

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA**

**FACULTAD DE INDUSTRIAS ALIMENTARIAS**

**DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE CIENCIAS, TECNOLOGÍA E INGENIERIA DE ALIMENTOS**



**“DISEÑO Y EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD  
ANTIOXIDANTE *IN VITRO* DE UNA BEBIDA EN BASE A  
TÉ VERDE (*Camellia sinensis*) Y HIERBA LUISA  
(*Cymbopogon citratus* Stap)”**

**TESIS**

Para optar el título de:

**INGENIERO EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS**

Presentado por:

**DIÓMEDES FERNANDO RAMOS ESCUDERO**

Tingo María - 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 19 de diciembre del 2002, a horas 08:30 a.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 el Bachiller en Ciencias Industrias Alimentarias: **Diómedes Fernando RAMOS ESCUDERO**.


**“DISEÑO Y EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE  
IN VITRO DE UNA BEBIDA EN BASE A TÉ VERDE (*Camellia  
sinensis*) Y HIERBA LUISA (*Cymbopogon citratus* Stap)”**

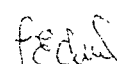
Después de haber escuchado la sustentación, las respuestas a las preguntas formuladas, lo declaran aprobado con el calificativo de **Muy Bueno**, en consecuencia al Bachiller: **Diómedes Fernando RAMOS ESCUDERO**, queda apto para recibir el título de **Ingeniero en Industrias Alimentarias** del Consejo 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, 19 de diciembre del 2002

  
Ing°. Gunter Daza Rengifo  
Presidente



  
Ing. Williams Roldan Carbajal  
Vocal

  
Ing. M. Sc. Elizabeth Ordóñez Gómez  
Vocal

  
Ing°. M. Sc. Luis Alberto Condezo Hoyos  
Asesor

## DEDICATORIA

### A MI DIOS

Por la vida concedida y por el gran amor demostrado para alcanzar salvación por medio de nuestro Señor **JESUCRISTO**, quien murió por nosotros para que ya sea que veamos, o que durmamos, vivamos juntamente con ÉL.

### A MI MADRE ADRIANA

Por su abnegado valor, inmenso cariño y afecto para inculcarme constantemente en el desarrollo de mi formación académica.

### A MI HERMANA MÓNICA

Con afecto y estima.

### A MIS TIOS PEDRO Y GLADYS

Por el apoyo incondicional brindado.

### A MARIAMNE JARIT

Con mucho amor y afecto

*"Todo lo que viniere a la mano para hacer,  
hazlo según tus fuerzas, porque en el Seol,  
adonde vas, no hay obra, ni trabajo,  
ni ciencia, ni sabiduría."*

## **AGRADECIMIENTO**

Mi más sincero agradecimiento a la **Universidad Nacional Agraria de la Selva** por haberme formado profesionalmente.

- Al Ing° **M.Sc. LUIS ALBERTO CONDEZO HOYOS** y al **Ph.D. MANUEL SANDOVAL CHACON**, asesores del presente trabajo.
- A los **Bach. QUINTO ESTELO CELESTINO, LUIS ALBERTO BECERRIL ALBORNOZ, IRIS RUIZ YANCE, JUAN VILLANUEVA TIBURCIO, SEYER ESTRELLA CARTAGENA, VICTOR MERA VALLES, PATRICIA LOZANO VARGAS** por su colaboración en el presente trabajo de investigación.
- A los técnicos de laboratorio: **RICHARD SIAS RODRIGUEZ, LUIS JARA ESTRADA, CELEDONIO YACHA MELGAREJO, GLELIA RÍOS SALDAÑA, CONCEPCIÓN ARIZA ESPINOZA**, por su apoyo desinteresado.
- A mis profesores que sabiamente supieron impartir sus conocimientos en mi formación académica.
- A la familia **ALVINO – SÁNCHEZ** por su afecto y apoyo espiritual.
- A los compañeros de milicia en la fe, quienes con sus oraciones hicieron que vuestro corazón se afirme en el conocimiento de **CRISTO**.
- A los amigos y compañeros de estudio, por los momentos compartidos.

## RESUMEN

El presente trabajo de investigación se realizó haciendo uso de los laboratorios de Análisis de Alimentos, Microbiología de Alimentos, Control de Calidad y Análisis Sensorial y Espectrofotometría de la Universidad Nacional Agraria de la Selva. Como materia prima se empleó té (*Camellia sinensis*) y hierba luisa (*Cymbopogon citratus*) provenientes de Río Azul y Porvenir de Marona, respectivamente. Los objetivos propuestos fueron: (a) Determinar los parámetros de cinética de inhibición al 1,1 difenil-2-picril-hidrazil del té verde y la hierba luisa, (b) diseñar una bebida en base a té verde y hierba luisa, (c) determinar los parámetros de cinética de inhibición al 1,1 difenil-2-picril-hidrazil de la bebida y (d) evaluar la estabilidad de la bebida.

Los parámetros de cinética de inhibición para el té verde se determinaron a concentraciones de 100, 30, 10 y 3  $\mu\text{g/mL}$  haciéndolo reaccionar con el radical  $\text{DPPH}^\bullet$ , el mismo procedimiento se realizó para la hierba luisa a concentraciones de 3000, 300, 100 y 10  $\mu\text{g/mL}$ . El coeficiente de inhibición ( $\text{IC}_{50}$ ) obtenido para el té verde fue de  $32,43 \pm 0,389 \mu\text{g/mL}$  y para la hierba luisa de  $1345,79 \pm 47,05 \mu\text{g/mL}$ . Para los análisis de cinética de inhibición cada una de las absorbancias generadas durante 10 minutos, medido cada 30 segundos, fueron ajustados a una curva de calibración de  $\text{DPPH}^\bullet$ , generada mediante el ploteo de la concentración  $\mu\text{M}$  versus las absorbancias, la ecuación fue: ( $[\text{Abs}] = 0,0096 [\mu\text{M}] - 0,0029$ ),  $R^2 = 0,9998$ . El cálculo del  $K_2$  se realizó haciendo uso del programa de Statistica/W ver. 6.0, donde el

coeficiente  $b$  obtenido por la aplicación del modelo multiplicativo  $A = a ( t + 1 )^b$ , se plotearon versus la concentración de cada una de las muestras. Obteniéndose un  $K_2$  para el té verde de  $2,30 \pm 0,018$  y para la hierba luisa de  $0,06 \pm 0,003 \text{ (mg/mL)}^{-1} \text{ Ln (s)}^{-1}$ , respectivamente. La formulación (SL<sub>3</sub>P<sub>3</sub>), correspondiente a (10 mg/mL; 50% té verde: 50% hierba luisa) presentó un contenido de catequinas de  $24,42 \pm 0,65 \text{ mg/100mL}$ , porcentaje de inhibición DPPH<sup>•</sup> de 88,63, atributos sensoriales de sabor, color y olor con valores de 6,78; 9,0; 8,0 respectivamente, atributos de acidez y dulzor a un pH de 3,1 y 11° Brix. Para la lixiviación el contenido de catequinas fue  $39,74 \pm 0,91 \text{ mg/100mL}$ . Para la pasteurización el contenido de catequinas fue  $32,79 \pm 0,84 \text{ mg/100mL}$ , el análisis microbiológicos fue  $< 10 \text{ ufc/mL}$  y la capacidad antioxidante fue  $10,65 \text{ }\mu\text{M TE/L}$  para DPPH<sup>•</sup> y  $16,83 \text{ mM TE/L}$  de bebida para ABTS<sup>+</sup>.

## ABSTRACT

This study was carried out in the laboratories of food analysis, food microbiology, quality control, sensorial analysis and Spectrophotometry at Universidad Nacional Agraria de la Selva, Tingo Maria, Peru. Samples of tea (*Camellia sinensis*) and lemon grass (*Cymbopogon citratus*) collected from the localities of Río Azul and Porvenir de Marona were used in this investigation. The objectives of this study were: 1) To determine the kinetic parameters of 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazil (DPPH<sup>\*</sup>) inhibition by tea and hierba luisa, 2) To formulate and establish the optimal technological parameters for obtaining a drink, 3) To determine the kinetic parameters of DPPH<sup>\*</sup> inhibition by the formulated drink, and 4) To evaluate the shelf life of the drink.

The green tea and lemon grass were obtained following the steps described in materials and methods. To assess the kinetic parameters of DPPH<sup>\*</sup> inhibition, different concentrations of green tea (3, 10, 30 and 100 µg/mL) and lemon grass (10, 100, 300 and 3000 µg/mL) were reacted with DPPH<sup>\*</sup> (100 µmol/L). The time of the reaction was 10 minutos and the absorbances were recorded every 30 segundos. The fifty percent inhibition coefficient (IC<sub>50</sub>) for green tea and lemon grass was 32,43 ± 0,39 and 1345,79 ± 47 µg/ml, respectively.

For the analysis of the kinetic inhibition, every absorbance generated during the 10 minutos was adjusted to a DPPH<sup>\*</sup> calibration curve. The curve was generated by plotting concentration [µM] against absorbance as indicated in the following equation: [ Abs ] = 0,0096 [ µM ] - 0,0029, R<sup>2</sup> = 0,9998. To calculate K<sub>2</sub> we used the statistical programa Statistica/W ver. 6.0. The coefficient (b), which was obtained from the multiplicative model (  $A = a ( t + 1 )^b$  ) was plotted

against the concentration of each sample. The  $K_2$  values for green tea and hierba luisa were  $2,30 \pm 0,018$  and  $0,06 \pm 0,003$   $(\text{mg/mL})^{-1} \text{Ln (s)}^{-1}$ , respectively. The formulation (SL<sub>3</sub>P<sub>3</sub>) corresponding (10 mg/mL; 50% green tea: 50% lemon grass) obtained a content of catechins of  $24,42 \pm 0,65$  mg/100mL, the percent inhibition was 88,63, the sensorial analysis of taste, color and odor obtained values of 6,78, 9,0, 8,0, . The attributes for acidity and sweetness were pH 3,1 and 11° Brix, For the lixiviation the content of catechins was  $39,74 \pm 0,91$  mg/100mL, for the pasteurización the content of catechins was  $32,79 \pm 0,84$  mg/100mL, the microbiological analysis was  $10^<$  cfu/mL, and antioxidant capacity was  $10,65 \mu\text{M TE/L}$  for DPPH\* and  $16,83 \text{ mM TE/L}$  of beverage for ABTS\*.

## INDICE

	Pag.
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
A. TÉ.....	3
1. Generalidades.....	3
2. Componentes funcionales.....	13
B. HIERBA LUISA.....	16
1. Generalidades.....	16
2. Componentes funcionales.....	21
C. ALIMENTOS FUNCIONALES.....	23
D. PERSPECTIVAS DE MERCADO.....	25
E. ROL DE LOS RADICALES LIBRES Y ANTIOXIDANTES.....	26
1. Radicales libres.....	26
2. Antioxidantes.....	29
F. DISEÑO DE LOS NUEVOS PRODUCTOS.....	30
1. Formulación.....	31
2. Estabilidad de los alimentos.....	34
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	37
A. LUGAR DE EJECUSIÓN.....	37
B. MATERIA PRIMA E INSUMOS.....	37
1. Materia prima.....	37
2. Insumos.....	37
C. MATERIALES.....	38
1. Materiales de laboratorio.....	38

2. Equipos de laboratorio.....	38
3. Reactivos.....	38
D. MÉTODOS DE ANÁLISIS.....	39
1. Análisis de polifenol oxidasa PPO.....	40
2. Capacidad antioxidante.....	40
3. Polifenoles totales.....	40
4. Catequinas.....	41
5. Pardeamiento.....	41
6. Análisis microbiológico.....	41
7. Análisis sensorial.....	41
E. METODOLOGIA EXPERIMENTAL.....	42
IV. RESULTADOS Y DISCUSION.....	53
V. CONCLUSIONES.....	90
VI. RECOMENDACIONES.....	91
VII. BIBLIOGRAFIA.....	92
VIII. ANEXOS.....	103

## INDICE CUADROS Y FIGURAS

### INDICE DE CUADROS

	<b>Pag.</b>
<b>Cuadro 1.</b> Composición de catequinas de té verde, negro y oolong (g/100 g de hoja seca).....	<b>10</b>
<b>Cuadro 2.</b> Composición de varios productos de té verde chino y japonés (mg/100 mg de hoja seca).....	<b>15</b>
<b>Cuadro 3.</b> Especies reactivas del oxígeno y sus principales características.....	<b>28</b>
<b>Cuadro 4.</b> Cadena de reacciones en el proceso de lipoperoxidación..	<b>29</b>
<b>Cuadro 5.</b> Algunos productos innovadores.....	<b>32</b>
<b>Cuadro 6.</b> Polifenoles totales del té verde y hierba luisa.....	<b>56</b>
<b>Cuadro 7.</b> Valores de IC <sub>50</sub> de las muestras de té verde y hierba luisa frente al radical DPPH.....	<b>57</b>
<b>Cuadro 8.</b> Determinación de los coeficientes obtenidos por la aplicación del modelo multiplicativo en el té verde y hierba luisa.....	<b>58</b>
<b>Cuadro 9.</b> Constante de segundo orden (K <sub>2</sub> ) para las reacciones entre el DPPH y los extractos de té verde y hierba luisa....	<b>59</b>
<b>Cuadro 10.</b> Contenido de catequinas totales en las diferentes formulaciones.....	<b>61</b>
<b>Cuadro 11.</b> Evaluación sensorial del atributo sabor producido por las diferentes formulaciones.....	<b>64</b>
<b>Cuadro 12.</b> Evaluación sensorial del atributo color producido por las diferentes formulaciones.....	<b>64</b>
<b>Cuadro 13.</b> Evaluación sensorial del atributo olor producido por las diferentes formulaciones.....	<b>65</b>

<b>Cuadro 14.</b>	Evaluación sensorial del atributo acidez.....	<b>68</b>
<b>Cuadro 15.</b>	Evaluación sensorial del atributo dulzor.....	<b>69</b>
<b>Cuadro 16.</b>	Cantidad de catequinas totales durante la lixiviación a diferentes tiempos.....	<b>70</b>
<b>Cuadro 17.</b>	Evaluación sensorial para el mejor color durante la lixiviación a diferentes tiempos.....	<b>71</b>
<b>Cuadro 18.</b>	Contenido de catequinas presentes en los tratamientos durante la pasteurización.....	<b>73</b>
<b>Cuadro 19.</b>	Estabilidad microbiología de los tratamientos después de la pasteurización.....	<b>74</b>
<b>Cuadro 20.</b>	Capacidad antioxidante para los tres mejores tratamientos medido pos el radical DPPH y ABTS <sup>+</sup> .....	<b>75</b>
<b>Cuadro 21.</b>	Contenido de catequinas presentes durante el almacenamiento a temperaturas diferentes.....	<b>81</b>
<b>Cuadro 22.</b>	Influencia de la temperatura sobre el periodo de inducción, absorbancia máxima y rango de pardeamiento..	<b>83</b>
<b>Cuadro 23.</b>	Estabilidad microbiología a diferentes temperaturas de almacenamiento.....	<b>86</b>
<b>Cuadro 24.</b>	Modelos de regresión para la degradación de las catequinas.....	<b>89</b>

## INDICE DE FIGURAS

	<b>Pag.</b>
<b>Figura 1.</b> Plantaciones de té ( <i>Camellia sinensis</i> . L).....	<b>3</b>
<b>Figura 2.</b> Bebidas formuladas a base de té verde y negro.....	<b>9</b>
<b>Figura 3.</b> Estructura química de los componentes polifenólicos del té verde.....	<b>11</b>
<b>Figura 4.</b> Producción mundial de hoja de té.....	<b>13</b>
<b>Figura 5.</b> Planta de hierba luisa ( <i>Cymbopogon citratus</i> . Stap).....	<b>17</b>
<b>Figura 6.</b> Cambio de calidad frente al tiempo.....	<b>35</b>
<b>Figura 7.</b> Etapas para el diseño y evaluación de la capacidad antioxidante <i>in vitro</i> de una bebida en base a té verde y hierba luisa.....	<b>42</b>
<b>Figura 8.</b> Diseño experimental para la determinación del mejor tiempo de blanqueado.....	<b>43</b>
<b>Figura 9.</b> Diseño experimental para la determinación de la capacidad antioxidante del té verde y hierba luisa.....	<b>46</b>
<b>Figura 10.</b> Diseño experimental para determinar la relación cantidad de té verde-hierba luisa: agua y proporción té verde: hierba luisa.....	<b>47</b>
<b>Figura 11.</b> Diseño experimental para determinar el nivel de acidez y dulzor.....	<b>48</b>
<b>Figura 12.</b> Diseño experimental para determinar el tiempo de lixiviación.....	<b>49</b>
<b>Figura 13.</b> Diseño experimental para determinar los baremos de pasteurización.....	<b>50</b>

