

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA

FACULTAD DE INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

**DEPARTAMENTO ACADEMICO DE CIENCIA TECNOLOGIA E
INGENIERÍA DE LOS ALIMENTOS**



**PROCESAMIENTO TECNOLOGICO PARA LA OBTENCION DE
TE VERDE (*Camellia sinensis*): DETERMINACION DE SU
ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y CUANTIFICACION DE
FLAVANOLES POR HPLC**

T E S I S

Para optar al título de:

INGENIERO EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

Presentado por:

VANESSA VERENICE MELCHOR SANDOVAL

TINGO MARIA – PERÚ

2002



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 25 de junio del 2002, a horas 16:10 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: **Vanessa Verenice Melchor Sandoval**.

“PROCESAMIENTO TECNOLÓGICO PARA LA OBTENCIÓN DE
TE VERDE (*Camellia sinensis*): DETERMINACIÓN DE SU
ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y CUANTIFICACION DE
FLAVANOLES POR HPLC”

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: **Vanessa Verenice Melchor Sandoval**, 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, junio 25 del 2002


Ing. Pedro Peláez Sánchez
Presidente




Lauriano Zavaleta De la Cruz
Vocal


Ing°. Luis Alberto Condezo Hoyos
Vocal


Ing. Elizabeth Ordoñez Gómez
Asesor

DEDICATORIA

A mis padres **Alejandro y Carmen**
por su amor innegable vertido durante todo instante de mi vida
y por proveerme todo el apoyo requerido.

A mi madre **Carmen**,
por que ella caminó conmigo durante muchos años de mis estudios,
con la perseverancia, resistencia y sin doblegar a las dificultades
hasta lograr el objetivo trazado.

A mis abuelitos **María y Manuel**,
quienes desde mi niñez me criaron
en los valores, virtudes y principios
que impartieron a sus hijos.

A mi abuelita **María Jesús**,
por sus consejos y apoyo de madre en los
momentos mas necesitados.

A mi hermano **Niels**,
para que este trabajo constituya
una fuente de inspiración en ascender
gradualmente las montañas de la
naturaleza de la vida.

AGRADECIMIENTO

- Al Dr. Manuel Sandoval Chacón, Co-Asesor, por permitirme trabajar en su laboratorio de Albany Medical College, Albany, New York brindándome todas las facilidades para la ejecución de esta investigación, por la paciencia de haber tenido conmigo en compartir su filosofía de hacer investigación.
- A la Ing. M.Sc. Elizabeth Susana Ordoñez, Asesora, por sus orientaciones y enseñanzas durante mis estudios y en la conducción de mi tesis.
- Al Ing. Juan Lao Gonzáles por el apoyo técnico brindado en el laboratorio de espectrofotometría de la UNAS, Tingo María, Perú.
- A la Empresa Jardines de Té S.A. por todo el apoyo en brindarme las muestras de hoja de té y las facilidades para tener acceso a su planta envasadora.
- Al personal de laboratorio de la Universidad Nacional Agraria de la Selva por las facilidades brindadas en el secado de las muestras y ejecución de los ensayos preliminares de la presente investigación.
- A mi condiscípula y amiga Blg. M.Sc. Nataly Okuhama por sus enseñanzas y compartir conmigo su experiencia profesional, durante mi permanencia en Albany Medical College.

- A mis tíos Manuel y Evi Sandoval por haberme acogido en su hogar y proveerme el apoyo de familia durante mi permanencia en Albany, New York, USA
- A mis padres, Alejandro y Carmen, por haberme brindado todo el apoyo y aliento a forjarme una profesión.
- A mi hermano Niels por su compañerismo y hermandad por afrontar conmigo todas las vicisitudes de nuestra vida familiar.
- A mis familiares porque siempre me brindaron su apoyo material, espiritual y por sus consejos en el transcurso de mi vida de estudiante.

INDICE GENERAL

	Pag.
I. INTRODUCCION.....	1
II. REVISION BIBLIOGRAFICA	4
A. CARACTERÍSTICAS BOTÁNICAS DEL CULTIVO DE TÉ.....	4
1. Generalidades	4
2. Clasificación sistemática	4
3. Descripción botánica	5
B. FORMAS DE PROCESAMIENTO DEL TÉ.....	5
1. Elaboración del té negro	5
2. Elaboración del té verde	6
C. COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL TÉ.....	8
1. Composición química del té negro	9
2. Composición química del té verde	10
D. ROL DEL TÉ VERDE EN LA SALUD HUMANA.....	11
1. Función antioxidante	12
2. Función antiinflamatoria	13
3. Función anticáncer	13
4. Función antimicrobiana	15
E. ANTIOXIDANTES.....	16
1. Definición	16
2. Principales antioxidantes	16
3. Radicales libres	19
F. CROMATOGRAFÍA LIQUIDA DE ALTA PERFORMACIA.....	21

G	PLASMA ACOPLADO INDUCTIVO.....	22
III.	MATERIALES Y METODOS	23
A.	LUGAR Y FECHA DE EJECUCIÓN.....	23
B.	MATERIALES Y EQUIPOS UTILIZADOS.....	23
1.	Materia prima	23
2.	Materiales y equipo.....	23
C.	MÉTODOS DE ANÁLISIS.....	25
1.	Análisis de la capacidad antioxidativa	25
2.	Determinación de flavanoles por HPLC.....	25
3.	Determinación de minerales	26
4.	Análisis microbiológico	27
D.	METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....	27
1.	Evaluación del blanqueado en el proceso de elaboración	27
2.	Cuantificación de flavanoles	35
3.	Determinación de minerales	36
4.	Evaluación durante el almacenamiento	37
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	42
A.	EVALUACIÓN DEL BLANQUEADO EN EL PROCESO DE ELABORACIÓN DEL TÉ VERDE FILTRANTE.....	42
B.	DETERMINACIÓN DE FLAVANOLES EN EL TÉ VERDE POR HPLC.....	45
C.	DETERMINACIÓN DE MINERALES EN EL TÉ VERDE.....	50
D.	EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DEL TÉ VERDE DURANTE EL ALMACENAMIENTO.....	51

V.	CONCLUSIONES	55
VI.	RECOMENDACIONES	56
VII.	BIBLIOGRAFÍA	57
VIII	ANEXOS	66

INDICE DE CUADROS

N°		Pag.
1.	Componentes químicos de la hoja de té	9
2.	Contenido de flavanoles en el té verde y té negro	11
3.	Distribución de los tratamientos	29
4.	Preparación de soluciones de trabajo de té verde	31
5.	Preparación de las reacciones entre té verde y DPPH	32
6.	Resumen de análisis microbiológico	40
7.	Balance de materia en la elaboración de té verde	42
8.	Capacidad del té verde de inhibir DPPH	44
9.	Determinación de la capacidad antioxidativa del té verde	45
10.	Contenido de flavanoles en el té verde	46
11.	Contenido de minerales en la hoja e infusión del té verde	51
12.	Efecto del almacenamiento en la actividad antioxidativa del té verde	52
13.	Análisis microbiológico del té verde	53

INDICE DE FIGURAS

N°		Pag.
1.	Flujograma para la producción de té verde filtrante	30
2.	Esquema experimental para la evaluación del blanqueado	34
3.	Determinación de flavanoles en el té verde por HPLC	49
4.	Contenido de flavanoles en el té verde	49
5.	Curva estándar del radical libre DPPH	72
6.	Cromatograma del estándar catequina (CAT) determinada por HPLC	73
7.	Curva estándar de la catequina estimada por HPLC	75

RESUMEN

El presente trabajo de investigación se desarrolló durante el periodo comprendido entre Mayo del 2001 y Abril de 2002.

Los objetivos planteados fueron: 1) Establecer la tecnología para la obtención de té verde tipo filtrante, y determinar la actividad antioxidante, contenido de flavanoles y variación de la actividad antioxidante en el almacenamiento. 2) Determinar el contenido de macro y micro minerales en el té (infusión y micropulverizadas).

En el valle del Alto Huallaga, específicamente en la Divisoria, se cultiva té desde hace muchos años orientado solamente a la producción de té negro.

En el país, no existe empresa alguna que elabore té verde para atender el mercado doméstico ni externo.

El proceso de elaboración de té verde consistió de las siguientes operaciones: 1) recepción, 2) selección, 3) blanqueado, 4) oreo, 5) secado, 6) molienda, 7) envasado y 8) almacenamiento. Para evaluar el efecto del blanqueado (en segundos) sobre la actividad antioxidativa se establecieron 4 tratamientos: T1 = 15, T2 = 30, T3 = 45 y T4 = 60 segundos, respectivamente. El blanqueado se realizó por inmersión de la muestra en agua caliente (95 °C).

La capacidad antioxidativa se evaluó a través del test de DPPH, por espectrofotometría. Las muestras de 25 µl de té verde (1 - 100 µg/ml) fueron reaccionadas con 975 µl de DPPH (100 µM). La absorbancia a 515 nm fue registrada cada 30 segundos durante 5 minutos. La actividad antioxidativa del té verde fue calculada por su capacidad de inhibir DPPH y luego expresada en

IC₅₀. La determinación de flavanoles se realizó por HPLC en fase reversa y cuantificada a 210 nm. El volumen de inyección fue de 10 µl para las muestras de té verde y de 1 µl para los estándares. Para la determinación de minerales en el té verde (filtrante y hojas micropulverizadas), las muestras de hoja micropulverizadas fueron sometidas a una digestión ácida en horno microondas. Para la infusión se filtró la solución a 20 µm. Luego las muestras fueron analizadas en Plasma Acoplado Inductivo (ICP). La evaluación microbiológica se hizo siguiendo los métodos recomendados por la American Association of Analytical Chemistry (AOAC). Se evaluó mesófilos aeróbios viables, *Salmonella/Shigella*, mohos y levaduras. Los análisis en el almacenamiento (60 días) del té verde en función de la actividad antioxidativa se realizaron cada 10 días. Concluido el tiempo de almacenamiento se realizaron los análisis microbiológicos.

Los resultados de rendimiento de materia para cada tratamiento fueron: T1 = 18,66 %, T2 = 17,85 %, T3 = 18,68 % y T4 = 17,00 %. La actividad antioxidativa (IC₅₀) al inicio del estudio indicó los siguientes valores: T1 = 47,59 µg/ml, T2 = 47,47 µg/ml T3 = 47,12 µg/ml y T4 = 46,39 µg/ml. Estos resultados indicaron que no hubo diferencias significativas ($P > 0,05$) entre tratamientos para inhibir DPPH. En base a los resultados anteriores, se seleccionó el tratamiento de blanqueado por 30 segundos (T2) para continuar con los otros análisis formulados para responder a los objetivos planteados en este estudio.

En el té verde seleccionado (T2) se cuantificó los flavanoles (catequinas) por HPLC, identificándose las siguientes: Epicatequin galato (ECG), 4,15 mg/g (2,50 %); Epigalocatequina (EGC), 26,14 mg/g (15,78%); Epicatequina (EC),

28,37 mg/g (17,13 %), Catequina (CAT) 35,08 mg/g, (21,18 %) y Epigallocatequina galato (EGCG) 71,89 mg/g, (43,41 %). Comparando las concentraciones se encontró diferencias significativas entre ellas ($P < 0,001$). La composición de estos flavanoles en el té verde fue EGCG > CAT > EC > EGC > ECG. La composición de minerales, en la hoja de té verde, en función a su concentración fue Ca > S > Al > Fe > Zn > Ba > Cu > Ni. Estos resultados indican que la infusión de té verde provee ciertos minerales como el Ca y Zn que tienen funciones biológicas conocidas. Durante el almacenamiento los valores de IC_{50} obtenidos fueron: 10d = 45,06 $\mu\text{g/ml}$; 20d = 47,66 $\mu\text{g/ml}$; 30d = 43,95 $\mu\text{g/ml}$; 40d = 45,49 $\mu\text{g/ml}$; 50d = 47,84 $\mu\text{g/ml}$ y 60d = 45,56 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente. No se encontró diferencias significativas entre los días de almacenamiento ($P > 0,05$). Indicando que bajo las condiciones de almacenamiento, la actividad de los flavanoles presentes en el té verde no fue afectada.

Para evaluar la salubridad del té verde elaborado se realizaron pruebas microbiológicas los cuales demostraron ausencia de microorganismos patógenos. Los valores Unidad Formación de Colonias (UFC) obtenidos fueron inferiores a lo establecido por la Organización Mundial de la Salud. Estos resultados permiten indicar que el producto elaborado posee todas las cualidades óptimas para el consumo humano.

SUMMARY

The present study was conducted in the laboratories of Universidad Nacional Agraria de la Selva, Tingo María, Peru and Albany Medical College, Albany, New York, USA from May 2001 to April 2002. The objectives were: 1) To establish the technological process to manufacture green tea, to determine its antioxidant activity, flavanols content, and the variation of its antioxidant capacity during storage, 2) to determine the content of macro and micro minerals in green tea, micropulverized and infusion.

In the Upper Huallaga Valley, specifically, La Divisoria, tea (*Camellia sinensis*) is cultivated and is used mainly to produce black tea. In Peru, there is not any industry that manufactures green tea for the domestic or the external market. Hence, we decided to conduct this study to satisfy this need.

The green tea processing included the following operations: reception, selection, steaming, drying, grinding, packaging and storage. To assess the effect of steaming time (seconds) on the antioxidant activity of green tea, four treatments were established: T1 = 15, T2 = 30, T3 = 45, and T4 = 60 seconds, respectively.

The steaming operation was conducted by immersing the sample in hot water (95 °C). The antioxidant activity was measured using the DPPH assay at 515 nm. The reactions were done with 25 µl of green tea at different concentrations (1 - 100 µg/ml) with 975 µl of DPPH (100 µM). The absorbance was registered

every 30 seconds during 5 minutes. The antioxidant activity of green tea was calculated by its capacity to inhibit DPPH and expressed in IC₅₀ values.

Flavanols were determined by HPLC reversed-phase and quantified at 210 nm. The injection volume was 10 µL for the green tea samples, and 1 µL for the internal standards. To determine the mineral content of green tea (micropulverized and infusion) two protocols were followed: 1) micropulverized samples were acid digested using a microwave system, and 2) green tea infusion was filtered at 20 µm and directly used for mineral quantification. All samples were analyzed using Inductive Couple Plasma (ICP). To assess the variation of the antioxidant activity of green tea during the storage, we carried out DPPH tests every 10 days. At the end of the storage time, several microbiological analyses were conducted following the American Association of Analytical Chemistry (AOAC) methods. Presence of aerobic bacteria, *Salmonella/Shigella*, fungi and mold were evaluated in all samples.

The dry matter yield for each treatment was T1 = 18,66 %, T2 = 17,85 %, T3 = 18,68 % and T4 = 17,0 %. The antioxidant activity (IC₅₀) at the beginning of the study was T1 = 47,59 µg/ml, T2 = 47,47 µg/ml, T3 = 47,12 µg/ml and T4 = 46,39 µg/ml. These results indicated that there were not statistical differences (P > 0,05) among the treatments in their ability to inhibit DPPH. From the previous results, we selected treatment 2 (T2), steaming for 30 seconds, for further analysis.

Quantification of flavanols in T2 indicated the following results: Epicatechin gallate (ECG), 4,15 mg/g (2,50 %); Epigallocatechin (EGC), 26,14 mg/g (15,78 %); Epicatechin (EC), 28,37 mg/g (17,13 %), Catechin (CAT) 35,08 mg/g,

(21,18 %) and Epigallocatechin gallate (EGCG) 71,89 mg/g, (43,41 %). The results showed significant differences ($P < 0,001$) among catechins and the composition of flavanols in the green tea was EGCG > CAT > EC > EGC > ECG. The presence of minerals in green tea based on concentration was Ca > S > Al > Fe > Zn > Ba > Cu > Ni. This result showed that green tea infusion provides essential elements such as Ca and Zn, which have well known biological functions.

