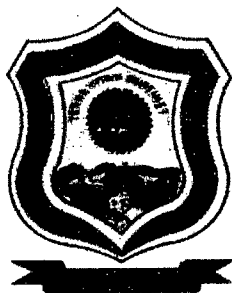


**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA**

**FACULTAD DE INGENIERIA EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS**

*DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE CIENCIA, TECNOLOGÍA E INGENIERÍA DE ALIMENTOS*



**ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE, POLIFENOLES TOTALES EN EL  
EXTRACTO ACUOSO DE HIERBA LUISA (*Cymbopogon citratus*  
*Staph*), Y SU ESTABILIDAD EN MODELOS DE BEBIDA**

Tesis

Para optar al título de:

INGENIERO EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

Presentado por:

**IRIS OLIVIA RUIZ YANCE**

**“UNASINOS FORJADORES DE NUEVOS PARADIGMAS”**

**TINGO MARIA – PERÚ**

**2004**



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA  
Tingo María  
FACULTAD DE INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Los Miembros del Jurado que suscriben, reunidos en acto público el 12 de enero del 2004, a horas 04:05 p.m. en la Sala de Grados de la Universidad Nacional Agraria de la Selva, ubicada en la ciudad de Tingo María, provincia de Leoncio Prado, departamento de Huánuco, para calificar la tesis presentado por la Bachiller en Ciencias Industrias Alimentarias: **Iris Olivia RUIZ YANCE**.

**“ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE, POLIFENOLES TOTALES EN EL EXTRACTO ACUOSO DE HIERBA LUISA (*Cymbopogon citratus* staph), Y SU ESTABILIDAD EN MODELOS DE BEBIDA”**

Después de haber escuchado la sustentación, las respuestas a las preguntas formuladas, lo declaran aprobado con el calificativo de **MUY BUENO**, en consecuencia la Bachiller: **Iris Olivia RUIZ YANCE**, queda apto para recibir el título de **Ingeniero en Industrias Alimentarias** del Consejo Universitario, de conformidad con el Art.22° de la Ley Universitaria 23733; los artículos 43° y 45° del Estatuto y los artículos 95° y 96° del Reglamento General de la Universidad Nacional Agraria de la Selva.

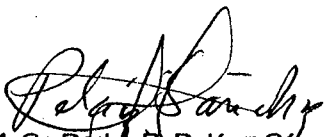
Tingo María, 13 de enero del 2004

  
Ing°. Laureano Zavaleta De La Cruz  
Presidente



  
Ing°. Alfredo Carmona Ruiz  
Vocal

  
Ing°. Yolanda Ramírez Trujillo  
Vocal

  
Ing°. M. Sc. Pedro P. Peláez Sánchez  
Asesor

581.63

R7

Ruiz Yance, I.O.

**Actividad antioxidante, polifenoles totales en el extracto acuoso de hierba luisa (*Cymbopogon citratus* Staph.) y su estabilidad en modelos de bebida. – Tingo María, 2004. 112 h.; 3 cuadros , 12 fig.; 81 ref.; 30 cm., Resumen (En, Es).**

Tesis (Ingeniero Industrias Alimentarias)  
Universidad Nacional Agraria de la Selva, Tingo María, (Perú)  
Facultad de Industrias Alimentarias

CYMBOPOGON / PLANTAS AROMATICAS / COMPUESTOS FENÓLICOS /  
ANTIOXIDANTES NATURALES / METABOLITOS SECUNDARIOS /  
EXTRACTOS VEGETALES / OSCURECIMIENTO / REACCION DE MAILLARD /  
SABOR / TINGO MARIA (LEONCIO PRADO, PROV) / HUÁNUCO (DPTO) /  
PERU.

AGRIS Q01

## DEDICATORIA

**A Dios:** por permitir mi existencia y darme la fuerza espiritual en todo momento y brindarme la sabiduría asertiva y culminar con uno de mis objetivos

### **A mis padres:**

**Juanita y Francisco** por el inmenso amor con eterna gratitud y por el sacrificio desplegado muy cariñosamente en todo momento.

### **A mis hermanas:**

**Vilma, Ruth, y Noemí,** por su permanente aliento, y apoyo altruista siempre avocado al éxito.

### **A mis hermanos:**

**Roger y Saúl** quienes con su apoyo moral, comprensión y para quienes fui siempre un ejemplo.

### **A mi tía:**

**Vilma Galván Allende:** con todo cariño por su comprensión en todo momento.

### **A:**

**Jorge Reineiro León Uribe y Richard Alfredo Durand Martínez:** por su sencillez y la constante comunicación.

## **AGRADECIMIENTO**

**A los Asesores: Ing° MS.c.: LUIS ALBERTO CONDEZO HOYOS;** por su incalculable aporte intelectual compartida en todo momento en la investigación, por su constante vigilia en el trabajo y al **Ing° MS.c.: PEDRO PABLO PELAÉZ SÁNCHEZ,** por la paciencia desplegada.

**Al Doctor: Ph.D.: MANUEL SANDOVAL CHACON;** quien compartió su sabiduría intelectual y fue guía del presente trabajo de investigación quién iluminando una luz espiritual, encamino hacia un mejor sendero.

**Al Ing° M.S.c.: DAVID GUARDA SOTELO,** por impartir sus experiencias adquiridos y evocarlos en el presente trabajo de investigación.

**Al Ing° : LUIS ALBERTO BECERRIL ALBORNOZ,** por compartir sus conocimientos intelectuales y su incalculable ayuda moral, intelectual.

**A la Lic.: CARMEN RUTH SANDOVAL CHACON,** quién fue mi constante apoyo en situaciones difíciles y a quién tengo que agradecer por sus sabios consejos para sobrellevar la vida a pesar de las situaciones difíciles que se presentes.

**A la Sra: ELISA ESTHER ARANDA CARDENAS,** por su apoyo altruista en todo momento de difícil situación y por transmitir su paciencia, alegría y por permitirme compartir una linda amistad.

**A la Sra: SONIA VARGAS MORALES,** quien con sus engrimientos me supo guiar hasta cumplir con uno de mis objetivos.

**A mis Amigos:** Ing° Vanessa Melchor Sandoval, Ing° Séyer Estrella Cartagena, Ing° Fernando Ramos Escudero, Ing° Juan Villanueva Tiburcio, con quienes compartimos momentos gratos en la ejecución de nuestro trabajo de investigación.

A las joyitas: Vanesa García Masias, Yesenia Roca Capcha, Maribel Quincho Capcha.

Amigos: Alberto Vásquez Rengifo, Anamelba Terrones Valles, Carmen Bartola Silva, Jack Estrella Cartagena, Hans Tafur Pereda, Juan Rumaldo Torres, Kadir Domínguez Palpa, Cinthia Valdivia Montalvan, Jessica Rojas Infanzón, Nataly Pinedo Heredia, Edin Choquehuanca Guevara, Osvelia Guerra Abanto, con quienes compartimos momentos agradables y algunas vicisitudes de la vida.

## INDICE

	Pág
<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>II. REVISIÓN DE LITERATURA.....</b>	<b>2</b>
<b>A.HIERBA LUISA.....</b>	<b>2</b>
1. Descripción botánica .....	2
2. Clasificación taxonómica .....	2
3. Composición fitoquímica.....	3
4. Zonas de producción .....	3
5. Formas de uso.....	4
6. Acción farmacológica.....	4
7. Acción antioxidante.....	5
<b>B.ANTIOXIDANTES.....</b>	<b>6</b>
1. Definición.....	6
2. Principales antioxidantes .....	7
3. Efectos benéficos de los antioxidantes.....	8
4. Radicales libres .....	11
<b>C.ESTABILIDAD DE POLIFENOLES EN MODELOS DE BEBIDAS .....</b>	<b>12</b>
1. Factores que afectan la estabilidad .....	13
2. Evaluaciones de la estabilidad de polifenoles en modelos de bebidas.....	14
<b>D.METODOS DE EVALUACIÓN EN LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE....</b>	<b>17</b>
1. Radical hidroxilo (2 - Desoxirribosa).....	17

2.	Radical 2,2' azinobis -3- ethylbenzotiazolina -6- ácido sulfónico (ABTS <sup>o+</sup> ).....	18
3.	Radical 1'1 diphenyl -2- picrylhidrazyl (DPPH <sup>o</sup> ).....	18
<b>E.</b>	<b>EXTRACTO</b> .....	<b>19</b>
1.	Definición.....	19
2.	Métodos de extracción.....	19
<b>III.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>21</b>
<b>A.</b>	<b>LUGAR DE EJECUCIÓN</b> .....	<b>21</b>
<b>B.</b>	<b>MATERIA PRIMA E INSUMOS</b> .....	<b>21</b>
1.	Hierba luisa.....	21
2.	Insumos.....	22
<b>C.</b>	<b>MATERIALES</b> .....	<b>22</b>
1.	Materiales de laboratorio.....	22
2.	Equipos de laboratorio.....	23
3.	Reactivos.....	23
<b>D.</b>	<b>MÉTODOS DE ANÁLISIS</b> .....	<b>24</b>
1.	Evaluación de la actividad antioxidante en el extracto acuoso de hierba luisa.....	24
2.	Evaluación de polifenoles totales en el extracto acuoso de hierba luisa.....	25
<b>E.</b>	<b>METODOLOGÍA EXPERIMENTAL</b> .....	<b>26</b>
1.	Evaluación de la actividad antioxidante del extracto acuoso de hierba luisa.....	26



2. Correlación entre el contenido de polifenoles totales y la actividad antioxidante .....	35
3. Evaluación del efecto del pH y temperatura en la estabilidad de modelos de bebida .....	38
<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSION.....</b>	<b>42</b>
<b>A.ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL EXTRACTO ACUOSO DE HIERBA LUISA.....</b>	<b>42</b>
1. Radical hidroxilo (2 - Desoxirribosa) .....	42
2. Radical 2,2' azinobis -3- ethylbenzotiazolina -6- ácido sulfónico (ABTS <sup>o+</sup> ) .....	45
3. Radical 1,1' diphenyl-2-picrylhidrazyl (DPPH <sup>o</sup> ) .....	49
<b>B.CORRELACIÓN ENTRE EL CONTENIDO DE POLIFENOLES TOTALES Y LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.....</b>	<b>53</b>
<b>C.EFECTO DEL PH Y TEMPERATURA EN LA ESTABILIDAD EN MODELOS DE BEBIDA.....</b>	<b>56</b>
1. Índice de pardeamiento .....	56
2. Polifenoles totales.....	59
3. Actividad antioxidante.....	62
<b>V. CONCLUSIONES.....</b>	<b>66</b>
<b>VI. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>67</b>
<b>VII. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>68</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>79</b>

## INDICE DE CUADROS

	<b>Pág</b>
Cuadro 1. Efecto del pH y temperatura en la estabilidad del índice de pardeamiento de modelos de bebida <sup>1</sup> .....	59
Cuadro 2. Efecto del pH y temperatura en la estabilidad del los polifenoles totales en modelos de bebida <sup>1</sup> .....	62
Cuadro 3. Efecto del pH y temperatura en la estabilidad de la actividad antioxidante en modelos de bebida <sup>1</sup> .....	64

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Pág</b>
Figura 1. Estructura de los principales ácidos fenólicos y flavonoides.....	10
Figura 2. Estabilidad de las catequinas de té verde.....	16
Figura 3. Estabilidad de las catequinas del té verde en agua destilada y otras bebidas.....	17
Figura 4. Diseño experimental para la evaluación de la actividad antioxidante en el EAHL con 2 - Dx.....	29
Figura 5. Diseño experimental para la evaluación de la actividad antioxidante en el EAHL con ABTS <sup>o+</sup> .....	32
Figura 6. Diseño experimental para la evaluación de la actividad antioxidante en el EAHL con DPPH <sup>o</sup> .....	35
Figura 7. Diseño experimental para la evaluación de polifenoles totales ...	38
Figura 8. Diseño experimental para la evaluación del efecto del pH y temperatura en la estabilidad de los MBHL.....	42
Figura 9. Porcentaje de inhibición de degradación de la 2 - Desoxirribose en el EAHL.....	44
Figura 10. Porcentaje de inhibición del radical ABTS <sup>o+</sup> en el EAHL.....	47
Figura 11. Porcentaje de inhibición del radical DPPH <sup>o</sup> en el EAHL .....	51
Figura 12. Correlación entre el contenido de polifenoles y actividad antioxidante.....	55

## RESUMEN

El presente trabajo de investigación se realizó en los laboratorios de Análisis de Alimentos y Espectrofotometría de la Universidad Nacional Agraria de la Selva, durante los meses de febrero a diciembre del 2002. Se utilizó como materia prima, hojas primarias y secundarias de hierba luisa (*Cymbopogon citratus Staph*), cosechadas en la provincia de Leoncio Prado, distrito de Padre Felipe Luyando - Naranjillo. Los objetivos de la presente investigación fueron: evaluar la actividad antioxidante del extracto acuoso de hierba luisa, correlacionar el contenido de polifenoles totales y la actividad antioxidante y evaluar el efecto del pH y temperatura en la estabilidad de modelos de bebida.

El extracto acuoso de hierba luisa demostró poseer actividad antioxidante que depende de la concentración, en la inhibición de degradación de la 2-desoxirribosa hasta 59 % (4000 µg/mL), asimismo inhibió al radical ABTS<sup>•+</sup> hasta 53,1 % (1000 µg/mL) y al radical DPPH<sup>•</sup> hasta 53 % (1000 µg/mL). Asimismo mostró correlación positiva de 0,93, con la 2 – Dx; 0,96, con el catión ABTS<sup>•+</sup>, y 0,99 con al radical DPPH<sup>•</sup>; con el contenido de polifenoles totales (1,01 µg AGE/g. muestra) mostrando afinidad positiva. Además influyó en la estabilidad el pH y la temperatura demostrado por presentar pardeamiento. Sin embargo el modelo de bebida de hierba luisa (MBHL) con respecto al índice de pardeamiento, polifenoles totales y actividad antioxidante en el tratamiento a pH 3 y Temperatura de 27°C presentó mejor estabilidad comparado con los demás tratamientos.

## SUMMARY

The present research was carried out in the laboratories of Foods Analysis and Spectrophotometry of the university : "Universidad Nacional Agraria de la Selva", Tingo Maria, Peru , during the months of February to December of the 2002. It was used as raw material, primary and secondary leaves of lemon grass (*Cymbopogon citratus* Staph), harvested in the province of Leoncio Prado, district of Padre Felipe Luyando - Naranjillo.

The objectives of the present research were: to evaluate the activity anti oxidation of the watery extract of lemon grass; to correlate the content of total polyphenols and the activity antioxidation; to evaluate the effect of the pH and the temperature in the stability of drink models. The watery extract of lemon grass demonstrated to possess activity antioxidation that depends on the concentration, in the inhibition of degradation of 2 - Desoxyribose to 59% (4000 µg/mL), also it inhibited the radical ABTS<sup>°+</sup> up to 53,1 % (1000 µg/mL) and to the radical DPPH<sup>°</sup> up to 53% (1000 µg/mL). Also it showed a positive correlation of 0,93, with 2 - Dx; 0,96; with the cation ABTS<sup>°+</sup>, and 0,99 with to the radical DPPH<sup>°</sup> and with the content of total polyphenols (1,01 µg AGE/g sample) showing a positive likeness. It also influenced in the stability the pH and the temperature demonstrated to present browning. However the pattern of drink of lemon grass (MBHL) in the browning index, total polyphenols and activity antioxidation in the treatment to pH 3, and Tempertura of 27°C presented better stability compared to the other treatments.

## I. INTRODUCCIÓN

La hierba luisa (*Cymbopogon citratus stapf*), es una planta exótica de hojas aromáticas que emiten un olor similar al limón, crece en forma silvestre en el Alto Huallaga; se emplea en la medicina natural como antiinflamatorio y antiespasmódico. Actualmente el consumo de la hierba luisa, presenta gran aceptación debido a su calidad sensorial y al contenido de aceites esenciales, siendo utilizado en la industria de gaseosas (citronela) y de perfumes (citral), no teniendo en cuenta su aporte antioxidante.

Los antioxidantes naturales constituidos por los polifenoles presentes en los vegetales como hierbas, hortalizas, frutas, cereales y otras plantas con alto contenido en polifenoles actúan como protectores de la salud humana previniendo enfermedades cardiovasculares, crónicas degenerativas, arterosclerosis y cáncer. Asimismo los polifenoles son de mayor interés para la industria alimentaria, retardando la degradación oxidativa de lípidos.

A través de la presente investigación se resalta la importancia del contenido de antioxidantes en la hierba luisa; para lo cual se plantearon los siguientes objetivos:

- Evaluar la actividad antioxidante del extracto acuoso de hierba luisa.
- Correlacionar el contenido de polifenoles totales y la actividad antioxidante.
- Evaluar el efecto del pH y temperatura de la estabilidad en modelos de bebida.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### A. HIERBA LUISA

#### 1. Descripción botánica

La hierba luisa es una planta herbácea, aromática (desprende un olor similar al limón concentrado en las hojas), rizomatosa, perenne, forma macollos, constituida por manojos densos de grama alta, pueden crecer hasta 2 m de altura. El tallo es corto, subterráneo y de orientación oblicua (Cabieses, 1993; Vila, 1995; Silva *et al.*, 1995). La base de la hoja es cilíndrica y se ajusta concéntricamente, crece en delgadas espigas, superficie áspera, puntas ligeramente endurecidas, lineales, bordes duros y cortantes, tienen generalmente más de un metro de largo y 2 cm de ancho (Cabieses, 1993).

#### 2. Clasificación taxonómica

Delgado (1987) clasifica la hierba luisa de la siguiente manera:

Reino	:	Vegetal
División	:	Fanerógamas
Subdivisión	:	Angiospermas
Clase	:	Monocotiledóneas
Orden	:	Glumiformes
Familia	:	Graminacia
Genero	:	<i>Cymbopogon</i>
Especie	:	<i>Cymbopogon citratus</i> Staph.

### 3. Composición fitoquímica

Diversas investigaciones fitoquímicas han permitido identificar componentes como:

- a) Monoterpenos: Citral como principal constituyente, borneol, canfeno, alcanfor, car-3-eno, cineal, citrala, citral-b, furfural, citronelal, metilheptona, ácido acético, caproico, acetato de citronelol, fenchone, geranial, acetato de geraniol, engenol, óxido de linaldol, mentol, mentona, neral, nerol, acetato de nerol, ocimeno,  $\alpha$ -pineno, terpineol, terpinoleno (Cabieses, 1993). El mirceno es el componente principal del aceite esencial de la hierba luisa (Olaniyi *et al.*, 1988).
- b) Sesquiterpeno:  $\alpha$ -oxibisaboleno,  $\alpha$ -cardineno, farnesol, humuleno (Cabieses, 1993).
- c) Triterpenos: (cymbopogenol, cymbopogona y cymbopogonol) y esteroides ( $\alpha$ -citosterol), alcaloides (Olaniyi *et al.* 1988), linaldol. Se ha aislado otros compuestos de la planta como cariofileno, linalilacetato, limoneno, quercetina y rutina (Cabieses, 1993).

### 4. Zonas de producción

Se encuentra en forma silvestre en la Selva Alta (Alto Huallaga), Selva Central (Chanchamayo, Santa Ana); Asimismo se le encuentra en pequeños huertos en el ámbito nacional (Cerón *et al.*, 1996).



## 5. Formas de uso

Las hojas de la hierba luisa maceradas alivian el dolor de cabeza y de ojos (Robineau, 1992). En nuestro medio es utilizado en forma de infusión dándole la atractiva característica sensorial a la bebida (olor y sabor); conferido por el alto contenido de los aceites esenciales tales como la citronela y citral (Cabieses, 1993; Silva *et al.*, 1995).

Los aceites esenciales de la hierba luisa son una fuente comercial importante, tanto por el volumen de extracción como por la calidad de sus aromas, las que se destinan a la elaboración de bebidas, repelente para insectos, en la fabricación de jabones y en la fabricación de perfumes, asimismo sirve como base en la elaboración de esencias costosas (Reeves, 1975). También sirve para la síntesis de varios productos químicos como mentol y ciertas vitaminas (León, 1968).

## 6. Acción farmacológica

La hierba luisa (*Cymbopogon citratus* Staph) es aprovechada por sus bondades medicinales como: antiinflamatorio faringeo (Cabieses, 1993), antipalúdico, antiasmático artritis, (Olaniyi *et al.*, 1988), sedante, antipirético, antijaquecoso, antigripal, antiséptico, estomáquico, antiulceroso y posee acción analgésica por vía tópica (Hyang - Sook *et al.*, 2000), antibacterial (Onawunmi *et al.*, 1984), antimicrobianos (Hyang - Sook *et al.*, 2000).

El mirceno es el componente principal del aceite esencial de la hierba luisa se reporta que tiene propiedades analgésicas y anticonceptivas (Olaniyi *et al.*, 1988).

El aceite esencial de hierba luisa ha sido examinado repetidamente en los laboratorios farmacológicos, comprobándose que tienen efectos fisiológicos como la acción relajante y antiespasmódico sobre el músculo liso intestinal y en las hojas se encontró que posee efectos diuréticos, y también se ha logrado aislar sustancias de acción similar a la insulina (Cabieses, 1993).

## **7. Acción antioxidante**

La hierba luisa contiene flavonoides que tiene propiedades antioxidantes (Meian y Mohamed, 2001); dentro de ellas se encuentran los flavonoides. Los flavonoides son compuestos polifenólicos naturales que están presentes en gran variedad de vegetales, responsables de las coloraciones de las flores y de las hojas (D'Crof, 1999).

Dentro de los flavonoides también encontramos al kaempferol este es un flavonoide que se encuentra en los aceites esenciales de la hierba luisa y posee actividad biológica con propiedades antioxidantes y antimicrobianos (Hyang - Sook *et al.*, 2000).

Meian y Mohamed (2001), mencionan que el Kaempferol se encuentra presente en el aceite esencial de la hierba luisa y tiene propiedades antifúngicas, antisépticas, antimicrobianas, antitumoral,

antiinflamatorio, antiulceras también estimulan la superóxido dismutasa como se ha visto en paciente con cirrosis hepática y tiene acción anticancerígeno, inhibe la actividad de HIV proteasa y la oxidación de la lipoproteínas de baja densidad (Nizart *et al.*, 2001).