<b>Figura 14.</b>	Diseño experimental para determinar la estabilidad de la bebida.....	<b>52</b>
<b>Figura 15.</b>	Curva de espectro para determinar la máxima longitud de onda para Polifenol Oxidasa (PPO).....	<b>53</b>
<b>Figura 16.</b>	Porcentaje de inhibición de Polifenol Oxidasa (PPO).....	<b>54</b>
<b>Figura 17.</b>	Capacidad de inhibición de radical DPPH del té verde y la hierba luisa a diferentes concentraciones.....	<b>55</b>
<b>Figura 18.</b>	Constante de velocidad de primer orden (b) sobre la concentración del extracto de té verde y hierba luisa.....	<b>60</b>
<b>Figura 19.</b>	Porcentaje de inhibición de DPPH de las diferentes formulaciones de té verde – hierba luisa.....	<b>63</b>
<b>Figura 20.</b>	Efecto del ácido cítrico y ácido ascórbico sobre el pardeamiento de la bebida. Datos expresados como media±SEM, n=3. Media unido por letras (a – c), diferencia significativas a p<0.05 según la prueba de duncan.....	<b>66</b>
<b>Figura 21.</b>	Flujograma para la obtención de la bebida de té verde-hierba luisa.....	<b>78</b>
<b>Figura 22.</b>	Pardeamiento de la bebida a temperatura ambiente con empaque y sin empaque. Datos expresados como media±SEM, n=3.....	<b>79</b>
<b>Figura 23.</b>	Pardeamiento de la bebida. Datos expresados como media±SEM, n=3. Media unidas por letras (a – c), diferencia significativa a p<0.05 según la prueba de duncan.....	<b>82</b>
<b>Figura 24.</b>	Capacidad antioxidante de la bebida sometida a varias temperaturas durante el almacenamiento.....	<b>84</b>

<b>Figura 25.</b>	Degradación de las catequinas en la bebida después del periodo de inducción durante el almacenamiento a diferentes temperaturas.....	<b>88</b>
<b>Figura 26.</b>	Curva de calibración DPPH.....	<b>104</b>
<b>Figura 27.</b>	Curva de calibración DPPH – TROLOX.....	<b>105</b>
<b>Figura 28.</b>	Curva de calibración ABTS <sup>+</sup> - TROLOX.....	<b>106</b>
<b>Figura 29.</b>	Curva de calibración para cuantificar polifenoles totales....	<b>107</b>
<b>Figura 30.</b>	Curva de calibración para cuantificar catequinas totales....	<b>108</b>
<b>Figura 31.</b>	Desarrollo del color sulfanilamide – catequina.....	<b>109</b>
<b>Figura 32.</b>	Curva para él calculo del coeficiente de inhibición 50%, para la hierba luisa.....	<b>110</b>
<b>Figura 33.</b>	Curva para él calculo del coeficiente de inhibición 50%, para el té verde.....	<b>111</b>
<b>Figura 34.</b>	Curva para él calculo de la constante de velocidad de orden 2 ( $K_2$ ), para la hierba luisa.....	<b>112</b>
<b>Figura 35.</b>	Curva para él calculo de la constante de orden 2 ( $K_2$ ), para el té verde.....	<b>113</b>
<b>Figura 36.</b>	Secuestro del radical DPPH por una especie antiradical (DPPH-H reducido 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical; (AH) <sub>n</sub> , especie antiradical “n” indica la presencia de n=1 ó n>1, especies radicales).....	<b>118</b>
<b>Figura 37.</b>	Diseño del empaque para la bebida “REFRESH LEMMON TEA”.....	<b>119</b>
<b>Figura 38.</b>	Diseño del envase para la bebida “REFRESH LEMMON TEA”.....	<b>120</b>

## GLOSARIO

<b>ABTS</b>	2,2-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic
<b>ADN</b>	Acido desoxiribonucleico
<b>AGE</b>	Acido gálico equivalente
<b>ARN</b>	Acido ribonucleico
<b>ARP</b>	Poder antiradical
<b>BHT</b>	Butil hidroxy tolueno
<b>DPPH</b>	1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl
<b>EC</b>	Epicatechin
<b>ECG</b>	Epicatechin gallate
<b>EGC</b>	Epigallocatechin
<b>EGCG</b>	Epigallocatechin gallate
<b>ERO</b>	Especies reactivas del oxígeno
<b>GCG</b>	Gallocatechin gallate
<b>HL</b>	Hierba luisa
<b>HPLC</b>	Cromatografía líquida de alta performance
<b>IC<sub>50</sub></b>	Coefficiente de inhibición 50%
<b>LDL</b>	Lipoproteína de baja densidad
<b>PPO</b>	Polifenol oxidasa
<b>RSC</b>	Capacidad de secuestro de radical
<b>TPP</b>	Total polifenoles
<b>TR</b>	Tearubiginas
<b>TROLOX</b>	Acido 6-hidroxy-2,5,7,8-tetramethylchoman-2-carboxilico
<b>TV</b>	Té verde
<b>UA</b>	Unidades de absorbancia
<b>UV</b>	Ultravioleta

## I. INTRODUCCION

En el Perú, los cultivos de té se encuentran principalmente en las zonas de La Divisoria y la Convención, otras zonas de cultivo son las tierras altas tropicales de Asia, Africa y América.

El té, en el contexto utilizado por la mayoría de los consumidores, es una bebida que consiste en la infusión de las hojas tratadas y desecadas de la planta. Se ha consumido desde la antigüedad y, aunque el origen de la bebida es incierto, se admite que los Chinos ya eran consumidores habituales en el siglo V d.C.

En el Perú no existen cultivos comerciales de hierba luisa, esta gramínea cuya parte utilizable por la industria está constituida por las hojas y los tallos tiernos, se puede producir en toda la Selva. Generalmente se encuentra en las zonas de Cainarachi, Uchiza, Aguaytia, Puerto Bermúdez y San Francisco, donde puede cultivarse hasta los 1600 m de altitud.

Paralelamente al estudio de los radicales libres, el estudio de los antioxidantes constituye actualmente un tema de investigación sumamente importante, ya que se ha considerado que el conocimiento de los mecanismos de acción de estas moléculas podrían permitir en algún momento, la utilización de los antioxidantes, para disminuir los efectos biológicos de los radicales libres.

El té y la hierba luisa presentan características funcionales que contribuyen a reducir el riesgo de contraer enfermedades y obtener resultados muy beneficiosos para la salud.

Los objetivos del presente trabajo de investigación fueron:

- Determinar los parámetros de cinética de inhibición al 1,1 difenil-2-picrilhidrazil (DPPH\*) del té verde y la hierba luisa.
- Diseñar una bebida en base a té verde y hierba luisa.
- Determinar los parámetros de cinética de inhibición al 1,1 difenil-2-picrilhidrazil de la bebida.
- Evaluar la estabilidad de la bebida.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### A. TÉ

#### 1. Generalidades

##### a. Género

El género *Camellia* comprende a arbustos de hoja perenne que en régimen de explotación comercial se mantienen a baja altura y en un continuado crecimiento vegetativo. Dentro del género hay un gran número de especies pero solo *Camellia sinensis* se cultiva comercialmente. Otras especies, particularmente *Camellia irrawadiensis* y *Camellia taliensis*, tienen importancia como material genético (Varnam y Sutherland, 1997).



Figura 1. Plantaciones de té (*Camellia sinensis*)

*Camellia* es una planta de polinización cruzada y por estas razones es altamente heterogénea. Se han descrito algunas variedades y subvariedades. Se conoce tres variedades de *Camellia* en cultivo.

China, Assam y Cambod, las cuales en ciertas clasificaciones taxonómicas se denominan *Camellia sinensis*, *Camellia assamica* y *Camellia assamica var. Lasicalyx* (Varnam y Sutherland, 1997).

Los tés de China, también denominado como *Camellia sinensis*, subtropicales, caracterizados por plantas tipo arbusto, de porte bajo, hojas pequeñas de color verde claro, brotes menudos, alta resistencia al frío y a la sequía. Menor rendimiento, pero mejor calidad.

Los tés de Assam, también clasificados como *Camellia assamica*, tropicales, plantas tipo árbol, hojas grandes color verde oscuro y más suaves, brotes bien desarrollados. Mayor rendimiento por hectárea, pero menor calidad.

#### **b. Cultivo**

El té se cultiva comercialmente en un gran número de países, siendo Georgia en la extinta Unión Soviética país más nórdico, Sudáfrica y Argentina los más meridionales. Los principales productores son India, China y Ceilán, aunque también se producen grandes cantidades en Java, Sumatra, Japón y en ciertas áreas de Africa (Varnam y Sutherland, 1997).

## 1) Suelo

El té desarrolla adecuadamente en suelos ácidos, siendo conocida su adaptación a condiciones de alta saturación de aluminio; sin embargo, el pH debe estar entre 5,0 y 6,0, para proporcionar la máxima disponibilidad de nutrientes. Crece mejor en suelos profundos, sueltos y fértiles (PROMPEX, 1997).

## 2) Clima

Generalmente se acepta que la temperatura del aire esté en el rango de 18 - 30° C, siendo la óptima para el desarrollo de los brotes entre 13 - 14° C, mientras que la fotosíntesis global y el crecimiento se reducen notablemente cuando la temperatura sobrepasa los 30° C. La producción máxima precisa de días largos, mientras que los días bastante inferiores a 12 horas, de luz hacen que *Camellia* entre en un estado de latencia (Varnam y Sutherland, 1997).

### c. Formas de uso

El té, es consumido como infusión, ya sea de las hojas sometidas o no a un proceso de fermentación (Varnam y Sutherland, 1997).

## 1) Té negro

El té negro, es más complejo desde el punto de vista técnico. El 78 % de la producción se destina al consumo de té negro (Jankun *et al.*, 1997). La forma comercial fermentada lo constituye el té negro, caracterizado por su menor contenido de flavonoides, pero con presencia de teaflavinas y tearubiginas (Dreosti, 2000); que son formados por oxidación enzimática y condensación de las catequinas (Subramanian *et al.*, 1999).

## 2) Té verde

El té verde es elaborado particularmente en China y Japón, y se prescinde de la fermentación (Belitz y Grosch, 1988); difiere del té negro tanto química como tecnológicamente. Es la forma no fermentada, y es el de mayor impacto en el mercado, en virtud a su capacidad para reducir riesgos de varios tipos de cánceres en humanos (Gadow *et al.*, 1996). El contenido de flavonoides es superior a todas las formas de procesamiento, y es a ellos que se atribuye el efecto benéfico (Dreosti, 2000). Proporciona infusiones muy claras, pálidas y amargas. En China y Japón se aromatiza frecuentemente con hojas de naranja, rosa, jazmín (Belitz y Grosch, 1988).

### **3) Tés aromatizados**

Los tés aromatizados se elaboran desde hace muchos años, siendo el más conocido el Earl Grey, que es aromatizado con esencias de limas bergamotas. Las flores como el jazmín, se emplean para aromatizar algunos tés chinos. El aromatizante se añade como un aceite esencial particularmente en los tés de bolsita, como un concentrado hidrosoluble. Los aromatizantes se prefieren cada vez más y tienden a proporcionar una calidad mayor y un producto más delicado, aunque su vida útil es más corta debido a la pérdida de aroma (Varnam y sutherland, 1997).

### **4) Tés semifermentados**

Los tés semifermentados vienen representados por los tés oolong y pouchong, y sus diferencias estriban en la intensidad de la fermentación (Belitz y Grosch, 1988). La existencia de los tés semifermentados en el mercado internacional, cuyo contenido de flavonoides es evidentemente intermedio a lo reportado en las otras dos formas (Gadow *et al.*, 1996).

### **5) Té encurtido**

El té encurtido se obtiene mediante diversos procesos. En cada caso el método de conservación consiste en una fermentación

en la que los microorganismos propios del té desempeñan un papel importante. El té encurtido auténtico se elabora a partir de hojas frescas que se someten a la acción del vapor por un periodo de hasta 1,5 horas. La masa de hojas tratadas con vapor se entierran en un foso y se empaquetan en canastos o contenedores de bambú dejándolas fermentar durante 2 a 4 meses. En algunos casos se añade NaCl para inhibir el crecimiento de microorganismos indeseables (Varnam y Sutherland, 1997).

## **6) Té descafeinado**

El té descafeinado es un producto muy difundido en los Estados Unidos, pero constituye un producto relativamente nuevo en el Reino Unido. Se han propuesto tres solventes para realizar la descafeinización, el acetato de etilo, el cloruro de metilo y el dióxido de oxígeno supercrítico (Varnam y Sutherland, 1997).

## **7) Bebidas de té**

Las bebidas de té en botellas y latas están cautivando su consumo en todo el mundo (Chen *et al.*, 2001).

Aunque las catequinas totales en el té verde, té oolong y té negro han sido reportados, la información sobre la composición

de catequinas de las bebidas en botellas o latas es limitada. Chen *et al.* (2001) reporta que las bebidas contienen de 0,3 – 35,0 mg de catequina/100 mL de bebida. Hollman (2002), reporta que el contenido de catequinas en el té verde va de 0.9 – 75.0 mg/100 mL.

Existe un sin número de bebidas formuladas sobre la base de té verde y otros ingredientes dentro de ellos tenemos: Refresh lemon flavored iced, nestea sweet, crystal spring honey dew, nestea peach flavoring, nestea natural lemon, crystal spring apple, crystal spring peach, bo – bo, Hi – C lemon, arizona (Chen *et al.*, 2001).

En la figura 2, se presentan bebidas formuladas en base a té verde y negro.



Figura 2. Bebidas formuladas a base de té verde y negro

#### d. Composición química

La composición química (catequinas) de las hojas de té varía dentro de límites muy amplios de acuerdo con su origen, edad y tratamiento (Belitz y Grosch, 1988)

**Cuadro 1.** Composición de catequinas de té verde, negro y oolong (g/100 g de hoja seca).

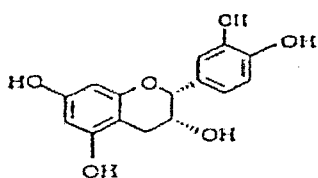
Recurso	EGC	EC	EGCG	ECG	GCG	Total
<b>Té verde</b>						
Xin-yang-mao-jian	0,36	0,79	10,44	2,63	0,18	14,44
Yun-nan-lu-cha	0,16	1,41	4,70	6,30	0,12	12,69
<b>Té oolong</b>						
Wu-yi-wu-long	0,21	0,34	3,26	0,71	0,11	4,63
Guan-yi	0,25	0,37	3,49	0,72	0,09	4,92
<b>Té negro</b>						
Li-zhi-hong-cha	Traza	0,05	0,16	0,17	Traza	0,38
Liu-an-gu	0,01	0,11	0,31	0,08	Traza	0,51

EGC, epigallocatechin; EC, epicatechin; EGCG, epigallocatechin gallate; ECG, epicatechin gallate; GCG, galocatechin gallate. Traza < 0.01 mg/100g

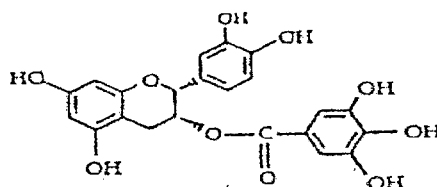
**Fuente:** Chen *et al.* (2001)

Los brotes tiernos del té presentan un elevado contenido en polifenoles y hasta el 30 % de su peso seco son catequinas (flavon-3-oles). Al menos seis compuestos derivados de las catequinas se encuentran presentes en cantidades superiores al 1 % (sobre su peso): 3-galato de (-)-epigallocatequina, (-)-epigallocatequina, 3-galato de (-)-epicatequina, (-)-epicatequina, (+)-galocatequina, y

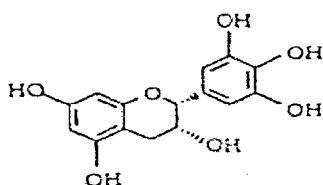
(+)-catequina (Varnan y Sutherland, 1997). En la Figura 3, se muestran las estructuras de las catequinas del té.