The antioxidant activity values (IC_{50}) for green tea during the storage were 10d = 45,06 $\mu\text{g/ml}$; 20d = 47,66 $\mu\text{g/ml}$; 30d = 43,95 $\mu\text{g/ml}$; 40d = 45,49 $\mu\text{g/ml}$; 50d = 47,84 $\mu\text{g/ml}$, 60d = 45,56 $\mu\text{g/ml}$, respectively. There were not statistical differences ($P > 0,05$) among the days of evaluation. Hence, the storage time did not affect the stability of catechins providing similar antioxidant capacity during the study. The microbiological assay demonstrated the absence of pathogenic bacteria, fungi and mold, and the Colony Forming Units (UFC) values detected were lower than the values recommended by the World Health Organization. Collectively, our results demonstrated that the green tea manufactured in this study has optimal quality for human consumption.

I. INTRODUCCIÓN

El Perú posee excelentes características geográficas para el cultivo del té (*Camellia sinensis*). En el país existen varios lugares donde se cultiva té, entre los más importantes se encuentra el Departamento de Huánuco, Provincia de Leoncio Prado, Distrito de Hermilio Valdizán - La Divisoria. La producción comercial del cultivo de té en el país se circunscribe principalmente a atender la demanda del mercado nacional y la forma de procesamiento es la fabricación de té negro. La empresa Jardines de Té S.A. ubicada en La Divisoria, Tingo María, es una de las empresas agroindustriales más antiguas de la zona del Alto Huallaga que se ha dedicado al cultivo y producción de té negro. A pesar que la empresa Jardines de Té, produce té negro desde hace más de 30 años, hasta la fecha, no ha desarrollado la tecnología para procesar té en otras formas tales como el té verde.

El té verde posee propiedades medicinales benéficas para la salud. Por ejemplo, su valor biológico como antioxidante, antiinflamatorio, anticancerígeno y antimicrobiano ha sido documentado en extenso en diversos *journals* científicos del mundo. El consumo de té verde está bien difundido en países asiáticos y durante los últimos diez años, la demanda de té verde se ha incrementado notablemente en los países desarrollados de Norte América y Europa.

En el Perú, el té verde no es conocido y esto se hace evidente por su escaso consumo. Es posible que esta situación se deba a la falta de acceso a la información científica que demuestra las bondades biomédicas, como también debido a la falta de conocimiento tecnológico (*know how*) para elaborar té verde. En nuestra zona, se encuentra la Cordillera Azul que provee condiciones favorables de clima, medio ambiente y edafológicas para el cultivo industrial del té. Precisamente y debido a estos factores, se tiene en Tingo María posee excelentes posibilidades para producir té verde con la calidad nutricional similar a los que se venden en el mercado de los países desarrollados.

Se ha reportado que el 80 % del té que se vende en el mundo, es té negro y el 20 % constituye té verde. El consumo de té verde se está incrementando cada vez mas en el extranjero y para el caso del Perú es de esperarse que la demanda aumente en el futuro; por lo tanto estamos ante una gran oportunidad de desarrollar un producto comercial, que no solamente sea favorable para la salud humana, si no que contribuiría notablemente al desarrollo agroindustrial de Tingo María. Para implementar la ejecución de esta investigación se establecieron acuerdos de cooperación científica con el Colegio de Medicina de Albany (AMC), Albany, New York, USA. En AMC, Phytonutrients Laboratory, se tuvo acceso a la tecnología analítica para evaluar científicamente el valor biológico del té verde producido en Tingo María.

Los objetivos de la presente investigación fueron:

- Establecer la tecnología para la obtención de té verde tipo filtrante, y determinar la actividad antioxidante, contenido de flavanoles y variación de la actividad de la actividad antioxidante en el almacenamiento.
- Determinar el contenido de macro y micro minerales en el té (infusión y micropulverizadas).

II. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA

A. CARACTERISTICAS BOTANICAS DEL CULTIVO DE TE

1. Generalidades

El té es una planta subtropical originaria del Sur este de China, Indonesia y Asia, su área natural de dispersión lo constituyen las zonas de clima templado y abundantes en lluvias. La planta de té se adapta bien a latitudes y altitudes variables (Paredes, 1994).

2. Clasificación sistemática

Según Paredes (1994), la clasificación sistemática del té comprende la siguiente información

División	:	Angiospermas
Clase	:	Dicotiledoneas
Orden	:	Parietales
Familia	:	Theaceas
Género	:	<i>Camellia</i> o <i>Camallia</i>
Especie	:	<i>Camellia sinensis</i> (L)

3. Descripción Botánica

La planta de té es un arbusto perteneciente a la familia de las Teáceas (Cameliáceas, ternstromiaceas). Mediante técnicas de cultivo crece de 1 - 1,50 metros. Se cultiva principalmente en las partes calurosas del Este y Sur de Asia (Bokuchava y Skobeleva, 1980).

B. FORMAS DE PROCESAMIENTO DEL TÉ

El consumo anual de té en el mundo es de aproximadamente un millón de toneladas, de las cuales el 80 % representa té negro y el 20 % té verde. Los principales países productores de té negro son: India, Sri Lanka e Indonesia. Por otro lado los países productores de té verde China, Rusia y Japón (Packer *et al.*, 1999). El consumo de té, como bebida está bien difundido de tal modo que ocupa el segundo lugar después del consumo del agua. El té es preparado a partir de las hojas secas de la planta (Ahmad *et al.*, 1997).

1. Elaboración del té negro

El té negro se obtiene sometiendo a las hojas a un proceso de fermentación y luego a un secado con aire caliente. Al término del proceso el té adquiere una tonalidad oscura y se produce una transformación química de los aminoácidos, ácidos grasos y polifenoles (Bokuchaba y Skobeleva, 1980). El proceso de fermentación oxida las catequinas y como resultado de ello sufren una conversión química formándose productos poliméricos como teaflavinas (TFs) y tearubiginas (TRs). Este proceso oxidativo está mediado por la enzima polifenol oxidasa (Samman *et al.*, 2001; Singh *et al.*, 1999).

Una característica de la manufactura del té negro es que las hojas son estrujadas para permitir una mejor actividad de la enzima polifenol oxidasa y pueda catalizar la oxidación y polimerización de las catequinas en el proceso de fermentación (Packer *et al.*, 1999). La polifenol oxidasa

(E.C1.11.1.7) es una enzima oxidoreductasa de importancia en productos vegetales ya que esta relacionada con el oscurecimiento enzimático que ocurre durante el almacenamiento o durante el proceso industrial.

2. Elaboración del té verde

La elaboración de té verde sigue un proceso diferente a la elaboración de té negro. Las hojas frescas recién cosechadas son sometidas a un cocido a vapor (steaming) o blanqueado para evitar la oxidación de las catequinas catalizada por la polifenol oxidasa. Al efectuarse este proceso térmico se conserva la mayor cantidad de catequinas en sus estructuras químicas originales. Después del blanqueado, ingresan a una etapa de enrollado, son secados sobre bandejas calientes para reducir el contenido de humedad y finalmente ser envasadas (Wang *et al.*, 2000 y Katiyar y Mukhtar, 1997).

La elaboración de té verde (*Camellia sinensis*) difiere en algunos países, por ejemplo en el sistema Japonés se utiliza vapor para secar las hojas y en el sistema Chino es por calentamiento. Un aspecto crucial en la manufactura de té verde es evitar que las hojas se fermenten antes de iniciar el proceso; es decir, después cosechado las hojas no se deben de dejar expuestas al medio ambiente. Los factores que afectan la composición de polifenoles en la infusión de té verde son: variedad, condiciones de crecimiento de la planta, condiciones de procesamiento y tamaño de partícula de las hojas de té. A diferencia del té negro, el método de elaboración del té verde

permite conservar una mayor concentración de polifenoles en el producto final Ahmad *et al.*, 1997; Astill *et al.*, 2001 y Wang *et al.*, 2000).

La importancia que se le atribuye al té verde, en cuanto a sus propiedades curativas, frente a los otros tipos de té radica en su proceso de fabricación (Wang *et al.*, 2000). A continuación se describe brevemente los tipos de té verde que se producen en el mundo:

- **Sencha:** Este tipo de té es inmensamente popular en Japón, tiene color amarillo y su sabor sabe a verduras.
- **Matcha:** Su poder refrescante es muy apreciado por los Japoneses, que lo sirven espumoso en la ceremonia del té.
- **Gyokuro:** Este té es cultivado en la sombra por dos semanas (100% oscuridad). Su sabor a hierba cortada lo ha hecho muy popular en Japón.
- **Kabusecha:** El periodo de oscurecimiento del té es más corto que el de Gyokuro (50 - 80 % de oscuridad), 1 - 2 semanas.
- **Tencha:** Después de cultivado en la sombra el té es cocido a vapor, enrollado, secado y finalmente pulverizado (50 μ m) en un molino de piedra. Es usado para la ceremonia de el té.
- **Bancha:** Es un té de baja calidad es hecho de hojas largas y maduras duras, se extrae del tallo de la planta. Tiene un sabor ligeramente a heno.
- **Ureshinocha:** Es un té especial elaborado en la Prefectura de Saga.
- **Aoyagicha:** Este té es una especialidad de la Prefectura de Miyazaki.
- **Pauchong:** Este té es fragante, es fermentado ligeramente, es un producto de China y Taiwan.

- **Té Jasmine:** Té Chino a la cual se le adiciona flores de jasmín para incrementar su fragancia.
- **Té Oolong:** Este té fabricado en Taiwan y China tiene un color pardusco, posee buen aroma y sabor. El té Oolong, es un té parcialmente oxidado, o semi fermentado. Es considerado en etapa intermedia de oxidación enzimática del té negro y contiene catequinas, teaflavinas y tearubiginas. Algunos componentes como ésteres epigallocatequin y teasinensis, son también encontrados en el té oolong (Katiyar y Mukhtar, 1997).

C. COMPOSICION QUIMICA DEL TE

La literatura indica que el té contiene una serie de compuestos químicos; entre ellas destaca los polifenoles. Se ha reportado que los polifenoles representan aproximadamente el 30 % del peso seco y los alcaloides, cafeína, teobromina y teofilina, representan alrededor del 4 % (Hour *et al.*, 1999; Packer *et al.*, 1999; Katiyar y Mukhtar, 1997).

Las hojas de té contienen de 5 – 6 % de agua y entre 4 – 7 % de sales minerales, especialmente ricas en potasio y manganeso (Fernandez *et al.*, 2001). El Cuadro 1, presenta datos de la composición química del té.

Cuadro 1. Componentes químicos de la hoja de té.

Componente químico [†]	%
Carbohidratos	
Azúcares	30
Almidón	4
Pectinas	2
Pentosanas	11
Fibra cruda	13
Proteínas (4% aminoácidos libres)	20
Lípidos	2
Polifenoles	3
Cafeína	5
Enzimas, aromas volátiles, vitaminas, clorofila y otros pigmentos (celulosa, lignina).	7

[†] Valores de porcentajes expresados en base a materia seca
Fuente: Stagg (1975).

1. Composición química del té negro

El té negro contiene mayormente teaflavinas y tearubiginas. La principal fracción de polifenoles en el té negro constituye las tearubiginas. Las tearubiginas tienen alto peso molecular y no están bien caracterizados químicamente y constituyen más del 20 % de sólidos en una bebida de té negro (Packer *et al.*, 1999).

Las teaflavinas son compuestos polifenólicos característicos del té negro y dentro de ellos se incluyen: teaflavin-3-gallate, teaflavin-3'-gallate, y teaflavin-3,3'-digallate. Estos compuestos son esenciales para la caracterización del color y sabor del té negro. Las teaflavinas

constituyen entre 3 – 6 % del peso seco en té preparado (Packer *et al.*, 1999; Chaudiere y Ferrari – Illiou, 1999).

2. Composición química del té verde

Las principales flavanoles (catequinas) presentes en el té verde constituyen una mezcla de isómeros de epicatequinas entre ellas: (-)-epigalocatequina 3-galato (EGCG), (-)-epigalocatequina (EGC), (-)-epicatequina galato (ECG) y (-)-epicatequina (EC) (Ahmat y Feyes, 1997; Bokuchava y Skobeleva, 1980; Packer *et al.*, 1999; Miura *et al.*, 2001).

La composición de polifenoles en las hojas de té verde varía con el clima, estación, prácticas hortícolas, variedad de la planta, edad de la hoja y tipo de procesamiento. A su vez contiene alcaloides como son: cafeína y en pequeña proporción teobromina y teofilina (Tena *et al.*, 1997; Katiyar y Mukhtar, 1997; Lu *et al.*, 2001). Después de una infusión de 3 - 5 min, el extracto contiene alrededor de 50 – 75 % de actividad antioxidante en equilibrio (Singh *et al.*, 1999).

En el Cuadro 2 se presenta el contenido de catequinas en el té verde y negro.

Cuadro 2. Contenido de flavanoles en té verde y té negro

Catequinas	Té verde (µg/ml)	Té negro (µg/ml)
Catequinas:		
(+)Catequina (CAT)	1064	300
(+)Gallocatequina	21	20
Epicatequinas:		
(-)-Epicatequina (EC)	98	37
(-)-Epicatequin-3-galate (ECG)	90	73
(-)-Epigallocatequina (EGC)	411	42
(-)-Epigallocatequina-3-galate (EGCG)	444	128
Teaflavinas:		
Teaflavin (TF)	0	64
Teaflavin galate A (TFA)	0	22
Teaflavin galate B (TFB)	0	20
Teaflavin digalate (TFDG)	0	13
Tearubiginas	3	9

Fuente: (Kuroda y Hara, 1999).

D. ROL DEL TE VERDE EN LA SALUD HUMANA

El té verde es una bebida que se consume desde hace más de mil años en la China y Japón y su uso está asociado a sus beneficios medicinales. En el pasado y debido a la falta de métodos científicos modernos, los investigadores han ignorado las propiedades curativas del té verde. Sin embargo, en años recientes se ha puesto mucha atención a las bondades medicinales del té verde en la salud humana (Fujiki, 1999).

En las investigaciones se ha utilizado modelos experimentales tales como cultivos celulares, animales de laboratorio y humanos para demostrar las

propiedades benéficas del té verde. Se indica que los mecanismos de acción del té verde para proteger la salud celular se debe a sus funciones como antioxidante, antiinflamatorio, anticancerígeno y antimicrobiano (Miyasawa, 2000).

1. Función antioxidante

El té verde contiene polifenoles tales como epigalocatequina galato (EGCG), epicatequina galato (ECG), epigalocatequina (EGC) y epicatequina (EC), que tienen propiedades antioxidativas. Los polifenoles o catequinas, a parte de ser potentes antioxidantes se ha reportado que también pueden reducir el riesgo de cancer al estómago, hígado, colon y pancreas (Miyasawa, 2000). Las hojas de té verde tienen aproximadamente 40 % de polifenoles por peso seco.

Las catequinas del té (flavan-3-ol derivados) son conocidos por poseer potente actividad antioxidante; particularmente la epicatequina-3-galato (EGCG) previene la oxidación de la lipoproteína de baja densidad (LDL) en el plasma sanguíneo (Sawai y Sakata, 1998; Ahmad; Feyes, 1997; Cao, 2000; Miyasawa, 2000). Se ha reportado que el consumo diario de 2 - cuatro tazas (500 - 1000 ml) de té verde ó EGCG contenido en el extracto de té verde, puede disminuir el contenido del mal colesterol (proteínas de baja densidad, LDL), incrementar el buen colesterol (proteínas de alta densidad, HDL) y reducir el contenido de glucosa en la sangre (Kao *et al.*, 2000).

El efecto protector del té verde contra enfermedades cardiovasculares fue reportado en un estudio epidemiológico conducido en Japón. En este

estudio con hombres mayores de 40 años (n = 1371), el incremento de consumo diario de té verde a cantidades mayores de 10 tazas (aproximadamente 1500 ml), fue asociado a los siguientes efectos: 1) reducción del colesterol total, 2) disminución del mal colesterol (LDL) y 3) incremento del buen colesterol (HDL). Asimismo, se reportó que una de las ventajas más importantes del té verde es su no toxicidad (Hour *et al.*, 1999; Imai *et al.*, 1995 y Kao *et al.*, 2000).