## **B. ANTIOXIDANTES**

### **1. Definición**

Se considera como antioxidante a toda sustancia que hallándose presente a bajas concentraciones con respecto a las de un sustrato oxidable, retarda o previene la oxidación de dicho sustrato (Halliwell *et al.*, 1987B).

Los antioxidantes son compuestos que inhiben o retrasan la oxidación de otras moléculas mediante la inhibición de la propagación de la reacción de oxidación (Martínez - Valverde *et al.*, 2000).

Se define como sustancia con reacción de prevención de varios alimentos que en su estructura la presencia del oxígeno oxida al alimento; este efecto protector es indeseable porque muchos alimentos son decolorados por la presencia de este compuesto.

Asimismo todo antioxidante prolonga la vida útil de los alimentos protegiéndolo contra el deterioro causado por la oxidación (Pszczola, 2001).

## 2. Principales antioxidantes

Los antioxidantes pueden dividirse en dos grupos: antioxidantes enzimáticos y antioxidantes no enzimáticos (Martínez - Valverde *et al.*, 2000).

- Antioxidantes enzimáticos: actúan a nivel intracelular existen tres tipos de enzimas: superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa (González *et al.*, 2000).
- Antioxidantes no enzimáticos: transforman los radicales en menos agresivos entre ellas tenemos: polifenoles, alfa tocoferol (vitamina E), beta caroteno, vitamina C, glutatión y uratro (Polyakov *et al.*, 2001; Gutiérrez, 2002).

Los antioxidantes como los polifenoles son compuestos fenólicos que comparten las características de poseer en su estructura varios grupos bencénicos sustituidos por funciones hidroxílicas y son importantes para la fisiología de las plantas, poseen diferentes estructuras químicas y actividad antioxidante (Martínez - Valverde *et al.*, 2000; Scalbert y Williamson, 2000).

Los polifenoles se encuentran distribuidos ampliamente en alimentos de origen vegetal: frutas, cereales, hortalizas y bebidas (D'Croft, 1999; Richelle *et al.*, 2001).

Los polifenoles que intervienen como antioxidantes en alimentos de origen vegetal, para la obtención y preparación de alimentos con un

alto contenido en estos compuestos, presenta una reducción en la oxidación de los alimentos; a la vez que se obtienen alimentos más saludables por conservar el valor nutricional de ellos (Martínez - Valverde *et al.*, 2000).

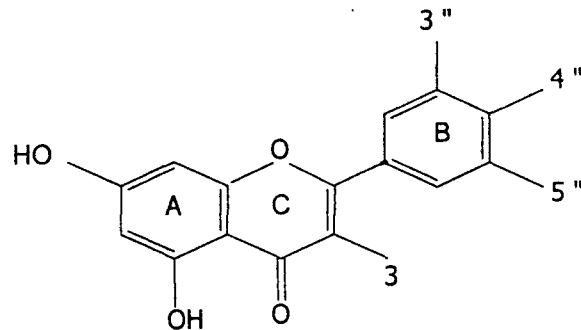
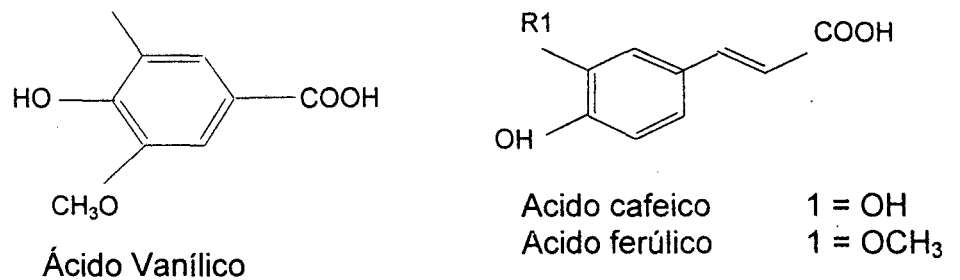
Los polifenoles son conocidos principalmente como ácidos fenólicos y flavonoides (D'Croft, 1999; Martínez - Valverde *et al.*, 2000). Los ácidos fenólicos han sido repetidamente implicados como antioxidantes naturales en frutas, hortalizas y otras plantas, entre ellos tenemos: el ácido cafeico, ferúlico y vanílico están ampliamente distribuidos en el reino vegetal (D'Croft, 1999; Zhen y Wang, 2001). En muchas plantas los principales flavonoides son las flavonol - aglyconas tales como la quercetina, myricetin (Fiorani *et al.*, 2002) y el kaempferol como se muestra en la Figura 1.

### **3. Efectos benéficos de los antioxidantes**

Los efectos benéficos de los antioxidantes, básicamente están dados por su capacidad de inhibir radicales libres ejerciendo acción en todos los procesos en los que se reduce o detiene el proceso de oxidación (Thomas, 2000), asimismo tienen acción potencialmente benéfica para la salud y que constituyen el principio activo de muchas plantas medicinales (González *et al.*, 2000).

La actividad antioxidante de los polifenoles se debe principalmente a sus propiedades redox, el cual les permite actuar como agentes reductores, donadores de hidrógeno y secuestradores del oxígeno

singulete; además de tener potencial para quelar metales (Hopia *et al.*, 1999), inhibir la lipoxigenasa y secuestrar radicales libres (Martínez - Valverde *et al.*, 2000).



Mirycetina	3'' = OH	4'' = OH	5'' = OH	3 = OH
Quercetina	3'' = OH	4'' = OH	5'' = H	3 = OH
Kaempferol	3'' = H	4'' = OH	5'' = H	3 = OH

**Figura 1.** Estructura de los principales ácidos fenólicos y flavonoides.

**Fuente.** Zhen y Wang (2001); Fiorani *et al.*, (2002).

Los antioxidantes como agentes reductores junto con otros agentes reductores de la dieta como: la vitamina C, vitamina E y los carotenoides protegen los tejidos del cuerpo (Scalbert y Williamson, 2000), por lo que el consumo de frutas y vegetales ricos en polifenoles, previenen muchas enfermedades, principalmente el corazón (Yildirim, 2001), además inhiben daños contra el ácido desoxirribonucleico -ADN- (Vasconcellos, 2000; Cadenas, 2001; Peinado, *et al.*, 2000).

Desde el punto de vista nutricional, los antioxidantes se asocian al papel protector contra enfermedades cardiovasculares, cáncer, aterosclerosis, retarda los procesos de envejecimiento (Vasconcellos, 2000; Cadenas, 2001; Peinado *et al.*, 2001).

Los flavonoides son consideradas una fuente importantes de antioxidantes que puede interactuar con las especies reactivas del oxígeno e inhibir la lipoperoxidación (González *et al.*, 2000).

Otros antioxidantes como el beta caroteno y vitamina C son efectivos secuestradores de radicales libres protegiendo contra enfermedades causadas por el estrés oxidativo quienes causan la disminución del sistema inmunológico en nuestro organismo (González - Torres *et al.*, 2000).

#### 4. Radicales libres

Son moléculas que en su estructura atómica presentan un electrón desapareado o impar en el orbital externo y puede existir independientemente (Clarckson y Thompson, 2000) siendo usualmente inestables, altamente reactivos y de vida corta (Hiramatsu y Koshikawa, 1997; Guerra, 2001; Thomas, 2000). Las especies reactivas del oxígeno (EROs) incluyen radicales del oxígeno y los no radicales derivados de oxígeno como el oxígeno singlete ( $O_2$ ) y peróxido de hidrógeno  $-H_2O_2-$  (Schmidl y Labuza, 2000).

Los radicales libres capturan el electrón que les falta para ser estables e iniciar una reacción en cadena que daña muchas células y pueden ser indefinidas si los antioxidantes no intervienen (González - Torres *et al.*, 2000; Hiramatsu y Koshikawa, 1997).

Los radicales libres causan muchas enfermedades como aterosclerosis, desórdenes en el tracto respiratorio, enfermedades neurodegenerativas, inflamaciones y cáncer (Anderson y Phillips, 2001).

Los radicales libres y las EROs son producidos constantemente en los seres humanos en condiciones normales durante el metabolismo celular normal (González - Torres *et al.*, 2000). Durante el proceso de oxidación a nivel celular aumentan los radicales libres y EROs que pueden interferir en los procesos normales y dañan las células



corporales causando un incremento e ingresando al estrés oxidativo (Thomas, 2000).

El estrés oxidativo es un estado de desbalance entre radicales libres y cantidades de antioxidantes presentes en el nivel celular, siendo el principal inductor de la disfunción mitocondrial en la patogénesis de la destrucción celular que causa el envejecimiento (Rodríguez *et al.*, 2001; Peinado *et al.*, 2001).

El estrés oxidativo depende de la velocidad de generación de oxidantes y de los niveles de defensa de antioxidantes los cuales están genéticamente controlados (Rodríguez *et al.*, 2001).

El estrés oxidativo está asociado a: 1) Enfermedades inflamatorias: artritis, vasculitis; 2) Enfermedades del corazón; 3) Ischemia intestinal, Síndrome de inmunodeficiencia adquirida; 4) Úlceras gástricas; 5) Enfermedad de alzheimer; 6) Enfermedad de parkinson y muchas otras (Andreoli, 2000).

### **C. ESTABILIDAD DE POLIFENOLES EN MODELOS DE BEBIDAS**

La estabilidad de los polifenoles en sistemas alimenticios de origen vegetal, está relacionado con el grado de formación de pigmentos amarillos y marrones debido a la actividad de las enzimas polifenoloxidasas (Martínez – Valverde *et al.*, 2000) y tirosina en reacciones enzimáticas y a la del oxígeno en reacciones no enzimáticas o “reacción de Maillard” (Bradshaw *et al.*, 2001).

## 1. Factores que afectan la estabilidad

La estabilidad de un alimento de origen vegetal frente a la oxidación depende de cuatro factores como: formulación, procesamiento, empaçado y condiciones de almacenamiento. Para el almacenamiento es importante conocer la cinética de pérdida de calidad como la vida útil del alimento ocasionada muchas veces por el desarrollo gradual del pardeamiento en un alimento (Álvarez, 2001).

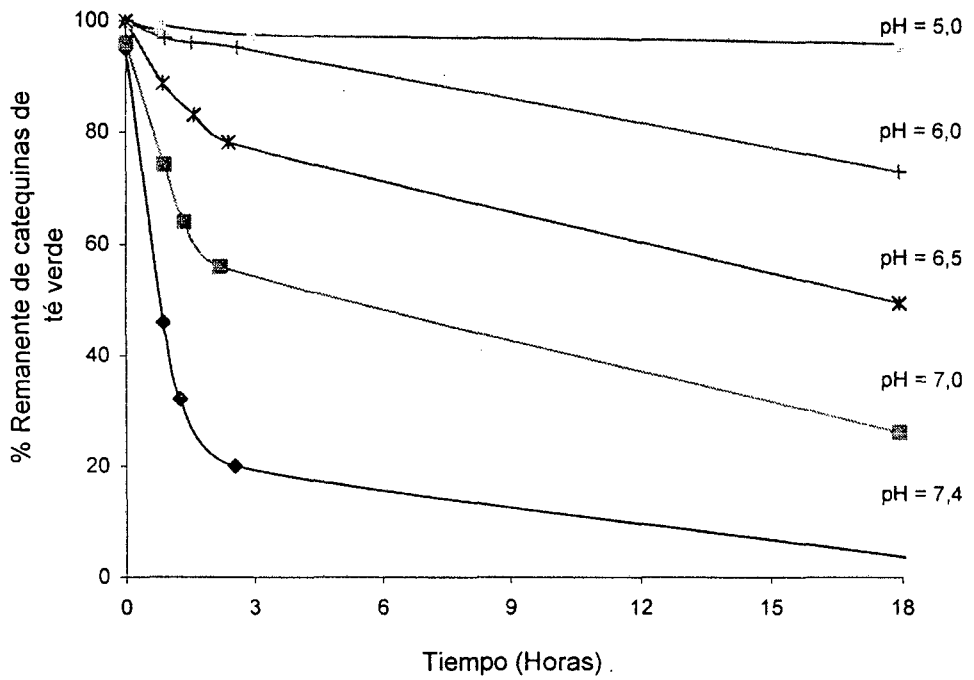
El desarrollo gradual del pardeamiento genera productos de la reacción de Maillard que es dependiente de las condiciones intrínsecas del medio y de los factores como: estructura y concentración del sustrato, pH, temperatura, actividad de agua y la presencia de agentes complejos como fenoles y iones metálicos (Kitts *et al.*, 1999; Malien - Aubert *et al.*, 2001).

Los productos de la reacción de Maillard al ser sometidos a los diferentes tratamientos durante el procesamiento de manufactura de los alimentos afectan la evolución de los pigmentos pardos con la consecuente producción de productos de la reacción de Maillard, también la actividad antioxidante y otros productos que se presentan en suspensión y que tienden a producir precipitación siendo factores que afectan la estabilidad de un alimento (Malien - Aubert *et al.*, 2001). Los productos sustrato de la reacción de Maillard, pueden actuar como antioxidantes o prooxidantes (Nicoli *et al.*, 1999).

## **2. Evaluaciones de la estabilidad de polifenoles en modelos de bebidas**

En la evaluación de éstas reacciones de Maillard se utilizaron a las catequinas de té verde en solución acuosa y en condiciones aceleradas de almacenamiento siendo más estables a 37 °C que a 98 °C y bajos valores de pH. Además es importante considerar la presencia de otros ingredientes en el sistema alimenticio ya que de esto depende la relativa vida útil del producto (Chen *et al.*, 2001).

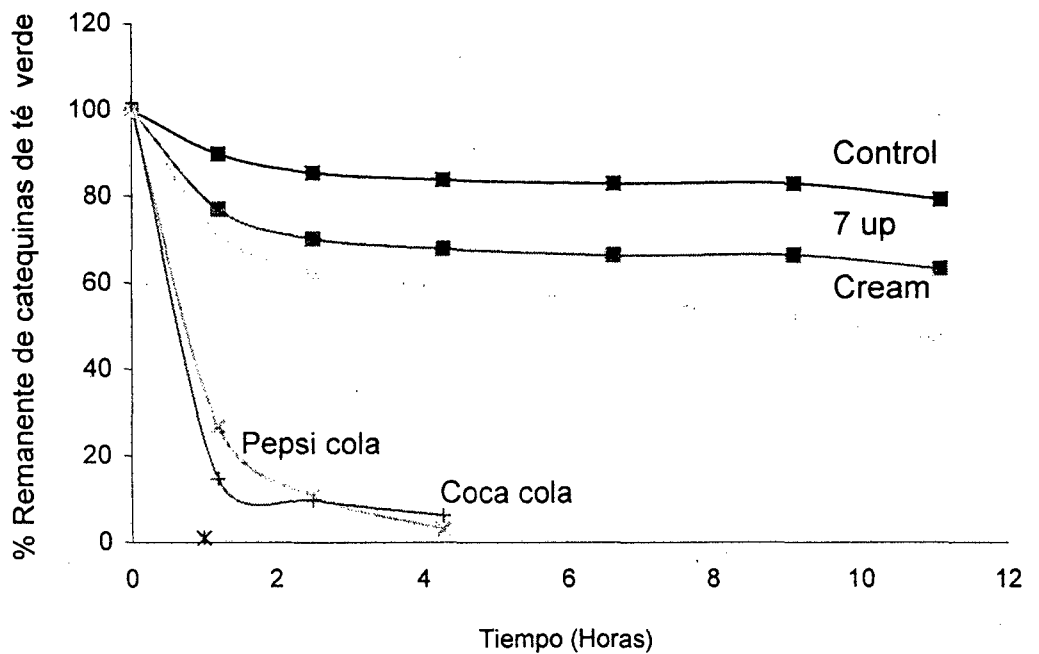
En la Figura 2 se muestra el contenido de catequinas de té verde con respecto al tiempo, en solución buffer fosfato de sodio a diferentes pH y cada tipo de catequina muestra diferentes niveles de estabilidad en soluciones buffer fosfato de sodio a pH = 7,4 (Zhen y Wang, 2001).



**Figura 2.** Estabilidad de las catequinas de té verde.

**Fuente:** Adaptado de Zhen y Wang (2001).

Las catequinas del té verde en solución acuosa y en condiciones aceleradas de almacenamiento son más estables a 37 °C que a 98 °C (Chen *et al.*, 2001). Las catequinas del té verde son más sensibles a bajos pH, cuando es adicionado a bebidas comerciales o soluciones de sacarosa conteniendo ácido cítrico y ácido ascórbico, como se presenta en la Figura 3.



**Figura 3.** Estabilidad de las catequinas del té verde en agua destilada y otras bebidas. Los datos representan la media  $\pm$  SD, n = 6.

**Fuente:** Adaptado de Zhen y Wang, (2001).

Además es importante considerar la presencia de otros ingredientes en el sistema alimenticio y de estos depende la relativa vida útil del producto (Chen *et al.*, 1998).

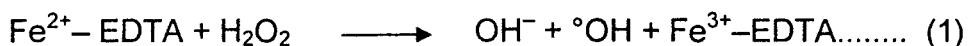
## D. METODOS DE EVALUACIÓN EN LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

Los métodos para la evaluación de la actividad antioxidantes se realiza usando radicales libres quienes simulan la reacción en un ente biológico.

### 1. Radical hidroxilo (2 - Desoxirribosa)

Los radicales hidroxilos generados por la reacción de Fenton, conteniendo  $H_2O_2$ , EDTA y ácido ascórbico, pueden ser medidos en inhibición de la degradación del desoxirribosa que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico (TBA) bajo condiciones ácidas (Kitts *et al.*, 1999), por la formación del malonaldehido (MDA) que se evidencia por el color rosado (Halliwell *et al.*, 1987B).

El proceso de prevención de degradación de la desoxirribosa se esquematiza en las ecuaciones 1 y 2.



Más que actividad antioxidante, lo que en realidad cuantifica esta prueba es la capacidad de quelar al ión hierro (II) en el sistema  $\text{Fe}^{2+}$  – EDTA +  $\text{H}_2\text{O}_2$ , que evita la reacción de Fenton con el  $\text{H}_2\text{O}_2$ , no favoreciendo la producción de  $^{\circ}\text{OH}$  en menor o mayor grado, dependiendo de la capacidad quelante (Halliwell y Grootvei, 1987A).

## **2. Radical 2,2' azinobis -3- ethylbenzotiazolina -6- ácido sulfónico (ABTS<sup>°+</sup>)**

El ABTS (verde - azul como catión ABTS<sup>°+</sup>), es un radical cromógeno estable, fácil de usar, tiene un elevado nivel de sensibilidad y permite analizar un gran número de muestras en tiempo relativamente corto (Re *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2002).

Arnoa (2000), menciona que la química de reacción del ABTS<sup>°+</sup> en las pruebas, involucra una disminución en la intensidad del color del ABTS<sup>°+</sup> de verde - azul a blanco - transparente, por efecto de la inhibición del antioxidante.

## **3. Radical 1'1 diphenyl -2- picrylhidrazyl (DPPH<sup>°</sup>)**

El DPPH<sup>°</sup> es un reactivo muy usual para investigar la actividad de inhibición de radicales libres de los polifenoles (Yildirim, 2001). El mecanismo de reacción consiste en sustraer un átomo de hidrógeno de un fenol donador para dar diphenylpicrylhidrazyl y un radical fenoxil (Lebeau *et al.*, 2000).

La reacción involucra un cambio de color de violeta a amarillo que fácilmente puede ser monitoreado midiendo el decaimiento de la absorbancia a 515 nm (Brand - Williams *et al.*, 1994).

El radical fenoxil puede sufrir posteriores reacciones tales como el acoplamiento y fragmentación, que resultan en productos complejos y que modifica la reacción valores del coeficiente de inhibición del 50 % del radical IC<sub>50</sub> por alteración de la estequiometría (Lebeau *et al.*, 2000).

El IC<sub>50</sub> es un parámetro que describe en forma global la reacción con el radical proporcionando en forma limitada del mecanismo de reacción (Espin *et al.*, 2000). Esto permite diferenciar a los compuestos de acuerdo a su reactividad intrínseca (Lebeau *et al.*, 2000).

## **E. Extracto**

### **1. Definición**

Es la separación de componentes en una mezcla de líquidos por contacto con un disolvente adecuado inmisible en ella, se usa para recuperación de determinados componentes importantes presentes en vegetales (Lewis y Irving, 1992; Mazza, 1998).

### **2. Métodos de extracción**

Las técnicas de extracción de los componentes activos de las plantas, en la composición influyen muchos factores: como la



preparación de la muestra, el procedimiento de extracción y el disolvente utilizado. Se puede extraer con: éter, metanol y agua (Mazza, 1998).

Los extractos con éter contienen aceites esenciales, poliacetilenos, fitosteroles y glucósidos mientras que los extractos con metanol contienen principalmente componentes de bajo peso molecular, la extracción con metanol seguida de la extracción con éter se obtiene glucósidos, pero también se puede obtener moléculas más pequeñas como azúcares, aminoácidos, péptidos y nucleótidos y la extracción en agua se obtienen sustancias macromoleculares (Mazza, 1998).

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **A. LUGAR DE EJECUCIÓN**

El presente trabajo de investigación se ejecutó entre los meses de febrero a diciembre del 2002, en los laboratorios de Análisis de Alimentos y Espectrofotometría de la Universidad Nacional Agraria de la Selva, ubicada a 09° 18' 00" de latitud sur; 76° 91' 00" de longitud oeste a una altitud de 660 msnm, temperatura que varía de 18 °C a 30 °C y humedad relativa de 79 – 86 %, con precipitación pluvial de 3500 mm, en el distrito de Rupa Rupa, provincia de Leoncio Prado, departamento de Huanuco.

#### **B. MATERIA PRIMA E INSUMOS**

##### **1. Hierba luisa**

La hierba luisa (*Cymbopogon citratus stapf*) fue cosechada en el distrito de Padre Felipe Luyando, Naranjillo en la provincia de Leoncio Prado, departamento de Huanuco.

Las hojas de la hierba luisa fueron cortadas a 35 cm del ápice superior (cortadas en cuatro partes), lavadas con agua potable y deshidratadas a 60 °C por 5 horas, luego se molieron y tamizaron en malla de 0,5 mm de luz. Las muestras secas y molidas de hierba luisa, se empacaron en bolsas de polietileno y se almacenaron en refrigeración para su análisis posterior.

## 2. Insumos

Se empleó azúcar blanca; ácido cítrico (Riedel - Haën) y benzoato de sodio (Riedel - Haën).

