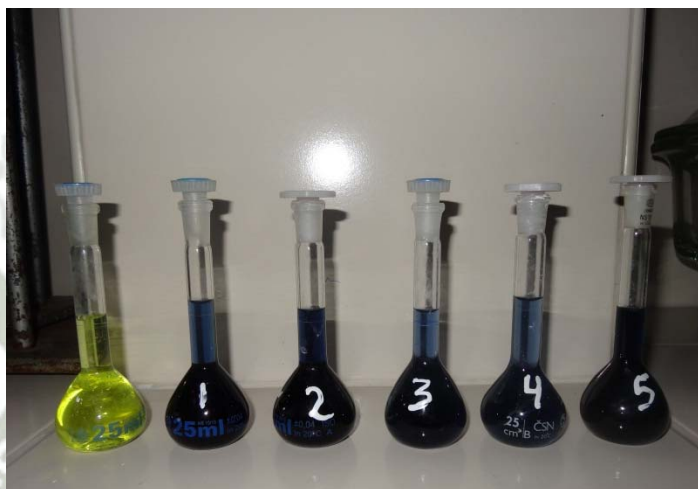
**Foto N° 3: Concentrado del extracto en el rotavapor**



**Foto N° 4: Extracto concentrado**



**Foto N° 5: Soluciones estándar para la curva de calibración de cuantificación de fenoles totales**



**Foto N° 6: Soluciones estándar para la curva de calibración de capacidad antioxidante**



**Anexo II: Cuadro de absorbancias por triplicado de las muestras para  
cuantificación de fenoles totales****Extracción Acuosa**

<b>Muestra</b>	<b>Abs. 1</b>	<b>Abs. 2</b>	<b>Abs. 3</b>	<b>promedio</b>
HORNIMANS	0.073	0.075	0.072	<b>0.073</b>
SCHAGREEN	0.095	0.100	0.098	<b>0.097</b>
SUNKA	0.097	0.101	0.102	<b>0.100</b>
WAWASANA	0.098	0.093	0.095	<b>0.095</b>
LIPTON	0.137	0.140	0.139	<b>0.114</b>

**Extracción Etanólica**

<b>Muestra</b>	<b>Abs. 1</b>	<b>Abs. 2</b>	<b>Abs. 3</b>	<b>promedio</b>
HORNIMANS	0.096	0.093	0.095	<b>0.094</b>
SCHAGREEN	0.125	0.122	0.124	<b>0.123</b>
SUNKA	0.132	0.137	0.135	<b>0.134</b>
WAWASANA	0.124	0.122	0.123	<b>0.123</b>
LIPTON	0.178	0.180	0.179	<b>0.179</b>

**Anexo III: Absorbancias de las muestras para determinar capacidad  
antioxidante**

**Extracción Etanólica**

<b>Muestra</b>	<b>Abs. 1</b>	<b>Abs. 2</b>	<b>Abs. 3</b>	<b>Abs. 4</b>	<b>Abs. 5</b>
HORNIMANS	0.103	0.11	0.122	0.14	0.171
	0.108	0.111	0.125	0.141	0.172
	0.106	0.113	0.123	0.142	0.172
<b>Promedio</b>	<b>0.105</b>	<b>0.111</b>	<b>0.123</b>	<b>0.141</b>	<b>0.171</b>
SCHAGREEN	0.105	0.112	0.126	0.139	0.165
	0.108	0.11	0.125	0.137	0.17
	0.106	0.115	0.127	0.143	0.171
<b>Promedio</b>	<b>0.106</b>	<b>0.112</b>	<b>0.126</b>	<b>0.139</b>	<b>0.168</b>
SUNKA	0.102	0.111	0.124	0.136	0.167
	0.105	0.112	0.125	0.142	0.172
	0.108	0.116	0.127	0.137	0.173
<b>Promedio</b>	<b>0.105</b>	<b>0.113</b>	<b>0.125</b>	<b>0.138</b>	<b>0.170</b>
WAWASANA	0.101	0.112	0.125	0.138	0.166
	0.103	0.111	0.129	0.136	0.168
	0.106	0.114	0.127	0.144	0.17
<b>Promedio</b>	<b>0.103</b>	<b>0.112</b>	<b>0.127</b>	<b>0.139</b>	<b>0.168</b>
LIPTON	0.108	0.114	0.13	0.146	0.166
	0.104	0.113	0.129	0.143	0.169
	0.106	0.116	0.128	0.144	0.171
<b>Promedio</b>	<b>0.106</b>	<b>0.114</b>	<b>0.129</b>	<b>0.144</b>	<b>0.168</b>