De igual forma, el té negro tiene un moderado efecto en la protección contra la oxidación de lipoproteínas en suero sanguíneo humano. Consecuentemente, una adecuada ingestión de alimentos ricos en polifenoles pueden ser un importante medio de prevención contra el estrés oxidativo (Cos *et al.*, 2001 y Hodgson *et al.*, 2000).

2. Función antiinflamatoria

Los polifenoles de el té verde tiene efectos antiinflamatorios, puede ser usado en el tratamiento de estados inflamatorios crónicos. Es producido por la EGCG, su efecto es semejante a otros medicamentos antiinflamatorios como dexametazona y silicato de sodio (Sato y Miyata, 2000; Halliwell *et al.*, 1999).

3. Función anticáncer

Los polifenoles del té verde tienen varios efectos anticarcinogénicos tales como, inhibición de la proliferación de células e inducción de apoptosis en células carcinogénicas. Los compuestos polifenólicos del té verde mostraron efectos de prevención contra el cáncer en muchos

modelos de tumores en animales (Ahmad *et al.*, 1997; Tsubono *et al.*, 2001).

El efecto anticarcinogeno del té verde o de la EGCG se manifiesta mediante la inhibición del crecimiento de tumores malignos y no malignos, inducidos en varios organos de animales incluyendo estómago, hígado, duodeno, esófago y colon desarrollando apoptosis en ambos tumores. Asimismo, en otros estudios se reportó que el consumo de té verde (mayor de 300 g/mes en hombres y 200 g/mes en mujeres) fue asociado con una reducción significativa de estos tipos de cáncer (Jankun *et al.*, 1997; Saucier y Waterhouse, 1999; Conney, 1999; Vasconcellos, 2000).

En un estudio prospectivo realizado en Japón, se observó una correlación negativa entre el consumo de té verde y la edad en la que se detectó el cáncer. En el caso de mujeres, el consumo diario más de 10 tazas (1800 ml; aproximadamente 300 - 400 mg de EGCG) fue asociado con una disminución significativa en la incidencia de cáncer en función con la edad.

De igual forma los resultados de las investigaciones epidemiológicas realizadas en pacientes con cáncer a los senos en fase I y II, quienes consumieron más de 5 tazas (750 ml) por día mostraron una significativa menor recurrencia (16,7 %) y mayores años libres de enfermedades (3,6 años) comparado a pacientes que tomaron menos de 4 tazas diarias, 24,3 % y 2,8 años, respectivamente (Jankun *et al.*, 1997).

En otro estudio controlado realizado en China, con pacientes a quienes recién se le había diagnosticado cáncer (931 colon, 884 recto, y 451

páncreas) y 1552 pacientes libres de cáncer como control, se encontró una correlación inversa entre el consumo diario de té verde y el riesgo de cáncer al recto y al páncreas (Jankun *et. al.*, 1997).

La aplicación tópica de EGCG brinda protección a la piel después de su exposición a rayos U.V. Estudios con ratones de laboratorio, expuestos a rayos ultravioletas, revelaron que aquellos a los que se les administró té verde ó se aplicó una crema con EGCG presentaron menos irritación en la piel (Saucier y Waterhouse, 1999; Ahmad *et al.*, 1999).

4. Función antimicrobiana

El té verde posee efectos bactericidas, actividades antimicrobiales. En este mecanismo actúan principalmente las catequinas dañando las membranas bacteriales (Hu, 200, Sato y Miyata, 2000).

La capacidad antimicrobiana del té verde es efectivo contra varias bacterias que causan diarrea (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Vibrio Cholerae* y caries dental (*Escherichia coli*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus mutans*) (Sato y Miyata, 2000; Hu, 2001).

Varias referencias de investigaciones realizadas demuestran que extractos de té verde poseen efectos bacteriostáticos y bactericidas de *Staphylococcus epidermidis*, *Salmonella typhy*, *Salmonella typhymurium*, *Salmonella enteritidis*, *Shigella flexneri*, *Shigella dysenteriae* y *Vibrio spp.*, incluyendo *Vibrio cholerae* (Hamilton, 1995).

E. ANTIOXIDANTES

1. Definición

Antioxidante es cualquier sustancia que a bajas concentraciones reduce, retrasa significativamente ó previene la oxidación de un sustrato (Sies, 1997).

Un antioxidante puede ser definido como una sustancia que en pequeñas cantidades puede retardar ó inhibir la acción de un pro-oxidante (oxidante) en una reacción de oxidación (Sies, 1997 y Weisburger, 1999).

Los antioxidantes son compuestos que prolongan la vida útil de los alimentos, protegiendo contra el deterioro causado por la oxidación. Los antioxidantes inhiben la propagación de radicales libres por eso son utilizados para prevenir el deterioro de los alimentos, evitando la rancidez de las grasas y los cambios de color. Los antioxidantes se clasifican en antioxidantes naturales y antioxidantes sintéticos (Sies, 1997).

2. Principales antioxidantes

Estos agentes pueden dividirse en dos categorías: antioxidantes endógenos (enzimáticos) y antioxidantes exógenos (no enzimáticos) (Gonzales y Betancourt, 2000).

a. Antioxidantes endógenos:

Los antioxidantes endógenos, ó antioxidantes enzimáticos, actúan a nivel intracelular. Existen tres sistemas principales de enzimas antioxidativas: 1) superóxido dismutasa (SOD), 2) catalasa (CTL) y 3)

glutación peroxidasa (GPX) (Gonzales y betancourt, 2000).

b. Antioxidantes exógenos:

Los antioxidantes exógenos o no enzimáticos, transforman los radicales en menos agresivos. Entre ellos tenemos: flavonoides, alfa tocoferol (vitamina E), beta caroteno, vitamina C, glutatión, y urato (Polyakov *et al.*, 2001).

Los flavonoides son compuestos polifenólicos naturales que están presentes en grandes variedades de vegetales, frutas y bebidas y muchos son considerados como importante fuente de antioxidantes. Pueden interactuar directamente con especies reactivas de oxígeno y inhibidores de la lipoperoxidación, (Gonzales y Betancourt, 2000). Son compuestos fenólicos que pertenecen a los populares fitoquímicos, sustancias derivadas de vegetales, con acción potencialmente beneficiosa para la salud y que constituyen el principio activo de muchas plantas medicinales (Reilly *et al.*, 2001). Los flavonoides consisten de un grupo de sustancias polifenólicas de bajo peso molecular que varían en su estructura química, incluye a los flavonoles quercetin, kaemferol, y miricetin (encontrados en cebollas y té), y las catequinas (Aherme y O'brien, 2000).

Las catequinas son los principales constituyentes de varios tipos de té, son mejores por su efecto antioxidativo, antimutación, anticarcinogénica, antibiótica y hipertensión. Las principales flavan 3 – ols presentes en el té constituyen una mezcla de catequinas (CAT) entre ellas: epigalocatequina galato (EGCG), epigalocatequina

(EGC), epicatequina galato (ECG) y epicatequina (EC), (Ahmad y feyes, 1997; Miura *et al.*, 2001; Kuroda *et al.*, 1999).

El contenido de catequina en los tres tipos de té tiene el siguiente orden: té verde > oolong té > té negro. La actividad de capturar radicales libres esta seguida en primer orden de té verde, segundo oolong té, y tercero té negro. Esto de debe a su contenido en catequinas (Yamaguchi *et al.*, 1998).

Recientemente se ha reportado efectos sinérgicos entre la EGCG y la EC de mejor beneficio como antioxidantes (Rice- Evans *et al.*, 1996).

Asimismo otras investigaciones demostraron el efecto sinérgico de EGCG con otros agentes preventivos del cáncer como Tamoxifen y Sulindac, desarrollando apoptosis (muerte celular programada) en celulas tipo PC-9. Específicamente, Sulindac a concentraciones de 10 μ M, no indujo apoptosis, mientras que 10 μ M de Sulindac más 75 μ M de EGCG indujo apoptosis ocho veces mayor que Sulindac solo (Fujiki, 1999).

Algunas de las catequinas constituyen de 3 – 10 % del peso de té preparado (Cao, 2000). Difieren ligeramente en su estructura química de otros flavonoides, pero comparten con ellos sus propiedades como preventivas y son estables a temperatura ambiente (Chen *et al.*, 2001).

Otros antioxidantes como el beta caroteno y vitamina C también son efectivos secuestradores de radicales libres, protejiendo así contra

enfermedades causadas por el estrés oxidativo (Polyakov *et al.*, 2001; Gonzales y Betancourt, 2000; Aherne O'brien, 2000).

3. Radicales libres

Los radicales libres son moléculas que contienen uno o más electrones desapareados, siendo altamente reactivas (Lachance *et al.*, 2001). Cualquier molécula o átomo que contiene uno o más electrones desapareados es un radical libre (Anderson y Phillips, 2001). Por lo tanto, los radicales libres intentaran arrancar un electrón de otra molécula y en este proceso rompen otras parejas de electrones para conseguir su propio apareamiento creando así moléculas inestables generándose una reacción en cadena (Anderson y Phillips, 2001). Los radicales libres (RL) presentan al menos un electrón desapareado en su orbital más externo (Elejalde, 2001). Los RL son extraordinariamente reactivos, inestables y tienen una vida media muchas veces inferior a una milésima de segundo. Estas especies reactivas son implicadas, en muchas enfermedades incluyendo aterosclerosis desordenes del tracto respiratorio, enfermedades neurodegenerativas, inflamaciones y cancer (Anderson y Phillips, 2001; Elejalde, 2001).

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) incluye radicales oxígeno y no radicales derivados de oxígeno cuales como oxígeno singlete (O_2) y peróxido de hidrogeno (H_2O_2). Los radicales libres y especies de oxígeno reactivo son producidos constantemente en los seres humanos bajo circunstancias normales. Se considera que la mitocondria es la fuente generadora de ROS más importante. El incremento en la formación de

O_2^- y H_2O_2 se justifica con el hallazgo que en el envejecimiento se modifican las condiciones de flujo de electrones en la cadena de transporte de estos (Lachance *et al.*, 2001).

Los investigadores postulan que las ROS generadas pueden producir daño tanto en la membrana interna de la mitocondria como a los componentes de la cadena de transportes de electrones o al ADN mitocondrial. Este proceso en turno incrementa la producción de ROS y causa más daño a la mitocondria e incremento del estrés oxidativo por aumentar la producción de oxidantes (Brody, 1994).

La célula tiende a generar oxidantes y antioxidantes en una forma interdependiente. Mientras que los oxidantes estimulan la producción endógena de antioxidantes; la administración de antioxidantes suprime varios componentes de las defensas endógenas. De acuerdo con dicha teoría existe interrelación entre la generación de oxidante, la protección antioxidante y la reparación del daño oxidativo (los dos últimos pueden ser inducidos en respuesta al daño). La expectativa de vida puede ser aumentada al disminuir el grado de los fenómenos oxidantes (Céspedes *et al.*, 2000 y Brody, 1994).

Los procesos de oxidación producen radicales libres que pueden interferir en los procesos normales y dañar las células corporales causando estrés oxidativo. El estrés oxidativo, se define como el desbalance entre la producción de radicales libres y la cantidad de antioxidantes presentes en el ambiente intracelular. Es la pérdida de equilibrio entre pro oxidación y antioxidación a favor de los prooxidantes (Elejalde, 2001 y Inoe *et al.*, 2001).

F. CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA PERFORMANCIA

Cromatografía líquida de alta performance (HPLC) es una técnica analítica de separación de compuestos, que permite aislar, identificar y cuantificar los compuestos desconocidos tales como vitaminas, proteínas, y compuestos activos como flavonoides, alcaloides y esteroides en una muestra o solución conocida. Para la cuantificación de estos compuestos se utiliza estándares específicos (Horie y Katsunori, 2000).

La técnica de HPLC describe el proceso en el cual la fase móvil el líquido es mecánicamente bombeado a través de una columna que contiene la fase estacionaria y la cuantificación de los analitos se realiza mediante un detector (Nielsen, 1998).

1. HPLC: El sistema de HPLC consta de las siguientes partes:

Inyector: El fin de el proceso de inyección es introducir la muestra en un reservorio sujeto a acción de la bomba para luego ser llevado a la columna.

Bomba: Son dispositivos de alta tecnología que tiene por función de entregar la fase móvil a través de el sistema, a un flujo variado (e.g. 1 ml/min) en cantidades exactas y de manera precisa.

Columna: La columna es considerado como una herramienta para la separación de las moléculas presentes en la muestra que está siendo analizada.

Detector: El detector por lo general es ultravioleta (UV) o visible (VIS) es el instrumento que detecta la presencia de las moléculas motivo de

análisis. Una vez que la muestra sale de la columna es presentada al detector que identifica en función a la absorbancia la cantidad presente de un determinado analito; luego el detector convierte esta interacción en señal electrónica que es enviada al sistema de datos. La magnitud de esta señal es graficada contra el tiempo (contado desde el momento de la inyección), para generar un gráfico denominado cromatograma (Nielsen, 1998).

G. PLASMA ACOPLADO INDUCTIVO

La espectroscopia de emisión en Plasma Acoplado Inductivo, llamado en ingles, Inductive Couple Plasma (ICP) es una técnica de análisis de multielementos que permite disociar una muestra en sus átomos y iones constituyentes, y como consecuencia de ello emite una luz a una longitud de onda característica por excitación de altos niveles de energía (Fernandez *et al.*, 2001).

Un instrumento de ICP consiste de un sistema de entrega de muestra, un plasma para generar el signo o señal, un o más espectros para medir la señal y un computador para controlar el análisis (Fernandez *et al.*, 2001)

III. MATERIALES Y METODOS

A. LUGAR Y FECHA DE EJECUCION

El presente trabajo se realizó en los laboratorios de Química, y Espectrofotometría, de la Universidad Nacional Agraria de la Selva, Tingo María, Empresa Jardines de té S.A. y en *Albany Medical College*, New York, USA. El estudio se llevó a cabo en el periodo comprendido entre Mayo a Diciembre del 2001.

B. MATERIALES Y EQUIPOS UTILIZADOS

1. Materia prima

La materia prima (yemas terminales de la hoja de té) fue recolectada de los campos de cultivo de la Empresa Jardines de Té, S.A. ubicado en La Divisoria, Distrito de Hermilio Valdizán, Provincia de Leoncio Prado, Departamento de Huánuco.

2. Materiales y equipo

- BBL™ Agar Miuller Hinton (Base para el aislamiento de mesófilos aerobios viables). (Becton, Dickinson and Company Sparks, MD, USA).
- BBL™ Agar Saboraud (Base para el aislamiento de mohos y levaduras). (Becton, Dickinson and Company Sparks, MD, USA).
- BBL™ Agar *Salmonella Shigella* (Base para el aislamiento de

patógenos entéricos) (Becton, Dickinson and Company Sparks, MD, USA).

- BBL TM Brilliant Green Bille Broth, 2 % (Base para la detección de organismos coliformes) (Becton, Dickinson and Company Sparks, MD, USA).
- Difco TM Plate Count Agar (Agar método estándar). (Becton, Dickinson and Company Sparks, MD, USA.).
- Balanza analítica modelo AE 163 (METTER TOLEDO, Switzerland).
- Baño María (Precision Scientific, Chicago, IL, USA).
- Beckman Coulter DU-640 espectrofotómetro (Beckman Instruments, Furlenton, CA, USA).
- Incubadora, modelo 133000 (BOEKEL SCIENTIFIC, PA, USA).
- Inductive Couple Plasma (ICP), Varian Vista Radial ICP (Walnut Creek, CA, USA).
- Microwave Digestor, MDS 2000, CEM (Matthews, NC, USA).
- Molino de acero inoxidable (Fisher Scientific, PA, USA).
- Sistema sterilizador autoclave. Tuttnauer; Modelo: 3870M (BRINKMANN) Capacidad: 85 L; Presión máxima: 2.56 bar; Presión mínima: 3.8 bar.
- Stirrer Hot Plate Modelo. PC – 320 (Corning, NY, USA).
- Todos los materiales químicos utilizados fueron de grado reactivo, calidad HPLC, comprado de Sigma Chemicals (San Luis, Missouri, USA).