## C. MATERIALES

### 1. Materiales de laboratorio

- Microcubetas de poliestireno (1 x 1 x 4,5 cm).
- Micropipetas (10 - 200  $\mu$ L y 200 - 1000  $\mu$ L).
- Tips (100 y 1000  $\mu$ L).
- Fiolas (25, 50 y 100 mL).
- Vasos de precipitación (50, 100 y 500 mL).
- Frascos de vidrio color ámbar (1,5 cm de diámetro).
- Embudo de vidrio.
- Vasos de precipitación (50, 100, 500 mL).
- Tubos de vidrio con tapa (0,5 de diámetro).
- Gradilla.
- Papel watman N° 4.
- Tubos de plástico de poliestireno (14 mL).
- Mechero Bunsen.
- Termómetro (0 - 100°C).

## 2. Equipos de laboratorio

- Balanza analítica plus (Ohaus Co. Suiza).
- Espectrofotómetro (UV-1201 Shimadzu Co. Japón; Genesys 8).
- Estufa (Precision Scientific, USA).
- Molino eléctrico de cuchillas (Thomas Wiley Laboratory MVL Thomas Scientific USA).
- Potenciometro (Inolab Co. Alemania).
- Refractómetro (Labor Min Hungría).
- Refrigeradora (Admiral USA).
- Cámara de secado.
- Baño María (Precision Scientific, USA) con temperatura regulable.

## 3. Reactivos

- 2 - Desoxirribosa (2 - Dx; Sigma Chemical Co. USA).
- 2,2' - azinobis -3- etilbenzotiazolina -6- ácido sulfónico (ABTS<sup>o+</sup>; Sigma Chemical Co. USA).
- 1,1 diphenyl -2- picrylhidrazyl (DPPH<sup>o</sup>; Sigma Chemical Co. USA).
- Folin ciocalteau (Sigma Chemical Co. USA).
- Cloruro férrico, (Sigma Chemical Co. USA).
- Carbonato de sodio (Sigma Chemical Co. USA).
- Ácido gálico (Sigma Chemical Co. USA).

- Persulfato de potasio (Sigma Chemical Co. USA).
- Ácido ascórbico (Sigma Chemical Co. USA).
- Fosfato de potasio (Sigma Chemical Co. USA).
- Peróxido de hidrógeno (30 % v/v).
- Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA).
- Ácido tiobarbitúrico (TBA).
- Ácido tricloroacético (TCA).
- Hidróxido de sodio (NaOH).
- Ácido clorhídrico (HCl).
- Etanol (95 %).

## **D. MÉTODOS DE ANÁLISIS**

### **1. Evaluación de la actividad antioxidante**

Para la evaluación de la actividad antioxidante del extracto acuoso de hierba luisa (EAHL) se utilizaron los siguientes métodos:

#### **a. Radical hidroxilo (2 - Desoxirribosa)**

Se realizó por el método de radicales hidroxilos, basado en la degradación del reactivo 2 – desoxirribosa (2 – Dx) descrito por Halliwell y Grootvei, 1987A.

**b. Radical 2,2' azinobis-3- ethylbenzotiazolina-6-ácido sulfónico (ABTS<sup>o+</sup>)**

Se realizó por el método del radical catión 2,2'- azinobis -3- etilbenzotiozolína -6- ácido sulfónico (ABTS<sup>o+</sup>), descrito y modificado por Re *et al.*, (1999).

**c. Radical 1'1 diphenyl -2- picrylhidrazyl (DPPH<sup>o</sup>)**

Se usó el método del radical 1'1 diphenyl -2- picrylhidrazyl (DPPH<sup>o</sup>) descrito por Brand - Williams *et al.*, (1994), modificado por Sandoval *et al.*, (2001).

## **2. Evaluación de polifenoles totales**

Para la evaluación de polifenoles totales en el EAHL se utilizó el método de: Folin ciocalteau, descrito por Brand - Williams *et al.*, (1994) modificado por Hopia *et al.*, (1999).

## E. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

### 1. Evaluación de la actividad antioxidante

#### a. Método del radical hidroxilo (2 - Desoxirribosa)

La preparación del reactivo de la 2 desoxirribosa (2 - Dx) fue a una concentración de 10 mM.

Seguidamente se preparó el extracto acuoso de hierba luisa constituyendo un stock de 100 mg/mL (EAHL<sub>stock</sub>) de esta solución stock se prepararon soluciones de trabajo de: 800, 1600, 2400, 3200 y 4000 µg/mL.

La preparación de los reactivos se realizó de la siguiente manera: 2 - desoxirribosa (10 mM), fosfato de potasio (100 mM), cloruro férrico (1 mM), peróxido de hidrogeno (30 % v/v), ácido ascórbico (1 mM), EDTA (100 mM), TBA (1 %), TCA (2,8 %) -Halliwell *et al.*, 1987A.

La evaluación de radicales hidroxilo se generó en un tubo de vidrio (0,5 cm de diámetro) en el siguiente orden: 2 - Dx (200 µL); fosfato de potasio (200 µL), cloruro férrico (100 µL), peróxido de hidrogeno (100 µL), ácido ascórbico (100 µL) y finalmente las soluciones de trabajo de: 800, 1600, 2400, 3200, 4000 mg/mL (200 µL) luego lo llevamos a baño maría a 37 °C por 1 hora. Para completar la reacción se agregó: EDTA (100

$\mu\text{L}$ ), TBA (500  $\mu\text{L}$ ), TCA (500  $\mu\text{L}$ ) se llevaron a ebullición por 10 minutos; inmediatamente se procedió a su lectura correspondiente en una microcubeta de poliestireno (1 x 1 x 4 cm) usándose un espectrofotómetro Shimadzu Co. Las lecturas se registraron a 532 nm de longitud de onda.

El % de inhibición del secuestro de radicales  $^{\circ}\text{OH}$  fue determinado por la siguiente expresión:

$$\% \text{ de inhibición de la } 2 - \text{Dx} = \left[ \frac{\text{Ac} - \text{Am}}{\text{Ac}} \right] \times 100$$

Donde:

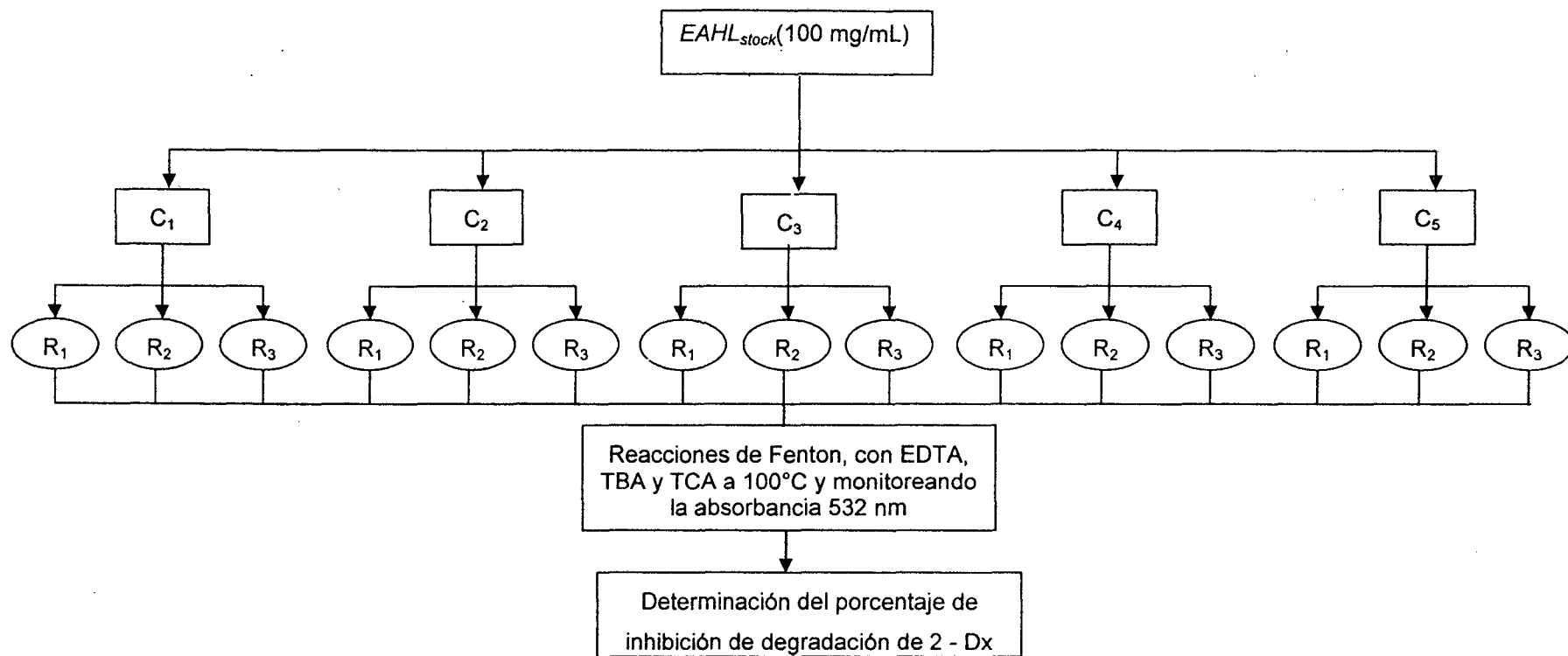
Ac = Absorbancia de la reacción del blanco (2 – Dx).

Am = Absorbancia de la reacción de la muestra

Los resultados fueron evaluados usando un diseño completo al azar (DCA) comparando las concentraciones en el EAHL, donde existió diferencia estadística se aplicó la prueba de Duncan ( $p < 0,05$ ).

En la Figura 4, se presenta el diseño experimental para la determinación de la actividad antioxidante en el EAHL evaluado por el método de radicales hidroxilos (2 - Dx).





Donde:

$C_i$  = Concentraciones finales de: 800, 1600, 2400, 3200 y 4000  $\mu\text{g/mL}$  ( $i = 1, 2, 3, 4$  y  $5$ ).

$R_i$  = Repeticiones ( $i = 1, 2$  y  $3$ ).

**Figura 4.** Diseño experimental para la evaluación de la actividad antioxidante en el EAHL con 2 - Dx.

**b. Método del radical 2,2' azinobis -3- ethylbenzotiazolina -6- ácido sulfónico (ABTS<sup>o+</sup>)**

La preparación del reactivo ABTS<sup>o+</sup> (7mM) fue en etanol (95 %) y persulfato de potasio en solución acuosa a 140 μM.

Se preparó el extracto acuoso de hierba luisa a concentración de 100 mg/mL, de ésta solución stock se prepararon soluciones de trabajo a: 200, 400, 600, 800 y 1000 μg/mL.

A partir de éstas soluciones de trabajo se tomó 10 μL del EAHL que fueron reaccionadas con el ABTS<sup>o+</sup>. La reacción *in vitro* se generó en una microcubeta de poliestireno (1 x 1 x 4 cm) muestra (10 μL) y ABTS<sup>o+</sup> (990 μL) luego inmediatamente se procedió a la lectura correspondiente usándose un espectrofotómetro Genesys 8. Las absorbancias se registraron a 734 nm de longitud de onda cada 60 segundos por 30 minutos.

La inhibición de secuestro del ABTS<sup>o+</sup> fue determinado por la siguiente expresión:

$$\% \text{ de inhibición del ABTS}^{\circ} = [(Ac - Am)/Ac] \times 100$$

Donde:

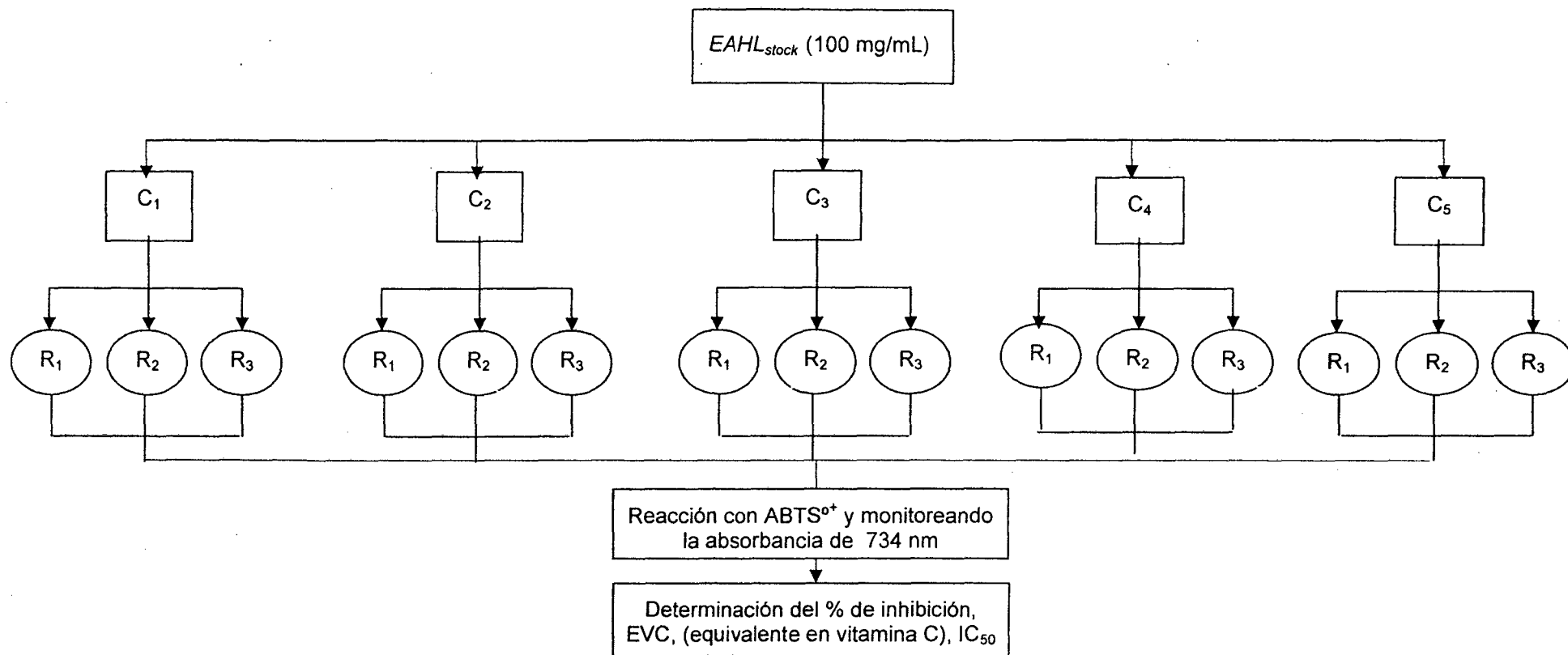
Ac = Absorbancia de la reacción del blanco del ABTS<sup>o+</sup>.

$A_m$  = Absorbancia de la reacción de la muestra a los 30 minutos.

Los resultados fueron sometidos a un análisis estadístico comparando las concentraciones en el EAHL en un diseño completo al azar (DCA), donde la variable independiente es el % de inhibición del  $ABTS^{o+}$  y la variable dependiente es la concentración en el EAHL, donde existió diferencia significativa se aplicó la prueba de Duncan ( $p < 0,05$ ). En la Figura 5, se muestra el diseño experimental para la evaluación en el EAHL medido por el radical  $ABTS^{o+}$ .

El mejor % de inhibición del  $ABTS^{o+}$  ( $p < 0,05$ ), fue expresado en equivalente de vitamina C a los 30 minutos. Para la expresión en equivalente de Vitamina C se utilizó la curva estándar (Anexo - I), construida de 1 - 6 mg/100 mL (Kim *et al.*, 2002).

El % de inhibición del  $ABTS^{o+}$  obtenido con cada uno de las 5 concentraciones fue utilizada para determinar el coeficiente de inhibición del  $ABTS^{o+}$  ( $IC_{50}$ ). Este coeficiente de inhibición nos indica la cantidad de la hierba luisa requerido para inhibir el 50 % del radical libre  $ABTS^{o+}$  (Pellegrini *et al.*, 2000).



Donde:

$C_i$  = Concentraciones finales de: 200, 400, 600, 800 y 1000  $\mu\text{g/mL}$  ( $i = 1, 2, 3, 4$  y  $5$ ).

$R_i$  = Repeticiones ( $i = 1, 2$  y  $3$ ).

**Figura 5.** Diseño experimental para la evaluación de la actividad antioxidante en el EAHL con  $\text{ABTS}^{\text{o+}}$ .

**c. Método del radical 1,1' diphenyl -2- picrylhidrazyl (DPPH°)**

El procedimiento para la preparación del reactivo y muestras del EAHL fue: el DPPH° se disolvió en etanol al 95 %, preparándose una solución stock de 1 mM.

Se preparó una solución stock en el EAHL de 100 mg/mL, de ésta solución stock se prepararon soluciones de trabajo a concentraciones de: 200, 400, 600, 800 y 1000 µg/mL.

A partir de éstas soluciones de trabajo de EAHL se tomó 50 µL del EAHL que reaccionaron con el DPPH° (100 µM). La reacción *in vitro*, se generó en una microcubeta de poliestireno (1 x 1 x 4 cm) muestra (50 µL) y DPPH° (950 µL), luego se procedió a su lectura usándose un espectrofotómetro Genesys 8. Las absorbancias se registraron a 515 nm cada 60 segundos por 30 minutos.

La inhibición de secuestro del DPPH° fue determinado por la siguiente expresión:

$$\% \text{ de inhibición DPPH}^\circ = [(Ac - Am) / Ac] \times 100$$

Donde:

Ac = Absorbancia de reacción con DPPH°.

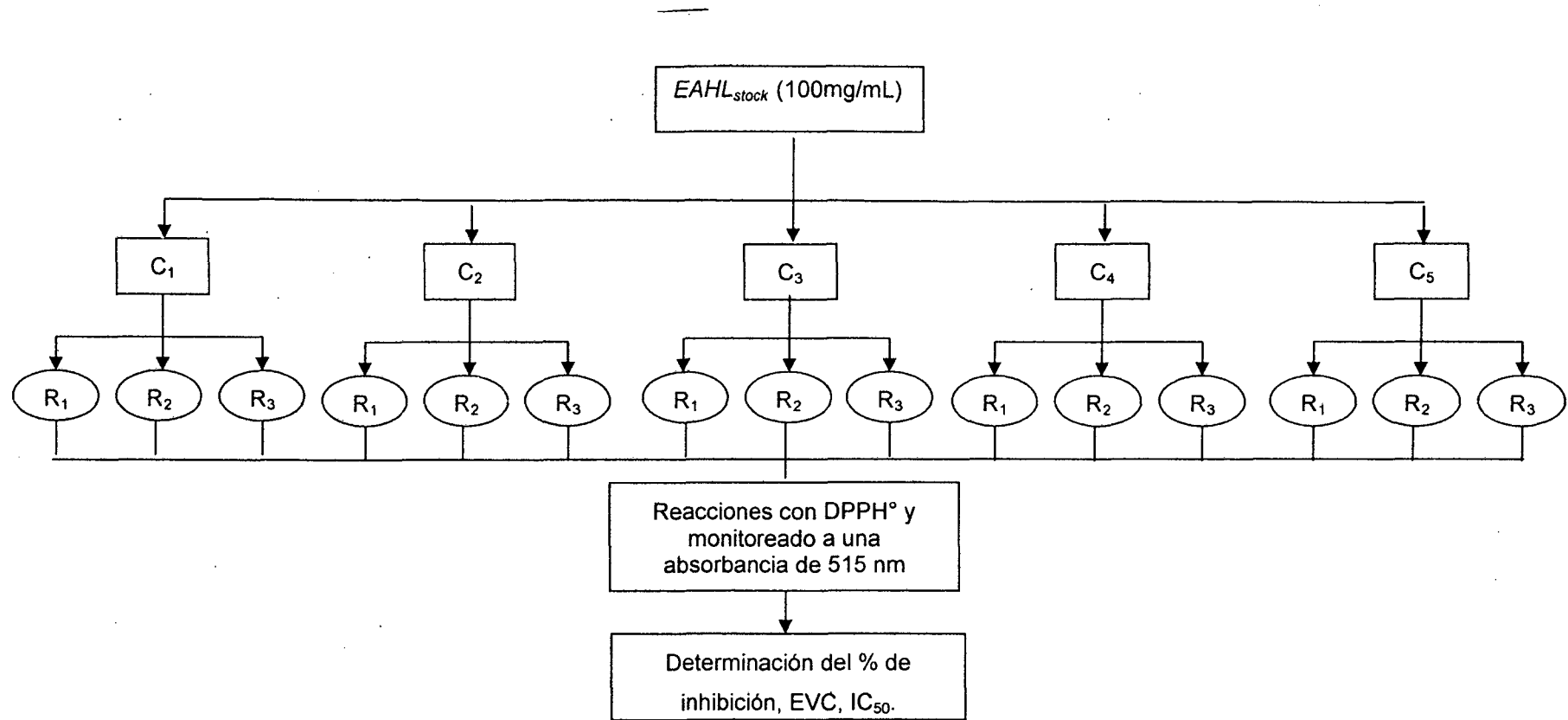
$A_m$  = Absorbancia de la reacción de la muestra a los 30 minutos.

Los resultados fueron sometidos a un análisis estadístico comparando las concentraciones en el EAHL, utilizándose un DCA donde la variable independiente es el % de inhibición del DPPH° y la variable dependiente es la concentración del EAHL, donde existió diferencia significativa aplicamos la prueba de Duncan ( $p < 0,05$ ).

En la Figura 6, se muestra el diseño experimental para la evaluación en el EAHL medido por el radical DPPH°.

El más alto % de inhibición del DPPH° fue expresado en equivalente de vitamina C, (Anexo - II) a los 30 minutos, construida de la curva estándar de 1 - 6 mg/100 mL (Kim *et al.*, 2002).

El % de inhibición del DPPH° ( $p < 0,05$ ) obtenido con cada uno de las 5 concentraciones; fue utilizada para determinar el coeficiente de inhibición ( $IC_{50}$ ) del DPPH°. Este coeficiente de inhibición nos indica la cantidad de la hierba luisa requerido para inhibir el 50 % del radical libre DPPH° (Lebeau *et al.*, 2000).



Donde:

$C_i$  = Concentraciones finales de: 200, 400, 600, 800 y 1000  $\mu\text{g/mL}$  ( $i = 1, 2, 3, 4$  y  $5$ ).

$R_i$  = Repeticiones ( $i = 1, 2$  y  $3$ ) para el radical  $\text{DPPH}^\circ$ .