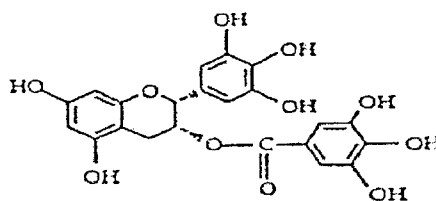
(-)-Epicatechin



(-)-Epicatechin-3-gallate



(-)-Epigallocatechin



(-)-Epigallocatechin-3-gallate

**Figura 3.** Estructuras químicas de las catequinas del té verde.

**Fuente:** Katillar *et al.* (2000)

Los principales flavanoles representa el 30 - 50 % de los sólidos en té verde y disminuye hasta 10 % después del proceso del té negro, con el consecuente aumento de las teaflavinas 3 - 6 % y tearubiginas 10 - 30 % (Dreosti, 2000). Las tearubiginas suponen el 10 - 20 % del peso seco del té negro, pero debido a su relativa elevada solubilidad en agua caliente llega a comprender el 30 - 60 %

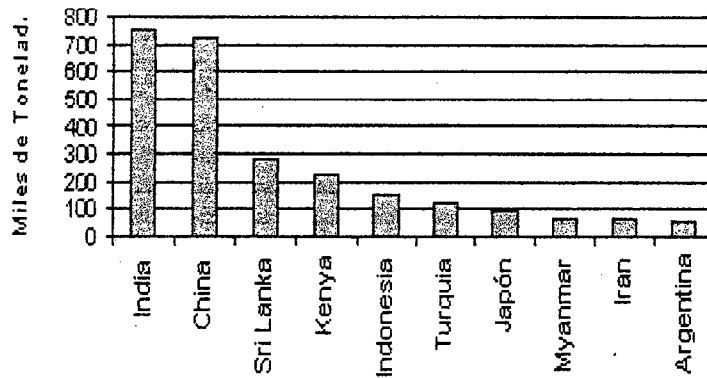
de los sólidos de la infusión de té preparado (Varnam y Sutherland, 1997).

El color amarillo rojizo intenso de una infusión de té negro es atribuible esencialmente a las teaflavinas y tearubiginas, mientras que la intensidad del sabor está en correlación con la tasa total de fenoles y con la actividad de las fenoloxidasas. En el té verde se inactivan las fenoloxidasas para evitar la oxidación de los flavanoles (Belitz y Grosch, 1988).

El color entre verdoso y amarillo limón del té verde obedece por consiguiente a la de los flavanoles y flavonas. En virtud de esta distinta preparación, los tés negro y verde, se diferencian químicamente en la composición de la fracción fenólica (Belitz y Grosch, 1988).

#### **e. Producción**

En el Perú se produce en las partes altas del valle del Alto Huallaga (La Divisoria) y en la convención (Huyro), también se producen en las tierras altas tropicales del Asia, Africa y América, China es el país más conocido por el té, pero Sri Lanka y la India producen la mayor cantidad del té de consumo mundial, también se consumen en Japón, Taiwan, Turquía, el sur de Rusia, Kenya, Brasil y Argentina (PROMPEX, 1997).



**Figura 4.** Producción mundial de hoja de té

## 2. Componentes funcionales

### a. Compuestos activos

En las hojas frescas de té y té verde, las catequinas son los principales polifenoles y están principalmente: (-)-epicatequina (EC), (-)-epigallocatequina (ECG), (-)-galato de epicatequina (EGC) y (-)-galato de epigallocatequina (EGCG). Recientemente estos componentes tienden a cautivar la atención del público en general debido a sus propiedades fisiológicas y antioxidantes (Horie y Kohata, 2000).

Las catequinas difieren ligeramente en su estructura química de otros flavonoides, pero comparten con ellos sus propiedades quemoprotectivas. Las catequinas más comunes son los ésteres gálicos. Todos estos compuestos se encuentran en los téis verdes (*Camelia sinensis*) y se cree que son responsables por los beneficios protectores de esta bebida (Komori, 1994).

En el Cuadro 2, se muestra el contenido de catequinas del té verde chino y japonés.

## **b. Bondades**

La capacidad del té verde para prevenir el cáncer está tan establecida, que los estudios actuales están probando, como posible terapia potencial contra el cáncer (Mazza, 1998; Gadow *et al.*, 1996).

Los potentes efectos antioxidantes del té verde inhiben la oxidación del LDL - colesterol en las arterias, la oxidación del LDL - colesterol desempeña un papel importante para contrarrestar la formación de aterosclerosis; y gracias a sus efectos antitrombóticos, puede ser eficaz en la prevención de algunas enfermedades cardíacas (Bratman y Kroll, 2001; Osada *et al.*, 2001).

Por su acción estimulante del sistema nervioso, pueden emplearse para aliviar tanto la fatiga física como la fatiga mental. Además puede contrarrestar los síntomas de un ataque de asma (Bratman y Kroll, 2001).

El té verde contiene, entre otros compuestos, bases xantinas, principalmente cafeína que actúa como estimulante del sistema nervioso, inhibiendo el sueño y reduciendo la sensación de fatiga. Se prescribe para contrarrestar la migraña, la soñolencia y la fatiga mental.

**Cuadro 2.** Composición de varios productos de té verde chino y japonés (mg catequina/100 mg de hoja seca).

Té verde	Catequinas media $\pm$ SEM						
	Total Catequinas	EGCG	EGC	ECG	EC	C	GCG
<b>Chino</b>							
Fu-Chien Mao-Fenng	20,20 $\pm$ 0,28	14,58 $\pm$ 0,28	0,54 $\pm$ 0,01	4,14 $\pm$ 0,08	0,67 $\pm$ 0,01	0,01 $\pm$ 0,002	0,27 $\pm$ 0,02
He-Nan Hsin-Yang Mao-Chien	22,66 $\pm$ 0,41	17,69 $\pm$ 0,28	0,58 $\pm$ 0,03	3,39 $\pm$ 0,19	0,62 $\pm$ 0,02	0,02 $\pm$ 0,001	0,37 $\pm$ 0,02
Hu-Pei He-Feng Fu-Hsi	20,74 $\pm$ 0,23	16,46 $\pm$ 0,21	0,46 $\pm$ 0,01	3,10 $\pm$ 0,07	0,47 $\pm$ 0,01	0,03 $\pm$ 0,002	0,21 $\pm$ 0,02
Chue-Chiag Longjing	15,75 $\pm$ 0,01	12,28 $\pm$ 0,05	0,29 $\pm$ 0,02	2,64 $\pm$ 0,03	0,47 $\pm$ 0,02	0,02 $\pm$ 0,01	0,32 $\pm$ 0,02
An-Hui Huang-Shan Yun Woo	11,61 $\pm$ 0,15	8,87 $\pm$ 0,11	0,10 $\pm$ 0,06	2,25 $\pm$ 0,02	0,23 $\pm$ 0,02	0,1 $\pm$ 0,01	0,16 $\pm$ 0,04
An-Hui Pi-Luo-Chun	12,38 $\pm$ 0,14	8,65 $\pm$ 0,08	0,24 $\pm$ 0,05	2,96 $\pm$ 0,23	0,35 $\pm$ 0,01	0,01 $\pm$ 0,002	0,17 $\pm$ 0,01
Bei-Jing Mo-Li-Hua	22,18 $\pm$ 0,97	16,45 $\pm$ 0,80	0,78 $\pm$ 0,06	3,63 $\pm$ 0,09	0,88 $\pm$ 0,13	0,01 $\pm$ 0,01	0,43 $\pm$ 0,03
Fu-Chien Hu-Chiu Mo-Li-Hua	16,22 $\pm$ 0,77	12,74 $\pm$ 0,55	0,51 $\pm$ 0,18	2,24 $\pm$ 0,05	0,43 $\pm$ 0,04	0,02 $\pm$ 0,004	0,29 $\pm$ 0,07
Ssu-Chuan Cheng-Tou Mo-Li-Hua	13,11 $\pm$ 0,10	10,00 $\pm$ 0,13	0,39 $\pm$ 0,03	2,10 $\pm$ 0,15	0,41 $\pm$ 0,06	0,03 $\pm$ 0,002	0,19 $\pm$ 0,01
Ssu-Chuan Yung-Chuan Mo-Li-Hua	18,58 $\pm$ 0,38	13,60 $\pm$ 0,28	0,60 $\pm$ 0,01	3,32 $\pm$ 0,07	0,79 $\pm$ 0,06	0,05 $\pm$ 0,001	0,22 $\pm$ 0,03
<b>Japonés</b>							
Osaka-Fu	8,92 $\pm$ 0,86	5,73 $\pm$ 0,67	0,57 $\pm$ 0,21	1,05 $\pm$ 0,07	0,19 $\pm$ 0,08	ND	1,38 $\pm$ 0,08
Aichi-Ken	16,36 $\pm$ 0,74	13,61 $\pm$ 0,51	0,72 $\pm$ 0,09	1,23 $\pm$ 0,07	0,57 $\pm$ 0,13	0,02 $\pm$ 0,004	0,22 $\pm$ 0,03
Kyoto Mai-Cha	21,59 $\pm$ 0,55	16,83 $\pm$ 0,55	0,90 $\pm$ 0,13	2,56 $\pm$ 0,16	0,93 $\pm$ 0,11	0,03 $\pm$ 0,002	0,35 $\pm$ 0,03
Shizuoka 1	15,89 $\pm$ 0,32	11,61 $\pm$ 0,22	0,65 $\pm$ 0,09	2,50 $\pm$ 0,18	0,90 $\pm$ 0,04	0,03 $\pm$ 0,01	0,21 $\pm$ 0,01

Fuente: Lin *et al.*,(1998)

Por otra parte, la teofilina (y en menor medida la cafeína) generan un aumento de la frecuencia y gasto cardiaco y coronario. Es un conocido broncodilatador prescrito para relajar el músculo liso de los conductos bronquiales en el tratamiento del broncoespasmo bronquial en la bronquitis y en el enfisema.

Otra metilxantina que se encuentra en el té es la teobromina. Esta actúa como diurético, vasodilatador, estimulante cardiaco y relajante en la musculatura lisa.

Los polifenoles llamados catequinas, entre los diversos estudios realizados han comprobado que poseen acción inhibitoria sobre la actividad de la uroquinasa, enzima necesaria para la reproducción de los tumores cancerosos (Hamilton-Miller, 2001).

El té verde contiene además sustancias que podrían proteger contra toxinas que poseen efectos carcinogénicos como la aflatoxina y la *Salmonella typhimurium* (Wolinsky *et al.*, 2000).

Se ha demostrado también cierto grado de protección contra las bacterias que causan la caries dental. La actividad de los bioflavonoides produce una importante disminución de la placa bacteriana, lo que justifica la utilización de extractos de té verde en la utilización de pasta dentífricas (Wolinsky *et al.*, 2000).

## B. HIERBA LUISA

### 1. Generalidades

#### a. El género

El género *Cymbopogon* de la familia graminaceae, tiene alrededor de setenta especies (Ceron *et al.*, 1996). Las características morfológicas de las especies del genero *Cymbopogon* son muy similares a sus partes vegetativas.



Figura 5. Planta de hierba luisa

Se conoce algunas variedades de este grupo de gramíneas por contener aromas característicos especialmente en las hojas como:

*Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon nardus*, *Cymbopogon flexuosus* y *Cymbopogon martini* (León, 1968).

### 1) *Cymbopogon nardus*

Es la especie de mayor importancia comercial; es de follaje verde claro, mide de 1 a 3 m, de alto se conoce dos tipos "Lenabatu" de Sri Lanka con hojas delgadas de márgenes duros y "Mahapangiri" llamado citronela de Java que da un aceite superior aunque su rendimiento es bajo (León, 1968).

### 2) *Cymbopogon citratus*

Crece en macollos compactos, hasta 2,0 metros de alto, formado por muchos tallos cortos que salen de rizomas pequeños. Los brotes de 20 a 100 centímetros de largo y uno a 1,5 centímetros de ancho, tienen los bordes duros y el nervio central fuerte en la sección basal (León, 1968).

### 3) *Cymbopogon martini*

Se cultiva en la India para la extracción del aceite, rico en geraniol, usado en jabonería por su olor a rosas y que se obtienen de la variedad "Motia". Otra variedad "Sofia",

produce el aceite de pasto jengibre, usado en perfumería (León, 1968).

## **b. Cultivo**

La hierba luisa se cultiva comercialmente para fines de extracción del aceite esencial, siendo la India el principal productor, seguido por Guatemala, China, Sri Lanka, Brasil, Argentina, Haití, Indonesia y Tailandia (PROMPEX, 1997).

### **1) Suelo**

Crece adecuadamente en una gran gama de suelos, su mayor productividad se da en suelos fértiles de textura media o ligera (franco a franco arenoso), y con buena capacidad retentiva de agua. En los suelos arenosos se tiene mayor producción de follaje pero menor aceite esencial. No tolera condiciones de mal drenaje. El pH del suelo puede estar entre 5 a 7,5 con pH menor a 5,0 debe considerarse la aplicación de enmiendas cálcicas (PROMPEX, 1997).

### **2) Clima**

Desarrolla en zonas con temperatura media entre 22 y 28° C. No se conoce limitaciones por bajas temperaturas nocturnas en el crecimiento de la planta, pero es necesario evaluar su efecto,

buscando mejor contenido o calidad del aceite esencial (PROMPEX, 1997).

Se encuentra en áreas con precipitaciones pluviales en el rango de 1500 a 4000 mm/año. Sin embargo, se espera que, las mejores condiciones estén alrededor de los 2000 mm/año con lluvias bien distribuidas (PROPEX, 1997).

### **c. Formas de uso**

Es una fuente comercial importante de aceites esenciales, tanto por el volumen como por la calidad de sus aromas, los que se destinan a la elaboración de bebidas (Reeves, 1975).

En nuestro medio, es usada en infusiones, de características sensoriales atractivas, conferido por el alto contenido de citral de 70 a 90 %. Además se conoce su uso medicinal, por sus propiedades digestivas y antineurálgicas (Cabieses, 1993).

Se intensificó su uso en la fabricación de jabones, en perfumería para servir de base en la elaboración de esencias costosas, como repelente de insectos y en la síntesis de varios productos químicos como mentol y ciertas vitaminas. Un uso popular en América y Asia es en la preparación de una tisana, llamada té de limón, usando hojas de *Cymbopogon citratus* (León, 1968).

#### **d. Composición química**

Diversas investigaciones fitoquímicas realizadas tanto en las hojas desecadas como en aceite esencial han permitido identificar los componentes como: monoterpenos, citronelol, geraniol, linaldol, triterpenos, sesquiterpenos,  $\beta$  - sitosterol (Cabieses, 1993).

#### **e. Producción**

Se encuentra en forma silvestre en la selva alta, Chanchamayo, Alto Huallaga y en la Costa de Huachipa. Así mismo se le encuentra vegetando en pequeños huertos a nivel nacional (Cerón *et al.*, 1996).

El principal productor de aceite esencial de hierba luisa (Lemmon grass oil), es la India, seguido de Guatemala. Otros países productores son China, Sri Lanka, Brasil, Argentina, Haití, Indonesia y Tailandia (PROMPEX, 1997).

## **2. Componentes funcionales**

### **a. Compuestos activos**

Algunos estudios sobre la hierba luisa (*Cymbopogon citratus*), comprobaron la presencia de mirceno, componente principal del aceite esencial, con propiedades analgésicas. Olaniyi *et al.*, (1975). Carvajal *et al.*, (1989), en su estudio farmacológico de las hojas de

*Cymbopogon citratus* encontró que una decocción al 10 ó 20 % mostró efectos hipotensores (en ratas), relacionada con la dosis que se administró por vía intravenosa, y cierto efecto diurético débil y antiinflamatorio cuando se administró de forma oral.

Sus hojas contienen aceite esencial cuyo rendimiento es del 0,2 a 0,5 % y excepcionalmente puede alcanzar el 5,0 % del material fresco, el cual está constituido por geranial y neral que son los componentes mayoritarios, además de geraniol, furfural, citronelal, metilheptona y mirceno, se han aislado otros compuestos de la planta como cariofileno, linalilacetato, limoneno, quercetina y rutina (Duke, 1992).

#### **b. Bondades**

La hierba luisa tiene un amplio uso en la medicina tradicional, se destaca como hipotensor, contra el catarro y la fiebre (Roig, 1988) antiséptico y antiasmático (Fook, 1980; Olaniyi *et al.*, 1975), estomáquico, antiulceroso y antiespasmódico (Hirechhorn, 1983).

Se ha comprobado que el *Cymbopogon citratus* por vía tópica en animales y en el hombre posee acción analgésica (Maluf y Assolant, 1985).

En la medicina tradicional se refiere que las hojas de *Cymbopogon citratus* tienen utilidad en los procesos artríticos (Carvajal *et al.*, 1989), empleadas en decocción. Además, se dice que aplicadas

tópicamente las hojas maceradas alivian el dolor de cabeza y de los ojos (Robineau, 1992).

### **C. ALIMENTOS FUNCIONALES**

La idea de los "alimentos funcionales" fue desarrollada en el Japón durante la década de 1980 como una necesidad para reducir el alto costo de los seguros de salud que aumentaban por la necesidad de proveer cobertura a una población cada vez mayor en edad, gracias a los avances en cuidado médico y una buena nutrición (Anónimo, 1991).

En Japón son definidos como cualquier alimento o ingrediente que tiene un impacto positivo en la salud de los individuos, eficiencia física, o estado mental, en adición a su valor nutritivo (Hardy, 2000).

De acuerdo a los japoneses los "alimentos funcionales" pueden clasificarse en tres categorías:

- a. Alimentos a base de ingredientes naturales.
- b. Alimento que deben consumirse como parte de la dieta diaria.
- c. Alimentos, que al consumirse cumplen un papel específico en las funciones del cuerpo humano, incluyendo:
  - Mejoramiento de los mecanismos de defensa biológica.
  - Prevención o recuperación de alguna enfermedad específica.
  - Control de las condiciones físicas y mentales.
  - Retardo en el proceso de envejecimiento (Arai, 1996).