- El sistema de HPLC consistió del siguiente instrumental: Bombas en serie GBC LC 1150, auto inyector avanzado GBC 1650 (GBC Scientific Equipmet Pty Ltd, Dandenog, Australia), columna analítica de 25 cm x 4.6 mm I.D Discovery[®] C18, con partículas de separación de 5 μm (SUPELCO, Bellefonte, PA, USA), y un detector programable de longitud de onda multivariable Waters 490E (Waters, Milford HPLC, MA, USA).

C. METODOS DE ANALISIS

1. Análisis de la capacidad antioxidativa

El reactivo 1,1-diphenyl-2-picrylhidrazyl (DPPH) es un radical libre estable y se utiliza como indicador para medir la capacidad de secuestro de cualquier compuesto que posea actividad antioxidativa. El principio del método DPPH consiste en la sustracción de un átomo de hidrógeno proveniente de un donador (compuesto fenólico) para generar el compuesto difenilpicrilhidrazine y una especie radical. En este proceso, la reacción desarrolla un cambio de color violeta a amarillo a medida que disminuye la absorbancia detectable a 515 nm (Lebeau *et al.*, 2000; Okawa, *et al.*, 2001).

2. Determinación de flavanoles por HPLC

Condiciones cromatográficas

Todas las determinaciones de flavanoles fueron efectuadas a

temperatura ambiente utilizándose un sistema de HPLC en fase reversa, mediante una separación por gradiente. Las catequinas fueron detectadas a 210 nm (Bronner, 1998; Sandoval *et al.*, 2002).

Los buffers utilizados como fase móvil fueron metanol (A) y acetato de sodio acuoso (1 mM ácido acético, 1mM acetato de sodio, pH 4,5). (B) La programación de separación por HPLC fue de 30 - 50 % metanol (0 - 40 min) a una velocidad de separación (flujo) de 0,5 ml/min. Volumen de inyección para los estándares y muestra fue 1 y 10 μ l respectivamente.

3. Determinación de minerales

Método de digestión

La digestión de la muestra se realizó en un horno microondas MDS 2000 (CEM, NC, USA). La digestión ácida de la muestra de té verde (hoja seca), se hizo siguiendo un programa elaborado por el fabricante. Este método consistió en una digestión ácida de la hoja, en frascos de teflón cerrado herméticamente y usando calefacción por microonda a presión controlada. Este método es ampliamente utilizado por la industria y laboratorios por que permite ahorrar tiempo y reactivos.

a) Análisis de Minerales

El análisis de minerales se realizó con un ICP Varian Vista Radial Plasma Acoplado Inductivamente (ICP). Las muestras fueron analizadas siguiendo el método recomendado por la Environmental Protection Agency, USA, (EPA) compatible con lo

recomendado por la AOAC 1998.

4. Análisis microbiológico

Los análisis realizados para determinar la carga microbiológica en la infusión del té verde fueron: Recuento de mesófilos aeróbios viables, coliformes totales, *Salmonella/Shigella* y mohos y levaduras. (AOAC,1995)

D. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

1. Evaluación del blanqueado en el proceso de elaboración

a. Elaboración de té verde

Las hojas de té verde, fueron procesadas siguiendo las operaciones indicadas en la Figura 1 que se describen a continuación.

- **Recepción**

Las hojas de té recién cosechadas fueron recepcionadas y separadas en lotes de 10 Kg aproximadamente.

- **Selección**

Se realizó con la finalidad de eliminar hojas que no presentaban las características de calidad (hojas maduras, con presencia de pardeamiento enzimático, magulladas, etc). En esta fase, se distribuyó los lotes de hoja en cuatro grupos experimentales o tratamientos (T1, T2, T3 y T4).

- **Blanqueado**

Esta operación se realizó con la finalidad de inactivar la enzima polifenol oxidasa (para evitar la oxidación de los flavanoles). Cada tratamiento fue sometido a un blanqueado en agua caliente (95 °C) y por diferentes tiempos en segundos: T1 = 15, T2 = 30, T3 = 45 y T4 = 60, respectivamente.

- **Oreo**

Después del blanqueado, las hojas fueron tendidas sobre mallas de plástico a temperatura ambiente (25 °C) por 2 - 3 h. Esta operación se realizó para reducir el agua adherida a la hoja proveniente del blanqueado.

- **Secado**

Las hojas procedentes del oreo ingresaron a la etapa de secado (55 – 60 °C) en horno convencional por un período de 8 - 12 h. El proceso terminó cuando el porcentaje de materia seca fue de 94 %.

- **Molienda**

La molienda del té verde se realizó utilizando un molino de acero inoxidable y separadas en una malla de abertura 1 mm. Después de la molienda, el té verde a granel fue embolsado herméticamente en bolsas de polietileno para su posterior envasado.

- **Envasado**

El té verde fue envasado en bolsas filtrantes con un peso de 1,3 g cada una y se realizó en la planta JARTESA, S.A (Lima, Perú).

- **Almacenamiento**

Los filtrantes se empaquetaron en cajas de cartón (100 unidades). El almacenamiento se realizó a temperatura de ambiente (22 – 25 °C).

Los tratamientos evaluados se presentan en el Cuadro 3. La temperatura del agua para el blanqueado fue de 95 °C, el tiempo de inmersión de las muestras para el blanqueado fue de 15 - 60 s.

Cuadro 3. Distribución de los tratamientos

Tratamiento	Blanqueado	
	segundos	Código
1	15	T1
2	30	T2
3	45	T3
4	60	T4

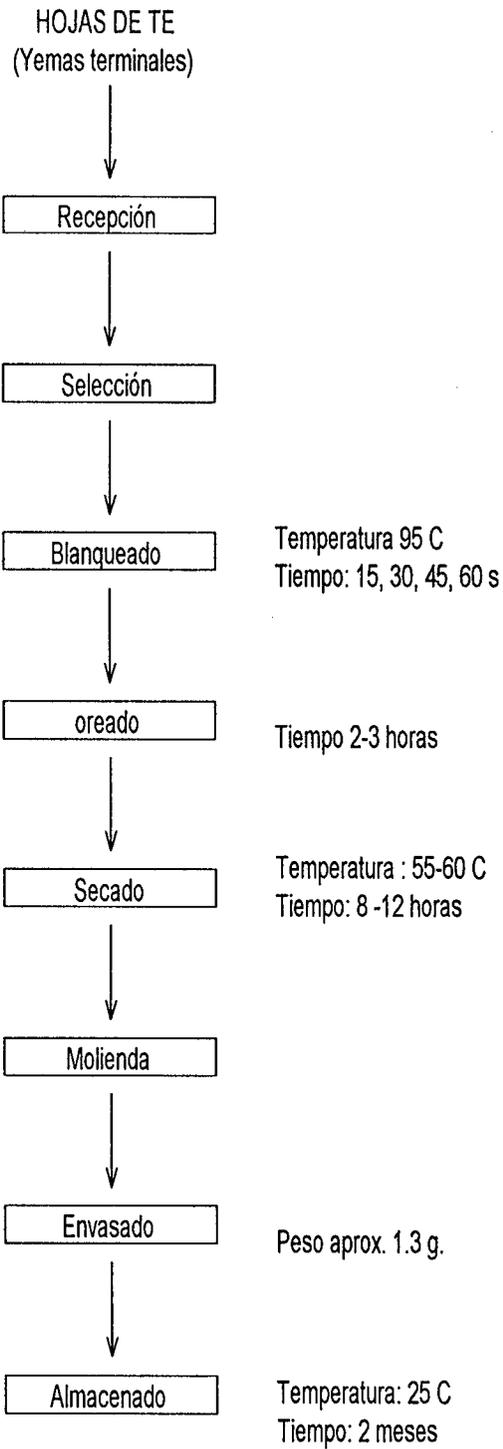


Figura 1. Flujograma para la producción de té verde filtrante

b. Determinación de capacidad antioxidante del té verde

Para determinar la actividad antioxidante se prepararon infusiones con el té verde filtrante incluyendo los cuatro tratamientos de blanqueado. El procedimiento para la preparación del reactivo y muestras de té verde fue: el DPPH se disolvió en etanol de grado reactivo (95 % de pureza), preparándose una solución stock de DPPH (1 mM).

A partir de este stock se preparó soluciones de trabajo para las reacciones in vitro. Seguidamente se preparó una solución stock de té verde (20 mg/ml). De esta solución stock, se prepararon soluciones de trabajo (soluciones intermedias) de varias concentraciones (40, 400, 1200, 4000 $\mu\text{g/ml}$). En el Cuadro 4 se describe el modo de operación seguido y en el anexo A - II y A - III.

Cuadro 4. Preparación de soluciones de trabajo de té verde

Solución de trabajo ($\mu\text{g/ml}$)	Solución stock	Agua	Volumen
	20 mg/ml (μl)	deshionizada (μl)	Final (μl)
40	2	998	1000
400	20	980	1000
1200	60	940	1000
4000	200	800	1000

A partir de cada una de las soluciones de trabajo se tomó 25 μl para obtener concentraciones finales de té verde en la cubeta (1,

10, 30, 100 $\mu\text{g/ml}$), que fueron reaccionadas con el DPPH (100 μM), como se puede observar en el Cuadro 5.

Cuadro 5. Preparación de las reacciones entre té verde y DPPH

Té verde evaluado ($\mu\text{g/ml}$)	Solución de trabajo (μl)	DPPH 100 μM (μl)	Vol. Final (μl)
1	25	975	1000
10	25	975	1000
30	25	975	1000
100	25	975	1000

La concentración final de DPPH en la solución de reacción fue de 0,1 mM ó 100 μM . Las concentraciones de té verde usado en las reacciones con DPPH fueron de 1, 10, 30 y 100 $\mu\text{g/ml}$. La reacción se generó en una cubeta de poliestireno (1 cm x 1 cm x 4,5 cm), muestra (25 μl) y DPPH (975 μl). Luego inmediatamente se procedió a su lectura correspondiente usándose un espectrofotómetro Beckman Coulter DU-640 (Beckman Instrumentos, Furlenton, CA, USA). Las lecturas se registraron a 515 nm de absorbancia cada 30 s por 5 min. La capacidad de secuestro del DPPH fue determinado por la siguiente expresión (Okawa, *et al.*, 2001):

$$\% \text{ Inhibición DPPH} = [(A_c - A_s)/A_c] \times 100$$

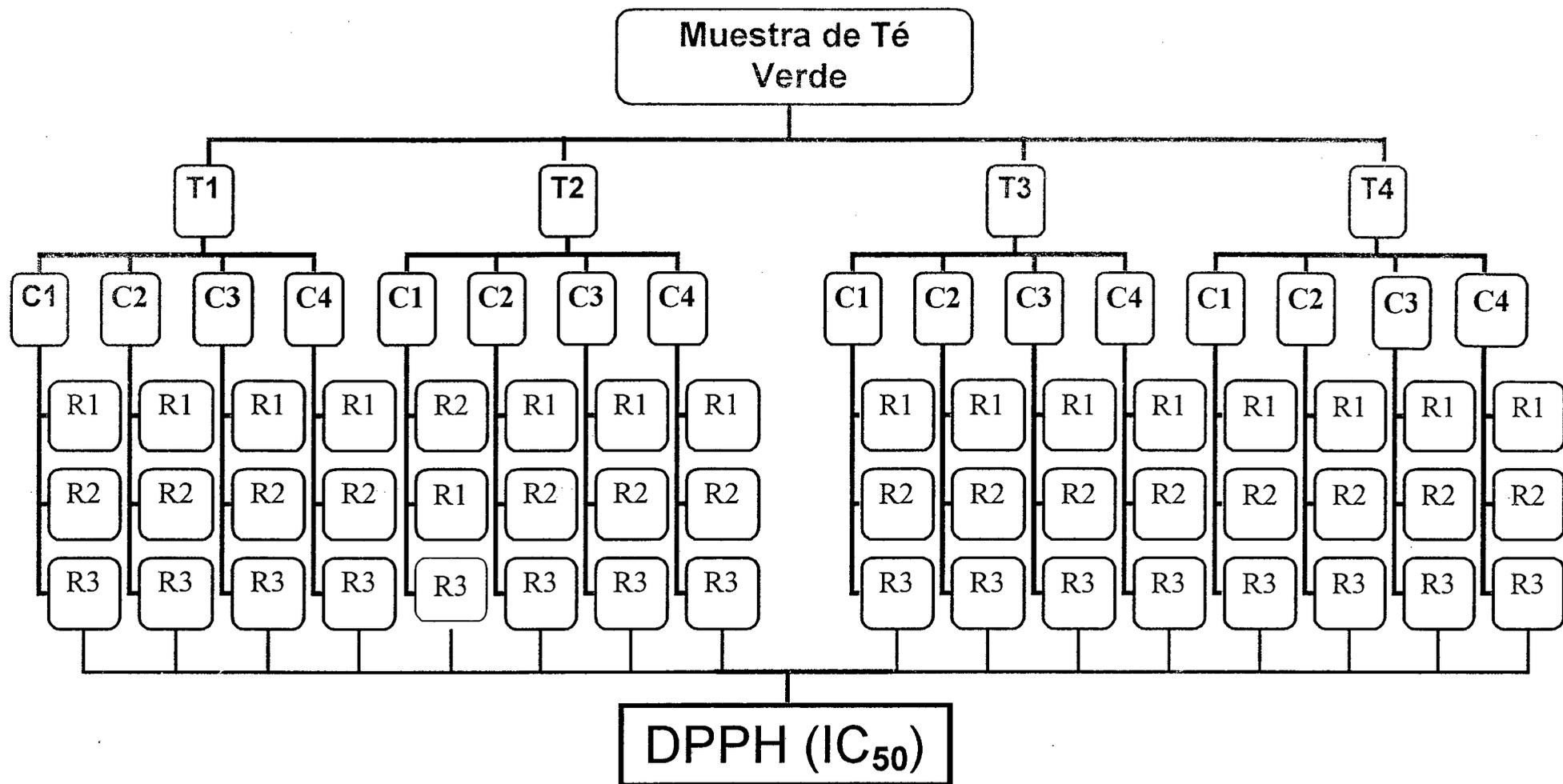
Donde:

A_c : Absorbancia del control, DPPH (100 μ M)

A_s : Absorbancia de la muestra en función al tiempo
(5 min)

El porcentaje de inhibición de DPPH obtenido con cada una de las concentraciones de té verde que fue utilizada para determinar el coeficiente de inhibición de DPPH (IC_{50}). Este coeficiente indica la cantidad de té verde en μ g/ml, requerido para inhibir el 50 % del radical libre DPPH (Lebeau *et al.*, 2000).

Los resultados de la capacidad de inhibir DPPH por efecto de las concentraciones (1, 10, 30 y 100 μ g/ml) fueron analizados mediante el diseño completamente randomizado (DCA) con tres repeticiones. Para niveles donde exista significación estadística se aplicó la prueba de Tukey $P > 0,05$. El mismo diseño estadístico se aplicó para determinar la capacidad antioxidante del té verde (IC_{50}). El esquema experimental se presenta a continuación.



Donde:

T1 = Tratamiento correspondiente a 15 s de blanqueado.

T2 = Tratamiento correspondiente a 30 s de blanqueado.

T3 = Tratamiento correspondiente a 45 s de blanqueado.

T4 = Tratamiento correspondiente a 60 s de blanqueado.