**Figura 6.** Diseño experimental para la evaluación de la actividad antioxidante en el EAHL con  $\text{DPPH}^\circ$ .

## **2. Correlación entre el contenido de polifenoles totales y la actividad antioxidante**

La evaluación de la correlación entre el contenido de polifenoles totales y la actividad antioxidante se realizó del siguiente modo:

### **a. Evaluación de polifenoles totales**

Para la evaluación de polifenoles totales se utilizó el siguiente método:

#### ***Método de Folin ciocalteau***

La preparación del reactivo de Folin ciocalteau en solución acuosa a 1 mM (solución stock).

Seguidamente se preparó una solución stock del extracto acuoso de hierba luisa (EAHL<sub>stock</sub> ;100 mg/mL), de ésta solución stock se prepararon soluciones de trabajo para las reacciones *in vitro* de: 200, 400, 600, 800, 1000, 1600, 2400, 3200, 4000 µg/mL.

A partir de éstas soluciones de trabajo se tomó 100 µL en el EAHL que fueron reaccionadas con: 100 µL de Folin ciocalteau y 2 mL de bicarbonato de sodio, para completar la reacción se dejó reposar por 30 minutos.



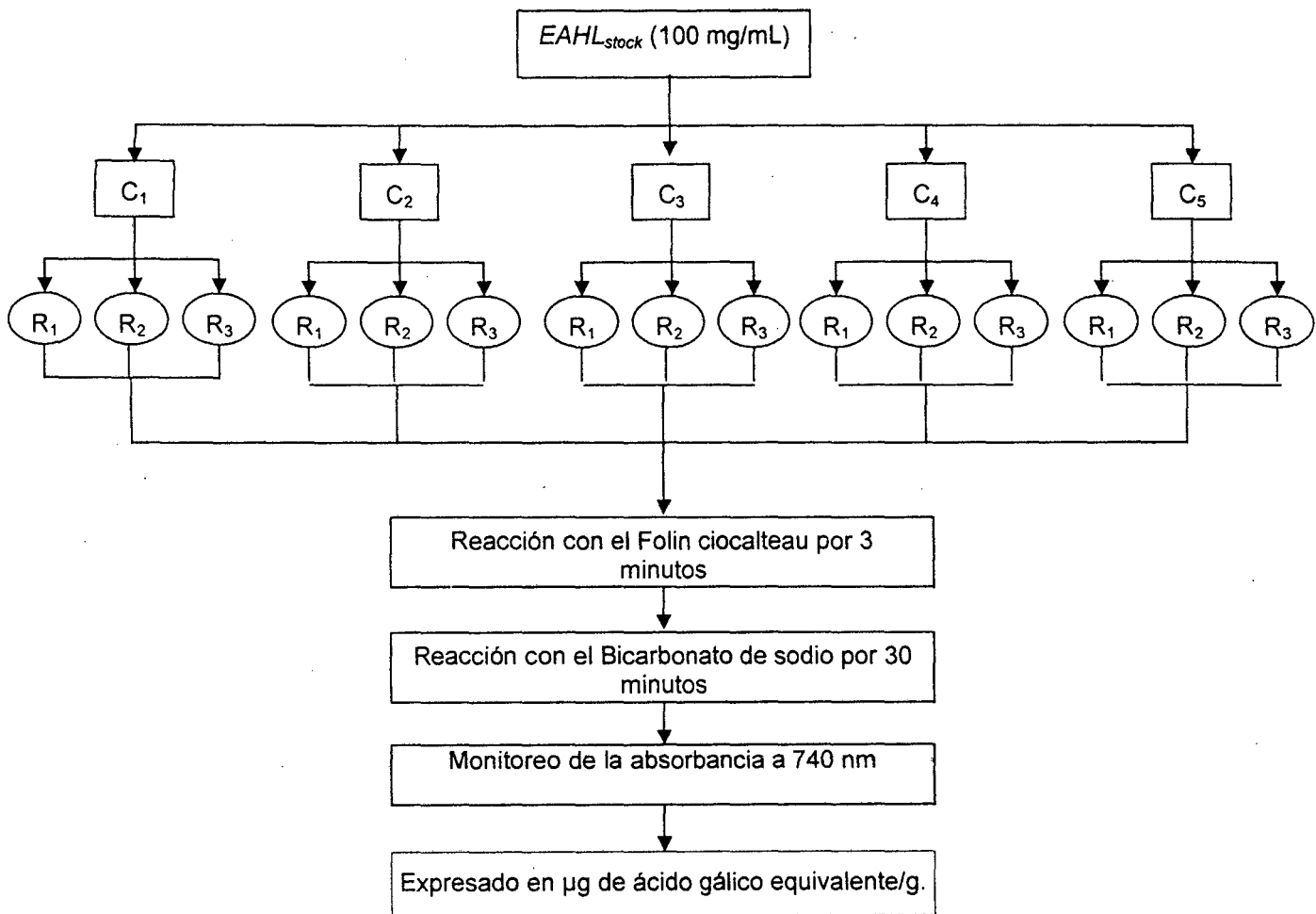
La reacción se generó en una microcubeta de poliestireno (1 x 1 x 4,5 cm) luego inmediatamente se procedió a su lectura correspondiente usándose un espectrofotómetro Genesys 8. Las absorbancias se registraron a 740 nm de longitud de onda.

Para el cálculo de polifenoles totales expresado en miligramo de ácido gálico equivalente (AGE) por 100 g muestra, utilizándose la curva estándar de ácido gálico equivalente (Anexo – III) en el rango de: 0, 25, 75, 100, 125, 150, 175, 200  $\mu\text{M}$  (Hopia *et al.*, 1999). En la Figura 7 se muestra el diseño experimental para la evaluación de polifenoles totales en el EAHL.

Para la expresión de los resultados de polifenoles totales se utilizó la estadística descriptiva con el promedio de tres repeticiones (Ureña y D'Arrigo, 1999; Veliz, 1993).

**b. Correlación entre polifenoles totales con la actividad antioxidante**

Para correlacionar el contenido de polifenoles totales con la actividad antioxidante, se utilizó el % de inhibición de la actividad antioxidante del 2 - Dx, ABTS<sup>o+</sup> y DPPH<sup>o</sup> versus el contenido de polifenoles totales expresado en ácido gálico equivalente y finalmente fue sometido a un análisis de correlación.



Donde:

$C_i$  = Concentraciones finales de: 800, 1600, 2400, 3200 y 4000  $\mu\text{g/mL}$  ( $i = 1, 2, 3, 4$  y  $5$ ) para la 2-Dx

$C_i$  = Concentraciones finales de: 200, 400, 600, 800 y 1000  $\mu\text{g/mL}$  ( $i = 1, 2, 3, 4$  y  $5$ ) para el ABTS<sup>o+</sup> y DPPH<sup>o</sup>.

$R_i$  = Repeticiones ( $i = 1, 2$  y  $3$ ).

**Figura 7.** Diseño experimental para la evaluación de polifenoles totales.

### **3. Evaluación del efecto del pH y temperatura en la estabilidad de modelos de bebida**

Los modelos de bebida de hierba luisa (MBHL) en base a lo descrito por Arts *et al.* (2000), se realizó de la siguiente manera:

Se preparó un extracto acuoso de hierba luisa a una concentración de 10 mg/mL, se llevó a ebullición durante 5 minutos, se filtro con papel watman N° 4; regulado los sólidos solubles a 11 °Brix; se adicionó 0,05 % de benzoato de sodio como conservante; se reguló el pH con ácido cítrico a: 3, 4, 5 y se incluyó un tratamiento sin regulación del pH (Figura 8).

Los MBHL fueron almacenadas a temperatura de: 27 °C, 37 °C, y 45 °C, las temperaturas fueron registradas durante los 4 días de almacenamiento (Anexo - IV). Los MBHL descritos por Arts *et al.* 2000, se evaluaron de la siguiente manera:

#### **a. Índice de pardeamiento**

Durante el almacenamiento de los modelos de bebida de hierba luisa (MBHL) descrito por Arts *et al.* (2000), se evaluó la variación del porcentaje de pardeamiento (% P) en función al tiempo de almacenamiento (4 días). Dichas evaluaciones se realizaron a 440 nm de longitud de onda, los % de pardeamiento se expresaron de la siguiente manera:

$$\% \text{ de Pardeamiento} = \frac{A_f - A_i}{A_i} \times 100$$

Donde:

$A_f$  = Absorbancia final.

$A_i$  = Absorbancia inicial.

Los resultados se analizaron estadísticamente mediante un análisis de varianza combinado, utilizándose el siguiente modelo: pH, temperatura, días, pH\*temperatura, temperatura\*pH\*Días, para conocer la significancia en el % de pardeamiento, se utilizó la prueba de Duncan ( $p < 0,05$ ), utilizándose el software "Statistic Analysis System (SAS) para Windows 6,12.

#### **b. Polifenoles totales**

El contenido de polifenoles totales (PT) en los MBHL se evaluó cada 24 horas registrándose las absorbancias a 740 nm de longitud de onda.

Para la expresión de los PT en ácido gálico equivalente, se utilizó una curva estándar de ácido gálico (Anexo - III), construida de: 0, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200  $\mu\text{M}$ . Los resultados fueron expresados en AGE.

Los resultados se analizaron estadísticamente mediante un análisis de varianza combinado, utilizándose el siguiente modelo: pH, temperatura, días, pH\*temperatura,

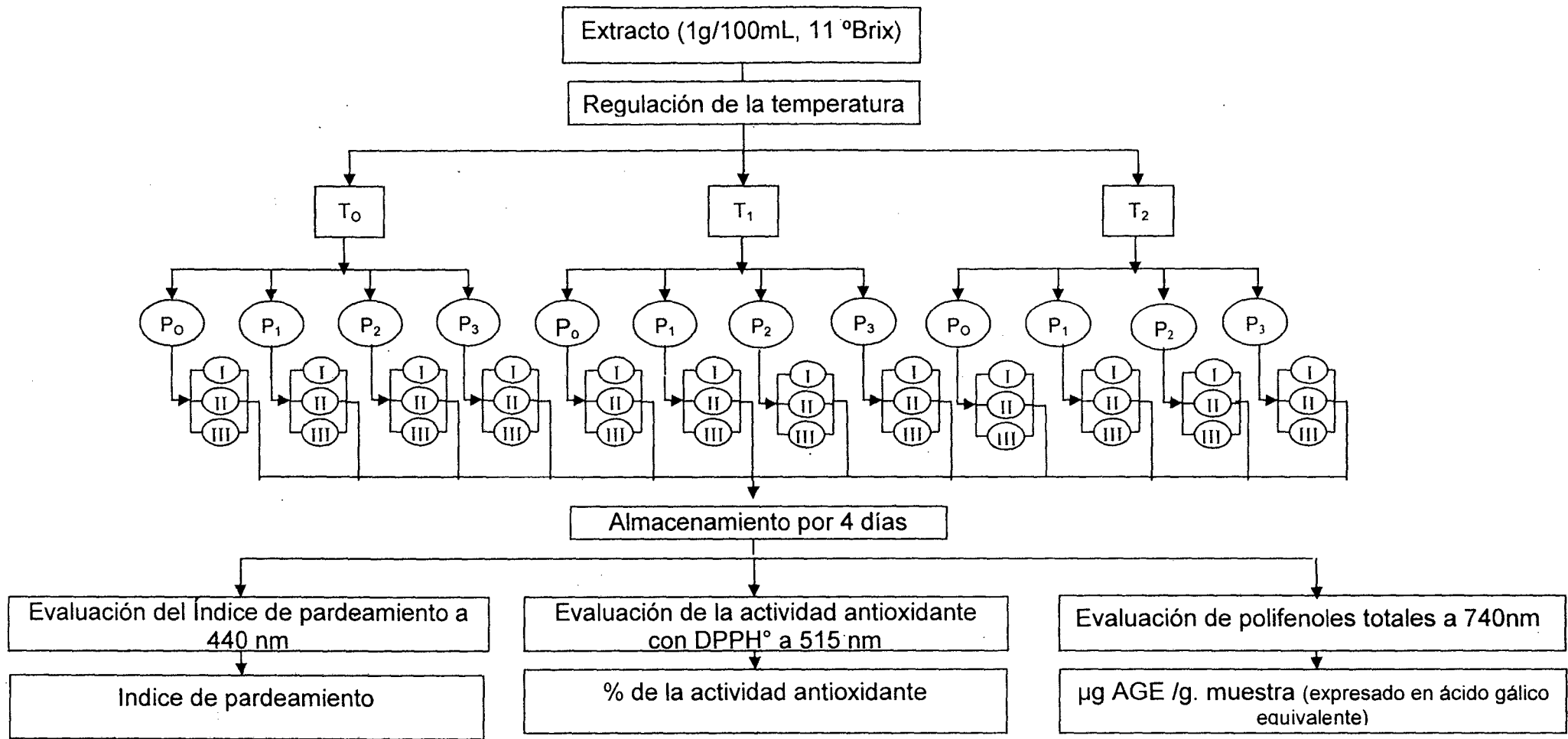
temperatura\*pH\*Días, para conocer la significancia en PT, se utilizó la prueba de Duncan ( $p < 0,05$ ), utilizándose el software "Stadistic Analisis System (SAS) para Windows 6,12.

### **c. Actividad antioxidante**

Durante el almacenamiento de los modelos de bebida de hierba luisa (MBHL), se realizó la evaluación de la actividad antioxidante (AA) en función al tiempo de almacenamiento (4 días). Dichas evaluaciones se realizaron cada 24 horas. Las lecturas se registraron a 515 nm de longitud de onda cada minuto durante treinta minutos. Los resultados se expresaron de la misma manera que el % de pardeamiento (% P).

Los resultados se analizaron estadísticamente mediante un análisis de varianza combinado, utilizándose el siguiente modelo: pH, temperatura, días, pH\*temperatura, temperatura\*pH\*Días, para conocer la significancia en la AA, se utilizó la prueba de Duncan ( $p < 0,05$ ), utilizándose el software "Stadistic Analisis System (SAS) para Windows 6,12.

En la Figura 8, se muestra el diseño experimental para la evaluación del efecto del pH y temperatura en la estabilidad de los MBHL, sobre el % de pardeamiento, polifenoles totales y actividad antioxidante.



Donde:

$T_i$  = Temperaturas de almacenamiento a 27 °C, 37°C y 45°C ( $i = 0, 1$  y  $2$ ).

$P_i$  = Niveles de pH de los modelos de bebida: 3, 4, 5 y 7 ( $P_i = 0, 1, 2, 3$ ),  $I_i$  = Repeticiones ( $i = 1, 2$  y  $3$ ).

**Figura 8.** Diseño experimental para la evaluación del efecto del pH y temperatura en la estabilidad de los MBHL.

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### A. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL EXTRACTO ACUOSO DE HIERBA LUISA

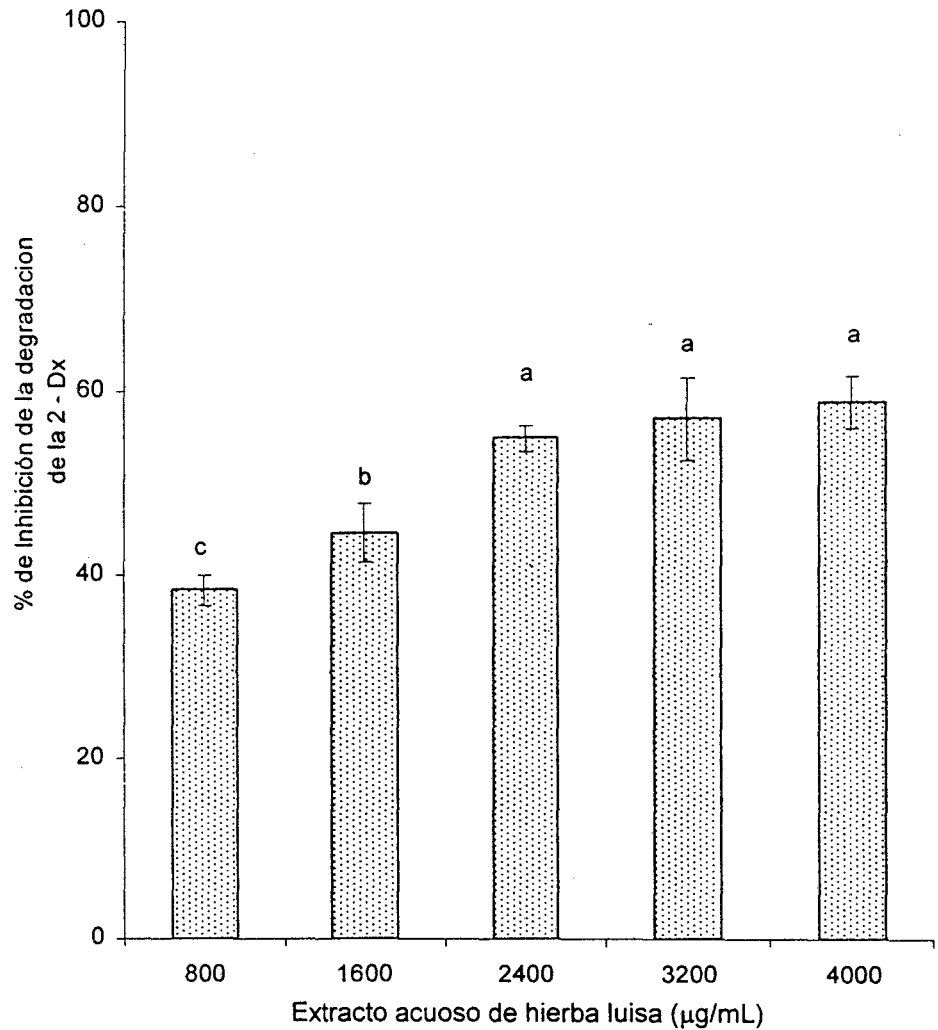
#### 1. Radical hidroxilo (2 - Desoxirribosa)

##### a. Porcentaje de inhibición del radical hidroxilo (2 - Dx)

La capacidad de la hierba luisa de inhibir al radical hidroxilo (2 - Dx), se muestra en la Figura 9. Las concentraciones de 800 y 4000  $\mu\text{g/mL}$  presentaron diferencia estadística entre ellos ( $p < 0,05$ ); la concentración de 4000  $\mu\text{g/mL}$  (59,12 %) fue más eficiente comparado a la de 800  $\mu\text{g/mL}$  (38,43 %) (Anexo V). Notándose una relación directa entre la concentración del EAHL y el % de inhibición de la degradación de la 2 - Dx; similares comportamientos presentaron otros investigadores como Halliwell *et al.* (1995), también mencionan que el % de inhibición de la degradación de la 2 - Dx depende de la especie y la concentración de compuestos que tiene actividad antioxidante presentes en el extracto.

Asimismo, Estrella (2002), encontró que el cedrón (*Aloysia triphylla*) presentó 48,1 % (800  $\mu\text{g/mL}$ ) y 65,6 % (4000  $\mu\text{g/mL}$ ) de inhibición de la degradación de la 2 - Dx. Los resultados indican que las concentraciones de hierba luisa de 2400 a 4000  $\mu\text{g/mL}$  proporcionaron los niveles más altos de eficiencia en la

inhibición del  $^{\circ}\text{OH}$ , no presentaron diferencia estadística debido a la saturación de los polifenoles (Halliwell *et al.*, 1987B).



**Figura 9.** Porcentaje de inhibición de la degradación de la 2 - Dx en el EAHL. Letras diferentes indican que hay diferencia significativa ( $p < 0,05$ ). Los datos representan la media  $\pm$  SD,  $n = 9$ .

Yildirim (2001); Li y Xie (2000), reportaron que el proceso de inhibición de degradación de la 2 - Dx se da por dos vías: 1) los



compuestos fenólicos que aporta el extracto actúan donando un átomo de hidrogeno al grupo °OH radical, haciéndolo más estable y 2) el extracto puede actuar como agente quelante formando complejos con el metal.

Asimismo González *et al.* (2000), mencionan que la 2 - Dx es una entidad biológica susceptible al ataque de los °OH y que debido a ésta propiedad es importante considerar su rol biológico. El °OH puede inducir mutaciones a nivel del ADN (Yildirim, 2001).

Otros estudios conducidos por Moran *et al.* (1997) y González *et al.* (2000), indican que cuando no hay protección de la 2 - Dx se daña la estructura del ADN, conduciendo al rompimiento del enlace entre el grupo fosfato y el azúcar pentosa (Yen y Shieh, 2000). También el °OH tiene la capacidad de reaccionar con las bases nitrogenadas causando mutaciones somáticas (Li y Xie, 2000).

El valor biológico en el EAHL estaría relacionado a su capacidad de inhibir °OH favoreciendo la protección del ADN en estados de estrés oxidativo (Moran *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2002; Li y Xie, 2000).

En otros estudios conducidos por Yu *et al.*, (2002), en muestras de extracto de trigo reportaron que no necesariamente las muestras que tienen una alta actividad antioxidante son capaces de secuestrar radicales °OH.