Los alimentos funcionales, neutraceuticos, son términos nuevos que, en su más amplia concepción, se puede aplicar a cualquier alimento o sustancia que forma parte de un alimento y que proporciona algún beneficio a la salud o ejerce algún efecto terapéutico (Varnam y Sutherland, 1997).

La Comunidad Científica Europea establece que los alimentos funcionales deben ser alimentos no drogas; ellos no tienen efectos terapéuticos. Más bien su rol es reducir y prevenir enfermedades (Roberfroid, 2000), no dejan de ser alimentos, pero se han elaborado para aportar elementos específicos provechosos para la salud, que añaden a los nutrientes tradicionales que contienen de modo natural, se desarrollan nuevos alimentos capaces de mejorar las condiciones físicas y mentales (Aggett *et al.*, 1999).

Conscientes que los fundamentos científicos son indispensables, los principales responsables de la Comunidad Científica Europea, los organismos gubernamentales e intergubernamentales y la Industria de la agricultura y alimentación han creado un programa destinado a sentar las bases conceptuales para estos alimentos:

- Todos los alimentos funcionales tienen un denominador común: actúan de forma beneficiosa sobre una o varias funciones específicas del organismo, pero para obtener estos efectos es preciso integrarlos en la dieta habitual.
- Por regla general, los alimentos funcionales huelen y saben como sus equivalentes comunes y presentan el mismo aspecto que estos.

- Se admite ya que los alimentos funcionales poseen propiedades específicas que pueden aprovecharse en diferentes etapas de la vida.
- Debería probarse fehacientemente que la ingesta de dicho alimento en cantidades normales tiene un efecto fisiológico provechoso, como reducir la presión arterial, o que actúa positivamente sobre un indicador bioquímico, como el colesterol, a escala medible.
- Aunque los alimentos funcionales son susceptibles de mejorar la salud, hay que valorarlos en su justa medida y disfrutar de ello sabiendo que, si bien no son la panacea de todos los males, resultan beneficioso y aportar un complemento saludable a una dieta apropiada y un estilo de vida activo (Bellisle et al., 1998; Roberfroid, 2000).

#### **D. PERSPECTIVAS DE MERCADO**

El ingreso al tercer milenio, ha venido acompañado de incremento en las expectativas de vida y mayor cobertura de los cuidados de la salud, los consumidores están interesados en la nutrición como soporte en el control o prevención de enfermedades. En recientes estudios en el Reino Unido, Alemania y Francia se concluye que la dieta está más relacionada con la salud que los ejercicios o factores hereditarios (Hardy, 2000).

Hardy (2000), revela que, hasta el momento, en el mercado se valora hasta en 830 millones de libras y estima un mercado entre 6 a 60 billones de dólares, creciendo a una tasa anual de 5,0 %.

Aggett *et al.* (1999), reporta que existen 102 alimentos funcionales en nueve países en toda Europa. De las 114 propiedades anunciadas en los

productos, el 37 % se refería a la salud intestinal, el 26 % al control del colesterol y el 23 % a la resistencia a enfermedades y al sistema inmunológico.

## **E. ROL DE LOS RADICALES LIBRES Y ANTIOXIDANTES**

### **1. Radicales libres**

Los radicales libres son moléculas que contienen un electrón desapareado, siendo de interés biológico el óxido nítrico, dióxido, superóxido e hidropéroxilos (Thomas, 2000).

Una molécula estable contiene átomos con electrones emparejados mientras que una molécula inestable (un radical libre) tiene un electrón no emparejado o, lo que es lo mismo, libre. Estas moléculas inestables recorren nuestro cuerpo intentando robar un electrón con vistas a recuperar su estabilidad electroquímica, lo que las hace muy peligrosas para conseguirlo atacan moléculas estables. Una vez que el radical libre ha conseguido robar el electrón que necesita para emparejar su electrón libre, la otra molécula se convierte a su vez en un radical libre, iniciándose así un ciclo destructivo para nuestras células (Pryor, 1976).

Un radical puede ceder un electrón desapareado a un no radical o puede recibir un radical de otra molécula para construir una pareja de electrones. Con cualquier reacción que se verifique la especie no radical se transforma en radical libre que puede extender y propagar el daño, es una reacción en cadena que es capaz de automantenerse y

amplificarse. La reacción termina en una fase en que los radicales libres se consuman a través de una recombinación en procesos estables, es decir el proceso de parada de la reacción es en cadena (Pryor, 1976).

Para los organismos aerobios el oxígeno es un compuesto esencial, sin embargo, su reducción secuencial dentro de las células conduce a la formación de las llamadas especies reactivas del oxígeno, que son en su mayoría radicales libres. En el Cuadro 3, se muestra las características de las especies reactivas del oxígeno. Al formarse pueden interactuar rápidamente con moléculas orgánicas tales como las proteínas, lípidos, carbohidratos, e incluso con el ADN, provocando en ellas diversas alteraciones estructurales, que conducen a alteraciones de tipo funcional, y de esta manera la fisiología de las células y por consecuencia la de los organismos, se ve afectada. El estudio de los radicales libres ha permitido relacionarlos directamente con el desarrollo de diversas enfermedades de tipo neurodegenerativo (Alzheimer, Huntington, Parkinson), con la carcinogénesis, y con el envejecimiento (González *et al.*, 2000).

Las defensas antioxidantes de nuestro organismo son indispensables para preservar nuestra salud. La evidencia actual demuestra que patologías crónicas como arteriosclerosis y cáncer, las dos principales causas de muerte en países desarrollados, están asociadas a daño oxidativo. Lo mismo ocurre con las complicaciones de otras condiciones patológicas como artritis, diabetes, nefropatías y

demencias, y el proceso biológico del envejecimiento, que se aceleran en función de la magnitud del estrés oxidativo (Sohal, 1996).

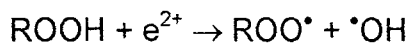
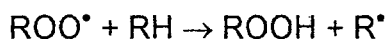
**Cuadro 3.** Especies reactivas del oxígeno y sus principales características.

Radical	Nombre	Características
$O_2^{\cdot -}$	<b>Superóxido</b>	Es muy reactivo en un medio hidrofóbico, pero no puede atravesar libremente las membranas biológicas, en condiciones fisiológicas pueden transformarse en peróxido de hidrogeno.
$\cdot OH$	<b>Hidroxilo</b>	Es el más reactivo y se le ha relacionado con el daño sufrido directamente al ADN, proteínas y lípidos.
$H_2O_2$	<b>Peróxido de hidrógeno</b>	No es un radical pero puede generarlos rápidamente al estar en contacto con iones metálicos, como el fierro y cobre.
$ONOO^{\cdot}$	<b>Peroxinitrito</b>	Se forma a partir de la reacción del radical superóxido con el ácido nítrico. Se le ha relacionado con la patología de varios desordenes neurodegenerativos, con la enfermedad de Alzheimer.
$O_2$	<b>Oxígeno simple</b>	Se forma como producto de la reacción del glutatión reducido y el radical superóxido, durante la lipoperoxidación. Juega un papel importante en los procesos de mutagenesis carcinogénesis, envejecimiento y desordenes degenerativos.

**Fuente:** González *et al.* (2000)

Durante el proceso de lipoperoxidación se forman otros compuestos (no radicales libres) que afectan otras estructuras celulares, éstos son principalmente hidroxialquenes, siendo el 4-OH-2,3-transnonenal uno de los más tóxicos. Los alquenes son compuestos que reaccionan con el ADN, inhiben la síntesis de proteínas y ARN, así como la reparación del ADN y se unen al glutatión disminuyéndose su capacidad protectora dentro de la célula (González *et al.*, 2000).

En el Cuadro 4, se muestra la cadena de reacciones en el proceso de lipoperoxidación.

**Cuadro 4.** Cadena de reacciones en el proceso de lipoperoxidación

**RH** – Acido poli-insaturado. **R<sup>•</sup>** – Radical lipídico. **ROO<sup>•</sup>** – Radical peróxilo.

**ROOH** – Radical hidroperóxido. **•OH** – Radical hidroxilo.

---

**Fuente:** González *et al.* (2000)

## 2. Antioxidantes

Las células presentan mecanismos de protección, de manera que los radicales libres derivados de la activación del oxígeno pueden ser transformados a productos menos tóxicos o no tóxicos. La protección de las células contra los radicales libres derivados del oxígeno comprenden no solo la captura de estos intermediarios a agresivos, sino también la prevención de su formación, la inhibición de su propagación y la reparación de las lesiones (González *et al.*, 2000).

La primera línea de defensa del organismo contra los radicales libres es la prevención, esto implica la acción de procedimientos que bloquean su formación, como sería la presencia de proteínas que se unen a metales (en particular hierro y cobre) lo que controla eficientemente la lipoperoxidación y la fragmentación del ADN, ya que

de esta manera se evita la participación de estos metales en las reacciones donde se producen las diferentes especies reactivas del oxígeno (Halliwell, 1991).

Los antioxidantes naturales son elementos esenciales para proteger de la oxidación a las macromoléculas biológicas en el cuerpo humano. Un antioxidante es una sustancia presente en los alimentos que disminuye significativamente los efectos adversos de las especies reactivas de oxígeno, especies reactivas de nitrógeno, o ambas sobre las funciones fisiológicas normales en humanos. (Nutrition Board, Institute of Medicine, National Academy of Sciences, 1998).

## **F. DISEÑO DE NUEVOS PRODUCTOS**

El primer término usado para este tipo de alimentos en los Estados Unidos fue el de "alimentos diseñados", utilizado en 1989 por el Dr. Herbert Pierson, Director del Programa de Alimentos Diseñados del Instituto Nacional del Cáncer, para describir aquellos alimentos que contienen naturalmente o que son enriquecidos con componentes químicos, biológicamente activos pero no nutritivos, provenientes de plantas (fitoquímicos), efectivos en la reducción de los riesgos al cáncer (Meyer, 1998).

La evaluación sensorial de los alimentos se constituye en la actualidad como una de las más importantes herramientas para el logro del mejor

desenvolvimiento de las actividades de la industria alimentaria, por su aplicación en el control de la calidad de los procesos, en el diseño y desarrollo de nuevos productos (Ureña y D'Arrigo, 1999).

Los nuevos productos alimenticios parecen originarse en la demanda del consumidor. Los grandes avances tecnológicos, combinados con la rápida modificación de los hábitos de consumo y los estilos de vida y con la mundialización, están contribuyendo a transformar las industrias de productos alimenticios y bebidas (Zaracostas, 1998).

## **1. Formulación**

La idea de la formulación de alimentos en base a los beneficios de salud que sus componentes no nutricionales podían proveer al consumidor, se ha convertido en una de mucho interés actual para las grandes compañías de alimentos (Best, 1997; Hollingworth, 1997).

El consumo de bebidas en general se ha alejado de su función básica de saciar la sed. Al igual que otros alimentos, las bebidas tienen un valor hedónico (procurar placer), y en ocasiones llegan a consumirse en cantidades que exceden las que serían necesarias para mantener la hidratación corporal (Hollingsworth, 2000).

En el Cuadro 5, se presentan algunos ejemplos de alimentos diseñados innovadores.

**Cuadro 5.** Algunos productos innovadores

<b>Alimento</b>	<b>Propiedades funcionales</b>
Leche y yogures fermentados con cultivos probióticos.	Facilita la digestión.
Margarina, yogurt, queso para untar.	Estereoles y estanoles de origen vegetal reducen el colesterol y disminuyen el riesgo de padecer afecciones cardíacas.
Huevos ricos en ácidos grasos esenciales omega – 3.	3 – 4 huevos por semana, proporcionan el aporte de ácidos grasos n – 3 recomendados para ayudar a reducir el riesgo de afecciones cardíacas.
Cereales para el desayuno.	El ácido fólico añadido podría ayudar a reducir el número de casos de bebés que nacen con espina bífida.
Pan, barra de cereales surtidos tipo muesli.	Las isoflavinas añadidas podrían ayudar a reducir el riesgo a la propensión a padecer cáncer de mama o próstata, afecciones cardíacas y osteoporosis.

**Fuente:** Bellisle *et al.* (1998); Aggett *et al.* (1999)

En la actualidad, el mercado nos ofrece una gran variedad de bebidas refrescantes. Muchas de ellas son carbonatadas, aunque el consumo de refrescos sin gas cada vez es mayor. Estos últimos son un grupo intermedio entre los refrescos y los zumos de fruta, ya que son mezcla de dos o más zumos con agua, junto con azúcares o edulcorantes, aromatizantes y acidulantes. También se les suele añadir ácido ascórbico como antioxidante y para enriquecer el producto en vitamina C (Zapelena, 2000).

Las bebidas deportivas son refrescos que se formulan para cubrir distintas necesidades asociadas con el ejercicio físico: bebidas para reponer líquidos, para facilitar la rehidratación tras una actividad física intensa o durante ella. Se conocen también como isotónicas y reponedoras de electrolitos. Este tipo de bebidas también incorporan hidratos de carbono como fuente de energía, y suelen incluir una mezcla de vitaminas, particularmente vitamina C, complejo B y E (Zapelena, 2000).

Otro tipo de bebidas refrescantes son las llamadas enriquecidas que contienen ciertos nutrientes (proteínas, minerales, vitaminas y fibra). Algunas se destinan a mercados específicos, como las bebidas de cola infantiles, que no contienen cafeína y contienen un alto nivel de calcio. Recientemente, también han aparecido en el mercado, las denominadas bebidas funcionales, algunas incluyen hipérico (o hierba de San Juan), ginseng, etc. (Hollingsworth, 2000).

Cabe recordar que los refrescos tienen un contenido elevado en azúcar y que el consumo de éstas bebidas en grandes cantidades conduce a un aporte calórico suplementario en forma de azúcar, lo que no es deseable para la salud. Por éste motivo, diferentes marcas comerciales, han puesto en el mercado bebidas "bajas en calorías" en las que el azúcar (sacarosa) se ha sustituido por un edulcorante de síntesis (Hollingsworth, 2000).

En general el valor nutricional de éstas bebidas es casi nulo. Sólo merece destacar el posible aporte de vitamina C en aquellas que se refuerzan con este nutriente (Hollingsworth, 2000).

## **2. Estabilidad de los alimentos**

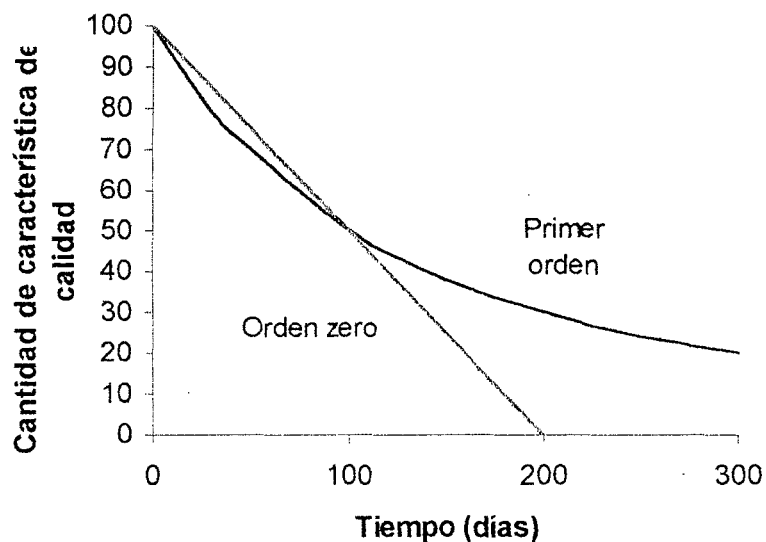
Todo alimento está sujeto a reacciones químicas, bioquímicas y microbiológicas que inducen a su alteración e influyen en la seguridad del alimento. La principal función es asegurar la estabilidad de los alimentos frente a las oxidaciones y el desarrollo y crecimiento de microorganismos, prolongando la vida útil del alimento y mejorando su seguridad (Belitz y Grosch, 1999).

La estabilidad de un producto alimenticio depende de cuatro factores: formulación, procesamiento, empaçado y condiciones de almacenamiento, para este último factor es importante conocer la cinética de pérdida de calidad a fin de poder realizar predicciones de vida útil. El periodo de vida útil de los alimentos procesados depende de factores extrínsecos y factores intrínsecos. Ambos factores se conjugan para definir el modo y la cinética de deterioro, el mismo que provoca alteraciones físicas, químicas, fisicoquímicas, enzimáticas o microbiológicas (Alvarez, 2001).

Torres (1991), reporta que las reacciones de deterioro que controlan la estabilidad de un alimento pueden ser de naturaleza:

- 1) Microbiológica, que induce a cambios químicos y organolépticos.
- 2) Químicas, como la oxidación, que genera modificaciones organolépticas y pérdida de nutrientes.
- 3) Bioquímicas, que incluyen reacciones enzimáticas, que modifican el color y el valor nutritivo.