C1 = 1 µg/ml

C2 = 10 µg/ml

C3 = 30 µg/ml

C4 = 100 µg/ml

Figura 2. Esquema experimental para la evaluación del blanqueado

2. Cuantificación de flavanoles

Preparación de muestra

La muestra de té verde (T2) se procesó de la siguiente manera: a) se preparó una infusión de té verde (1 g/20 ml de agua caliente grado HPLC), haciendo una concentración de 50 mg/ml. b) la infusión se filtró con papel Whatman (20 μ m) y centrifugó a (10 000 r.p.m/10 min) a temperatura de 4 °C y c) después de la centrifugación, se separó el sobre - nadante para filtrarlo a 0,2 μ m antes de ser inyectados al HPLC. Las alícuotas restantes se almacenaron a 20 °C para evitar el deterioro de las catequinas presentes en la muestra.

Preparación de estándares

Antes de inyectar las muestras en el HPLC se calibró el instrumento con estándares individuales de flavanoles: catequina (CAT), epigalocatequina (EGC), epicatequina (EC), epicatequina galato (ECG) y epigalocatequina galato (EGCG) que fueron adquiridos de Aldrich (Milwaukee, WI, USA). Cada estándar fue disuelto en agua de calidad HPLC. Se prepararon soluciones de CAT y EGCG (0,1; 1; 2,5; 5; 10 mM) que fueron usadas para levantar la curva estándar. Las otras catequinas (EC, EGC y ECG) fueron inyectadas a una determinada concentración para determinar los tiempos de retención (o tiempo de salida de la columna). Las alícuotas de la solución stock fueron almacenadas a 20 °C para preservar su estabilidad y calidad. Por cada inyección de estándar o muestra se registró con exactitud y precisión,

el tiempo de retención (t_R), (también referido como tiempo de salida de la muestra de la columna), tamaño del pico (t_P), área debajo de la curva (A_C) y porcentaje del área de cada pico (%).

Para la determinación de flavanoles en la infusión de té verde se hicieron ocho inyecciones, cada una correspondiente a una muestra de té verde (T2). Para cada proceso de separación se utilizaron muestras frescas, recién preparadas. Para la cuantificación de flavanoles se utilizaron los valores el área bajo la curva, teniendo en cuenta el tiempo de retención. Se utilizó el software del sistema del HPLC para calcular los valores de área bajo la curva. Luego utilizándose la ecuación generada por los estándares (CAT) se estimó la cantidad de catequinas (mg/g) presentes en el té verde. Las catequinas analizadas fueron: EGC, EGCG, CAT, EC, ECG.

3. Determinación de minerales

Para la determinación de minerales se utilizaron dos muestras: 1) infusión y 2) hoja de té verde micropulverizada.

a. Infusión de té verde

La infusión se preparó utilizándose 1 g de té verde/200 ml de agua desionizada caliente y filtrada a 20 μ m.

b. Hoja de té verde

Se tomó tres muestras, de 0,5 g de hoja de té verde, y se preparó una digestión ácida.

Los minerales analizados fueron: Ca, S, Al, Ba, Cu, Fe, Ni y Zn. Cada elemento fue evaluado con tres repeticiones y los resultados fueron reportados como promedio \pm SE.

4. Evaluación durante el almacenamiento

a. Evaluación de DPPH

Durante el período de almacenamiento de la hoja de té verde se realizó la evaluación de variación de su capacidad antioxidante en función al tiempo de almacenamiento (60 días), dichas evaluaciones se realizaron cada diez días. Los resultados se reportan en función al IC₅₀ μ g/ml además se calculó el máximo porcentaje de inhibición de la reacción.

b. Análisis microbiológico

Preparación de los medios de cultivo microbiológico

Los medios de cultivos fueron disueltos en agua desionizada fría, según recomendaciones del fabricante y teniendo en cuenta su solubilidad. La solución se calentó durante cinco min para disolver completamente los grumos formados e inmediatamente se esterilizó el medio a 121 °C por 15 min con la finalidad de evitar posibles medios de contaminación. Luego se enfrió en baño maría a 25 °C por 10 min.

a. Conteo de placas

Esta técnica (recuento de mesófilos aerobios viables) pone de manifiesto una parte del total microbiano presente. A este grupo pertenece una variedad de microorganismos están incluidos todos aquellos capaces de desarrollarse entre 20 y 37 °C. Dentro de la flora mesófilica aeróbica tenemos bacilos, cocos gram positivos y gram negativos, aislados ó agrupados en todas las variedades (Tortora *et al* , 1998). Para realizar esta prueba se utilizó agar Plate Count (APC). La preparación del medio de cultivo consistió en pesar 11,75 g de agar Plate Count disuelto en 500 ml de agua desionizada fría.

b. *Salmonella/Shigella*

Para la realización de esta prueba microbiológica se utilizó 12 g de agar *Salmonella/Shigella* para 200 ml de agua ultra filtrada fría según especificaciones del fabricante.

c. Coliformes Totales

La preparación de este agar consistió en disolver 4 g de agar Brilliant Green Bile Broth, 2 % en 100 ml de agua desionizada fría. Se separaron seis grupos de tres tubos de vidrio conteniendo una campana de Dumham, en cada tubo (10^{-1}) se colocó 4500 μ l de agar, segundo tubo (10^{-2}) 4950 μ l de agar, y tercer tubo (10^{-3}) 4995 μ l de agar verde brillante para realizar las respectivas diluciones.

d. Mohos y Levaduras

Se disolvió 32,5 g de agar Saboraud/500 ml de agua autoclaveada fría. Finalizado la preparación del medio de cultivo se procedió a vaciar el agar a cada una de las placas petri en volumen de 15 ml cada una. Para obtener un medio de cultivo libre de humedad, se dejó enfriar a temperatura de ambiente (25 °C) por un tiempo de 30 min y incubado a 37 °C por 30 min antes de proceder a inocular las muestras respectivas.

Determinación microbiológica

Dichas pruebas consistieron en tomar 200 µl de té verde y extendida con un isopo estéril sobre el agar previamente preparado para evitar así la aglomeración de colonias. Para todas las pruebas y con excepción de coliformes totales se utilizaron placas petri de 9 cm de diámetro y 1 ml de altura. Las placas recién inoculadas con la muestra analítica, fueron incubadas a 35 °C ± 2 por 48 h. Para el desarrollo de la técnica de coliformes totales, se preparó una infusión (1g de té/100 ml de agua caliente desionizada), teniendo una concentración de 100 mg/ml. En el desarrollo de esta prueba se prepararon diluciones previa preparación de agar caldo verde brillante. Para obtener una dilución de 10^{-1} , se adicionó 500µl de infusión de té verde, al segundo tubo 50 µl de muestra, y al tercero 5 µl de muestra

analítica (muestra más agar). Finalmente, se dejó incubar por 35 °C ± 2 por 48 h. El procedimiento para la evaluación microbiológica del té verde se desarrolla en el Cuadro 6.

Cuadro 6. Resumen de análisis microbiológico

Técnica	Volumen de muestra utilizada (µl)	Medio de cultivo	T°/h
Recuento de Mesófilos aerobios viables	200	Agar Plate Count	35 ± 2 °C/48 h
<i>Salmonella/Shigella</i>	200	Agar <i>Salmonella/Shigella</i>	35 ± 2 °C/48 h
Coliformes Totales	500, 50 y 5	Agar caldo Verde Brillante	35 ± 2 °C/48 h
Hongos	200	Agar Saboraud	35 ± 2 °C/48 h

Fuente: AOAC (1995)

Para la cuantificación de colonias se utilizó la siguiente fórmula (AOAC, 1995).

$$N = \frac{\sum C}{[(1 \cdot n_1) + (0.1 \cdot n_2)] \cdot (d)}$$

Donde:

N = Número de colonias por ml ó por g de producto.

ΣC = Sumatoria de todas las colonias contadas en todos los platos.

n_1 = Número de placas en la primera dilución contada.

n_2 = Número de placas en la segunda dilución contada.

d = Dilución de la cual fue obtenido el primer conteo.

La muestra de té verde (infusión) pertenece a la categoría II de acuerdo a lo establecido por la (AOAC, 1995), así como también el método seguido para su evaluación microbiológica.

Se preparó la infusión con 1 g de hoja micropulverizada de té verde/20 ml de agua autoclaveada caliente. De igual forma para el análisis de la hoja micropulverizada de té verde, se pesó 1 g de té en 20 ml de agua autoclaveada fría y filtradas a 20 μm .

Los datos se reportaron en función a la norma internacional OMS.

El control microbiológico consistió en determinar la carga microbiana de las siguientes bacterias: *Salmonella/Shigella*, Coliformes totales, hongos y recuento de mesófilos aerobios viables, como se menciona en el cuadro 6 (métodos de análisis) se evaluó al final del almacenamiento (60 días).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A. EVALUACION DEL TIEMPO DE BLANQUEADO EN EL PROCESO DE ELABORACION DEL TE VERDE FILTRANTE

1. Evaluación del rendimiento por proceso

Los resultados de balance de materia se observa en el cuadro 7 y rendimiento por proceso en el A – I. Efectuado el análisis estadístico encontró diferencias significativas ($P < 0,05$) entre los tratamientos evaluados. El procesamiento de té verde con un tiempo de blanqueado de 60 segundos (T4) proveyó el menor rendimiento (17 %), comparado al resto de tratamientos. No se encontró diferencias estadísticas significativas ($P > 0,05$) entre los tratamientos T1, T2, y T3, respectivamente.

Cuadro 7. Balance de materia en la elaboración de té verde

Tratamiento	Blanqueado Segundos	Peso Fresco Kg	Peso Seco Kg	Rendimiento por Proceso ¹ %
1	15	9,07	1,68	18,67 ± 0,33 ^a
2	30	8,57	1,53	17,86 ± 0,27 ^{ab}
3	45	8,57	1,60	18,68 ± 0,16 ^a
4	60	5,23	0,89	17,00 ± 0,52 ^b

¹El balance de materia fue obtenido de tres batches de hoja fresca (n=3), los valores representan el promedio ± SE. Valores en una misma columna con diferentes superíndices indican que son diferentes ($P < 0, 05$).

Tomando en cuenta los resultados de balance de materia, se puede inferir que por cada 100 Kg de hoja fresca se obtendría un rendimiento

aproximado de 18 Kg de té verde, con características físicas aptas para su comercialización. Comparando nuestros resultados con los que se obtiene en la elaboración de té negro, que oscila entre 20 – 21 % (Bokuchava y Skobeleva, 2000), ambos procesos poseen similares características en aspectos de rendimiento. Referente a la influencia del efecto de blanqueado en el balance de materia, se notó que solamente el T4 (60 s) fue afectado en el balance final. Sin embargo, esta diferencia expresada en porcentaje no fue muy marcado. Es posible que otros factores diferentes al efecto de blanqueado podrían influenciar en el rendimiento.

2. Determinación de la actividad antioxidativa del té verde

Los resultados de la determinación de la actividad antioxidativa por DPPH se presentan en el Cuadro 8 en el se puede apreciar que la capacidad de inhibir el DPPH está directamente relacionado con la concentración de té verde (T1, $r = 0,9947$; T2, $r = 0,9952$; T3, $r = 0,9947$; T4, $r = 0,9954$). El análisis estadístico entre tratamientos y para cada una de las concentraciones evaluadas, indicó que no existe diferencia significativa ($P > 0,05$) entre ellas. Por otro lado y como era de esperarse, se encontró diferencias significativas ($P < 0,0001$) entre las concentraciones evaluadas. La eficiencia de inhibición fue: 100 $\mu\text{g/ml}$ > 30 $\mu\text{g/ml}$ > 10 $\mu\text{g/ml}$ > 1 $\mu\text{g/ml}$). Los resultados obtenidos concuerdan con lo publicado por Sandoval *et al.*, 2000 respecto a la

capacidad del té verde de contener componentes antioxidantes que secuestran radicales libres.

Cuadro 8. Capacidad del té verde de inhibir DPPH

Tratamiento	Té verde ($\mu\text{g/ml}$)				r
	1	10	30	100	
Porcentaje de Inhibición					
1	$1,13 \pm 0,006$	$8,63 \pm 1,58$	$32,99 \pm 1,05$	$83,61 \pm 1,03$	0,9947
2	$1,14 \pm 0,003$	$11,58 \pm 0,95$	$34,14 \pm 3,33$	$86,32 \pm 0,59$	0,9952
3	$1,15 \pm 0,007$	$10,12 \pm 1,63$	$33,24 \pm 2,33$	$83,36 \pm 0,46$	0,9947
4	$1,11 \pm 0,001$	$11,23 \pm 0,47$	$33,48 \pm 2,49$	$85,08 \pm 0,19$	0,9954

Los valores representan el promedio \pm SE de tres repeticiones. El valor de r, representa el promedio de tres repeticiones de cada tratamiento. El análisis estadístico entre tratamientos y en una misma concentración no fue significativa ($P > 0,05$) para 10 y 30 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente. Se notó diferencias significativas ($P < 0,05$) en los niveles de 1 y 100 $\mu\text{g/ml}$, sin embargo, estos porcentajes no fueron muy marcados.

Para comparar la eficiencia de inhibir DPPH, se determinó el IC_{50} para cada uno de los tratamientos. El IC_{50} representa la cantidad de té verde ($\mu\text{g/ml}$), requerido para inhibir el 50 % de DPPH utilizado en la reacción, en base a la máxima inhibición lograda en cada reacción. Los resultados de IC_{50} se reportan en el Cuadro 9. El análisis estadístico demostró que no existe diferencia significativa entre los tratamientos ($P > 0.05$).

Cuadro 9: Determinación de la actividad antioxidativa del té verde

Tratamientos	IC ₅₀ , µg/ml	Máxima Inhibición, %
1	47,59 ± 0,67	83,61 ± 1,03
2	47,47 ± 1,47	86,32 ± 0,59
3	47,12 ± 1,03	83,36 ± 0,46
4	46,39 ± 0,15	85,08 ± 0,19

¹Valores representan el promedio ± SE de tres repeticiones. El análisis estadístico entre tratamientos indicó no significancia (P > 0,05).

Los valores de IC₅₀ obtenidos en el presente estudio, reflejan la excelente capacidad antioxidativa que posee el té verde elaborado bajo nuestras condiciones experimentales. En adición, los valores de IC₅₀ son similares a los obtenidos con té verdes proveniente de Japón y China (Sandoval *et al.*, 2002). La actividad antioxidativa del té verde obtenido y coincide con lo reportado por otros autores (Sawai y Sakata, 1998; Leake, 2001; Kao *et al.*, 2000).

Considerando los resultados la evaluación del tiempo de blanqueado en el proceso de elaboración del té verde, el rendimiento de proceso y la capacidad antioxidante, el T2 (30 s) fue seleccionado por tener un punto intermedio entre los cuatro tratamientos.

B. DETERMINACION DE FLAVANOLES EN EL TE VERDE POR HPLC

Los resultados obtenidos en la determinación de flavanoles se presentan en el Cuadro 10, los análisis de varianza se reportan en el anexo A - IV. Se observa que el té verde (T2) contiene las principales catequinas (CAT, EC,

ECG, EGC y EGCG), reportados por otros investigadores (Sawai y Sakata, 1998). El análisis estadístico entre los flavanoles (CAT, EC, ECG, EGC y EGCG) demostró que existe diferencias significativas entre ellos ($P < 0,001$). La concentración de EGCG fue superior al resto de flavanoles (catequinas) ($EGCG > CAT > EC > EGC > ECG$).

Cuadro 10. Contenido de flavanoles en el té verde

Pico	Código	Flavanoles	mg/g ¹	%
1	EGC	(-)-epigalocatequina	26,14 ± 1,72 ^c	15,78
2	EGCG	(-)-epigalocatequina galato	71,89 ± 1,63 ^a	43,41
3	CAT	(-)-catequina	35,08 ± 1,45 ^b	21,18
4	EC	(-)-epicatequina	28,37 ± 0,92 ^c	17,13
5	ECG	(-)-epicatequina galato	4,15 ± 0,39 ^d	2,50
Total			165,54 ± 6,51	

¹Los valores representan el promedio ± SE, n = 8 inyecciones de HPLC. El volumen de cada inyección (10 µl). La cantidad de flavanoles esta expresada en mg/g de té verde en materia seca. Valores en una misma columna con diferentes superíndices son significativamente diferentes ($P < 0,001$).