## 2. Radical 2,2' azinobis -3- ethylbenzotiazolina -6- ácido sulfónico (ABTS<sup>o+</sup>)

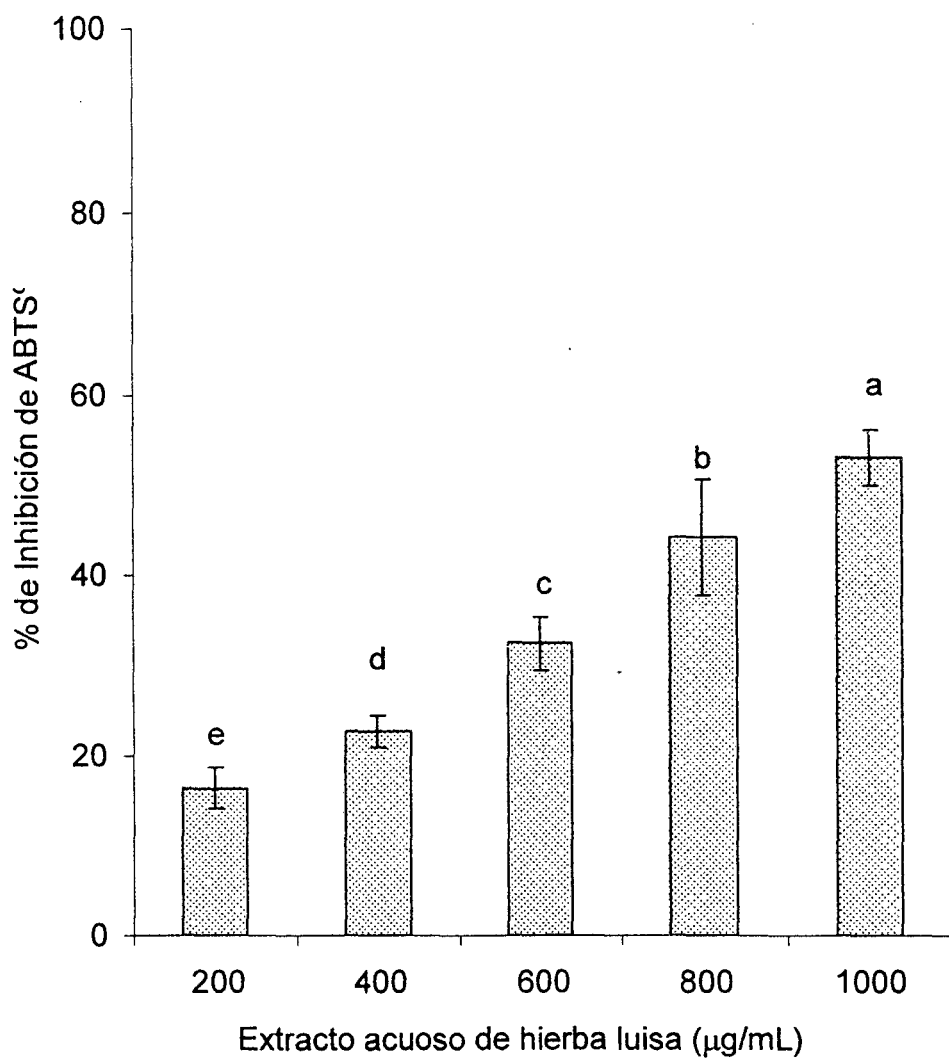
### a. Porcentaje de inhibición del radical ABTS<sup>o+</sup>

La capacidad de la hierba luisa de inhibir al catión ABTS<sup>o+</sup>, se muestra en la Figura 10, notándose que existe diferencia estadística entre ellos ( $p < 0,05$ ). La concentración de 1000  $\mu\text{g/mL}$  (53,1 %) fue más eficiente comparado a las concentraciones de 200  $\mu\text{g/mL}$  (16,39 %) y 800  $\mu\text{g/mL}$  (44,3 %) (Anexo VI). Los resultados indican que la concentración de hierba luisa de 1000  $\mu\text{g/mL}$  proporcionó el nivel más alto de eficiente de inhibición del radical catión ABTS<sup>o+</sup> guardando relación con el contenido de compuestos fenólicos presentes en el EAHL (Yildirim, 2001).

Por otro lado Pellegrini *et al.* (2002) y Kim *et al.* (2002), indican que el estudio del secuestro del radical ABTS<sup>o+</sup>, permite una evaluación en fases acuosas, fases lipídicas y fases orgánicas. Asimismo la eficiencia del secuestro del radical ABTS<sup>o+</sup>, es proporcional a las concentraciones de la actividad antioxidante; demostrando que a mayor concentración hay mayor capacidad de secuestro del radical ABTS<sup>o+</sup>, determinando que hay un aumento en el % de inhibición a medida que aumenta el tiempo de reacción (Brand - Williams *et al.*, 1994).

Los valores encontrados para inhibir al catión ABTS<sup>o+</sup> difieren de otras especies que también poseen actividad antioxidante en el

extracto. Estrella (2002), encontró en el cedrón (*Aloysia triphylla*) en concentraciones de 200  $\mu\text{g/mL}$  y 1000  $\mu\text{g/mL}$  porcentajes de inhibición de 39,4 y 97,5 respectivamente, en el mismo tiempo de reacción; además fue más eficaz su actividad antioxidante frente al catión  $\text{ABTS}^{\circ+}$  comparado al EAHL.



**Figura 10.** Porcentaje de inhibición del radical  $\text{ABTS}^{\circ+}$  en el EAHL. Letras diferentes indican que hay diferencia significativa ( $p < 0,05$ ). Los datos representan la media  $\pm$  SD,  $n = 3$ .

La formación del radical  $^{\circ}\text{OH}$  y las especies reactivas del oxígeno originan el desbalance entre las defensas antioxidantes que causan el estrés oxidativo como lo indicó Yu *et al.*, (2002).

**b. Actividad antioxidante equivalente**

La actividad antioxidante de la hierba luisa expresada como equivalente en vitamina C fue 115,9 mg de EVC/100 g muestra (Anexo VII). Kim *et al.* (2002), reportaron 136,0 mg EVC/100 g muestra en manzanas rojas de la variedad delicia. Sin embargo Estrella (2002), en el extracto acuoso del cedrón (*Aloysia triphylla*) encontró 258,8 mg EVC/100 g muestra a una concentración de 600  $\mu\text{g/mL}$ , siendo el cedrón 3,2 veces superior a la hierba luisa como equivalentes de vitamina C.

La vitamina C tiene una potente actividad antioxidante y es un componente natural en nutrientes en nuestra dieta diaria y tiene efectos anticarcinogénicos (Kim *et al.*, 2001).

Una taza de infusión de hierba luisa simulada (2 g/200mL) aporta aproximadamente 1,25 mg de EVC/100g. También la vitamina C se encuentran en las frutas como: naranja aportando 57,3 mg/100g de vitamina C, toronja aporta 500 mg/100g de vitamina C, las uvas aportan 400 mg/100g de vitamina C.

### c. Coeficiente de inhibición

El EAHL tuvo un coeficiente de inhibición ( $IC_{50}$ ) de 939,7  $\mu\text{g/mL}$  (Anexo VIII y Anexo IX) se comparó con el  $IC_{50}$  reportado por Ramos (2002), quién indica que el té verde es aproximadamente 40 veces más eficiente que la hierba luisa, indicando sus valores de  $IC_{50}$  para muestras de té verde de 32,43  $\mu\text{g/mL}$  y hierba luisa de 1345,7  $\mu\text{g/mL}$ . La variabilidad del  $IC_{50}$  frente a la hierba luisa en estudio y lo reportado por Ramos (2002), es diferente posiblemente debido a: método usado, muestras provenientes de zonas diferentes, tiempo de cosecha y tipo de proceso para la obtención del extracto (Chen *et al.*, 2001).

Esta variabilidad observada en la hierba luisa con respecto a lo reportado por otros autores puede atribuirse al contenido de polifenoles (Yildirim, 2001). Adicionalmente, Vajragupta *et al.* (2000), reportan que los polifenoles simples exhibieron mayor capacidad antioxidante que los compuestos fenólicos poliméricos éste fenómeno explica el suceso de un impedimento estérico.

Moure *et al.* (2000) y Vayalil (2002), atribuyeron que la actividad antioxidante de los extractos podría deberse al efecto individual o combinado de las sustancias presentes. Sin embargo Moure *et al.* (2000), mencionan que en el extracto de Gevuina avellana encontró una variación en la actividad antioxidante total, al usar diferentes tipos de solventes.

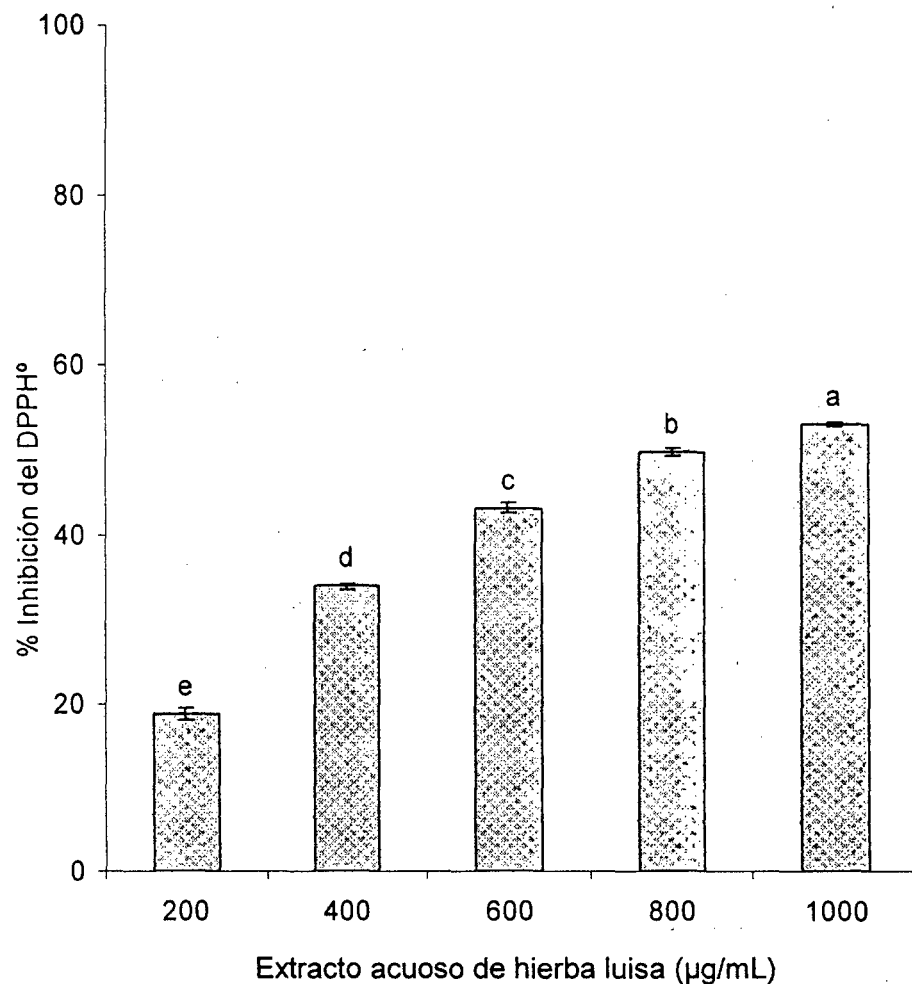
### 3. Radical 1,1' diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH°)

#### a. Porcentaje de inhibición del radical DPPH°

La capacidad de la hierba luisa de inhibir al radical DPPH°, se observa en la Figura 11. La concentración de 1000 µg/mL (53,12 %) fue más eficiente comparado a las demás concentraciones (Anexo X), mostrando diferencia estadística ( $p < 0,05$ ).

Los valores encontrados para inhibir al radical DPPH° difieren de otras especies que también poseen actividad antioxidante; Estrella (2002), reportó en el cedrón (*Aloysia triphylla*) 28,2 y 86,9 % de inhibición en 30 minutos de reacción a una concentración de 200 µg/mL y 1000 µg/mL, respectivamente, demostrando mayor % de inhibición del radical DPPH° a mayor concentración, coincidiendo con lo obtenido por Yu *et al.* (2002), quien reporta el mismo comportamiento bifásico al evaluar las propiedades de inhibición de radicales libres.

Becerril (2002), reportó en el extracto de hierba luisa a una concentración de 1000 y 300 µg/mL, el 79,5 y 53,7 % de inhibición en 12 minutos de reacción, asimismo, Ramos (2002), encontró en la hierba luisa un 74 % de inhibición en 10 minutos de reacción a una dosis de 3000 µg/mL, comparadas a la muestra en estudio ésta presentó menor % de inhibición.



**Figura 11.** Porcentaje de inhibición del radical DPPH° en el EAHL. Letras diferentes indican que hay diferencia significativa ( $p < 0,05$ ). Los datos representan la media  $\pm$  SD,  $n = 3$ ).

Estudios conducidos por Van - Acker *et al.* (1996), indicaron que la actividad antioxidante de los compuestos fenólicos, está relacionado con la presencia de grupos hidroxilos ( $^{\circ}\text{OH}$ ) en la estructura molecular del anillo B. Asimismo Vajragupta *et al.* (2000), reporta que la capacidad antioxidante de los compuestos

fenólicos simples exhibieron mayor capacidad antioxidante que los compuestos fenólicos poliméricos, que se presencia un suceso de un impedimento estérico que posiblemente se explicaría en las evaluaciones de especies vegetales (Fennema, 2000).

Por otro lado Arnoa (2002), indica que la actividad antioxidante podría explicarse por la interacción de los compuestos cromógenos del radical DPPH° con los compuestos fenólicos que, como tal tiene la capacidad de ser agentes reductores; es decir donar electrones que reaccionen con las moléculas de los radicales libres, convirtiéndoles en productos más estables que podrían terminar con la cadena de reacción. Sin embargo Chou *et al.* (2001), reportan que la acción depende de la configuración electrónica de sus grupos hidróxilos (°OH) en la estructura química.

#### **b. Actividad antioxidante equivalente**

La inhibición del radical DPPH° del EAHL a una concentración de 1000 µg/mL, expresado como equivalente en vitamina C (EVC) fue 144,7 mg EVC/100 g peso seco (Kim *et al.*, 2001; Anexo XI). Sin embargo Estrella (2002), en el cedrón (*Aloysia triphylla*) encontró 372,5 mg EVC/100 g peso seco a una concentración de 600 µg/mL siendo 2,5 veces superior a la hierba luisa como equivalentes de vitamina C.



La vitamina C tiene una potente actividad antioxidante y es un componente natural en nutrientes en nuestra dieta diaria y tiene efectos anticarcinogénicos (Kim *et al.* 2001).

**c. Coeficiente de inhibición**

El coeficiente de inhibición ( $IC_{50}$ ) del radical DPPH° en la hierba luisa (*Cymbopogon citratus Staph*), fue de 834,6  $\mu\text{g/mL}$  (Anexo XII y Anexo XIII). Becerril (2003) y Ramos (2002) reportan para la hierba luisa (*Cymbopogon citratus Staph*) un  $IC_{50}$  de 387,4 y 1345,79  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente, siendo éstos valores 2,1 veces más bajo y 1,6 veces más alto respectivamente que la muestra en estudio. Asimismo Estrella (2002), en el cedrón (*Aloysia triphylla*), encontró un  $IC_{50}$  329,6  $\mu\text{g/mL}$  siendo 2,5 veces menor que el EAHL.

Lai *et al.* (2001), reportaron en antioxidantes sintéticos para el  $\alpha$ -tocoferol y el BHT valores de  $IC_{50}$  de 0,15 y 0,09  $\text{mg/mL}$ , respectivamente, comparando los antioxidantes sintéticos es 5,56 y 9,27 veces mayor con el EAHL.

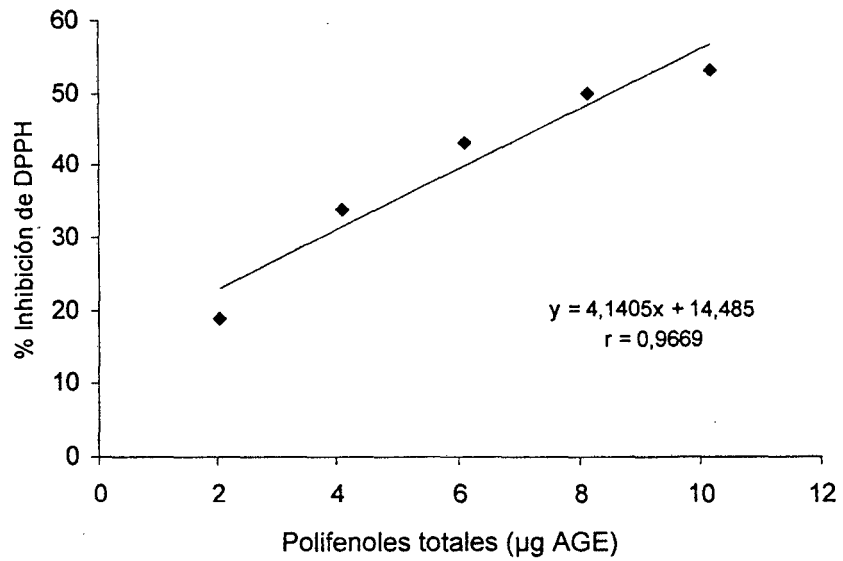
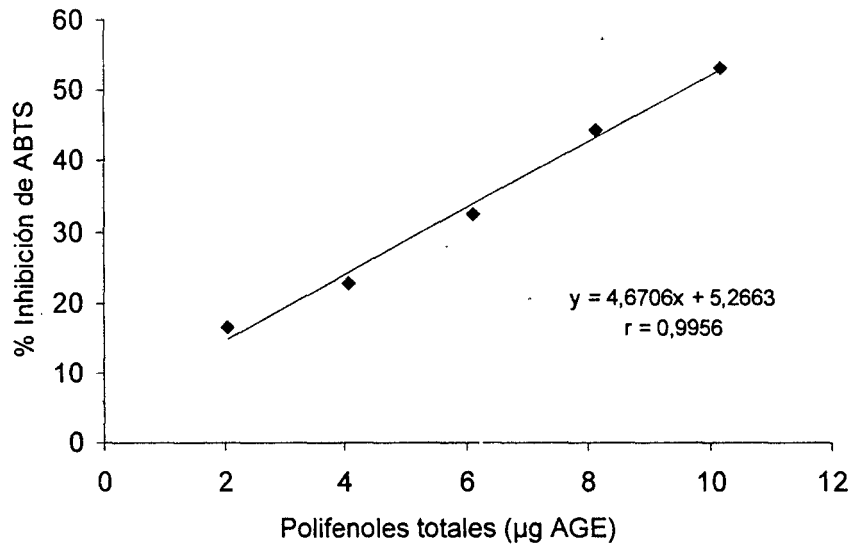
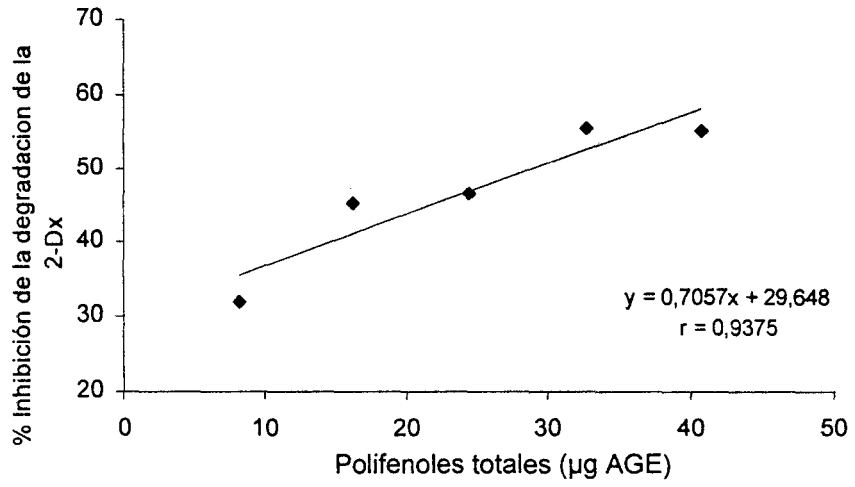
Fennema (2000), menciona que el BHT y BHA son buenos antioxidantes sintéticos en el sistema alimenticio, su consumo disminuye por la presencia de antioxidantes naturales, esto evidencia la acción de los polifenoles como antioxidantes que evitan la oxidación de las grasas.

Estudios reportados por Zhen y Wang (2001), indican que los antioxidantes sintéticos en la actualidad están siendo cuestionados y restringidos en el uso en la industria de alimentos, por sus efectos secundarios sobre la salud. Ante esta realidad, la hierba luisa se presenta como recurso en el uso de la industria alimentaria como antioxidante natural.

## **B. CORRELACIÓN ENTRE EL CONTENIDO DE POLIFENOLES TOTALES Y LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE**

En la Figura 12, se observa que el contenido de polifenoles totales expresado en ácido gálico equivalente se incrementó conjuntamente con el % de inhibición en los radicales 2 - Dx, ABTS<sup>o+</sup> y DPPH<sup>o</sup> en el EAHL, mostrando una afinidad positiva al inhibir el radical 2 - Dx en 0,9375; al radical catión del ABTS<sup>o+</sup> en 0,9956 y al radical DPPH<sup>o</sup> en 0,9669, demostrando que existe relación directa con el contenido de polifenoles totales; los mismos comportamientos son reportados por Nanjo *et al.* (1996).

Asimismo Wang y Zhen (2001), quienes encontraron en extractos acuosos de hierbas selectas una correlación positiva de 0,9848 entre el contenido de polifenoles y la capacidad antioxidante. La correlación encontrada en el EAHL difiere de otras especies, debido al uso de



**Figura 12.** Correlación entre el contenido de polifenoles totales y actividad antioxidante.

diferentes tipos de solventes, coincidiendo con Moure *et al.* (2000), en extractos de Gevuina avellana al usar diferentes solventes encontraron una variación en la correlación entre el contenido de actividad antioxidante y polifenoles totales.

Los resultados indican que el contenido de polifenoles totales de la hierba luisa (*Cymbopogon citratus Staph*) fue 1,018 g AGE/100 g muestra. Ramos (2002), trabajando con hierba luisa (*Cymbopogon citratus Staph*) obtuvo 0,8 g de AGE/100 g muestra y Becerril (2003), reportó en hierba luisa (*Cymbopogon citratus Staph*) 1,0 g de AGE/100 g muestra; Zhen y Wang (2001), en el hinojo (*Foeniculum vulgare*) obtuvieron 0,68 mg de AGE/100 g de muestra y en la hierba buena (*Mentha spicata*) 0,94 mg de AGE/100 g de muestra.

La variabilidad encontrada en la hierba luisa difiere de otras especies, que poseen polifenoles totales en las mismas condiciones comparado con la muestra en estudio, el contenido de polifenoles totales del EAHL es menor que lo reportado por Ramos (2002) y mayor que lo reportado por Becerril (2003) y Zhen y Wang (2001) teniendo relación con la actividad antioxidante discutido anteriormente.

Las diferencias encontradas en el contenido de polifenoles totales para el EAHL puede deberse a múltiples factores como: lugar de procedencia y estado de madurez de la hojas. Estudios realizados por Hopia *et al.* (1999), reportaron que la diferencia de los polifenoles presentes en

extractos de plantas es debido a la estructura química de las moléculas antioxidantes.

Estudios conducidos por Wei y Wang (2001), en extracto de varias hierbas selectas encontraron que los antioxidantes poseen diferentes componentes fenólicos, que ocasionan el incremento o disminución de su contenido en polifenoles siendo el número de grupos hidroxilo el responsable de este mecanismo, esto estaría sucediendo en la diferencia encontrada en el EAHL comparada con las otras muestras mencionadas anteriormente.