Labuza (1993), reporta que la pérdida de calidad de la mayoría de los alimentos, según observaciones se ajustan a las siguientes ecuaciones generales como se presenta en la figura 6.



**Figura 6.** Cambio de calidad frente al tiempo.

Reducción de una característica deseable: 
$$-\frac{dA}{d\theta} = K(A)^n$$

Aumento de una característica deseable: 
$$-\frac{dB}{d\theta} = K(B)^n$$

En las que  $dA/d\theta$  o  $dB/d\theta$  es el cambio cuantitativo de A ó B con el tiempo, (A) ó (B) es la cantidad de medida de la característica a cualquier tiempo, k es la constante de velocidad en unidades apropiadas y n es el orden de reacción.

La mayor parte de los datos de vida útil para el cambio de una característica de calidad, basados en reacciones químicas o crecimiento bacteriano, siguen un modelo de orden zero ( $n=0$ ) o de primer orden ( $n=1$ ). Si los datos son de orden zero se obtiene una gráfica lineal mientras que si los datos son de primer orden se necesitan coordenadas semilogarítmicas, el efecto de orden de reacción sobre la magnitud de cambio se observa en la figura 6.

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **A. LUGAR DE EJECUCIÓN**

El trabajo de investigación se ejecutó entre los meses de agosto 2001 a Junio 2002 en los laboratorios de Análisis Sensorial, Espectrofotometría, Análisis de Alimentos y Microbiología de Alimentos de la Universidad Nacional Agraria de la Selva (UNAS). La UNAS se encuentra a 09° 17' 08" de Latitud Sur, a 75° 59' 52" de Longitud Oeste y a 665 msnm, en el distrito de Rupa Rupa, provincia de Leoncio Prado, departamento de Huanuco que presenta una temperatura y humedad relativa promedio de 24°C y 89%, respectivamente.

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

##### **1. Materia prima**

Té y hierba luisa recolectados de la Empresa Jardines del Té (Río Azul) y del caserío de Porvenir de Marona (Pumahuasi), respectivamente.

##### **2. Insumos**

Azúcar blanca, ácido 2-hidroxi-1,2,3-propano tricarbóxico de Riedel-de Haën y benzoato de sodio de Riedel-de Haën.

## C. MATERIALES

### 1. Materiales de laboratorio

Matraces de 100 y 250 mL, vasos de precipitación de 50 y 100 mL, pipetas de 1, 2, 5 y 10 mL, micropipetas de 0 - 25, 20 - 200, y 200 - 100  $\mu$ L, tips de 200 y 1000  $\mu$ L, cubetas de poliestireno (1 cm x 1 cm x 4.5 cm), fiolas de 25 y 50 mL, placas petri, gradillas, termómetro de - 10 a 100 °C, papel filtro N° 42, tubos de espectrofotometro, tubos de plástico de 15 y 50 mL.

### 2. Equipos de laboratorio

Balanza analítica, Ohaus. Co, Suiza; potenciómetro de Inolab. Co, Alemania; refractómetro de Labor MIN, Hungría; estufa de lab - line, USA; termostato de Labor MIN, Hungría; espectrofotometro UV-1201, Shimadzu Co, Japón; refrigeradora, Admiral, USA; sacudidora universal de Labor MIM, Hungría; autoclave de All American Co, USA.

### 3. Reactivos

(1,1-diphenyl-2-picrilhydrazyl (DPPH) de Sigma Chemical Co, USA; etanol absoluto de Riedel-de Haën Alemania; acetona de Chemical Diagnostic S.A. USA; sulfanilamide de Sigma Chemical Co, USA; nitrito de sodio de Sigma Chemical Co, USA; catequina de Sigma Chemical Co, USA; ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxilico (Trolox) de Sigma Chemical Co, USA; agar plate count de

Merck Co, Alemania; peptona de Merck Co, Alemania; ácido clorhídrico de Panreac Química S.A. España.

## D. MÉTODOS DE ANÁLISIS

### 1. Análisis de polifenol oxidasa (PPO)

Se utilizaron los métodos descritos por Subramanian *et al.* (1999); Fernandez *et al.* (2002), los cuales fueron acondicionados para el té, se hizo reaccionar 1,5 mL del extracto de té, luego se añadió guayacol a 0,1 M en  $H_2O_2$  a 0,1 M. Los resultados fueron expresados en % de inhibición de PPO.

### 2. Ensayo de secuestro del radical DPPH\*

Se utilizó el método descrito por Brand-Williams *et al.* (1995), se hizo reaccionar 50  $\mu$ L del extracto acuoso con 950  $\mu$ L de DPPH\* en etanol a 95 % y se monitoreó la absorbancia a 515 nm. Para la determinación de la capacidad antioxidante los resultados fueron expresados en % de DPPH\* remanente. En la etapa de la formulación fueron expresados en % de inhibición de DPPH\* y para la etapa de la pasteurización fueron expresados en función a la cantidad de  $\mu$ M de trolox equivalente, medido por el DPPH\* y ABTS\* radical, para los mejores tratamientos.

### 3. Polifenoles totales (TPP)

Se utilizó el método propuesto por Price y Butler (1977), se pesaron 1 g, de muestra seca de cada especie en estudio y fueron extraídas con 10 mL de acetona/agua (70/30), con agitación durante 20 minutos. Posteriormente se sometió a un centrifugado a 1500 rpm durante 10

minutos. Se tomo 1 mL del sobrenadante y se adiciono de 3 mL de  $\text{FeCl}_3$  a 0,1M en HCl 0,1N, luego 3 mL, de  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  a 0,008M. La reacción fue leída a 720 nm.

#### **4. Catequinas**

Se utilizo el método descrito por Sing *et al.* (1999), se hizo reaccionar 200  $\mu\text{L}$  de HCl a 30 %, 200  $\mu\text{L}$  de sulfanilamide 1% (w/v) en acetona adicionando 1000  $\mu\text{L}$  del extracto. Se registro la absorbancia luego de 1 h, de reacción a 425 nm.

#### **5. Pardeamiento**

Se utilizó el método descrito por Bradshaw *et al.* (2001), sé monitoreó el pardeamiento a 440 nm.

#### **6. Análisis microbiológicos**

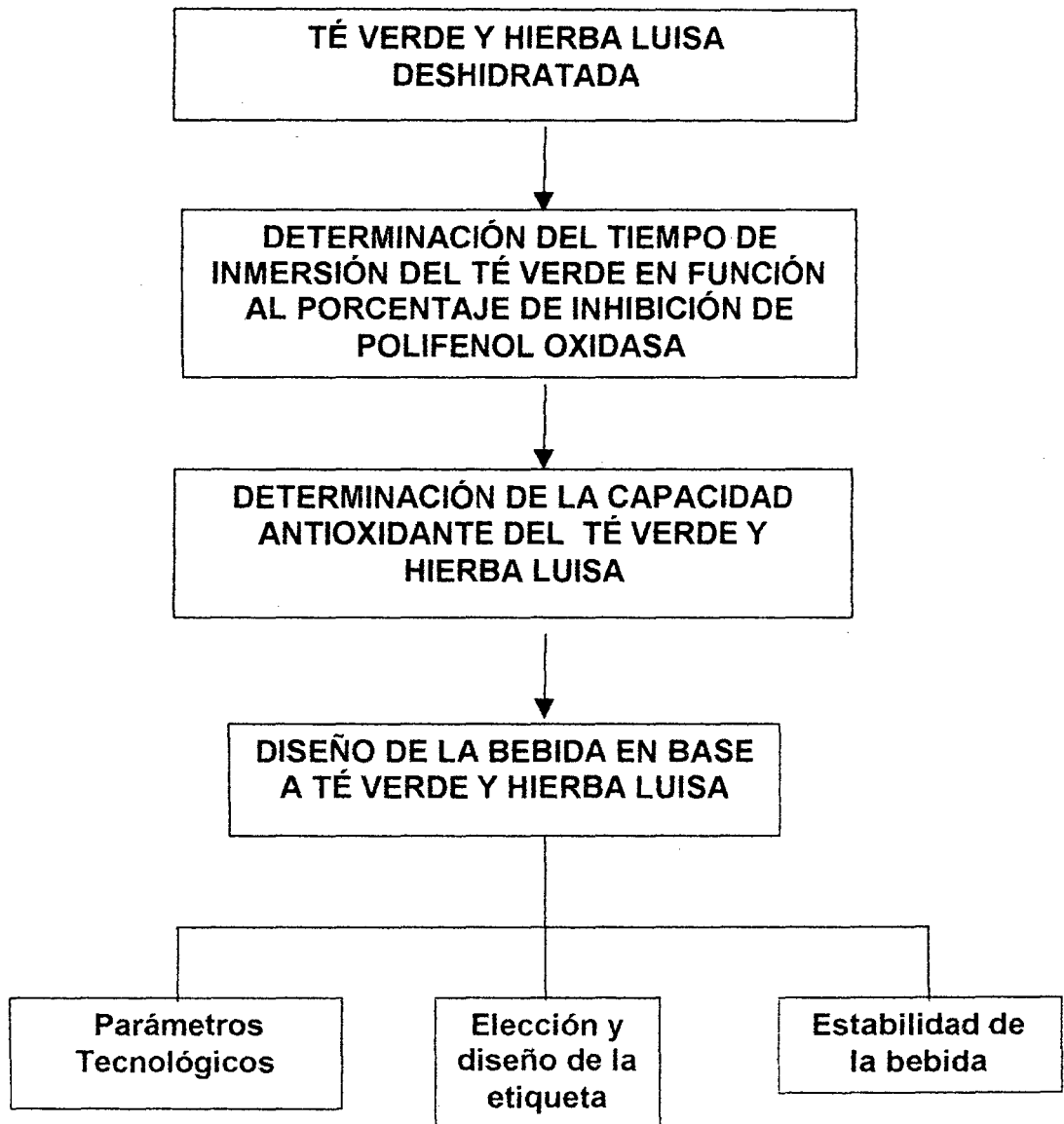
Se utilizó el método descrito por la ICMSF (1980), realizando la numeración de microorganismos mesofilos arebios viables, en la etapa de la pasteurización y estabilidad de la bebida, los resultados fueron expresados en ufc/mL.

#### **7. Análisis sensorial**

Se utilizó la prueba de Friedman de Múltiples Comparaciones para las diferentes formulaciones, que se encuentra descrito en Ureña y D'arrigo. (1999), evaluando los atributos de sabor (acidez y dulzor), olor y color.

## E. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

En la figura 7, se presenta las etapas del presente trabajo de investigación.



**Figura 7.** Etapas para el diseño y evaluación de la capacidad antioxidante *in vitro* de una bebida en base a té verde y hierba luisa.

## 1. TÉ VERDE Y HIERBA LUISA DESHIDRATADA

### a. Té verde

La cosecha procede de una recolección fina de las primeras tres hojas empezando por las guías.

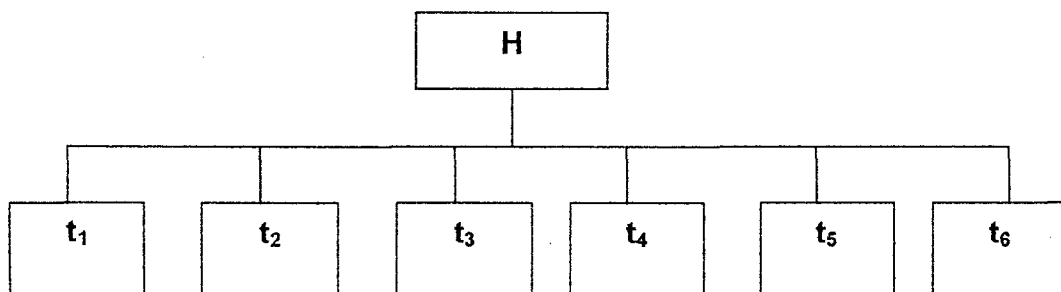
Las hojas tratadas fueron colocadas en una estufa para su deshidratación mediante aire forzado a una temperatura de 100°C. Las hojas deshidratadas fueron colocadas en un molino para su reducción de tamaño, se hizo uso de una criba de 1 mm de diámetro. Finalmente fueron deshidratadas por 40 min. Para obtener el té verde con una humedad de 6 a 9 % (Varnan y Sutherland, 1997).

### b. Hierba luisa

La cosecha se realizó cortando las hojas a 15 cm, por encima de la tierra. Las hojas cosechadas fueron sometidas a una selección separando las hojas secas de las frescas. Las hojas frescas fueron cortadas cada 10 cm, se les sometió a un lavado con agua potable, para luego ser deshidratadas a 100°C. Se procedió a una molienda y posteriormente fueron deshidratadas a 50°C por 6h (PROMPEX, 1997).

## 2. - DETERMINACIÓN DEL TIEMPO DE INMERSIÓN DEL TÉ VERDE EN FUNCIÓN AL PORCENTAJE DE INHIBICIÓN DE (PPO)

En la figura 8, se muestra la metodología desarrollada para la determinación del mejor tiempo de inmersión en función al % de inhibición de PPO, previamente se construyó una curva de espectro para determinar la máxima longitud de onda en el rango de 200 – 400 nm. El mejor tratamiento correspondió al mayor % de inhibición de PPO.



Donde:

H : Hoja

t1, t2, t3, t4, t5, t6 : Tiempo de inmersión 10, 20, 30, 40, 50, 60 s.

**Figura 8.** Diseño experimental para la determinación del mejor tiempo de inmersión.

### 3. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DEL TÉ VERDE Y LA HIERBA LUISA

#### a. Coeficiente de inhibición ( $IC_{50}$ )

Se determinó mediante análisis de regresión del % remanente versus la concentración de los extractos, que esta dado por la concentración del extracto acuoso de té verde, hierba luisa o de la bebida necesaria para inhibir el 50 % de radicales DPPH\* (Brand-Williams *et al.*, 1995).

#### b. Constante de velocidad $K_2$

Comprendió las siguientes etapas:

##### 1) Construcción de una curva de calibración DPPH\*

Se construyó una curva de calibración de DPPH\* para las siguientes concentraciones 1, 3, 10, 30, y 100  $\mu$ M, respectivamente.

##### 2) Cálculo de la constante de velocidad

Los valores de absorbancia obtenidos por la decoloración del DPPH\* para cada concentración de las soluciones de trabajo de las hojas en estudio, fueron analizados mediante interpolación en la curva de calibración de DPPH\*, estos valores fueron corridos a partir de las absorbancias versus el tiempo.

Los valores de **b** fueron plotados versus la concentraciones de las soluciones de trabajo al cabo de 10 minutos de reacción. La pendiente de la recta, corresponderá al valor de  $K_2$ .

Los valores de **b** fueron obtenidos mediante el programa STATISTICA/W ver 6.0 (Stat Soft Inc., 1993). Para él calculo del parámetro **b** se empleo el modelo matemático propuesto por Porto *et al.* (2000).

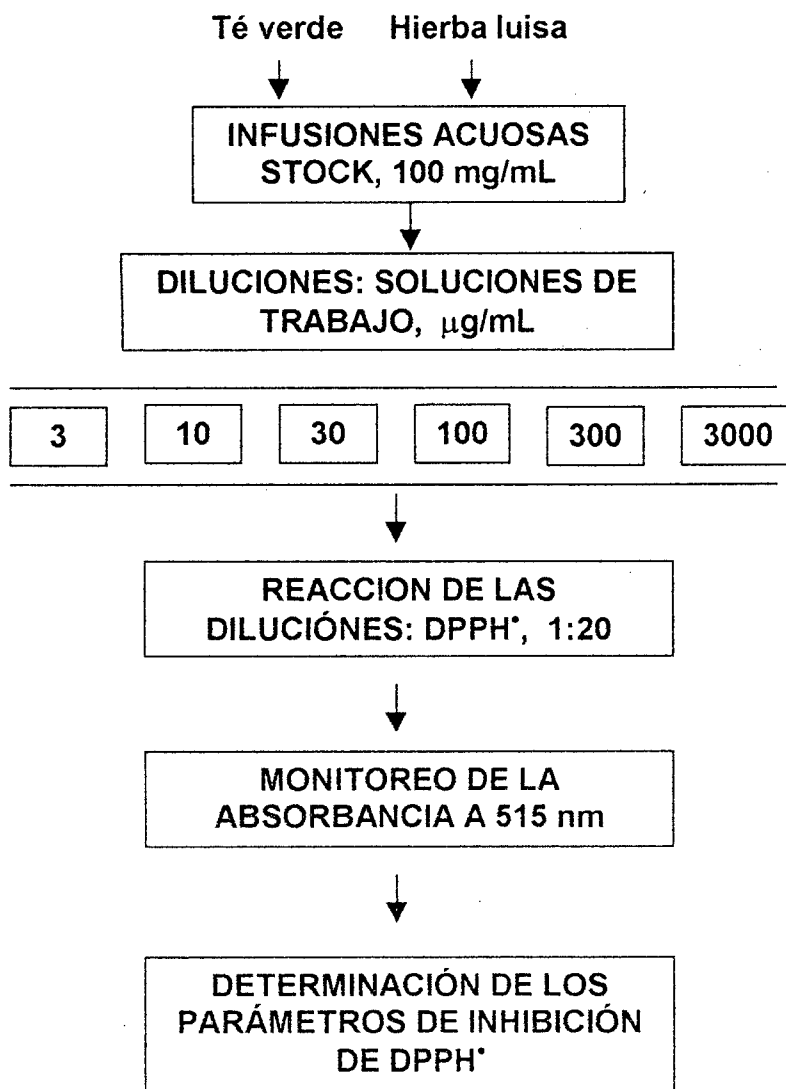
$$A = (t + 1)^b a$$

Donde: **A** es la absorbancia en algún tiempo *t*.