En la Figura 3, se reporta un cromatograma representativo de la identificación de los flavanoles en el té verde. Observando las concentraciones de cada una de ellas, la EGCG constituye el 43 % del total de flavanoles presentes en el té verde (T2). Los resultados de este estudio demuestran que el té verde preparado, siguiendo nuestro procedimiento, permitió obtener una excelente concentración de flavanoles (catequinas). Se ha reportado que el contenido de flavanoles especialmente la concentración de EGCG contribuyen al valor biológico del té verde (Miura, *et al.*, 2001). Nuestros resultados coinciden con lo reportado por otros investigadores (Sawai y Sakata 1998; Kao *et al.*, 2000; Cao, 2000). Estos

investigadores también indican que la capacidad de inhibir radicales libres, radica en la concentración y naturaleza de los flavanoles presentes en el té verde. Asimismo, se ha reportado que la EGCG es el flavanol que posee la mayor potencia de secuestrar radicales libres comparado a la EC, ECG, EGC y CAT dicha facilidad se debe a su estructura bencénica, la disponibilidad de sus dobles enlaces y la cantidad de radicales OH que presenta, siendo el producto final de esta reacción una cetona, de fácil condensación (Cao, 2000).

Existen varios estudios que se han conducido con la finalidad de determinar el contenido de flavanoles en té verde Japonés (Lee y Ong, 2000; Packer *et al.*, 1999). Las concentraciones de flavanoles en el té verde de origen Japonés, obtenida por los investigadores antes mencionados fueron similares a los obtenidos con el té verde elaborado en este estudio (T2). Esto nos indicó que la excelente capacidad antioxidativa encontrada está asociado a su mayor contenido de EGCG y EC comparado al té Japonés. Asimismo, comparado a los resultados obtenidos por (Dalluge *et al.*, 2000) demuestran que el contenido de flavanoles del té verde "Lung Chin", fueron inferiores a los obtenidos en nuestra investigación.

El contenido de flavanoles totales en el tratamiento 2 fue de 21,18 %; concentración que está dentro del rango de 11,9 – 25,2 % reportados por (Sing, 1999; Astill *et al.*, 2001; Bocuchava y Skobeleva, 1980). Otros autores, (Katiyar y Mukhtar 1997; Lu *et al.*, 2001) mencionan que existe una serie de factores que influyen en la cantidad y composición de polifenoles presentes en el té verde; entre ellas se mencionan: a) buen manejo agronómico del cultivo de té, b) condiciones geográficas

adecuadas, c) estación del año, d) condiciones de cosecha, e) edad y variedad de la planta, f) tipo de hoja cosechada (terminal o adultas) y g) tipo de procesamiento. Tomando en consideración todos estos factores, se puede indicar que los campos de cultivo de té de la empresa Jardines de Té, se encuentran ubicadas en una área geográfica apropiada que permite a la planta *Camellia sinensis* expresar adecuadamente los genes responsables de la síntesis de flavanoles. Por lo tanto, existe excelentes oportunidades para tener disponibilidad de materia prima (hoja de té) con buen contenido de éstos polifenoles que contribuyen notablemente a su calidad como fuente de antioxidantes naturales.

El valor biológico del té verde está documentado en una serie de investigaciones orientados a beneficiar el cuidado de la salud. Por ejemplo, (Kuroda, 1999) reportó que el consumo diario de 2 – 4 tazas de té verde proporciona efectos antioxidativo, antimutagénico, antiinflamatorio y anticarcinogénico. A parte de la propiedad intrínseca de las flavanoles de secuestrar radicales libres, especialmente de la EGCG, se conoce que éste compuesto actúa sinérgicamente con otros agentes preventivos del cáncer tales como *Sulindac* y *Tamoxifen*, potenciando su beneficio (Fujiki, 1999).

Desde el punto de vista de la calidad del té verde elaborado, se ha demostrado su calidad como excelente fuente de antioxidantes. El té verde, manufacturado en la presente investigación, posee condiciones óptimas para ser ofertado para el consumo humano. La calidad obtenida permitiría ingresar fácilmente al mercado nacional. Asimismo, esta investigación ha permitido generar en el país, la primera evidencia científica que se puede producir té verde de excelente calidad.

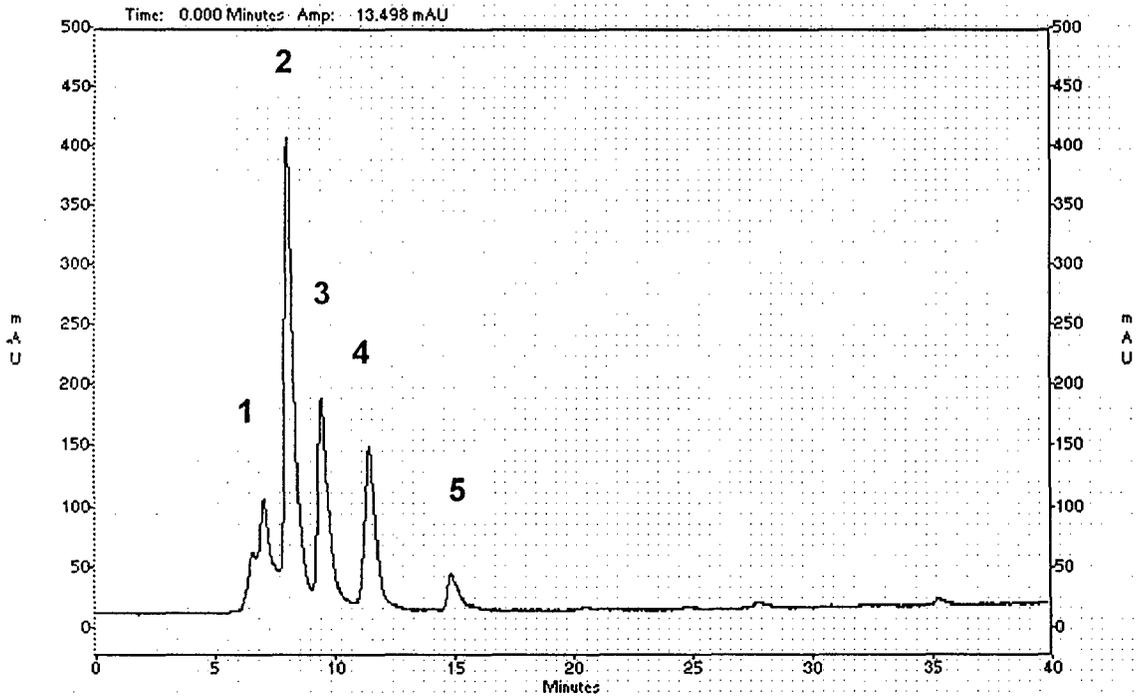


Figura 3. Determinación de flavanoles en el té verde por HPLC

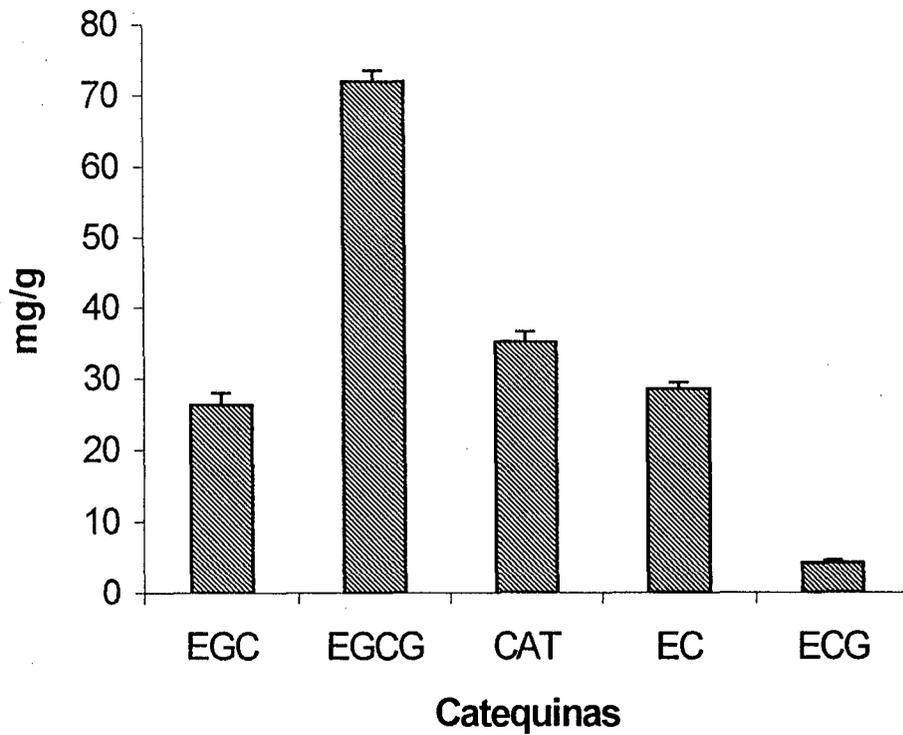


Figura 4. Contenido de Flavanoles en el té verde

C. DETERMINACION DE MINERALES EN EL TE VERDE

La concentración de minerales en el té verde se reporta en el Cuadro 11. Los resultados indican que los minerales en mayor concentración presentes en el té verde fueron Calcio, Azufre y Aluminio. Por otro lado y como era de esperarse, el contenido de minerales en la infusión fue inferior a lo encontrado en el té verde *per se*. De acuerdo a estos resultados, se puede indicar que una taza de té verde provee cantidades variadas de minerales (Cuadro 11). Es conocido que en el mundo se consume una gran cantidad de té verde (Kuroda y Hara, 1999), por esta razón, varios grupos de investigadores han evaluado los niveles de minerales que poseen las diferentes marcas de té verde comercial que se ofertan en el mercado internacional (Fernández *et al.*, 2001). El propósito de estos estudios es conocer si la ingesta de té verde como infusión, aparte de proveer antioxidantes, provee otros nutrientes esenciales, tales como minerales. El rol que los minerales juegan en salud, como por ejemplo el Zinc, está bien documentado (Powell, 2000).

Estudios conducidos por (Fernández *et al.*, 2001) indican que el contenido de minerales en el té verde varía según el lugar de procedencia. Estos autores evaluarón la concentración de minerales en 21 muestras comerciales procedentes de Asia (Japón, China). Los valores obtenidos en el presente estudio permite afirmar que la concentración de minerales en la hoja de té depende de varios factores (Lamble, 1995).

Cuadro 11. Contenido de minerales en la hoja e infusión del té verde

Elementos	Hoja, mg/Kg ¹	Infusión, mg/l ²	mg/Taza ³
Ca	4340 ± 24,6	182 ± 2,72	43,13
S	1879 ± 2,8	60,96 ± 0,44	14,44
Al	443 ± 11,4	16,2 ± 2,43	3,84
Ba	25,8 ± 0,25	3,48 ± 0,03	0,82
Cu	20,7 ± 0,04	1,63 ± 0,16	0,39
Fe	176,6 ± 1,12	ND	ND
Ni	3,85 ± 0,15	0,54 ± 0,34	0,13
Zn	126,31 ± 0,18	9,26 ± 0,16	2,19

Los valores representan el promedio ± SE, de tres réplicas por análisis.

¹ Té verde en materia seca

² Té verde en infusión preparado a una concentración de (50 mg/ml).

³ Una taza de infusión equivale a un volumen de 237 ml. ND, no determinado.

D. EVALUACION DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DEL TE VERDE DURANTE EL ALMACENAMIENTO

1. Evaluación de la actividad antioxidante

Como no existió diferencias significativas en la capacidad antioxidativa (IC₅₀) entre los cuatro tratamientos, se seleccionó el tratamiento 2 (T2) para proseguir con los análisis adicionales planteados en la presente investigación. Los resultados de IC₅₀ obtenidos durante los dos meses de almacenamiento, se presenta en el Cuadro 12. Los valores demuestran que la capacidad antioxidativa del té verde no fue influenciado (P > 0,05) durante el almacenamiento realizado a temperatura de ambiente (rango 22 – 25 °C) estos valores se muestran en el anexo A –V.

Cuadro 12. Efecto del almacenamiento en la actividad antioxidativa del té verde

Almacenamiento Días	IC ₅₀ , µg/ml	Máxima Inhibición %
0	47,47 ± 1,47	86,32 ± 0,59
10	45,06 ± 1,30	84,96 ± 0,54
20	47,66 ± 0,77	89,33 ± 0,02
30	43,95 ± 1,31	88,24 ± 0,53
40	45,49 ± 0,95	84,00 ± 0,73
50	47,84 ± 0,51	85,28 ± 0,35
60	45,56 ± 0,63	89,77 ± 0,83

¹Los valores representan el promedio ± SE, por cada fecha de evaluación (n=3). Valores en una misma columna con igual superíndice no son estadísticamente diferentes (P > 0,05).

2. Determinación microbiológica

La cantidad de unidades de colonias formadas (UFC) en las muestras evaluadas se reporta en el Cuadro 13.

Los valores de UFC son inferiores a lo recomendado por la Organización Mundial de la Salud (OMS), que indica que el conteo total de aerobios en una infusión de hierbas debe de ser < 105 UFC/g. Asimismo, no se detectó coliformes totales (*E. coli*) en las muestras evaluadas. La OMS recomienda que, en una infusión de hierbas, el conteo de *coliformes totales* debe ser < 103 UFC/g. Respecto a la presencia de *Salmonella* y *Shigella* no se identificó su presencia en ninguna de las muestras. La OMS recomienda que no debe de existir presencia de estas bacterias patógenas en un alimento destinado al

consumo humano. Analizando colectivamente nuestros resultados, podemos afirmar que el té verde elaborado bajo nuestras condiciones experimentales permitió obtener un producto con las cualidades de calidad y salubridad recomendadas por la OMS, 1992.

Los resultados del presente estudio al ser comparados con lo reportado por Hamilton, (1995) coinciden en las características de salubridad que debe de reunir un producto comercial de té verde. Este mismo autor reportó que el consumo de extracto de té inhibe la proliferación de especies de bacterias tales como *Salmonella*, *Shigella*, *Staphylococcus*, *Vibrio* y *Vibrio cholerae*. Es así que Hamilton, (1995) recomienda que los pacientes con cólera pueden beneficiarse con soluciones de rehidratación oral preparadas con extractos de té verde.

Cuadro 13. Análisis microbiológico del té verde

Método	Análisis Microbiológico	Norma Internacional OMS	UFC/g	Calificación
Plate Count	Mesófilos viables	105 UFC/g	8	Negativo
Caldo, bilis Verde Brillante	Coliformes Totales	103 UFC/g	0	Negativo
Agar Salmonella Shigella	<i>Salmonella</i> Y <i>Shigella</i>	Ausencia	0	Negativo
Sabouraud	Mohos y Levaduras	Ausencia	0	Negativo

Todos los beneficios del té verde se deben a los efectos benéficos de los flavanoles, en especial EGCG. El té contiene pequeñas cantidades

de flavanoles como quercetin, kaempferol y myricetin, estos presentan actividad contra bacterias gram-positivas y fitopatogénicos *funji* ello explica la ausencia de hongos, Coliformes totales y *Salmonella*, *Shigella*, en la infusión de té verde. (Dreosiy, 1996; Sato y Miyata, 2000). HU *et al.*, 2001 refuerzan esta afirmación ya que reportaron que el contenido bactericida es atribuido al daño, perturbación de la membrana ó pared celular de las bacterias.

V. CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos por las condiciones experimentadas descritas en el presente estudio se puede concluir lo siguiente:

1. El proceso desarrollado para la elaboración de té verde (recepción, selección, blanqueado, oreado, secado, molienda, envasado y almacenamiento), permitió obtener un té filtrante con características óptimas para el consumo humano según lo recomendado por la OMS y la AOAC con un rendimiento de materia seca de 18 %.
2. La actividad antioxidativa del té verde expresada como coeficiente de inhibición del 50 % de radicales libres (IC_{50}), fue en promedio 47 $\mu\text{g/ml}$ y las condiciones de almacenamiento (60 días) no disminuyó dicha actividad.
3. El contenido total de flavanoles (catequinas) fue 165,54 mg/g de materia seca (16,5 %) y la concentración fue: EGCG > CAT > EC > ECG. La EGCG (71,89 mg/g) representó el 43,41 % del total de flavanoles cuantificadas en el té verde; ésta característica demuestra su excelente actividad antioxidativa.
3. El té verde aparte de proveer antioxidantes proporciona minerales esenciales tales como Ca, Cu, y Zn en cantidades moderadas por taza.

VI. RECOMENDACIONES

1. Basado en la información científica disponible se debe de incentivar el consumo de té verde como infusión.
2. Promover el consumo de té verde a nivel nacional para que sea parte de nuestra cultura alimentaria.
3. Promover la elaboración de té verde en la Divisoria como una alternativa al desarrollo de la agricultura sostenible del Alto Huallaga
4. Diseñar investigaciones adicionales que permitan la incorporación del té verde en productos alimenticios.
5. Desarrollar investigaciones de formulación que permite complementar el valor antioxidativo del té verde como otros frutales de la amazonía y su incorporación al mercado nacional como bebidas funcionales

VII. BIBLIOGRAFÍA

- AHERNE, S; O'BRIEN, M. 2000.** Mechanism of protection by flavanols, quercetin and rutin, against tert – butylhydroperoxide – and menadione induced DNA single strand breaks in Caco – 2 cells. *J. Free Rad. Biol. e Med.* 29 (6): 507 – 514.
- AHMAD, N; FEYES, D.K; NIEMINEN, A.L; AGARWAL, R; MUKHTAR, H. 1997.** Green tea Constituent epigallocatechin–3–gallate and induction of apoptosis and cell cycle arrest in human carcinoma cells. *J. Nat. Cancer Inst.* 89 (24): 1881 – 1886.
- AMAROWICZ, R; PEGG, R.B; BAUTISTA, D.A. 2000.** Antibacterial activity of green tea polyphenols against *Escherichia coli* K 12. *Nahrung.* 44 (1): S60 – 62.
- ANDERSON, D.; PHILLIPS, B. 2001.** Comparative in Vitro and in Vivo Effects of Antioxidants. *Food. Chem. Toxicol.* 37: 1015 – 1025.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMIST (AOAC). 1998.** Bacteriological Analytical Manual 8th Ed. Gaithersburg. 429.
- ASTILL, C; BIRCH, M; DACOMBE, C; HUMPHREY, P; MARTIN, P. 2001.** Factors Affecting the Caffeine and Polyphenol Contents of Black and Green Tea infusions. *J. Agric. Food. Chem.* 49: 5340 – 5347.

- BOKUCHAVA, M; SKOBELEVA, N. 1980.** The Biochemistry and Technology of Tea Manufacture CRC. Crit Rev Food Sci Nutr. 12 (4): 303 – 327.
- BRODY, T. 1999.** Nutrition Biochemistry 2nd Ed. USA Academic Press, New York. 458 – 459.
- BRONNER, W.E; BEECHER, G.R. 1998.** Method for determining the content of catechins in tea infusions by high performance liquid chromatography. J. Chrom. A. 805: 137 – 142.
- CAO, Y; CAO, R. 2000.** Angiogenesis inhibited by drinking tea. Nature. 398: 381.
- CESPEDES, E; RODRIGUES, K; LLOPIZ, N; CRUZ, N. 2000.** Un acercamiento a la teoría de los radicales libres y el estrés oxidativo en el envejecimiento. Rev. Cub. Inves. Biomed. 19 (3): 186 – 190.
- CHAUDIERE, J; FERRARI – ILIOU, R. 1999.** Intracellular Antioxidants from Chemical to Biochemical Mechanisms. Food Chem. 49: 477 – 482.
- CONNEY, A.H; LU, Y; LOU, Y; XIE, J; Y HUANG, M – T. 1999.** Inhibitory effect of Green and Black Tea on Tumor Growth. P.S.E.B.M. 220: 229 – 233.
- COS, P; CALOMME, M; SINDAMBIWE, JB; BRUYNE, T; CIMANGA, K; PIETERS, L; VLIETINCK, A; BERGHE, D. 2000.** Cytotoxicity and Lipid Peroxidation Inhibiting Activity of Flavanolds. Plant. Med. 67: 215 – 519.

- DALLUGE, J; NELSON, B. 2000.** Determination of tea catechins. *J. Chr A.* 881: 411 – 424.
- DREOSTY, I. 1996.** Antioxidant Polyphenols in Tea, Cocoa and Wine. *Nutrition.* 16 (7/8): 692 – 696.
- ELEJALDE, J. L. 2001.** Oxidacion entre la vida y la enfermedad. *Ann. Med. Interna.* 18 (1): 1 – 4.
- FERNÁNDEZ, P; MARTÍN, M; GONZALES, G. 2001.** Differentiation of Tea (*Camellia sinensis*) varieties and their Geographical Origin According to their Metal Content. *J. Agric: Food. Chem.* 49: 4775 – 4779.
- FUJIKI, H; SUGANUMA, M; OKABE, S. 1999.** Cancer inhibition by green tea. *Mutat. Res.* 402: 307 – 310.
- GONZALES, M; BETANCOURT, M; ORTIZ, R. 2000.** Daño oxidativo y antioxidante. *Bioquimica.* 25 (1): 3 – 9.
- HALLIWELL, B. 1999.** Establishing the Significance and Optimal Intake of Dietary Antioxidants. The biomarker Concept. *Nutr. Rev.* 57: 101 – 113.
- HAMILTON – MILLER, J. M. 2001.** Antimicrobial properties of tea (*Camellia sinensis*) *J. Med. Microbiol.* 50 (4): 299 – 302.
- HODDGSON, J. M; PUDDEY, I.B; CROFT, K. D; BURKE, V; MORI, TA; CACETTA, R.A; BEILIN, L. J. 2000.** Acute effects of ingestions of black and green tea on lipoprotein oxidation. *Am. Clin. Nutr.* 71: 1103 – 1107.

- HORIE, H; KOHATA, K. 2000.** Analysis of tea components by high performance liquid chromatography and high – performance capillary electrophoresis. *J. Chrom A.* 881: 4725 – 4738.
- HOUR, T; LIANG, Y; CHU, I; Y LIN, J. 1999.** Inhibition of Eleven Mutagens by Various Tea Extracts, (-) Epigallocatechin-3-gallate, Gallic acid and Caffeine. *Food Chem. Toxicol.* 37: 569 – 579.
- HU, Z.Q; ZHAO, W; HARA, Y; SHIMAMURA, T. 2001.** Epigallocatechin gallate synergy with ampicillin/sulbactam against 28 clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Ant. Chem.* 48: 314 – 364.
- IMAI, K; NAKACHI, K. 1995.** Cross sectional study of effects of drinking green tea on cardiovascular and liver diseases. *Br. Med. J.* 310: 693.
- INOE, M; TAJIMA, K; MIZUTANI, M; IWATA, H; IWASE, T; MIURA, S; HIROSE, K; HAMAJIMA, N; TOMINAGA, S. 2001.** Regular consumption of green tea and the risk of breast cancer recurrence: Research Program at Aichi Cancer Center (HERPACC) Japan. *Cancer Let.* 167: 175 – 182.
- JANKUN, J; SELMAN, S; SWIERCS, R. 1997.** Why drinking green tea could prevent cancer. *Nature.* 387: 561.
- JIN, Z. Q; CHEN, X. 1998.** A simple Reproducible Model of Free Radical Injured Isolated heart induced by 1,1-Diphenyl-2-Picryl-Hydrazyl (DPPH). *J.P.M.* 39(2): 63-70.
- KAO, Y; HIPAKKA, R. A; LIAO, S. 2000.** Modulation of obesity by a green tea catechin. *Am. J. Clin. Nutr.* 72: 1232-1241.

KATIYAR, S. K; MUKHTAR, H. 1997. Tea Antioxidants in Cancer Chemoprevention. *J. Cell. Biochem. Suppl.* 27: 59 - 67.

KURODA, Y; HARA, Y. 1999. Antimutagenic and anticarcinogenic activity of tea polyphenols. *Mutation Res.* 436: 69 - 97.

KUROFUNE, K, 1998. Japanese Green Tea. The Supporters Association of the 80th Anniversary Shizuoka Tea Experiment Station 4 .

LACHANCE, P; NAKAT, Z; JEONG, W. S. 2001. Antioxidants: An Integrative Approach. *Nutr.* 17: 835 - 838.

LAMBLE, K; HILL, S. J. 1995. Determination of trace metals in tea using both microwave digestion at atmospheric pressure and inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. *Analyst.* 120: 413 – 417.

LARRAURI, J. A; RUPEREZ, P; SAURA – CALIXTO, F. 1997. Effect of Drying Temperature on the Stability of Polyphenols and Antioxidant Activity of Red Grape Pomace Peels. *J. Agric. Food Chem.* 45: 1390 – 1393.

LEAKE, D.S. 2001. Flavanoids and the Oxidation of Low - Density Lipoprotein. *Nutrition* 17(1): 63 – 65.

LEBEAU, J; FURMAN, C; BERNIER, J. L; DURIEZ, P; TESSIER, E; COTELLE, N. 2000. Antioxidant Properties of Di- Tert-Butylhydroxylated Flavonoids. *Free. Rad. Biol. e Med.* 29: 909 – 912.

LU, Y. P; LOU, Y. R; LIN, Y; SHIIH, W; HUANG, M; YANG, CH; CONNEY, A. 2001. Inhibitory Effects of Orally Administered Green Tea, Black Tea, and

Caffeine on Skin Carcinogenesis in Mice Previously treated with Ultraviolet B light (High-Risk mice): Relationship to decreased Tissue fat. *Cancer Res* 61: 5002 – 5009.

MIURA, Y; CHIBA, T; TOMITA, I; KOIZUMI, H; MIURA, S; CUMEGAKI, K; HARA, Y; IKEDA, M; TOMITA, T. 2001. Tea catechins prevent the development of atherosclerosis in apoprotein E-deficient mice. *J. Nutr.* 131: 27 – 32.

MIYASAWA, T. 2000. Absorption metabolism and antioxidative effects of tea catechin in humans. *Biofactors.* 13 (1-4): 55 – 59.

NAKACHI, K; MATSUYAMA, S; MIYALE, S; SUGANUMA, M; IMI, K. 2000. Preventive effects of drinking green tea on cancer and cardiovascular disease: Epidemiological evidence for multiple targeting prevention *Biofactors.* 13: 49 – 54.

NIELSEN, S. 1998. *Food Analysis* 2 Ed. Services Ruth Bloom. USA pp. 487 – 526.

OKAWA, M; KINJO, T; ONO, M. 2001. DPPH (1,1-Diphenyl-2-Picrylydrazyl) Radical Scavenging Activity of Flavanoids Obtained from Some Medicinal Plants. *Biol. Pharm. Bull.* 24(10): 12002 – 1205.

ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD. 1992. Tercera Ed. Manual de resoluciones de la asamblea mundial de salud y del consejo ejecutivo Ginebra OMS 147.

- PACKER, L; RIMBACH, G; VIRGILLI, F. 1999.** Antioxidant Activity and Biologic Properties of a Procyanidin-Rich Extract from Pine (*Pinus maritima*) Bark Pycnogenol. *J. Free Rad. Biol. e Medicine* 27: 704 – 724.
- PAREDES, A 1994.** Evaluación del nitrógeno y fósforo e los suelos de la cooperativa jardines de té "El Porvenir" mediante el análisis foliar y de suelos. Tesis Agronomía UNAS Tingo María, Huánuco – Perú 14 – 17.
- POLYAKOV, N; LESHINA, T; KONOVALOVA, T; KISPERT, L. 2001.** Carotenoids as scavengers of free radicals in Fenton reaction. Antioxidants or pro-oxidants. *J. Free. Rad. Biol. e Med.* 31 (3): 398 – 404.
- POWELL, S. 2000.** The Antioxidant Properties of Zinc. *J. Nutr.* 130: 1447S – 1454S.
- REILLY, J; MALLET, A; MCANLIS, G; YOUNG, I; HALLIWELL, B; SANDERS, T; WISSEMAN, H; 2001.** Consumption of flavanoids in onions and black tea lack of effect on F₂ – isoprostanes and autoantibodies to oxidized LDL in healthy humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 73: 1040 – 1044.
- RICE – EVANS, C; MILLER, N; PAGANG, S. 1996.** Structure - Antioxidant Activity Relationship of Flavanoids and Phenolic Acid. *J. Free Rad. Biol. e Med.* 20: 933 – 956.
- SAMMAN, S; SANDSTROM, B; BJORNDAL, M; BUKHAVE, K; JENSEN, M; SORENSEN, S; HANSEN, M. 2001.** Green tea or rosemary extract added to foods reduces nonheme - iron absorption. *Am. J. Clin. Nut.* 73: 607 – 612.

- SANDOVAL, M; OKUHAMA, N; ANGELES, F; MELCHOR, V; CONDEZO, L; LAO, J; MILLER, M. 2002.** Antioxidant activity of the cruciferous vegetable maca (*Lepidium meyenii*) Food Chem. 79: 207 - 213.
- SATO, T; MIYATA, G. 2000.** The Nutraceutical Benefit, Part I Green tea Nutrition. 16: 315 – 317.
- SAUCIER, C; WATERHOUSE, A. 1999.** Synergetic Activity of Catechin and Other Antioxidants. J. Agric. Food Chem. 47 (11): 4491 – 4494.
- SAWAI, Y; SAKATA, K. 1998.** NMR Analytical Approach To Clarify the Antioxidative Molecular Mechanism of Catechins Using 1,1-Diphenyl-2-Picryl-Hydrazyl. J. Agric. Food Chem. 46: 111 – 114.
- SIES, H, 1997.** Antioxidants in Disease Mechanisms and Therapy. Vol. 38. USA. Academic Press Inc. 293.
- SING H; RAVINDRANATH, S. D; SING, C. 1999.** Analysis of Tea Shoot Catechin: Spectrophotometric Quantification and Selective Visualization on Two – Dimensional paper Chromatograms Using Diazotized Sulfanilamide. J. Agric. Food Chem. 47: 1041 – 1045.
- TENA, M; VARCARCEL, M; HIDALGO, P; UBERA, J. 1997.** Supercritical Fluid Extraction of Natural Antioxidants from Rosemary: Comparison with Liquid Solvent Sonication. Anal. Chem. 69: 1041 – 1045.

- TORTORA, G; FUNKE, B; CASE, C. 1998.** Microbiology. Sexta Ed. Addison Wesley Longman, Inc. 2725 San Hill Road, Menlo Park, CA 94025 USA 171pp.
- TSUBONO, Y; NISHINO, Y; KOMATSU, S; HSIEH, CH; KANEMURA, S; TSUJI, I; NAKATSUKA, H; FUKAO, A; SATOH, H; HIMAMICHI, S. 2001.** Green Tea and The Risk of Gastric Cancer in Japan. The New England J. Med. 344: 632 – 637.
- VASCONCELLOS, A. 2001.** Alimentos Funcionales. Conceptos y Beneficios para la salud ([http://worldfoodscience .org/voll_3/feature1-3a.html](http://worldfoodscience.org/voll_3/feature1-3a.html).22.jun.2001).
- WANG, L; KIM, G; LEE, CH. 2000.** Effects of Heat Processing and Storage on Flavanols and Sensory Qualities of Green Tea Beverage. J. Agric. Food. Chem. 48: 4227 – 4232.
- WEISBURGER, J. H. 1999.** Mechanisms of Action of Antioxidants as Exemplified in Vegetables Tomatoes and Tea. Food Chem. Toxicol. 37: 943 – 948.
- YAMAGUCHI, T; TAKAMUR, H; MATOBA, T; TERAU, J. 1998.** HPLC Method for Evaluation of Free Radical-Scavenging activity of foods by using 1,1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl. Biosci. Biotechnol. Biochem. 62 (6): 1201 – 1204.