El contenido de polifenoles totales en el EAHL nos revela la presencia de antioxidante naturales y por lo tanto ayudaría en la dieta balanceada suplementaria, demostrando efectos benéficos para la salud.

## **C. EFECTO DEL pH Y TEMPERATURA EN LA ESTABILIDAD DE MODELOS DE BEBIDA**

### **1. Índice de pardeamiento**

En el Cuadro 1, se observa los incrementos en el índice de pardeamiento para los modelos de bebida de hierba luisa (MBHL – 10 mg/mL), en el estudio del % de pardeamiento (% P), se encontró diferencia estadística al evaluar los efectos del pH y la temperatura en la estabilidad de los MBHL ( $p < 0,05$ ); Anexo XIV y Anexo XV).

En el día 1, el tratamiento a pH = 3; T<sub>1</sub>: 27 °C no presentó diferencia estadística ( $p > 0,05$ ) con respecto al tratamiento pH = 5; T<sub>1</sub>: 45 °C, sin embargo el tratamiento a pH = 3, T<sub>1</sub>: 27 °C presentó mayor efecto estabilizante durante los 4 días de almacenamiento comparado al resto de los tratamientos coincidiendo con Fennema (2000), quién menciona que no se produce pardeamiento no enzimático en soluciones ácidas.

El tratamiento a pH = 5, T<sub>2</sub>: 37 °C fue menos eficiente comparado al tratamiento a pH = 3, T<sub>1</sub>: 27 °C que evidencia el efecto desestabilizante sobre los MBHL, observándose que el efecto de las variables en estudio sobre el % de P fueron irregulares. También Fennema (2000), manifiesta que el aumento del pH y la temperatura causan incremento en la velocidad de reacción de formación de compuestos pardos.

Los valores del incremento en el % de pardeamiento (% P) encontrados en los MBHL, indican que influye el pH y la temperatura, coincidiendo con lo reportado por Malien - Aubert *et al.* (2001) y Fennema (2000), quienes mencionan que el color del extracto en el pardeamiento dependen de factores como: temperatura, pH, presencia de iones metálicos y la propia estructura del azúcar influyen significativamente sobre la estabilidad de los alimentos. Estudios reportados por Bradshaw *et al.* (2001),

mencionan que el espacio de cabeza, el ácido ascórbico y el ácido cítrico influyen en el pardeamiento no enzimático.

**Cuadro 1.** Efecto del pH y temperatura en la estabilidad sobre el índice de pardeamiento de modelos de bebida<sup>1</sup>.

		Porcentaje de pardeamiento (% P)			
pH (°C)		Día 1	Día 2	Día 3	Día 4
3	27	42,09±3,44 <sup>ghi</sup> <sub>d</sub>	60,94±0,29 <sup>i</sup> <sub>bc</sub>	86,87±3,81 <sup>k</sup> <sub>ab</sub>	85,02±6,31 <sup>k</sup> <sub>a</sub>
3	37	39,39±6,62 <sup>ghi</sup> <sub>c</sub>	43,60±9,55 <sup>j</sup> <sub>c</sub>	61,28±2,59 <sup>l</sup> <sub>b</sub>	106,90±5,75 <sup>j</sup> <sub>a</sub>
3	45	72,22±7,44 <sup>gh</sup> <sub>d</sub>	113,97±4,30 <sup>h</sup> <sub>c</sub>	144,78±3,36 <sup>l</sup> <sub>b</sub>	179,12±4,80 <sup>gh</sup> <sub>a</sub>
4	27	46,01±7,81 <sup>ghi</sup> <sub>d</sub>	156,52±3,56 <sup>d</sup> <sub>c</sub>	238,04±4,31 <sup>cd</sup> <sub>b</sub>	248,01±3,70 <sup>cd</sup> <sub>a</sub>
4	37	54,89±18,09 <sup>ghi</sup> <sub>b</sub>	138,95±3,54 <sup>defg</sup> <sub>a</sub>	132,07±4,64 <sup>j</sup> <sub>a</sub>	131,16±1,91 <sup>i</sup> <sub>a</sub>
4	45	80,98±8,04 <sup>g</sup> <sub>d</sub>	134,42±4,62 <sup>defg</sup> <sub>c</sub>	163,59±0,94 <sup>gh</sup> <sub>b</sub>	186,96±1,44 <sup>fg</sup> <sub>a</sub>
5	27	120,47±8,75 <sup>c</sup> <sub>d</sub>	227,07±2,11 <sup>bc</sup> <sub>c</sub>	252,96±1,78 <sup>bc</sup> <sub>ab</sub>	265,14±7,64 <sup>c</sup> <sub>a</sub>
5	37	120,98±4,58 <sup>c</sup> <sub>d</sub>	222,00±13,14 <sup>bc</sup> <sub>c</sub>	288,32±2,03 <sup>a</sup> <sub>b</sub>	332,49±14,21 <sup>a</sup> <sub>a</sub>
5	45	168,53±3,66 <sup>b</sup> <sub>d</sub>	242,81±4,43 <sup>ab</sup> <sub>c</sub>	265,14±0,59 <sup>b</sup> <sub>b</sub>	289,34±6,24 <sup>b</sup> <sub>a</sub>
7	27	106,19±6,29 <sup>odef</sup> <sub>d</sub>	146,43±1,79 <sup>de</sup> <sub>c</sub>	170,95±1,69 <sup>g</sup> <sub>b</sub>	191,55±17,75 <sup>f</sup> <sub>a</sub>
7	37	115,36±1,79 <sup>cde</sup> <sub>c</sub>	140,95±4,31 <sup>def</sup> <sub>b</sub>	199,29±2,23 <sup>f</sup> <sub>a</sub>	213,10±3,82 <sup>e</sup> <sub>a</sub>
7	45	201,90±5,13 <sup>a</sup> <sub>c</sub>	253,81±2,43 <sup>a</sup> <sub>a</sub>	232,50±2,83 <sup>ode</sup> <sub>b</sub>	247,50±1,56 <sup>cd</sup> <sub>b</sub>

<sup>1</sup> El índice de pardeamiento se evaluó durante 4 días de almacenamiento. Letras diferentes indican que hay diferencia significativa ( $p < 0,05$ ). Los datos representan la media  $\pm$  SD,  $n = 3$ ). Los superíndices representan la diferencia estadística en columna y los subíndices representan la diferencia estadística en fila.

Belitz (1988), menciona que en la producción de compuestos pardos se realizan transformaciones de monosacáridos cuando el azúcar presente en los MBHL se degrada y posiblemente actúen como catalizadores en las reacciones.

Siendo el pardeamiento el causante del efecto desestabilizante de los MBHL, se evitaría el pardeamiento a pH bajo como se presentó en el tratamiento a pH = 3; T<sub>1</sub>: 27 °C coincidiendo con Fennema (2000), quién menciona que para evitar el pardeamiento no enzimático en infusiones es necesario bajar las concentraciones de azúcar y pH logrando mayor estabilidad en los otros MBHL.

## **2. Polifenoles totales**

En el Cuadro 2, se observa el contenido de polifenoles totales (PT) para los modelos de bebida de hierba luisa (MBHL – 10 mg/mL) en el estudio de polifenoles totales (PT), se encontró diferencia estadística significativa entre ellos ( $p < 0,05$ ; Anexo XVI y Anexo XVII). El tratamiento a pH = 3, T<sub>1</sub>: 27 °C fue más eficiente sobre la estabilidad de los MBHL que el tratamiento a pH = 5, T<sub>2</sub>: 37 °C ( $p < 0,05$ ) beneficiando a los MBHL.

El contenido de polifenoles totales en los MBHL iniciaron en el día 0 a pH = 3 con 1,01 g de AGE/100 g muestra; a pH = 4 con 1,03 g de AGE/100 g muestra, a pH = 5 con 1,04 g de AGE/100 g muestra y a pH = 7 con 0,98 g de AGE/100 g muestra. Comparando al primer día de almacenamiento los polifenoles totales en los diferentes



tratamientos como se muestra en el cuadro 2, se incrementaron en un 100 % coincidiendo con lo reportado por Wei y Wang (2001), donde la interacción de los efectos del pH y la temperatura en los PT causó efectos desestabilizantes en los MBHL pudiendo ser otros factores o sustancias no identificadas que ocasionaron el efecto sinérgico y que se le atribuye el incremento de los PT en el almacenamiento.

En investigaciones realizadas por Chen *et al.* (1998), reportaron que en el almacenamiento de las bebidas de té verde, el efecto desestabilizante fue el ácido cítrico quién actuó como un agente sinérgico con los polifenoles que se le atribuye a los MBHL. También Hopia *et al.* (1999), reportaron que el aumento de polifenolicos presentes es debido a la interferencia de otros componentes presentes, pudiendo ocurrir este fenómeno en los MBHL.

En el día 1, el tratamiento a pH = 5, T<sub>3</sub>: 45 °C no presentó diferencia estadística ( $p > 0,05$ ) frente al tratamiento pH = 3, T<sub>1</sub>: 27 °C; pero en el día 4 éstos tratamientos no tuvieron diferencia estadística, sin embargo el tratamiento a pH = 3, T<sub>1</sub>: 27 °C fue más estable en el almacenamiento, coincidiendo con lo reportado por Zhen y Wang (2001), quienes indicaron que la estabilidad es dependiente del pH, que a más bajos pH las bebidas serán más estables, lo que pudo suceder en el tratamiento a pH = 3 y T<sub>1</sub>: 27 °C que mostró mejor estabilidad frente a los demás tratamientos.

**Cuadro 2:** Efecto del pH y temperatura en la estabilidad sobre los polifenoles totales en modelos de bebida<sup>2</sup>.

		POLIFENOLES TOTALES (Ácido Gálico Equivalente)			
pH (°C)		Día 1	Día 2	Día 3	Día 4
3	27	2,08±0,01	2,09±0,00 <sup>bcd</sup>	2,12±0,08 <sup>b</sup>	1,91±0,06 <sup>cde</sup>
3	37	2,07±0,14	2,14±0,08 <sup>bcd</sup>	2,05±0,04 <sup>bc</sup>	2,04±0,05 <sup>bcd</sup>
3	45	1,94±0,02	2,11±0,01 <sup>bcd</sup>	1,95±0,08 <sup>bc</sup>	1,96±0,06 <sup>cde</sup>
4	27	2,02±0,02	2,13±0,02 <sup>bcd</sup>	2,11±0,07 <sup>b</sup>	2,04±0,00 <sup>bcd</sup>
4	37	2,01±0,05 <sub>b</sub>	2,22±0,17 <sup>bc</sup> <sub>b</sub>	2,11±0,02 <sup>b</sup> <sub>ab</sub>	2,03±0,01 <sup>bcd</sup> <sub>a</sub>
4	45	1,94±0,03	1,86±0,06 <sup>e</sup>	1,92±0,05 <sup>bc</sup>	2,80±0,04 <sup>e</sup>
5	27	2,10±0,08 <sub>a</sub>	2,70±0,25 <sup>a</sup> <sub>c</sub>	2,41±0,02 <sub>bc</sub>	2,32±0,04 <sub>b</sub>
5	37	2,01±0,04	1,94±0,24 <sup>de</sup>	2,05±0,05 <sup>bc</sup>	2,38±0,56 <sup>abc</sup>
5	45	1,85±0,02	2,05±0,06 <sup>cde</sup>	1,95±0,13 <sup>bc</sup>	1,92±0,02 <sup>cde</sup>
7	27	2,07±0,03	2,32±0,32 <sup>b</sup>	2,13±0,08 <sup>b</sup>	2,27±0,28 <sup>ab</sup>
7	37	1,96±0,01	2,11±0,06 <sup>bcd</sup>	2,06±0,05 <sup>bc</sup>	2,05±0,05 <sup>bcd</sup>
7	45	1,92±0,11	2,13±0,03 <sup>bcd</sup>	2,87±0,11 <sup>c</sup>	2,83±0,06 <sup>de</sup>

<sup>2</sup>Los polifenoles totales se evaluaron durante 4 días de almacenamiento. Letras diferentes indican que hay diferencia significativa ( $p < 0,05$ ). Los datos representan la media  $\pm$  SD,  $n = 3$ ). Los superíndices representan la diferencia estadística en columna y los subíndices representan la diferencia estadística en fila.

En investigaciones realizadas por Chen *et al.* (1998) y Chen *et al.* (2001), encontraron que las catequinas (polifenoles del té verde) se mantuvieron estables a 37 °C, se reduce en un 20 % a 98 °C y en otro estudio con catequinas, determinaron que después de 6 meses de almacenamiento el control extracto acuoso a pH = 7 retuvo un 80 % de las catequinas, más que el extracto con pH = 5 y en estudios realizados por Wang y Zhen (2001); Wei y Wang (2001), observaron que el efecto de la temperatura ocasionó un aumento y cambios en los polifenoles y a altas temperaturas éstos cambios mostraron un incremento significativo afectando el contenido de ácidos fenólicos, flavonoides y antocianinas. El efecto del pH y la temperatura; las sustancias no identificadas y el efecto sinérgico estarían ocasionando el incremento en la estabilidad de los MBHL.

### **3. Actividad antioxidante**

En el Cuadro 3, se observa la actividad antioxidante de los modelos de bebida de hierba luisa (MBHL - 10 mg/mL), encontrándose diferencia estadística entre ellos ( $p < 0,05$ ). El tratamiento a pH = 3, T<sub>1</sub>: 27 °C fue el más eficiente comparativamente al resto de tratamientos. El tratamiento pH = 5, T<sub>2</sub>: 37 °C fue 1,6 veces menos eficiente que el tratamiento pH = 3, T<sub>1</sub>: 27 °C que presentaron diferencia estadística ( $p < 0,05$ ; Anexo XVIII y Anexo XIX).

**Cuadro 3:** Efecto del pH y temperatura en la estabilidad sobre la actividad antioxidante en modelos de bebida<sup>3</sup>.

% DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE (DPPH <sup>•</sup> )					
PH	(°C)	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4
3	27	35,55±1,72 <sup>i</sup> <sub>c</sub>	33,6±5,37 <sup>e</sup> <sub>b</sub>	39,30±0,97 <sup>e</sup> <sub>d</sub>	32,29±1,93 <sup>g</sup> <sub>a</sub>
3	37	31,09±2,58 <sup>j</sup> <sub>a</sub>	32,28±2,03 <sup>f</sup> <sub>b</sub>	43,35±1,47 <sup>bcd</sup> <sub>d</sub>	36,64±1,57 <sup>cef</sup> <sub>c</sub>
3	45	40,45±2,49 <sup>i</sup>	42,27±0,83 <sup>abcd</sup>	37,00±2,87 <sup>ef</sup>	36,23±2,29 <sup>cef</sup>
4	27	59,17±3,95 <sup>bcd</sup> <sub>d</sub>	45,29±3,86 <sup>abcd</sup> <sub>c</sub>	42,94±3,01 <sup>bcd</sup> <sub>a</sub>	44,90±2,84 <sup>ab</sup> <sub>b</sub>
4	37	38,11±1,36 <sup>i</sup> <sub>b</sub>	32,04±1,36 <sup>g</sup> <sub>a</sub>	45,97±4,42 <sup>bc</sup> <sub>d</sub>	39,90±1,61 <sup>bcd</sup> <sub>c</sub>
4	45	64,14±0,80 <sup>bcde</sup> <sub>d</sub>	41,35±1,62 <sup>bcd</sup> <sub>b</sub>	48,55±6,41 <sup>ab</sup> <sub>c</sub>	39,51±0,27 <sup>bcef</sup> <sub>a</sub>
5	27	63,63±1,99 <sup>bcd</sup> <sub>d</sub>	46,44±2,17 <sup>abc</sup> <sub>c</sub>	44,98±1,84 <sup>bcd</sup> <sub>b</sub>	39,64±1,71 <sup>bcd</sup> <sub>a</sub>
5	37	80,56±1,06 <sup>a</sup> <sub>d</sub>	45,41±7,24 <sup>abcd</sup> <sub>b</sub>	43,06±2,96 <sup>bcd</sup> <sub>a</sub>	49,71±3,07 <sup>a</sup> <sub>c</sub>
5	45	66,11±2,21 <sup>bcd</sup> <sub>d</sub>	42,26±2,39 <sup>abcd</sup> <sub>c</sub>	41,43±2,16 <sup>de</sup> <sub>b</sub>	38,87±2,14 <sup>cef</sup> <sub>a</sub>
7	27	68,96±3,47 <sup>b</sup> <sub>d</sub>	40,04±4,75 <sup>d</sup> <sub>c</sub>	44,51±3,02 <sup>bcd</sup> <sub>b</sub>	38,23±1,79 <sup>cef</sup> <sub>a</sub>
7	37	68,64±3,21 <sup>bc</sup> <sub>d</sub>	47,36±2,43 <sup>ab</sup> <sub>b</sub>	52,96±1,30 <sup>a</sup> <sub>c</sub>	41,02±1,47 <sup>bc</sup> <sub>a</sub>
7	45	56,61±3,86 <sup>h</sup> <sub>d</sub>	48,69±6,92 <sup>a</sup> <sub>c</sub>	42,46±2,83 <sup>cde</sup> <sub>b</sub>	37,64±1,00 <sup>cef</sup> <sub>a</sub>

<sup>3</sup>La actividad antioxidante se evaluaron durante 4 días de almacenamiento. Letras diferentes indican que hay diferencia significativa ( $p < 0,05$ ). Los datos representan la media  $\pm$  SD,  $n = 3$ ). Los superíndices representan la diferencia estadística en columna y los subíndices representan la diferencia estadística en fila.

La estabilidad del tratamiento a pH: 3;  $T_1$ : 27 °C ( $p < 0,05$ ) influyeron en los valores de la actividad antioxidante encontrándose un efecto estabilizante presentando un incremento regular con respecto a los días en los MBHL que coinciden con Fennema (2000), quien menciona que los radicales intermedios  $AH^\circ$  forman productos estables al reaccionar con un radical  $RO_2$  formando un complejo entre el inhibidor y el radical, fenómeno que se presenta en la deslocalización por resonancia y la falta de posición apropiada para ser atacados por el oxígeno.

Los tratamientos difieren entre ellos; el tratamiento a pH = 5,  $T_2$ : 37 °C fue el que se incrementó más que los otros tratamientos coincidiendo con lo reportado por Wang y Zhen (2001), quienes reportaron que el efecto de incremento de temperaturas en fresas, aumenta el contenido de la actividad antioxidante. Asimismo Morales y Babel (2002), reportaron que la actividad antioxidante es afectada por los productos pardos.

En estudios dirigidos Wei y Wang (2001) en hierbas selectas reportaron que la actividad antioxidante puede atribuírsele a que otras sustancias no identificadas interactúen sinérgicamente, es posible que se presente este mecanismo en los MBHL que presentó un incremento en los días 1 al 4. También Badui (1994) y Fennema (2000), mencionan que la mezcla de antioxidantes ejerce en ocasiones acción sinérgica atribuyéndoseles al rol antioxidante

de ambos recursos a la vez o que uno se comporte como antioxidante y el otro como agente quelante como es el caso del ácido cítrico, comportamiento que dependen del sistema en estudio y la naturaleza de los antioxidantes y que no se conoce la estructura química de sus componentes presente en la reacción de Maillard que hace posible que la actividad antioxidante se incrementa (Morales y Babel, 2002).

En estudios conducidos por Richelli *et al.* (2001), en bebidas de té, café y cocoa, se menciona la composición física y química de los polifenoles que afectan su actividad antioxidante y el bajo contenido de polifenoles se debe a que se presenta productos de la reacción de Maillard.

En cuanto a los MBHL a diferentes tratamientos, difieren del efecto del pH y la temperatura en la estabilidad debido a reacciones químicas que influenciaron en las bebidas durante el almacenamiento.

## V. CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos se llegaron a las siguientes conclusiones:

- El extracto acuoso de hierba luisa demostró poseer actividad antioxidante al inhibir al radical 2 - Dx en 59,2 %; el radical ABTS<sup>o+</sup> en 53,11 % y al radical DPPH<sup>o</sup> en 53,12 %.
- La correlación entre los polifenoles totales y la actividad antioxidante que presentó el extracto acuoso de hierba luisa, mostraron una afinidad positiva entre dichas variables en 0,93 al radical 2 – Dx; 0,99 al radical ABTS<sup>o+</sup> y 0,96 al radical DPPH<sup>o</sup>.
- El modelo de bebida de hierba luisa que tuvo mayor estabilidad en el porcentaje de pardeamiento, polifenoles totales y actividad antioxidante fue en el tratamiento a pH 3, Temperatura a 27°C demostrándose que el pH y la temperatura influyeron en la estabilidad.

## VI. RECOMENDACIONES

- Realizar estudios *in vitro* en el extracto acuoso de hierba luisa para la caracterización de polifenoles en Cromatografía Líquida de Alta Performancia (HPLC) que permitan identificar y cuantificar los componentes que evidencian su actividad antioxidante.
- Promover el consumo de bebidas de hierba luisa porque tienen cualidades beneficiosas para la salud.
- Realizar estudios en la formulación de modelos de bebidas con otras plantas medicinales de investigación a fin de complementar el valor antioxidante de la hierba luisa y estudiar su rol biológico *in vivo* sobre el efecto benéfico de los polifenoles en la prevención de enfermedades del cuerpo humano.
- Realizar estudios que evidencien la prevención de enfermedades y las bondades que brinda la hierba luisa en las áreas de: fitoquímica, química, farmacia, medicina, etc.



## VII. BIBLIOGRAFIA

- ANDREOLI, T. E. 2000.** Free radicals and oxidative stress. *J. Am. med.* 108: 650 – 651.
- ANDERSON, D.; PHILLIPS. B. 2001.** Comparative in vitro and in vivo. Effects of antioxidants. *J. Food. Chem. Tox.* 37: 1015 – 1025.
- ALVAREZ, B. L. 2001.** Predicción de ganancia de humedad en harina de platano (*Musa paradisiaca. var ingiri*) empacado mediante modelos matematicos deterministas. Tesis Ing° Ind Alim. Universidad Nacional Agraria de la Selva. Tingo Maria - Perú. 69 p.
- ARNOA, M. 2000.** Some methodological problems in the determination of antioxidants activity using chromogen radicals: A practical case. *Viewpoint of Food Science and Technology.* 11: 419 – 421p.
- ARTS, I. C. W.; PUTTE, V. B.; HOLLMAN, P. C. 2000.** Catechins contents of food commonly consumed in the Netherlands. Tea. Wine. Fruit Juices and Chocolate Milk, *J. Agric. Food Chem.* 48: 1752 – 1757.
- BADUI, D. S. 1994.** Química de los alimentos. Edit. Alhambra Mexicana S.A. México. 639 p.
- BECERRIL, A. L. 2003.** Optimización del filtrante en base a té verde (*Camellia sinensis*), hierba luisa (*Cymbopogon citratus Staph*) y Pampa orégano (*Lippia alba*) mediante la metodología de superficie de respuesta. Tesis Ing° Ind. Alim. Universidad Nacional Agraria de la Selva. Tingo Maria - Perú. 145 p.