**a** y **b** son constantes.

**t** es el tiempo

En la figura 9, se muestra la metodología desarrollada para determinar la capacidad antioxidante del té verde y hierba luisa deshidratada.



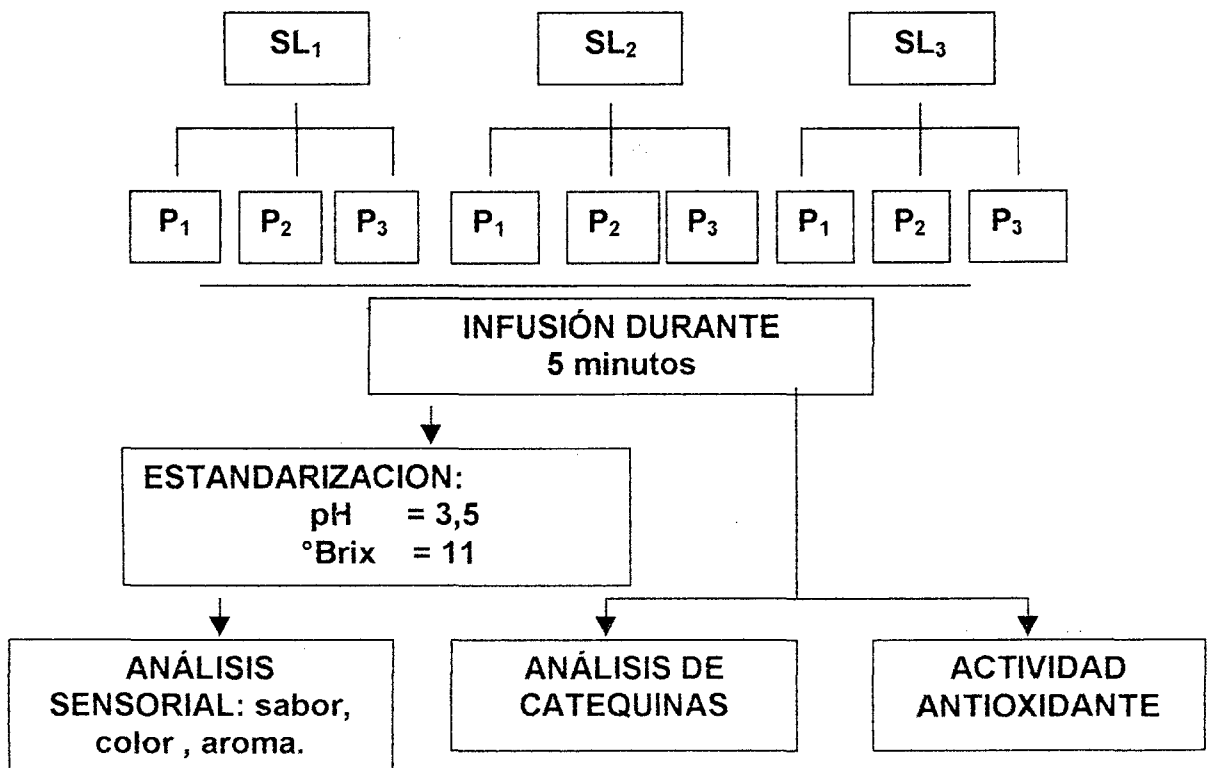
**Figura 9.** Diseño experimental para determinación de capacidad antioxidante del té verde y la hierba luisa.

#### 4. DISEÑO DE LA BEBIDA EN BASE A TÉ VERDE Y HIERBA LUISA

##### a. Formulación

##### 1) Relación té verde – hierba luisa

En la figura 10, se muestra la metodología desarrollada para determinar la relación más adecuada para la proporción té verde – hierba luisa.



Leyenda:

SL<sub>1</sub>, SL<sub>2</sub> y SL<sub>3</sub> : Té verde-hierba luisa 5,0, 7,5 y 10,0 mg/mL

P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub>, P<sub>3</sub> : Porcentaje de té verde 100%, 75% y 50%

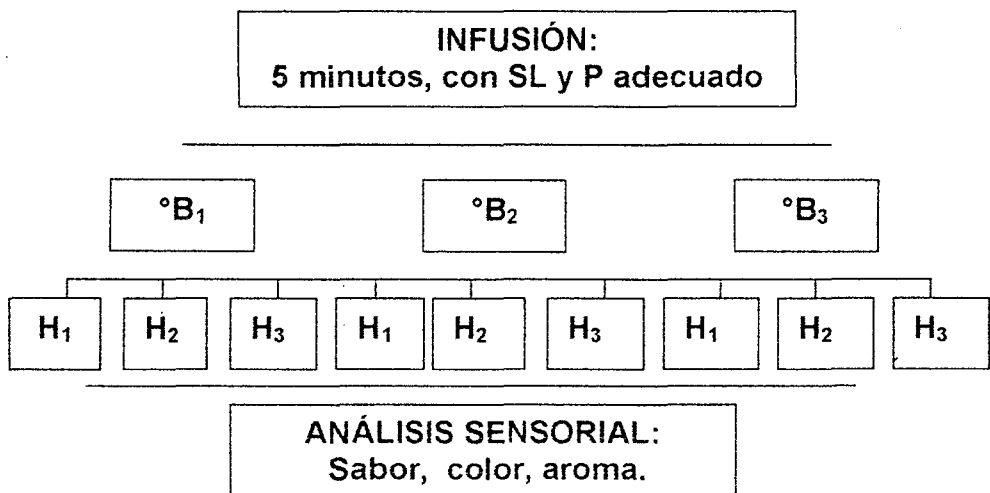
**Figura 10.** Diseño experimental para determinar la relación cantidad de té verde-hierba luisa: agua y proporción té verde: hierba luisa.

## 2) Elección del ácido para la bebida

En esta etapa la bebida fue sometida a una temperatura de 48° C durante 7 días, con la utilización de ácido cítrico y ascórbico. La selección del mejor ácido a utilizar para la formulación de la bebida corresponderá a la menor absorbancia registrada para los días de evaluación.

## 3) Determinación de la acidez y dulzor de la bebida

En la figura 11, se presenta la metodología desarrollada para determinar el mejor nivel de acidez y dulzor en combinación con ambos atributos.



**Leyenda:**

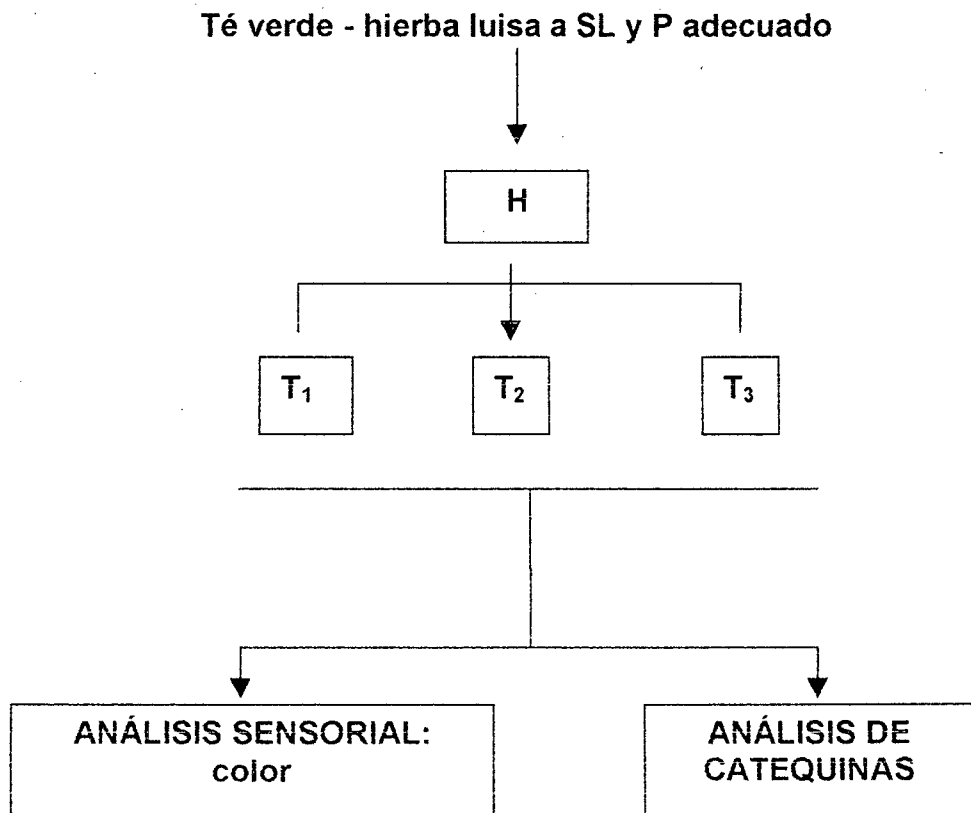
**°B<sub>1</sub>, °B<sub>2</sub> y °B<sub>3</sub>** : °Brix 7, 9 y 11, respectivamente.

**H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub> y H<sub>3</sub>** : pH 3,1, 3,3 y 3,5 respectivamente.

**Figura 11.** Diseño experimental para determinar el nivel de acidez y dulzor.

**b. Lixiviación**

En la figura 12, se presenta la metodología desarrollada para determinar el mejor tiempo de lixiviación.



**Leyenda:**

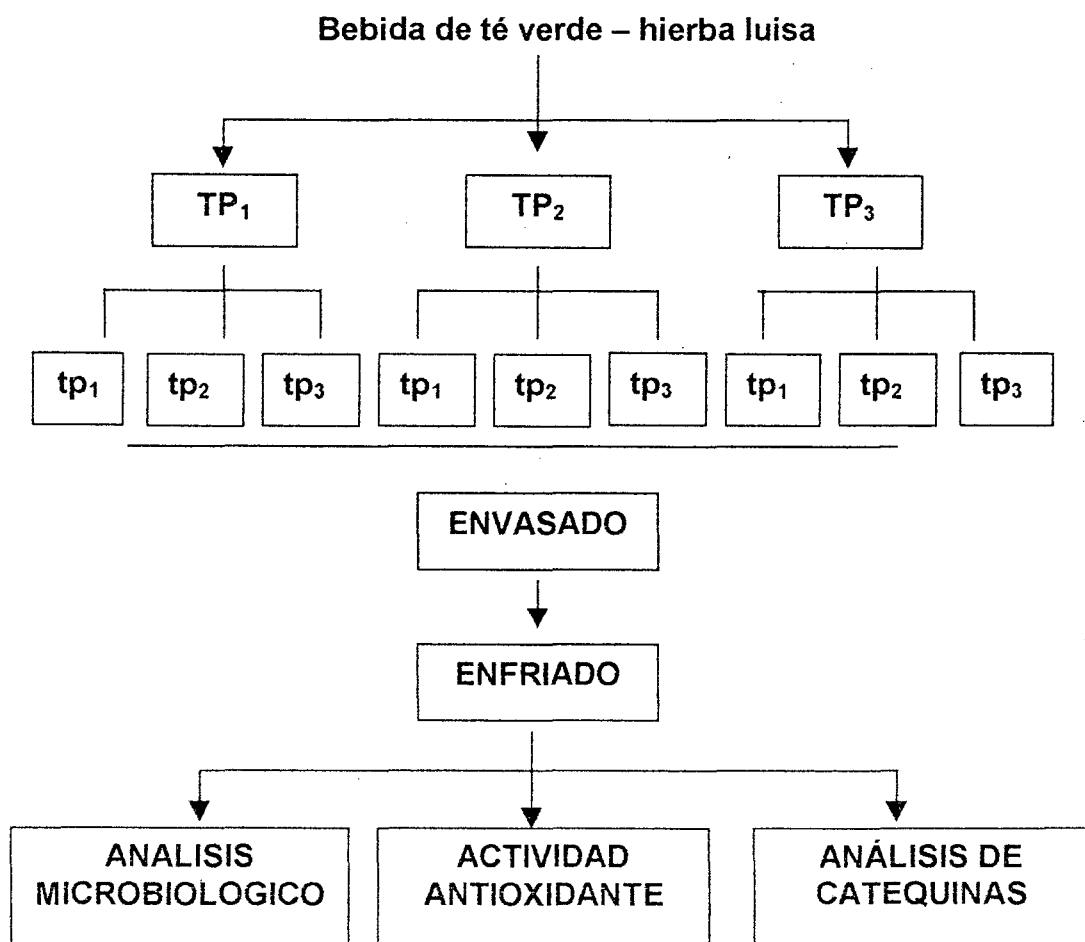
**T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub>, T<sub>3</sub>** : Tiempo de infusión 3, 5, 7 minutos

**H** : pH 3,5

**Figura 12.** Diseño experimental para determinar el tiempo de lixiviación.

### c. Pasteurización

En la figura 13, se presenta la metodología desarrollada para determinar la mejor temperatura y tiempo de pasteurización.



#### Leyenda:

TP<sub>1</sub>, TP<sub>2</sub>, TP<sub>3</sub> : Temperatura de pasteurización 85, 90 y 95°C

tp<sub>1</sub>, tp<sub>2</sub>, tp<sub>3</sub> : Tiempo de pasteurización 5, 10 y 15 minutos

**Figura 13.** Diseño experimental para determinar los baremos de pasteurización.

#### **d. Elección y diseño de la etiqueta**

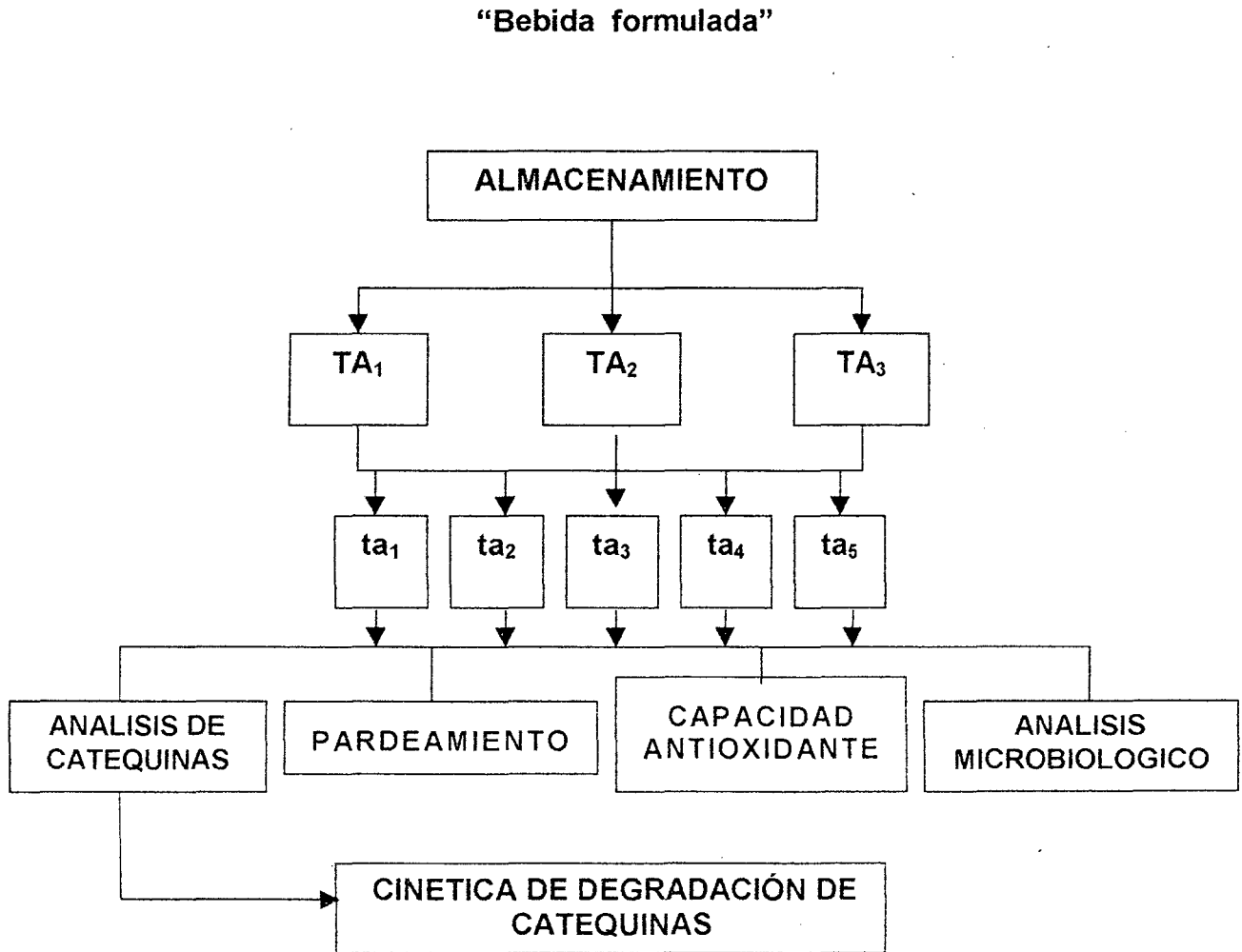
##### **1. Efecto de la luz**

En esta etapa se evaluó el efecto de la luz sobre el pardeamiento de la bebida durante 16 días a temperatura ambiente, durante el almacenamiento se utilizaron botellas con etiqueta y sin etiqueta.