VIII. ANEXOS

A - I. Resumen de balance de materia de té verde

Operación	Tratamiento	Peso Ingreso Kg	Peso Salida Kg	Desperdicio Kg	Rendimiento por Operación %
Recepción	1	9,07	9,07	0	100
	2	8,57	8,57	0	100
	3	8,57	8,57	0	100
	4	5,23	5,23	0	100
Selección	1	9,07	8,82	0	97,39
	2	8,57	8,3	0,27	96,89
	3	8,57	8,3	0,27	96,87
	4	5,23	4,97	0,27	94,92
Blanqueado	1	8,82	8,72	0,1	98,86
	2	8,3	8,2	0,1	98,79
	3	8,3	8,2	0,1	98,79
	4	4,97	4,9	0,07	98,65
Oreado	1	8,72	8,48	0,08	96,37
	2	8,2	8,13	0,07	99,19
	3	8,2	8,13	0,07	99,19
	4	4,9	4,8	0,1	97,96
Secado	1	8,48	1,79	0,05	21,11
	2	8,13	1,68	0,05	20,90
	3	8,13	1,72	0,05	21,11
	4	4,8	1,00	0,05	20,95
Molienda	1	1,79	1,73	0,07	97,2
	2	1,68	1,58	0,10	95,46
	3	1,72	1,65	0,07	96,07
	4	1,00	0,94	0,07	93,31
Envasado	1	1,73	1,68	0,05	97,10
	2	1,58	1,53	0,05	97,67
	3	1,65	1,6	0,05	96,96
	4	0,94	0,89	0,05	94,66
Almacenamiento	1	1,68	1,68	0,00	100
	2	1,53	1,53	0,00	100
	3	1,6	1,6	0,00	100
	4	0,89	0,89	0,00	100

Análisis de varianza de la determinación de balance de materia en la elaboración de té verde

Fuente de Variación	GL	SC	CM	Fc	Valor P
Tratamientos	3	5,738	1,913	5,262	0,0269
Error Experimental	8	2,908	0,3635		
Total	11	8,646			

A - II. Cuantificación del radical libre DPPH

Para evaluar la actividad antioxidativa del té verde se determinó en primer lugar la curva de calibración del radical libre DPPH. Se preparó soluciones etanólicas a diferentes concentraciones (10 - 200 μM) y se registró sus absorbancias a 515 nm durante 5 min. Los resultados se presentan en el Cuadro 14. En la Figura 5 cuyo objetivo es demostrar la linealidad obtenida en la cuantificación de DPPH a diferentes concentraciones. Se observa que existió una directa correlación entre la concentración de DPPH y las unidades de absorbancia a 515 nm ($r = 0,9987$). Adicionalmente, se registró la estabilidad del DPPH a 515 nm durante 30 min y se observó que su absorbancia no varió, conforme fue observada por (Sandoval *et al.*, 2001 y Okawa, 2001), la curva de calibración de DPPH se construyó, para expresar cuanto de inhibición de DPPH en micro molar ocurrió al término de la reacción.

Cuadro 14. Curva de calibración del radical libre DPPH

DPPH μM	Absorbancia ¹ 515 nm
0	0,00 \pm 0,000
10	0,03 \pm 0,004
30	0,22 \pm 0,004
100	1,04 \pm 0,021
200	2,17 \pm 0,001
R	0,9987
R ²	0,9976

¹Valores representan el promedio \pm SE de tres repeticiones.

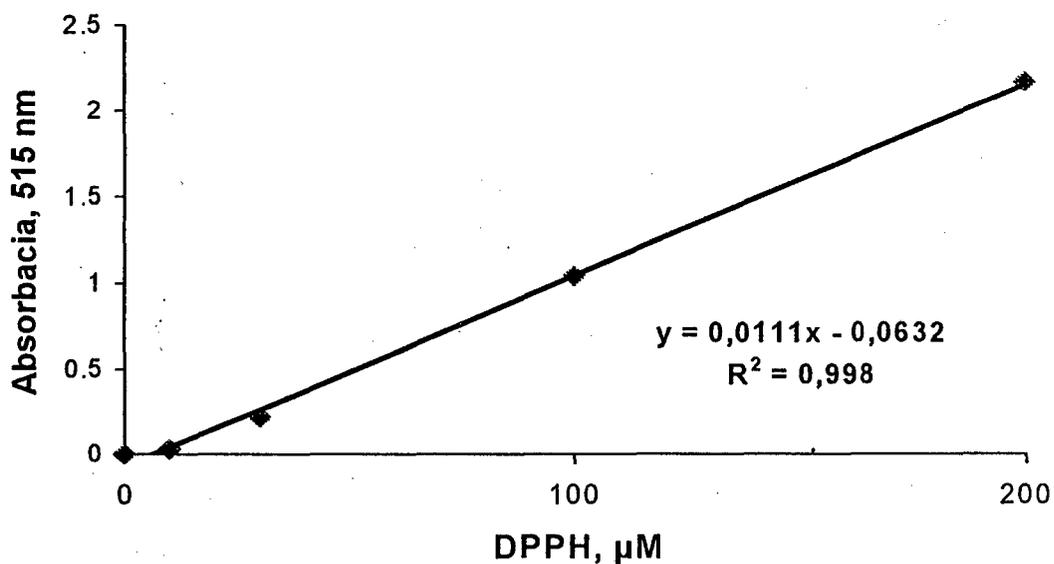


Figura 5. Curva estándar del radical libre DPPH

Análisis de varianza de la curva de calibración para determinar la estabilidad de DPPH

Fuente de Variación	GL	SC	CM	Fc	Valor P
Tratamiento	3	8,523	2,841	5053,1	0,0001
Error Experimental	8	0,004498	0,0005623		
Total	11	8,528			

A - III. Análisis de varianza de la capacidad del té verde de inhibir DPPH:

Efecto de concentraciones (1, 10, 30 y 100 µg/ml)

Fuente de Variación	GL	SC	CM	Fc	Valor P
Tratamiento	3	50243	16748	3255,2	0,0001
Error Experimental	44	226,38	5,145		
Total	47	50470			

Análisis de varianza de la capacidad del té verde de inhibir DPPH: Efecto de tratamientos a la concentración de 1 µg/ml

Fuente de Variación	GL	SC	CM	Fc	Valor P
Tratamiento	3	0,003674	0,001225	19,112	0,0005
Error Experimental	8	0,0005127	0,00006408		
Total	11	0,004187			

Análisis de varianza de la capacidad del té verde de inhibir DPPH: Efecto de tratamientos a la concentración de 10 µg/ml

Fuente de Variación	GL	SC	CM	Fc	Valor P
Tratamiento	3	16,060	5,353	1,138	0,3907
Error Experimental	8	37,648	4,706		
Total	11	53,708			

Análisis de varianza de la capacidad del té verde de inhibir DPPH: Efecto de tratamientos a la concentración de 30 µg/ml

Fuente de Variación	GL	SC	CM	Fc	Valor P
Tratamiento	3	2,179	0,7263	0,04052	0,9883
Error Experimental	8	143,40	17,925		
Total	11	145,58			

Análisis de varianza de la capacidad del té verde de inhibir DPPH: Efecto de tratamientos a la concentración de 100 µg/ml

Fuente de Variación	GL	SC	CM	Fc	Valor P
Tratamiento	3	17,075	5,692	4,549	0,0385
Error Experimental	8	10,009	1,251		
Total	11	27,084			

**A - IV. Análisis de varianza del contenido de flavanoles en el té verde
seleccionado: Blanqueado por 30 seg (T2)**

Fuente de Variación	GL	SC	CM	Fc	Valor P
Tratamiento	4	19345	4836,3	347,07	0,0001
Error Experimental	35	487,71	13,935		
Total	39	19833			

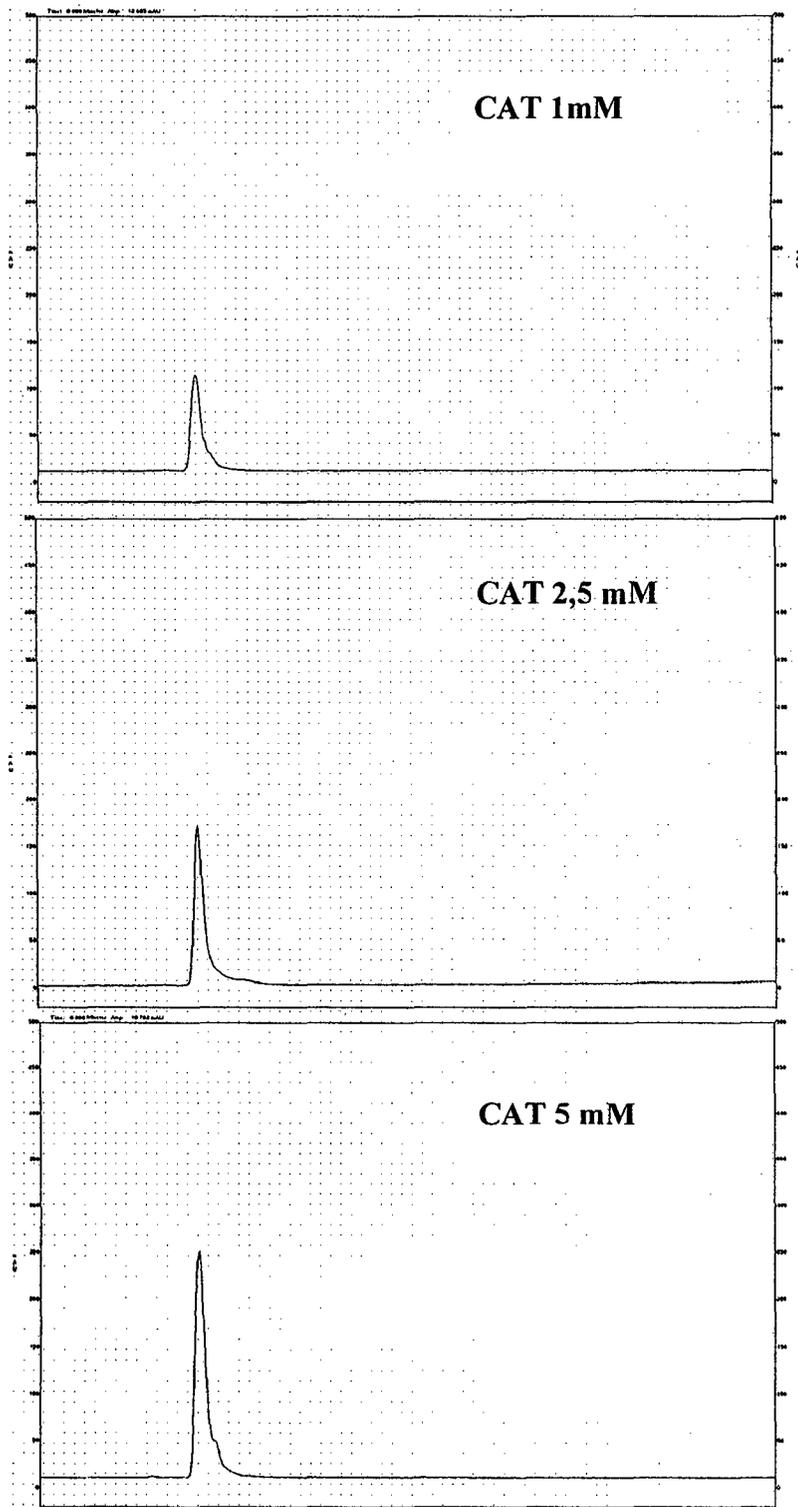


Figura 6. Cromatograma del estándar catequina (CAT) determinada por HPLC

Cuadro 16. Curva de calibración de la catequinas por HPLC

Concentración Mm	Peso ng	Area ¹ 210 nm
0	0	0
0,1	29	573434
1,0	290	4072549
2,5	725	7095188
5,0	1450	10989345
R		0,9806
r ²		0,9617
Ecuación de regresión lineal: Y = 7445,8X + 832162		

¹Indica los valores representativos del área debajo de la curva (HPLC peak) de una inyección por cada concentración de catequina (CAT) realizada en el sistema de HPLC en fase reversa. La regresión lineal obtenida se hizo correlacionando la concentración de CAT en nanogramos (ng) y sus respectivas áreas. El área de cada concentración fue calculada por el software del HPLC.

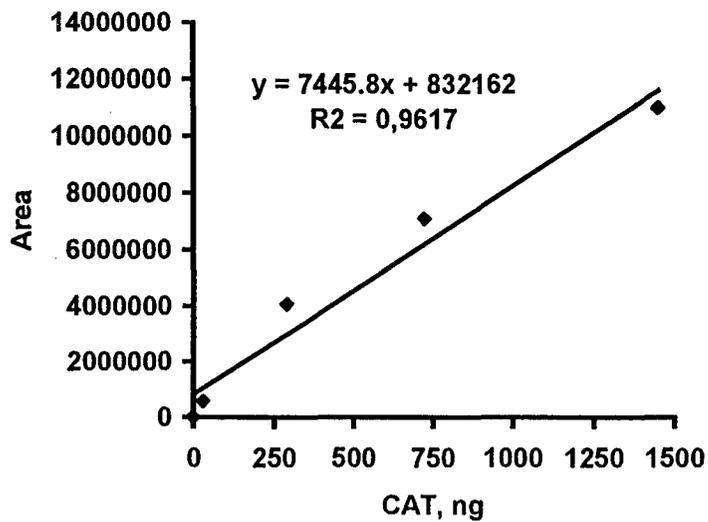


Figura 7. Curva estándar de la catequina estimada por HPLC

A - V. Efecto del almacenamiento en la capacidad antioxidativa del té verde: Blanqueado por 30 segundos (T2)

Almacenamiento (Días)	Té verde µg/ml			
	1	10	30	100
	Porcentaje de inhibición			
0	1,15	13,46	37,17	86,19
	1,14	10,33	27,48	87,39
	1,14	11,01	37,76	85,35
Promedio	1,14	11,60	34,14	86,31
10	1,10	13,20	46,10	86,00
	2,30	14,12	42,45	84,70
	1,80	12,54	31,34	84,18
Promedio	1,73	13,29	39,96	84,96
20	4,22	14,48	31,52	89,37
	7,69	13,73	32,58	89,33
	4,15	10,03	29,04	89,29
Promedio	5,35	12,75	31,05	89,33
30	10,63	17,79	28,88	78,13
	9,73	12,59	21,87	82,05
	9,20	15,54	30,92	85,97
Promedio	9,85	15,31	27,22	82,05
40	3,48	12,72	39,78	82,95
	4,07	9,670	37,49	83,63
	2,46	12,13	31,64	85,41
Promedio	3,34	11,51	36,30	83,99
50	2,05	9,76	33,82	84,59
	3,34	9,50	33,05	85,53
	1,46	6,85	31,59	85,70
Promedio	2,29	8,71	32,82	85,27
60	3,50	11,76	42,99	89,95
	0,98	11,76	39,68	88,24
	3,86	9,6	37,34	91,11
Promedio	2,78	11,04	40,00	89,77

Análisis de varianza de la capacidad del té verde de inhibir DPPH: Efecto de almacenamiento y blanqueado por 30 segundos (T2)

Fuente de Variación	GL	SC	CM	Fc	Valor P
Tratamiento	6	48,748	8,125	2,447	0,0787
Error Experimental	14	46,477	3,320		
Total	20	95,224			