- BELITZ, H. D.; GROSS W. 1988.** Química de los alimentos. Edit. Acribia. S.A. Zaragoza España. 423 p.
- BRADSHAW, M. P.; PRENZLER, P. D.; SCOLLARY, G. R. 2001.** Ascorbic acid induced browning of (+) - catechin in model wine system. J. Agric. Food Chem. 49: 934 – 939 p.
- BRAND - WILLIAMS.; BERSET, C. Y.; CUVELIER, M. 1994.** Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. J. Agric. Food Chem. 1234 – 1238 p.
- CABIESES, F. 1993.** Apuntes de medicina. Consejo Nacional de ciencia y tecnología (CONCYTEC) Lima Perú. 477 p.
- CADENAS, E. 2001.** Sustancias flavonoides. Department of Molecular Pharmacology & Toxicology. School of Pharmacy. University of Southern California Los Angeles. 27: 456 – 459. p.
- CERÓN, J.; ADRIOZOLA, J.; MIRANDA, C.; SILVA, F. 1996.** Evaluación agronómica de la hierba luisa (*Cymbopogon citratus Staph*) con diferentes niveles de nitrógeno y movimientos de cosecha en un suelo ex cocal Tingo Maria. Universidad Nacional Agraria de la Selva Tingo Maria Perú. 62 p.
- CHEN, Z.; ZHU, Q.; WONG, Y. F.; ZHANG, Z.; CHUNG, H. Y. 1998.** Estability effect of ascorbic acid on green tea catechins. J. Agric. Food Chem. 46: 2512 – 2516 p.
- CHEN, Z.; ZHU, Q. Y.; TSANG, D.; HUANG Y. 2001.** Degradation of green tea catechins in tea drinks. J. Agric. Food Chem. 49: 477 – 482.

- CHEN, C. Y.; WONG, Y. F.; LEUNG, M. W. S.; HE, Z.; HUANG, Y. 2002.** Characterization of antioxidants presents in better tea (*Ligustrum pedunculare*). J. Agric. Food Chem. Page Est: 5.5 A–F.
- CHOU, T. S.; SHIUH, L. L.; CHAO, W. W. 2001.** Studies on the antioxidantive activities of Hsian-Tsao (*Hesona procumbens hemsf*) leaf gum. J. Agric. Food Chem. 49: 963 – 968.
- CLARCKSON, P. M.; THOMPSON, H. S. 2000.** Antioxidants: What role do they play in physical activity and Health?. J. Am. Soc. Clin. Nutr. USA. 72 (suppl): 637S - 46S.
- D'CROFT, K. 1999.** Antioxidant effects of plant phenolic compounds. CAB international antioxidants in human health (Jeds T.K.Basu N.J. Temple and M.L. Garg).
- DELGADO DE LA FLOR, B. C. 1987.** Características básicas y económicas de hierbas del sabor. Boletín del instituto de comercio exterior. Lima Perú. 101 p.
- ESPIN, J. C.; SOLER - RIVAS, C.; WICHERS, H. J.; GARCIA-VIGUERA, C. 2000.** Anthocyanin - based: A new source of antiradical activity for foodstuff. J. Agric. Food Chem. 1588 – 1591.
- ESTRELLA, C. S. 2002.** Actividad antioxidante del extracto acuoso de cedrón (*Aloysia triphylla*) en diferentes modelos *in vitro*. Tesis Ing° Ind. Alim. Universidad Nacional Agraria de la Selva. Tingo María - Perú. 103 p.

**FENNEMA, O. 2000.** Química de los alimentos. Editorial Acribia S.A. Madrid. España. 1850 p.

**FIORANI, M.; DE SANCTIS, R; DE DELLIS, R.; DACHA, M. 2002.** Intracellular flavonoids as electron donors for extracellular ferricyanide reduction in human erythrocytes. *J. Free Rad Biol & Med.* 32 (1): 64 – 72 p.

**GONZÁLEZ – TORRES, M. C.; BETANCOURT–RULE, M. Y. ORTÍZ–MUÑIZ, R. 2000.** Daño oxidativo y antioxidantes. *Bioquímica.* 25 (1): 98 p.

**GONZALEZ, M; BETANCOURT, M; ORTIZ, R. 2000.** Daño oxidativo y antioxidante. *Bioquímica.* 25 (1): 3 – 9 p.

**GUERRA, E. 2001.** Oxidación. entre la vida y las enfermedades. *And. Med. Interna (Madrid).* 18: 1 – 4 p.

**GUTIERREZ, M. A. 2002.** Té polifenoles y protección a la salud. Instituto superior de ciencias médicas.

**HALLIWELL, B.; GROOTVEI, D. 1987A.** Methods for the measurement of hydroxyl radicals in biochemical systems; Deoxyribose degradation and aromatic hydroxylation. *Methods of biochemical analysis.* Vol. 33.

**HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C.; AROUNA, O. J. I. 1987B.** The deoxyribose method. A simple "test – tube" assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. *Analytical Biochem.* 165: 215 – 219 p.

- HALLIWELL, B.; MURCIA, M. A.; CHIRICO, S.; ARUONA O. I. 1995.** Free radical and antioxidants in food and in vivo: What they do and how they work?. *Crit Rev in Food Sc and Nutr*, 35 (1 & 2): 7–20 p.
- HIRAMATSU, M. YOSHIKAWA, T. Y. 1997.** Food and free radical. Plenum press. New York and London. 165 p.
- HOPIA, I.; KOHKONEN, P.; VOURELA, J.; RAHUA, P.; PIHLAJA, K.; KUJALA, S.; HEINONEN, M. 1999.** Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem.* 47 (101): 1347 – 1349 p.
- HYANG - SOOK, CH.; SONG, S. H.; UKEDA, H.; SAWAMURA, M. 2000.** Radical scavenging activities of citrus essential oils and their component: detection using 1,1 – Diphenyl -2- picrylhydrazyl. *J. Agric. Food Chem.* 48: 4156 – 4161 p.
- KIM, D.; LEE, CH.; LEE, K.; LEE, H. 2002.** Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals. *J. Agric. Food Chem.* 5: 2A - E.
- KITTS, D. D.; WIJEWICKREME, A.; KREJPCIO, Z. 1999.** Hydroxyl scavenging activity of glucose. fructose and ribose – lysine model Maillard products. *J. Food Sci.* 64 (3): 1239 – 1254 p.
- LAI, L.; CHOU, S.; CHAO, W. 2001.** Studies on the antioxidative activities of Hsian-Tsao (*Mesona procumbres Hems*) Leaf Gumm. *J. Agric. Food Chem.* 49: 963 – 968 p.

- LEBEAU, J.; FURMAN, C.; BERNIER, J.; DURIEZ, P.; TEISSIER, E.; COTELLE, N. N. 2000.** Antioxidant properties of di-tert-butylhydroxylated flavonoids. *Free Rad. Biol & Med.* 29 (9): 900 – 912 p.
- LEÓN, J. 1968.** Botánica de los cultivos tropicales. Instituto Americano de Ciencias Agrícolas (IICA). San José-Costa Rica. 154 – 155 p.
- LEWIS, S. R. J.; IRVING, S. N. 1992.** Diccionario de química y de productos químicos. Ediciones Omega. S.A. Barcelona España. 1170 p.
- LI, C.; XIE, B. 2000.** Evaluation of the antioxidant and pro-oxidant effects of tea catechin oxypolymers. *J. Agric. Food Chem.* 48: 6362 – 6366 p.
- MALIEN – AUBERT, C.; DANGLES, O.; AMIOT, M. J. 2001.** Color stability of commercial anthocianin – bases extract in relation to the phenolic protective effects by intra and intermolecular copigmentation. *J. Agric. Food Chem.* 49: 170 – 176 p.
- MARTÍNEZ – VALVERDE.; PERIAGO, M.; RUS, G.; 2000.** Significado nutricional de los compuestos fenólicos en la dieta. *ALAN.* 50(1): 5 – 15.
- MAZZA, G. 1998.** Functional Food: Biochemical & Processing. Aspect technomic publish Co.; Inc. Canada. 359 p.
- MIEAN, K. H.; MOHAMED, S. 2001.** Flavonoid (mirycetin. quercetin. kaempferol. luteolin and apigenin) content of edible tropical plants. *J. Food Agric Chem.* 49: 3106 – 3112 p.

- MORAN, F. J.; KLUCAS, V. R.; GRAYER, R. J.; ABIAN, J.; BECAN, M. 1997.** Complexes of Iron with phenolic compounds from soybean nodules and other legume tissues: prooxidant and antioxidant properties. *J. Free Rad Biol & Med.* 22 (5): 861 – 870 p.
- MORALES, J.; BABEL, M-B. 2002.** Melanoidins exert a weak antiradical activity in watery fluids. *J. Agric. Food Chem.* 4,4: A – E.
- MOURE, A.; FRANCO, D.; SINEIRO, J.; DOMÍNGUEZ, H.; JOSÉ, N. M.; LEMA, J. 2000.** Evaluation of extracts from *gevuina avellana* hulls as antioxidants. *J. Agric. Food Chem.* 48: 3890 – 3897 p.
- NANJO, F.; GOTO, K.; RYOTA, S.; MASAYUKI, S.; SAKAI, M.; YUKIHIKO, H. 1996.** Scavenging effects of tea catechins and their derivatives on 1.1 –Diphenyl –2- picrylhydrazyl radical. *J. Sci. Ic. Usa.* 895 – 902 p.
- NICOLI, M.; ANESE, M.; PARPINEL, M. 1999.** Influence of processing on the antioxidants properties of fruit and vegetables. *Review. Food Sci. Tech.* 10: 94 – 100 p.
- NIZAR, S. M.; RUNNIE, J.; D.ROACH, D. P.; MOHAME, S.; ABEYWARDENA, Y. M. 2001** Inhibition of low density lipoprotein receptor in hep G2 cells by tropical plant extracts. *J. Agric. Food Chem.* 6573 – 6578 p.
- OLANIYI, A. A.; SOFOWORA, E. A.; OGUNTIMEHIN, B. O. 1988.** Photochemicals investigation of some Nigerian plants used against fever II *Cymbopogon citratus*. *Plant Med.* 28: 179 – 186 p.

- ONAWUNMI, G. O.; YISAK, W. A.; OGUNIANA, E. O. 1984.** Antibacterial constituyente in the essential oil of *cymbopogon citratus* Staph. J. Ethnopharmacol. 12 (3) 279: 86 p.
- PELLEGRINI, N.; DEL RIO, D.; COLOMBI, B.; BIANCHI, M.; BRIGHENTI, F. 2002.** Application of the 2,2' – azinobis (3-ethylbenzothiazoline -6-sulfonic acid) Radical cation assay to a fol. Injection system for the evaluation of antioxidant activity of some pure compounds and beverages. J. Agric and Food Chem. Vol 36: 207 – 210 p.
- POLYACOV, N.; LESHINA, T; KONOVALOVA, T; KISPERT, L. 2001.** Carotenoides as scavengers of free radical in Fenton reaction. Antioxidants or pro-oxidants. J. Free. Rad. Biol. Med. 31 (3):398 – 404 p.
- PEINADO, M. A.; MORAL, M. L.; DEL ESTABEAN, F. J.; MARTÍNEZ – LARA, E.; SILAS, E.; JIMÉNEZ, A.; HERNÁNDEZ – COBOS, R.; BLANCO, S.; RODRIGO, J. Y.; PEDROSA, J. A. 2000.** Envejecimiento y neurodegeneración: Bases moleculares y celulares. Revisión. Revista de Neurología. 31 (11): 1054 – 1065 p.
- PSZCZOLA, D. E. 2001.** Antioxidants from preserving food quality to quality of life. Food Tech. 56 (6): 51 p.
- RAMOS, E. F. 2002.** Diseño y evaluación de la capacidad antioxidante in vitro de una bebida en base a té verde (*Camellia sinensis. K*) y hierba luisa (*Cymbopogon citratus.Staph*)". Tesis Ingeniero en Industrias Alimentarias. Universidad Nacional Agraria de la Selva. Tingo Maria - Perú.120 p.



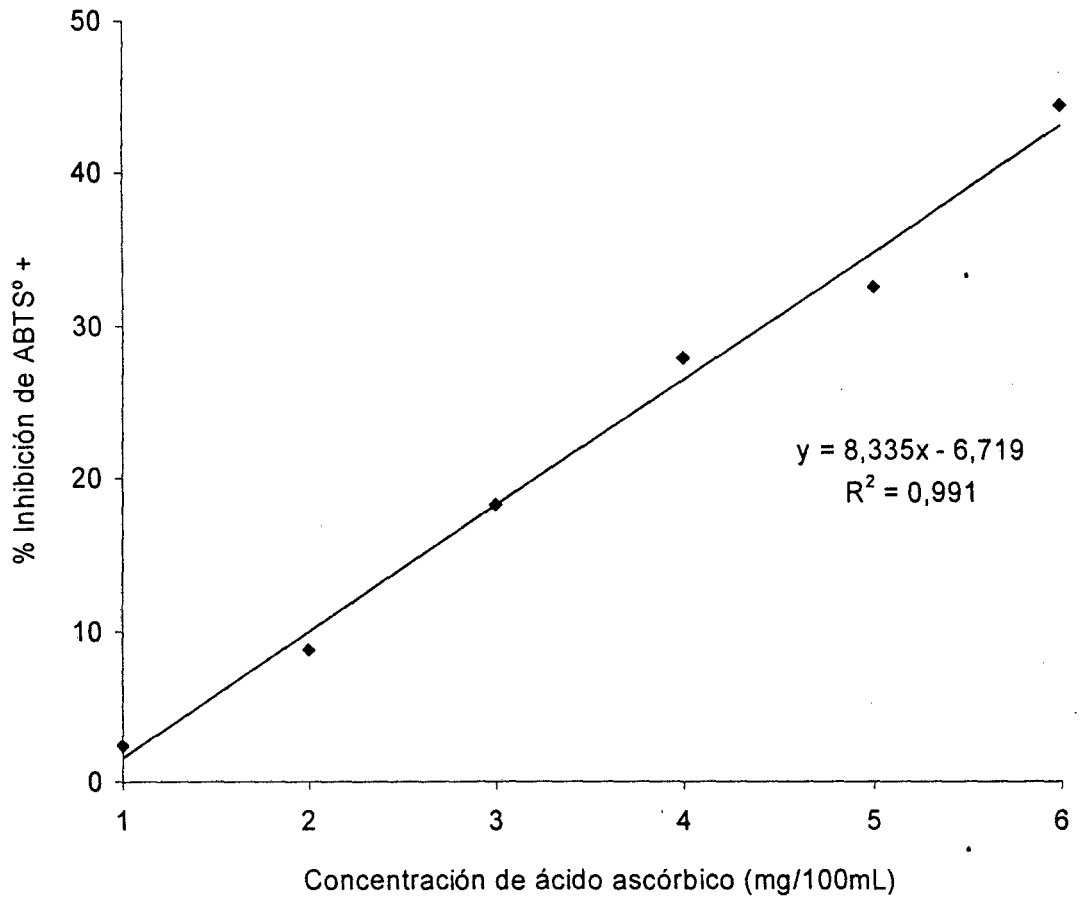
- RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGENT, A.; PANNALA, A. ; YANG, M. ; RICE-EVANS, C. 1999.** Antioxidant activity applies and improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Rad. Biol. Med.* 26 (9/10): 1231 – 1237 p.
- REEVES, I. D. 1975.** Estudio de la extracción almacenaje y elaboración de bebidas gaseosas con aceites esenciales de la hierba luisa. Tesis Ingeniero en Industrias Alimentarias. Universidad Nacional Agraria La Molina - Lima. Perú. 92 p.
- RICHELLE, M; TAVAZZI, I.; OFFORD, E. 2001.** Comparison of the antioxidant activity of commonly consumed polyphenolic beverages (Coffee, Cocoa, and Tea) prepared per cup serving. *J. Agric. Food Chem.* 49: 3438 – 3442 p.
- ROBINEAU, L. 1992.** Hacia una farmacopea caribeña. Seminario Gramil V y VI. Santo Domingo. 42 – 139. p
- RODRÍGUEZ, P.; MENENDEZ, L.; TRUJILLO, L. 2001.** Radicales Libres en la biomedicina y estrés oxidativo. *Rev. Cub. Med. Mil.* 30(1): 36 – 44 p.
- SANDOVAL, M.; OKUHAMA, N.; MELCHOR, V.; CONDEZO, L.; LAO, J.; MILLER, M. J. 2001.** Antioxidant activity of the cruciferous vegetable maca (*Lepidium meyenii*). *J. Agric. Food Chem.* 79: 207 – 213 p.
- SCALBERT, A.; WILLIAMSON, G. 2000.** Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J. Am. Soc. Nut. Sci.* 130: 2073S - 2085S.
- SCHMIDL, M. Y.; LABUZA, T. P. 2000.** Essential of functional foods. Aspen publication. Maryland. USA. 385 p.

- SILVA, D. H.; GARCIA, R. A.; ALVARADO, D. R.; GARCIA, R. J.; PINEDO, P. M.; CERRUTTI, S. T. 1995.** Plantas medicinales de la amazonía peruana. Iquitos. Perú. 124 p.
- THOMAS, M. J. 2000.** The role of free radicals and antioxidants. *Nutrition*. 16 (7/8): 716 – 718 p.
- UREÑA, P. M. y D'ARRIGO, H. M. 1999.** Evaluación sensorial de los alimentos. Editorial Agraria. Universidad nacional agraria La Molina. Lima - Perú. 197 p.
- VAJRAGUPTA, O; BOOCHOONGI, P.; WONGKRAJANG, Y. 2000.** Comparative quantitative structure activity study of radical scavenger. *J. Bioorg & Med. Chem*. 8: 2617 – 2628 p.
- VAN - ACKER A.; SASKIA, A. B.; DE GROOT, M. J.; DEN BERG, D. V.; TROMP, M. N.; DEN KELDER, G. D.; VAN DER VIJGH, W. J.; BAST, A. 1996.** A quantum chemical explanation of the antioxidant activity of flavonoids. *J. Chem Res. Tox*. 9: 1305 – 1312 p.
- VASCONCELLOS, J. A. 2000.** Alimentos funcionales. Conceptos y beneficios para la salud. *The world of food science*. Institute of food technology (IFT). California. U.S.A. 5435 – 5442 p.
- VAYALIL, P. K. 2002.** Antioxidant and properties of aqueous extract of date fruit (*Phoenix dactylifera L.*). *J. Agric. Food Chem*. 50: 610 – 617 p.
- VELIZ, C. C. 1993.** Estadística Aplicaciones. 2<sup>da</sup> Edición. Edit. Graficas S.A. Lima - Perú. 456 p.

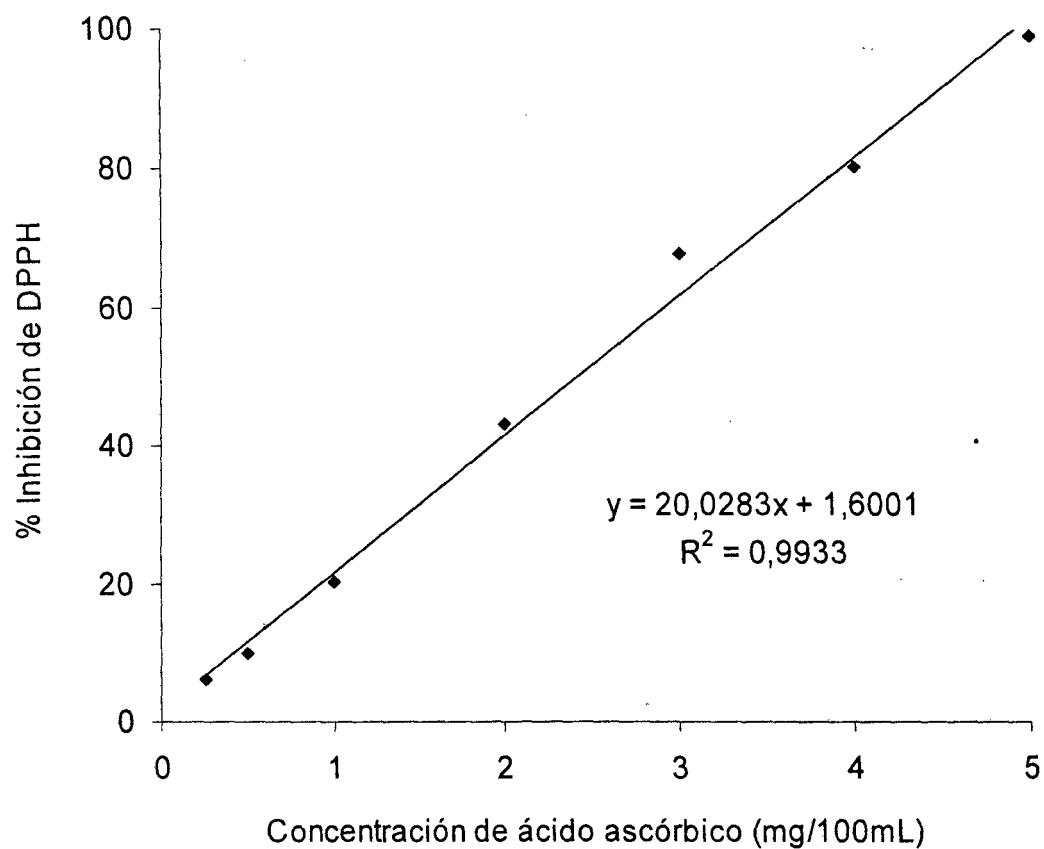
- VILA, C. B. 1995.** Plantas medicinales de uso popular en la amazonia. Kember Mejia. Elsa Reng - Lima Agencia española de cooperación internacional. Tarea asociación gráfica educativa. Lima - Perú. 438 p.
- WANG, S. Y.; ZHEN, W. 2001.** Effect of plant growth temperature on antioxidant capacity in strawberry. *J. Agric Food Chem.* 49: 4977 – 4982 p.
- WEI, Z.; WANG, S. 2001.** Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *J. Agric Food Chem.* 49: 5165 – 5170 p.
- YEN, G.; HSIEH, C. 2000.** Reactive oxygen species scavenging activity of Du - Zhong (*Eucommia ulmoides Oliv.*) and its active compounds. *J. Agric. Food Chem.* 48: 3431 – 3436 p.
- YILDIRIM, A. 2001.** Determination of antioxidant and antimicrobial activity of *Rumex crispus L.* Extracts. *J. Agric Food Chem.* 49: 4083 – 4089 p.
- YU, L.; HALEY, S.; PERRET, J.; HARRIS, M.; WILSON, J.; QIAN, M. 2002.** Free radical scavenging properties of wheat extracts. *J. Agric. Food Chem.* 50. 1619 – 1624 p.
- ZHEN, W.; WANG, S. Y. 2001.** Antioxidant activity and phenolic compounds in select herbs. *J. Agric Food Chem.* 49: 5165 – 5170 p.