Además, la etiqueta mostrará en detalle los ingredientes de la bebida, instrucciones de consumo, aspectos funcionales y nutricionales, nombre y dirección del fabricante, condiciones de almacenamiento.

e. Estabilidad de la bebida

En la figura 14, se presenta la metodología desarrollada para determinar la estabilidad de la bebida.



Leyenda:

$TA_1, TA_2, TA_3$  : Temperatura de almacenamiento 15, 25 y 35°C

$ta_1, ta_2, ta_3, ta_4, ta_5$  : Tiempo de almacenamiento 0, 4, 8, 12 y 16 días.

Figura 14. Diseño experimental para determinar la estabilidad de la bebida.

#### IV. RESULTADOS Y DISCUSION

##### A. DETERMINACIÓN DEL TIEMPO DE INMERSIÓN DEL TÉ VERDE EN FUNCIÓN AL % DE INHIBICIÓN DE POLIFENOL OXIDASA (PPO)

En la figura 15, se muestra la curva de espectro levantada para determinar la longitud de onda optima.

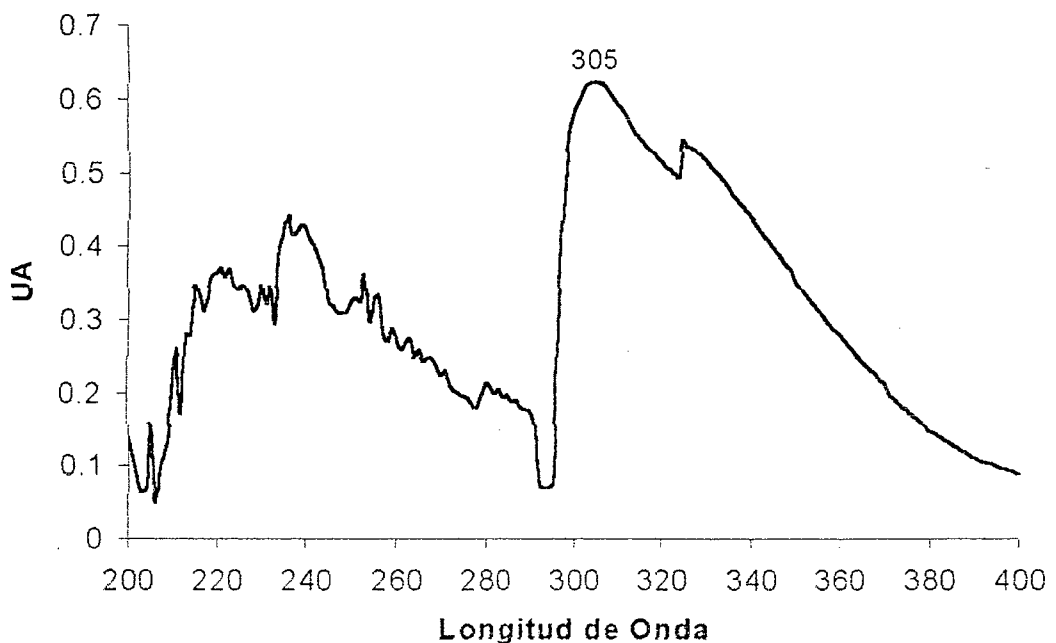
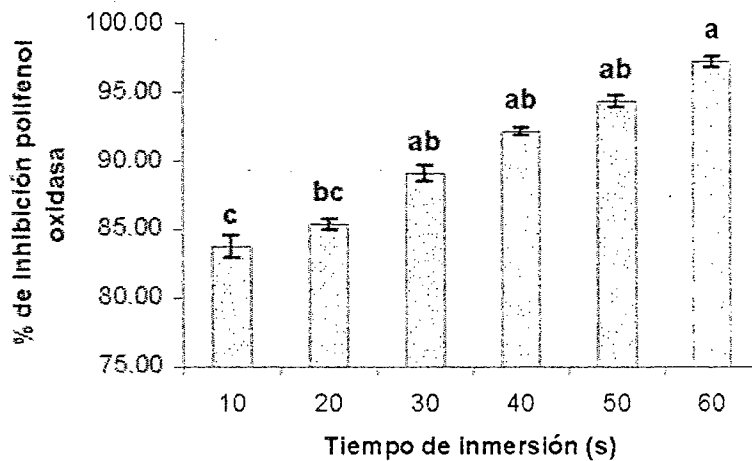


Figura 15. Curva de espectro para determinar la máxima longitud de onda.

Como se observa e639582\*1n la figura 15, la longitud de onda de máxima absorción determinada para el té verde fue de 305 nm, se tomó esta longitud por encontrarse aquí la mayor absorbancia. Yamaguchi *et al.*(2002), reporta una longitud de onda de 411 nm, para PPO, considerando una solución de la enzima pura y con utilización de catecol y buffer fosfato como reactivos.

En la figura 16, se muestra el porcentaje de inhibición para los diferentes tiempos de inmersión.



**Figura 16.** Porcentaje de inhibición de PPO. Datos expresados media $\pm$ SEM, n=3. Media unido a letras (a – c), diferencia estadística a  $p < 0.05$  según la prueba de Duncan.

De lo observado en la figura 16, para los diferentes tiempos de inmersión presentaron % de inhibición de polifenol oxidasa de 83,76, 85,74, 88,62, 91,83, 94,71 y 97,28 respectivamente, notándose una considerable disminución a medida que incrementa el tiempo de inmersión, para los resultados hubo diferencia estadística a  $p < 0.05$ , según la prueba de Duncan. Por lo que consideramos que a 60 s, inhibió un mayor % de la enzima presente en la solución extracto.

Otros autores reportan que para la manufactura del té verde es necesario un tiempo de blanqueado de 60 s (Balentine, 1992; Varnam y Sutherland, 1997).

## B. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DEL TÉ VERDE Y LA HIERBA LUISA

### 1. Ensayo de secuestro del radical DPPH<sup>•</sup>

En la figura 17, se muestra la decoloración del DPPH<sup>•</sup> cuando son secuestrados por un antirradical.

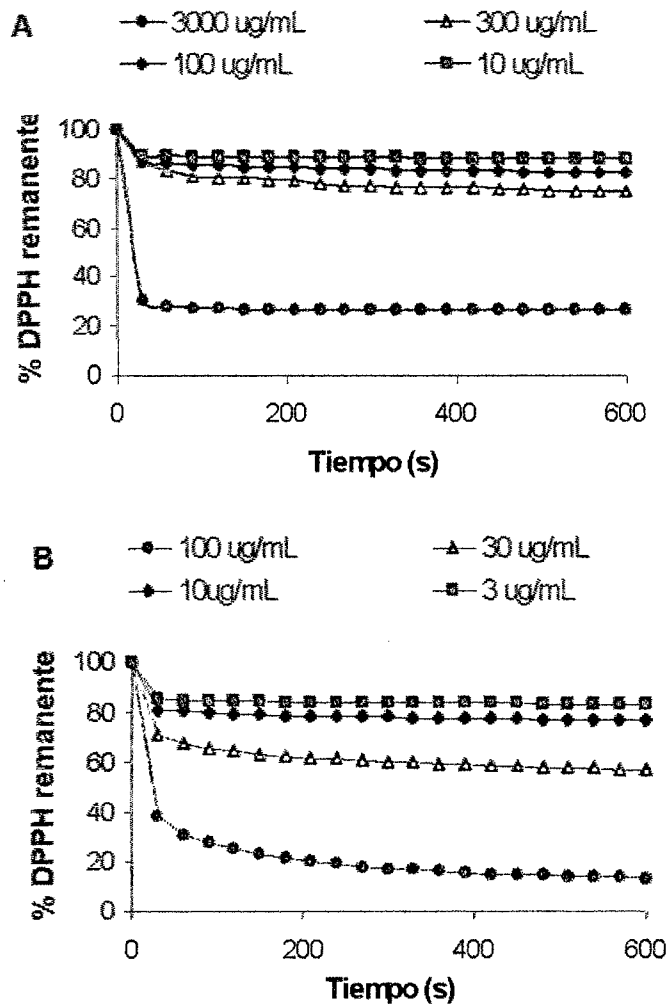


Figura 17. Capacidad de secuestro del radical DPPH<sup>•</sup> por las diferentes concentraciones de los extractos acuosos de hierba luisa (A) y té verde (B).

De la figura 17, los extractos de té verde mostraron tener mayor capacidad antioxidante que los extractos de hierba luisa, de aquí se observa que mayores concentraciones determinaron una mayor

capacidad de secuestro del radical DPPH<sup>\*</sup>, esto significa que habrá una disminución del % DPPH<sup>\*</sup> remanente a medida que aumenta el tiempo de reacción (Brand-Williams *et al.*, 1995; Okawa *et al.*, 2001). Las curvas de calibración de DPPH<sup>\*</sup>, DPPH<sup>\*</sup> – Trolox y ABTS<sup>+</sup> – Trolox se muestran en los Anexos – 1, 2 y 3 respectivamente. En el Anexo – 15, se muestra el secuestro del radical DPPH<sup>\*</sup> vs (AH)<sub>n</sub>.

En el cuadro 6, se muestra el contenido de polifenoles totales del té verde y hierba luisa.

**Cuadro 6.** Polifenoles totales del té verde y hierba luisa.

<b>Material</b>	<b>% Total Polifenoles (TPP)</b>
Té verde	14,11 <sup>a</sup>
Hierba luisa	0,81 <sup>b</sup>

Datos expresados en media, n = 3. (a – b) diferencia significativa a p<0.01, evaluado mediante una prueba de t, student's.

Del cuadro 6, se observa que existe evidente correlación entre los polifenoles y la capacidad antioxidante. Astill *et al.* (2001), reporta que el contenido total de polifenoles del té verde es 17,5 %. Singleton *et al.* (1999) y Astill *et al.*(2001), reportan que el contenido de polifenoles totales en el té verde fluctúa generalmente entre 11,9 a 25,2 %. En el Anexo - 4, se presenta la curva de calibración para polifenoles totales, los resultados fueron expresados en términos de porcentaje.

## 2. Coeficiente de inhibición (IC<sub>50</sub>)

En el cuadro 7, se muestran los valores del coeficiente de inhibición 50 % (IC<sub>50</sub>), calculados para té verde y hierba luisa.

**Cuadro7.** Valores de IC<sub>50</sub> de las muestras frente al radical DPPH\*

Material	IC <sub>50</sub> (μg/mL)	ARP*
Té verde	32,43±0,38 <sup>a</sup>	30,80
Hierba luisa	1345,79±47,05 <sup>b</sup>	0,74

Datos expresados en media±SEM, n = 3. (a – b) diferencia significativa a p<0,01, evaluado mediante una prueba de t, student's. Medido por el DPPH\*, durante 10 minutos. \*Poder Antiradical

La muestra de té verde es aproximadamente 40 veces más potente que la hierba luisa, los valores de IC<sub>50</sub> calculados para las muestras, fueron: té verde 32,43 μg/mL, hierba luisa 1345,79 μg/mL. Otros trabajos de investigación realizados para muestras liofilizadas de té verde, té oolong y té negro fueron de 4,14; 27,02 μg/mL y 47,12 μg/mL respectivamente (Yokozawa *et al.*, 1998). En los Anexos – 7 y 8, se presentan las curvas para calcular el IC<sub>50</sub> del té verde y hierba luisa. La variabilidad del coeficiente de inhibición 50% entre el té verde estudiado y los reportados por otros autores probablemente se deba al método usado, muestras provenientes de zonas diferentes, tiempo de cosecha que varía entre 14 y 17 % y el tipo de proceso para la obtención del té verde (Singh *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2001).

El té verde es un excelente recurso de polifenoles antioxidantes especialmente del grupo de flavanoles, componentes conocidos como catequinas del té verde (Zhu *et al.*, 1997). Las mejores catequinas de té verde son la (-) –epicatequina, (-) – epicatequingalato, (-) – epigalocatequina y (-) – epigalocatequingalato (Katiyar *et al.*, 2000). Así mismo Cook y Samman (1996), indican que el té verde contiene flavonoides que son metabolitos secundarios y se encuentran ampliamente distribuidos en esta planta.

### 3. Constante de velocidad $K_2$

En el cuadro 8, se presenta los valores obtenidos por la aplicación del modelo multiplicativo.

**Cuadro 8.** Determinación de los coeficientes obtenidos por la aplicación del modelo multiplicativo en el té verde y hierba luisa.

Té verde $\mu\text{g/mL}$	$B^*$	A	$R^2$
100	0,241 $\pm$ 0,0010	102,79	0,9997
30	0,076 $\pm$ 0,0014	101,12	0,9915
10	0,034 $\pm$ 0,0024	99,69	0,9117
3	0,023 $\pm$ 0,0023	99,67	0,8431
<b>Hierba luisa</b>			
$\mu\text{g/mL}$			
3000	0,188 $\pm$ 0,012	96,60	0,9432
300	0,042 $\pm$ 0,0005	102,96	0,9985
100	0,026 $\pm$ 0,0011	101,11	0,9820
10	0,016 $\pm$ 0,0017	100,34	0,9142

( \* ) expresado en términos de valor absoluto obteniéndose una ecuación lineal determinado por el modelo multiplicativo.

En esta etapa es importante que los resultados obtenidos por la aplicación del modelo presente una linealidad, debido a la relación existente entre  $IC_{50}$  y el ARP determinado, de lo contrario los datos tomados inicialmente indicaran que las concentraciones tomadas no son las más adecuadas (Brand-Williams *et al.*, 1995; Espin *et al.*, 2000; Porto *et al.*, 2000).

**Cuadro 9.** Constante de segundo orden ( $K_2$ ) para las reacciones entre el DPPH<sup>•</sup> y los extractos de las muestras.

Extractos	$K_2$ (mg/mL) <sup>-1</sup> Ln (s) <sup>-1</sup>
Té verde	2,30±0,018 <sup>a</sup>
Hierba luisa	0,06±0,003 <sup>b</sup>

Datos expresados en media±SEM, n=3. diferencia significativa a  $p<0,01$ , evaluado mediante una prueba de t, student's.

Los extractos de té verde demostraron tener mayor capacidad de secuestro de radical (RSC) que la hierba luisa. Espin *et al.*(2000), reporta para antioxidantes sintéticos como el BHT un ( $K_2$ ) de 0,05 (mg/mL)<sup>-1</sup> (s)<sup>-1</sup>, lo que demuestra que estos extractos son mejores secuestradores de radicales libres que el antioxidante sintético.

En la figura 18, se muestra la constante de proporción de primer orden (**b**), que presenta una linealidad para ambas muestras. Se observa que el té verde presenta una mayor pendiente que la hierba luisa esto significa que el té verde es unas 38 veces más rápido sé secuestrar al

radical DPPH'. Cao *et al.* (1997) y Silva *et al.* (1991), reportan que las catequinas del té verde son capaces de ceder o donar un átomo de hidrógeno o un electrón a las cadenas de iniciación de radicales libres.