## **ANEXOS**

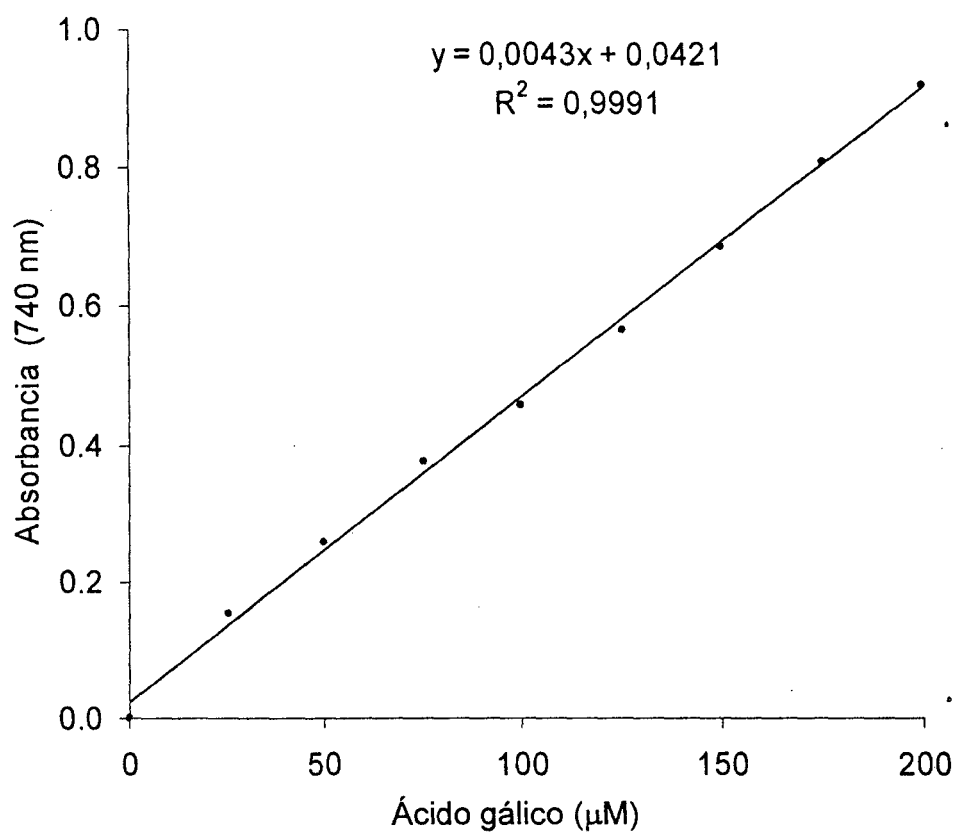
Anexo I: Curva de calibración estándar del ácido ascórbico - ABTS<sup>o+</sup>



**Anexo II: Curva de calibración estándar del ácido ascórbico - DPPH°.**



Anexo III: Curva de calibración estándar de polifenoles totales.



**Anexo IV: Control de temperaturas durante el almacenamiento en la  
evaluación de la estabilidad de modelos de bebida.**

<b>Días</b>	<b>Temperaturas</b>		
	<b>27°C</b>	<b>37°C</b>	<b>45°C</b>
0	26,80	37,00	45,00
1	27,70	37,20	45,50
2	27,30	37,40	45,60
3	27,80	36,90	45,80
4	27,50	37,50	44,90
<b>Promedio ± SD</b>	<b>27,42 ± 0,46</b>	<b>37,20 ± 0,55</b>	<b>45,44 ± 0,76</b>



**Anexo V:** Análisis de varianza (ANVA) para los radicales hidroxilos (2 - Dx).

F. V.	G. L.	S. C.	C. M.	F.Cal.
Concentraciones	4	3384,7088	846,1772	*10,26
Error	40	3300,4323	82,5108	
Total	44	85,1411		

\* Significancia.

**Anexo VI:** Análisis de varianza (ANVA) para el radical ABTS<sup>o+</sup>.

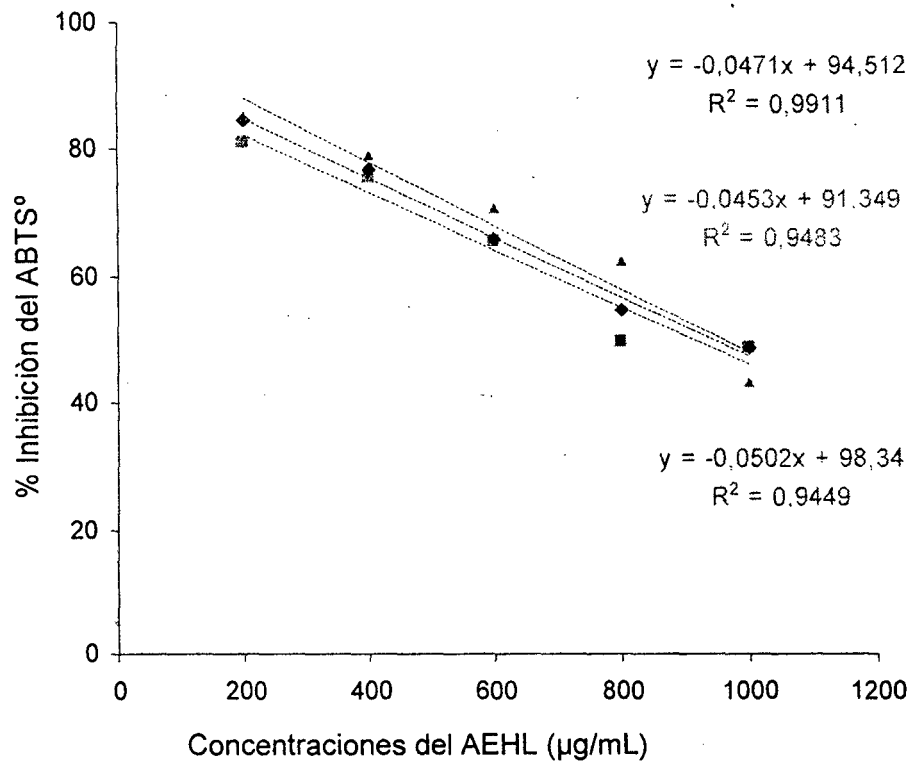
<b>F. V.</b>	<b>G. L.</b>	<b>S. C.</b>	<b>C. M.</b>	<b>F. Cal.</b>
Concentraciones	4	2738,6078	684,6519	*51,16
Error	10	133,8217	13,3821	
Total	14	2872,4295		

\* Significancia.

**Anexo VII:** Cálculo de los valores de la actividad antioxidante como equivalente vitamina C (EVC) frente al radical ABTS<sup>•+</sup>.

<b>Repeticiones</b>	<b>mg EVC/100g muestra</b>
R <sub>1</sub>	114,051
R <sub>2</sub>	114,051
R <sub>3</sub>	119,797
<b>Promedio</b>	<b>115,966</b>
<b>SD</b>	<b>3,318</b>

Anexo VIII: Cálculo del IC<sub>50</sub> en el EAHL con ABTS<sup>o+</sup>.



**Anexo IX:** Cálculo de los valores del IC<sub>50</sub> para el EAHL en ABTS<sup>o+</sup>.

<b>Repeticiones</b>	<b>Valores de IC<sub>50</sub> (µg/mL)</b>
R <sub>1</sub>	937,284
R <sub>2</sub>	943,438
R <sub>3</sub>	938,642
<b>Promedio</b>	<b>939,788</b>
<b>SD</b>	<b>5,274</b>

**Anexo X:** Análisis de varianza (ANVA) para el radical DPPH°.

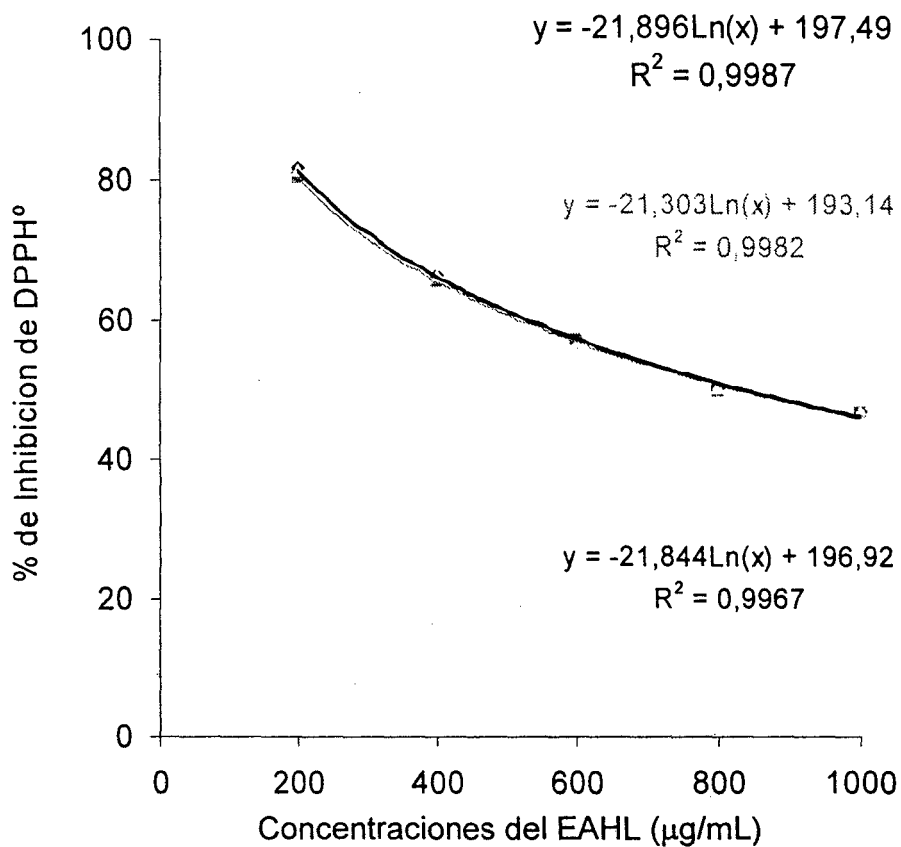
F. V.	G. L.	S. C.	C. M.	F: Cal.
Concentraciones	4	2282,0624	570,5155	2352,07*
Error	10	2,4255	0,2425	
Total	14	2284,4879		

\* Significancia.

**Anexo XI: Cálculo de los valores de la actividad antioxidante como equivalente en Vitamina C (EVC) frente al radical DPPH°.**

<b>Repeticiones</b>	<b>mg EVC/100 g muestra</b>
R <sub>1</sub>	145,895
R <sub>2</sub>	143,480
R <sub>3</sub>	144,931
<b>Promedio</b>	<b>144,769</b>
<b>SD</b>	<b>1,216</b>

Anexo XII: Cálculo del IC<sub>50</sub> en el EAHL con DPPH°.





**Anexo XIII: Cálculo de los valores del IC<sub>50</sub> para el EAHL en DPPH°.**

<b>Repeticiones</b>	<b>Valores de IC<sub>50</sub> (µg/mL)</b>
R <sub>1</sub>	828,189
R <sub>2</sub>	842,129
R <sub>3</sub>	833,701
<b>Promedio</b>	<b>834,673</b>
<b>SD</b>	<b>7,021</b>

**Anexo XIV:** Análisis de varianza combinado para el estudio de los tratamientos en pH y temperatura en la estabilidad de los MBHL sobre el índice de pardeamiento.

F.V.	G.L	S.C.	C.M.	F.Cal	Pr > F
Combinaciones	47	838937,856	17849,74162	169,88	0,0001*
pH	3	419660,049	139886,6830	1331,30	0,0001*
Temperatura	2	43794,6896	21897,34483	208,40	0,0001*
Días	3	243229,968	81076,65615	771,61	0,0001*
Temp * pH	6	56214,44877	9369,07480	89,17	0,0001*
Temp * pH * Días	33	76038,7000	2304,20303	21,93	0,0001*
Error experimental	96	10087,19307	105,07493		
Error total	143	849025,0491			

\*Significancia.

**Anexo XV:** Análisis de varianza del efecto simple de interacciones del pH y temperatura en la estabilidad sobre el índice de pardeamiento.

<b>F.V.</b>	<b>G.L.</b>	<b>S.C.</b>	<b>C.M.</b>	<b>F.Cal</b>	<b>Pr &gt; F</b>
<b>Efecto simple en Temp</b>					
Temp en pH 3	2	30729,0197	15364,509	146,2243	3,1058*
Temp en pH 4	2	20124,5562	10062,278	95,76288	3,1058*
Temp en pH 5	2	4917,30319	2458,6516	23,39903	3,1058*
Temp en pH 7	2	44238,2592	22119,129	210,5081	3,1058*
<b>Efecto simple en pH</b>					
pH en Temp 27	3	137877,421	45959,140	437,3939	2,7138*
pH en Temp 37	3	208718,017	69572,672	662,1243	2,7138*
pH en Temp 45	3	129279,058	43093,019	410,1170	2,7138*
<b>Efecto simple en Temp * pH</b>					
Temp * pH en Días 1	11	87731,5920	7975,5993	75,90392	1,9048*
Temp * pH en Días 2	11	153035,802	13912,345	132,4040	1,9048*
Temp * pH en Días 3	11	170948,736	15540,794	147,9020	1,9048*
Temp * pH en Días 4	11	183991,756	16726,523	159,1866	1,9048*
<b>Efecto simple en días</b>					
Días en Temp 27*pH 3	3	4094,20223	1364,7341	12,98819	2,7138*
Días en Temp 27*pH 4	3	78752,1526	26250,717	249,8285	2,7138*
Días en Temp 27*pH 5	3	39085,3738	13028,457	123,9920	2,7138*
Días en Temp 27*pH 7	3	12120,2369	4040,0790	38,44950	2,7138*
Días en Temp 37*pH 3	3	8591,11967	2863,7066	27,25394	2,7138*
Días en Temp 37*pH 4	3	14210,4075	4736,8025	45,08023	2,7138*
Días en Temp 37*pH 5	3	76125,1788	25375,059	241,4949	2,7138*
Días en Temp 37*pH 7	3	19537,5552	6512,5184	61,97975	2,7138*
Días en Temp 45*pH 3	3	18606,9906	6202,3302	59,02769	2,7138*
Días en Temp 45*pH 4	3	18801,4112	6267,1371	59,64445	2,7138*
Días en Temp 45*pH 5	3	24523,0134	8174,3378	77,79532	2,7138*
Días en Temp 45*pH 7	3	4821,02614	1607,0087	15,29393	2,7138*
Error experimental	96	10087,1935	105,07493		

**Anexo XVI:** Análisis de varianza combinado para el estudio de los tratamientos de pH y temperatura en la estabilidad de los MBHL sobre los polifenoles totales.

<b>F.V.</b>	<b>G.L.</b>	<b>S.C</b>	<b>C.M.</b>	<b>F. Cal</b>	<b>Pr &gt; F</b>
Combinaciones	47	3,58060166	0,07618301	4,68	0,0001*
pH	3	1,33449069	0,44483023	27,31	0,0001*
Temperatura	2	0,12847610	0,06423805	3,94	0,0226*
Días	3	0,49795635	0,16598545	10,19	0,0001*
Temp*pH	6	0,84336913	0,14056152	8,63	0,0001*
Temp*pH*Días	33	0,77630940	0,02352453	1,44	0,0861*
Error experimental	96	1,56391067	0,01629074		
Error Total	143	5,14451233			

\*Significancia.

**Anexo XVII:** Análisis de varianza del efecto simple de las interacciones del pH y la temperatura en la estabilidad sobre los polifenoles totales.

<b>F.V.</b>	<b>G.L.</b>	<b>S.C.</b>	<b>C.M.</b>	<b>F.Cal</b>	<b>Pr &gt; F</b>
<b>Efecto simple en Temp</b>					
Temp en pH 3	2	0,81665239	0,408326195	25,064926	3,1058*
Temp en pH 4	2	0,10986422	0,05493211	3,371984	3,1058*
Temp en pH 5	2	0,01808572	0,00904286	0,555092	3,1058N.S
Temp en pH 7	2	0,02724289	0,013621445	0,836146	3,1058N.S
<b>Efecto simple en pH</b>					
pH en Temp 27	3	0,61006506	0,20335502	12,482860	2,7138*
pH en Temp 37	3	0,14418075	0,04806025	2,950158	2,7138*
pH en Temp 45	3	1,42361400	0,474538	29,129309	2,7138*
<b>Efecto simple en Temp*pH</b>					
Temp * pH en Días 1	11	0,19275300	0,017523	1,075642	1,9048N.S
Temp * pH en Días 2	11	1,44594733	0,131449757	8,068986	1,9048*
Temp * pH en Días 3	11	0,65002408	0,059093098	3,627404	1,9048*
Temp * pH en Días 4	11	0,79392089	0,072174626	4,430408	1,9048*
<b>Efecto simple en Días</b>					
Días en Temp 27*pH 3	3	0,08448800	0,028162666	1,728753	2,7138N.S
Días en Temp 27*pH 4	3	0,11962867	0,039876223	2,447785	2,7138N.S
Días en Temp 27*pH 5	3	0,03012958	0,010043193	0,616497	2,7138N.S
Días en Temp 27*pH 7	3	0,03312567	0,01104189	0,677802	2,7138N.S
Días en Temp 37*pH 3	3	0,02528425	0,008428083	0,517354	2,7138N.S
Días en Temp 37*pH 4	3	0,01855500	0,006185	0,379664	2,7138N.S
Días en Temp 37*pH 5	3	0,03491958	0,01163986	0,714508	2,7138N.S
Días en Temp 37*pH 7	3	0,05721700	0,019072333	1,170747	2,7138N.S
Días en Temp 45*pH 3	3	0,56059233	0,18686411	11,470572	2,7138*
Días en Temp 45*pH 4	3	0,08202467	0,027341556	1,678350	2,7138N.S
Días en Temp 45*pH 5	3	0,06023233	0,020077443	1,232445	2,7138N.S
Días en Temp 45*pH 7	3	0,16806867	0,05602289	3,438941	2,7138*
Error experimental	96	1,56391067	0,01629074		

**Anexo XVIII:** Análisis de varianza combinado para el estudio de los tratamientos de pH y temperatura en la estabilidad de los MBHL sobre la actividad antioxidante.

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	F. Cal	Pr > F
Combinaciones	47	16664,5499	354,564892	39,09	0,0001*
pH	3	4026,79608	3,7635071	147,97	0,0001*
Temperatura	2	7,5270143	1342,26536	0,41	0,6616N.S
Días	3	6001,21369	2000,40456	220,52	0,0001*
Temp*pH	6	1400,13933	233,356555	25,72	0,0001*
Temp*pH*Días	33	5228,87379	158,450721	17,47	0,0001*
Error	96	870,840601	9,071256		
Error Total	143	17535,3905			

\* Significancia.

**Anexo XIX:** Análisis de varianza del efecto simple de las interacciones de pH y temperatura en la estabilidad sobre la actividad antioxidante.

<b>F.V.</b>	<b>G.L.</b>	<b>S.C.</b>	<b>C.M.</b>	<b>F.Cal</b>	<b>Pr &gt; F</b>
<b>Efecto simple en Temp</b>					
Temp en pH 3	2	102,31129339	51,1556	5,6393123	3,1058*
Temp en pH 4	2	681,64179717	340,8209	37,5715214	3,1058*
Temp en pH 5	2	379,52554372	189,7628	20,9191281	3,1058*
Temp en pH 7	2	244,18771439	122,0939	13,4594210	3,1058*
<b>Efecto simple en pH</b>					
pH en Temp 27°C	3	1554,2317237	518,0772	57,1119618	2,7138*
pH en Temp 37°C	3	3225,3322028	1075,110	118,518395	2,7138*
pH en Temp 45°C	3	647,37149523	215,7905	23,7883808	2,7138*
<b>Efecto simple en Temp*pH</b>					
Temp * pH en Días 1	11	8304,6410050	754,9674	83,2263297	1,9048*
Temp * pH en Días 2	11	1157,0543434	105,1868	11,5956110	1,9048*
Temp * pH en Días 3	11	565,33727056	51,3943	5,6656207	1,9048*
<b>Temp * pH en Días 4</b>	11	636,30361322	57,8458	6,3768216	1,9048*
<b>Efecto simple en Días</b>					
Días en Temp 27*pH 3	3	87,38571767	29,1286	3,2110847	2,7138*
Días en Temp 27*pH 4	3	501,84329633	167,281	18,4407864	2,7138*
Días en Temp 27*pH 5	3	971,7538220	323,917	35,7081678	2,7138*
Días en Temp 27*pH 7	3	1830,3043296	610,101	67,2565547	2,7138*
Días en Temp 37*pH 3	3	277,10609233	92,3687	10,1825695	2,7138*
Días en Temp 37*pH 4	3	295,71672092	98,5722	10,8664376	2,7138*
Días en Temp 37*pH 5	3	2746,5979817	915,532	100,926777	2,7138*
Días en Temp 37*pH 7	3	1256,8821303	418,960	3	2,7138*
Días en Temp 45*pH 3	3	73,55936692	24,5198	46,1855225	2,7138N.S
Días en Temp 45*pH 4	3	1129,5360982	376,512	2,7030202	2,7138*
Días en Temp 45*pH 5	3	1453,8677636	484,622	41,5060519	2,7138*
Días en Temp 45*pH 7	3	605,53416800	201,844	53,4239772	2,7138*
Error experimental	96	870,840601	9,071256	22,2510220	