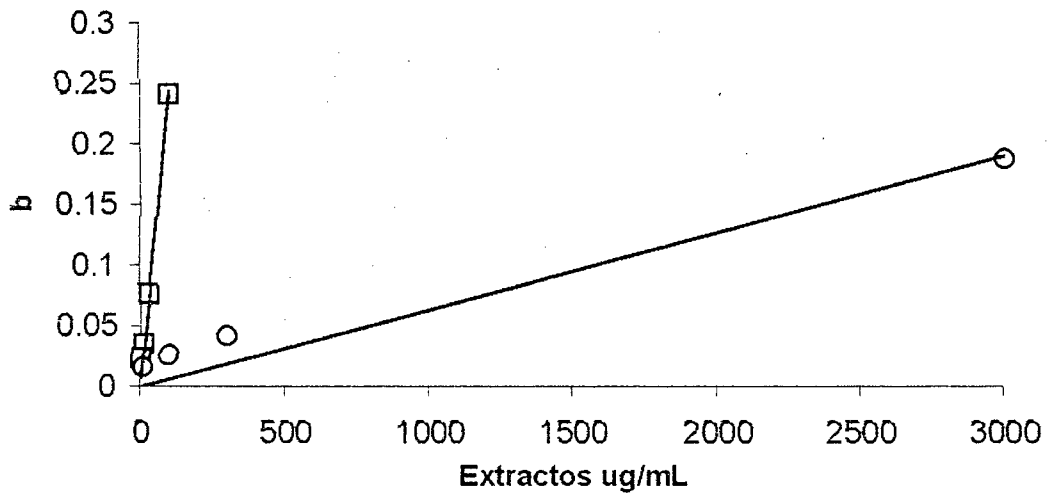


Figura 18. Constante de velocidad de primer orden (b) sobre la concentración del extracto: (o) hierba luisa, (□) té verde.

Los resultados para nuestro experimento se encuentran en el siguiente orden té verde > hierba luisa, de los ensayos realizados el valor de  $(K_2)$  para el té verde fue 2,3 y para la hierba luisa  $0,06 \text{ (mg/mL)}^{-1} \text{Ln (s)}^{-1}$ . Espin *et al.* (2000), reportan valores de la constante de segundo orden en muestras liofilizadas de *Aronia melanocarpa*, Elliot, *Prunus spinosa*. L, *Fragaria ananassa*. Duch, *Sambucus nigra*. L de 0,70, 0,20, 0,03 y  $0,008 \text{ (mg/mL)}^{-1} \text{(s)}^{-1}$  respectivamente. En el Anexos – 9 y 10, se presentan las curvas para determinar el  $K_2$ , del té verde y hierba luisa.

## C. DISEÑO DE LA BEBIDA EN BASE A TÉ VERDE-HIERBA LUISA

### a. Formulación

#### 1) Relación té verde – hierba luisa

En el cuadro 10, se muestra el contenido de catequinas totales en las diferentes formulaciones té verde – hierba luisa.

**Cuadro10.** Contenido de catequinas totales en las diferentes formulaciones.

Formulaciones	mg/mL	Proporción		Catequinas totales mg/100mL
		% TV	% HL	
SL <sub>3</sub> P <sub>1</sub>	10,0	100	0	67,55±1,54 <sup>a</sup>
SL <sub>2</sub> P <sub>1</sub>	7,50	100	0	50,20±0,96 <sup>b</sup>
SL <sub>3</sub> P <sub>2</sub>	10,0	75	25	47,22±1,87 <sup>c</sup>
SL <sub>2</sub> P <sub>2</sub>	7,50	75	25	37,99±1,30 <sup>d</sup>
SL <sub>1</sub> P <sub>1</sub>	5,0	100	0	34,04±0,77 <sup>e</sup>
SL <sub>3</sub> P <sub>3</sub>	10,0	50	50	24,42±0,65 <sup>f</sup>
SL <sub>1</sub> P <sub>2</sub>	5,0	75	25	23,50±0,97 <sup>f</sup>
SL <sub>2</sub> P <sub>3</sub>	7,50	50	50	18,19±1,08 <sup>g</sup>
SL <sub>1</sub> P <sub>3</sub>	5,0	50	50	12,41±2,08 <sup>h</sup>

Datos expresados en media±SEM, n=3, unido por letras (a - h) difieren estadísticamente a p<0.05, según la prueba de Duncan.

Como se puede apreciar en el cuadro 10, las formulaciones evaluadas (SL<sub>3</sub>P<sub>1</sub>, SL<sub>2</sub>P<sub>1</sub>, SL<sub>3</sub>P<sub>3</sub>) presentan variación y decrecen gradualmente conforme disminuye el contenido de té verde. Arts *et al.* (2000) reportaron para un experimento similar

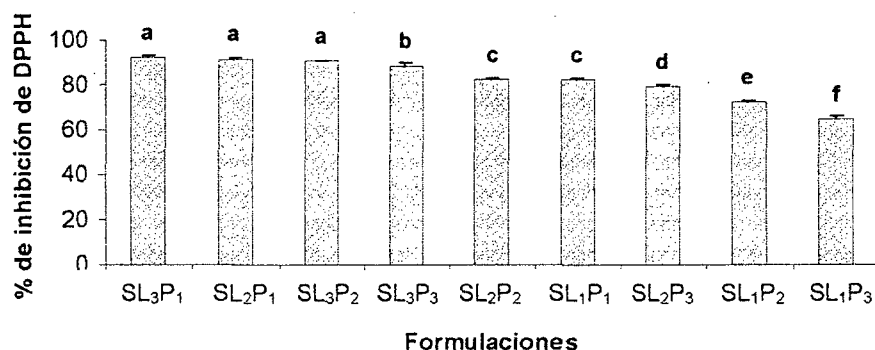
en un rango de 2 a 4 g de té negro/200 mL, que la concentración de catequinas se incrementa proporcionalmente a medida que se adiciona té. Este mismo efecto es lo que observamos para nuestras muestras. En el Anexo - 5, se presenta la curva de calibración para catequinas, los resultados fueron expresados en mg de catequina/100 mL. En el Anexo - 6, se muestra el desarrollo del color sulfanilamide - catequina.

El contenido de catequinas en las demás formulaciones presenta una disminución por debajo de la mitad que cuando se encuentran como té verde sólo. El aporte mayoritario de catequinas proviene del té verde, el aporte de catequinas de la hierba luisa es insignificante, esto significa que no adiciona al contenido de catequinas, produciéndose más bien un efecto inhibitorio entre los componentes del té verde y la hierba luisa.

En la figura 19, se muestra el porcentaje de inhibición del DPPH' frente a los antirradicales presentes en las formulaciones. Realizada mediante la prueba de Duncan a  $p < 0,05$  se encuentra diferencia estadística.

El porcentaje de inhibición de las nueve formulaciones decrece en el orden como se muestra en la figura 14, los valores son 91,14; 91,76; 90,53; 88,63; 82,22; 82,15; 79,13; 72,01 y 64,38 % respectivamente.

Estos resultados pueden explicar que mayores concentraciones presentan mayores porcentajes de inhibición para secuestrar a los radicales DPPH\* (Brand-Williams *et al.*, 1995).



**Figura 19.** Porcentaje de inhibición del DPPH\* de las diferentes formulaciones de té verde-hierba luisa, monitoreada en 1 min.

En los cuadros 11, 12 y 13, se presentan los resultados de las evaluaciones sensoriales de los atributos sabor, color y olor de las diferentes formulaciones, siguiendo la cartilla de evaluación sensorial Anexo – 11, evaluado según la prueba de Friedman de Múltiples Comparaciones.

En el cuadro 11, se muestra la calidad sensorial para el sabor. Siendo los tratamientos iguales estadísticamente a  $p < 0,05$ , según la prueba de Friedman de múltiples comparaciones, de los resultados mostrados de las formulaciones (SL<sub>3</sub>P<sub>3</sub> y SL<sub>3</sub>P<sub>2</sub>), estadísticamente son mejores respecto a las otras formulaciones, numéricamente la (SL<sub>3</sub>P<sub>3</sub>) es mejor que la (SL<sub>3</sub>P<sub>2</sub>) debido a que presenta mejor media respecto a las demás.

**Cuadro 11.** Evaluación sensorial del atributo sabor en diferentes formulaciones.

Formulaciones	mg/mL	Proporción		Característica de calidad (Sabor)
		% TV	% HL	
SL <sub>3</sub> P <sub>3</sub>	10,0	50	50	6,78 <sup>a</sup>
SL <sub>3</sub> P <sub>2</sub>	10,0	75	25	5,78 <sup>ab</sup>
SL <sub>2</sub> P <sub>3</sub>	7,5	50	50	5,44 <sup>bc</sup>
SL <sub>1</sub> P <sub>3</sub>	5,0	50	50	5,33 <sup>bc</sup>
SL <sub>1</sub> P <sub>2</sub>	5,0	75	25	5,22 <sup>bc</sup>
SL <sub>3</sub> P <sub>1</sub>	10,0	100	0	4,67 <sup>bc</sup>
SL <sub>2</sub> P <sub>1</sub>	7,50	100	0	4,47 <sup>bc</sup>
SL <sub>2</sub> P <sub>2</sub>	7,50	75	25	4,33 <sup>c</sup>
SL <sub>1</sub> P <sub>1</sub>	5,0	100	0	2,78 <sup>d</sup>

Datos expresados en media unidos por letras (a - d), estadísticamente los tratamientos son iguales a  $p < 0,05$

**Cuadro 12.** Evaluación sensorial del atributo color en las diferentes formulaciones.

Formulaciones	mg/mL	Proporción		Característica de calidad (Color)
		% TV	% HL	
SL <sub>3</sub> P <sub>3</sub>	10,0	50	50	9,00 <sup>a</sup>
SL <sub>3</sub> P <sub>2</sub>	10,0	75	25	7,44 <sup>b</sup>
SL <sub>2</sub> P <sub>3</sub>	7,5	50	50	7,11 <sup>b</sup>
SL <sub>1</sub> P <sub>3</sub>	5,0	50	50	6,22 <sup>c</sup>
SL <sub>1</sub> P <sub>2</sub>	5,0	75	25	4,56 <sup>d</sup>
SL <sub>3</sub> P <sub>1</sub>	10,0	100	0	4,00 <sup>e</sup>
SL <sub>2</sub> P <sub>1</sub>	7,50	100	0	2,78 <sup>f</sup>
SL <sub>2</sub> P <sub>2</sub>	7,50	75	25	2,33 <sup>g</sup>
SL <sub>1</sub> P <sub>1</sub>	5,0	100	0	1,56 <sup>h</sup>

Datos expresados en media unidos por letras (a - h), estadísticamente los tratamientos son diferentes a  $p < 0,05$ .

**Cuadro 13.** Evaluación sensorial del atributo olor en las diferentes formulaciones.

Formulaciones	mg/mL	Proporción		Característica de calidad (Olor)
		% TV	% HL	
SL <sub>3</sub> P <sub>3</sub>	10,0	50	50	8,00 <sup>a</sup>
SL <sub>3</sub> P <sub>2</sub>	10,0	75	25	6,78 <sup>b</sup>
SL <sub>2</sub> P <sub>3</sub>	7,5	50	50	5,89 <sup>bc</sup>
SL <sub>3</sub> P <sub>1</sub>	10,0	100	0	5,33 <sup>cd</sup>
SL <sub>2</sub> P <sub>1</sub>	7,5	100	0	5,33 <sup>de</sup>
SL <sub>2</sub> P <sub>2</sub>	7,5	75	25	4,78 <sup>e</sup>
SL <sub>1</sub> P <sub>3</sub>	5,0	50	50	4,33 <sup>e</sup>
SL <sub>1</sub> P <sub>1</sub>	5,0	100	0	2,44 <sup>f</sup>
SL <sub>1</sub> P <sub>2</sub>	5,0	75	25	2,11 <sup>f</sup>

Datos expresados en media unidos por letras (a - f), estadísticamente los tratamientos son diferentes a  $p < 0,05$ .

Los resultados obtenidos de la evaluación sensorial de las diferentes formulaciones en los tres atributos: sabor, color y olor se muestran en los Anexos – 12, 13 y 14.

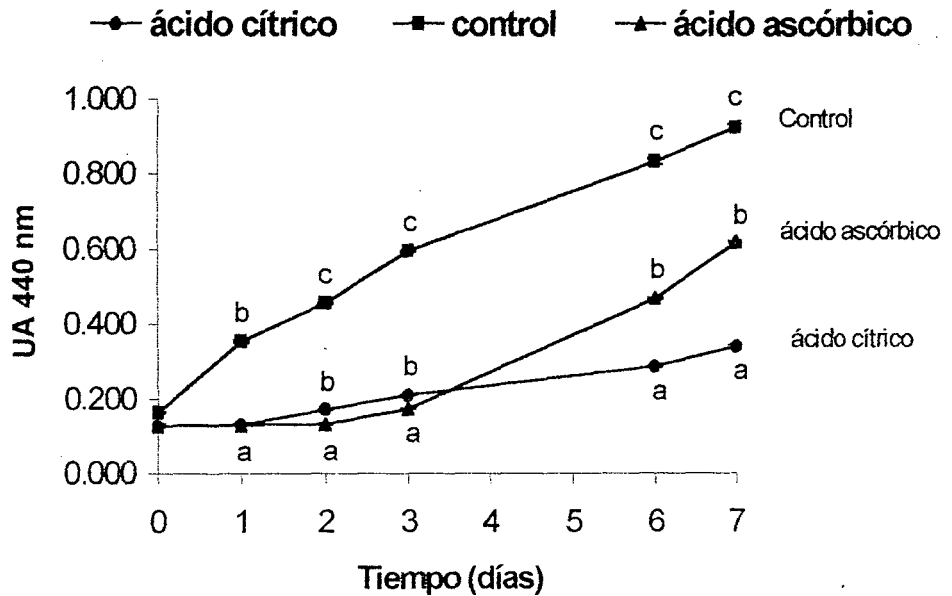
En los cuadros 12 y 13, se muestra las características de las formulaciones en cuanto al color y olor, estos tratamientos estadísticamente son diferentes según la prueba de Friedman de múltiples comparaciones a  $p < 0,05$ , demostrando que la (SL<sub>3</sub>P<sub>3</sub>) es mejor que las otras formulaciones.

De los resultados obtenidos hasta esta etapa se determina que la formulación SL<sub>3</sub>P<sub>3</sub> (10 mg/mL; 50% de té verde y 50% de hierba luisa), ha presentado una mayor aceptación para los

atributos sensoriales por lo que se eligió esta formulación, para pasar a la siguiente etapa. Estas concentraciones obtenidas concuerdan con lo reportado por Arts *et al.* (2000), quien reporta una concentración de 10 mg/mL.

## 2) Elección del ácido para la bebida

En la figura 20, se muestra el efecto del ácido cítrico y ascórbico sobre el pardeamiento de la bebida.



**Figura 20.** Efecto del ácido cítrico y ácido ascórbico sobre el pardeamiento de la bebida. Datos expresados como media $\pm$ SEM, n=3. Media unido por letras (a – c), diferencia significativas a  $p < 0,05$  según la prueba de duncan.

En la figura 20, se observa que existe pardeamiento en el control desde el día 1. La muestra con ácido cítrico induce a un pardeamiento desde el día 2, mientras que la muestra con

ácido ascórbico desde el día 3. Nuestros resultados muestran que el ácido cítrico induce a un pardeamiento de la bebida en menos tiempo que el ácido ascórbico lo que significa que este último actúa en los primeros días como un antioxidante después del día 4, actúa como un prooxidante. Este mismo efecto encontraron Podmore *et al.* (1998) y Herbert *et al.* (1996), quienes reportaron que la presencia de ácido ascórbico como un ingrediente tiende a actuar como un antioxidante y un prooxidante.

Chen *et al.* (1998), reportaron que el ácido ascórbico presenta un efecto protector a corto plazo; por lo que se considera que para efectos de almacenamiento es conveniente usar ácido cítrico antes que ácido ascórbico. Asimismo Chen *et al.* (1998), reportaron que para condiciones *in vivo* la presencia de ácido ascórbico es importante debido a que tiende a estabilizar las catequinas, en el intestino el pH es neutro o ligeramente alcalino, la presencia de ácido ascórbico puede prevenir particularmente la degradación o epimerización de las catequinas del té verde antes de su absorción.

De los resultados obtenidos consideramos que para efectos de la formulación de la bebida es conveniente utilizar ácido cítrico ya que permite la estabilidad de las catequinas en el tiempo.

### 3) Determinación de la acidez y dulzor de la bebida

En los cuadros 14 y 15, se muestran los resultados de la evaluación sensorial de los atributos de acidez y dulzor, los tratamientos incluyen valores de pH y °Brix, estos resultados fueron evaluados estadísticamente y se encontró diferencias significativas a  $p < 0,05$  según la prueba de Friedman de Múltiples Comparaciones.

**Cuadro 14.** Evaluación sensorial del atributo acidez.

Tratamientos	Descripción		Característica de calidad (Ácido)
	pH	° Brix	
H <sub>1</sub> B <sub>1</sub>	3,1	7,0	8,00 <sup>a</sup>
H <sub>1</sub> B <sub>2</sub>	3,1	9,0	6,78 <sup>b</sup>
H <sub>2</sub> B <sub>1</sub>	3,3	7,0	5,89 <sup>b</sup>
H <sub>2</sub> B <sub>1</sub>	3,3	9,0	5,33 <sup>c</sup>
H <sub>1</sub> B <sub>3</sub>	3,1	11,0	5,33 <sup>c</sup>
H <sub>3</sub> B <sub>1</sub>	3,5	7,0	4,78 <sup>d</sup>
H <sub>2</sub> B <sub>3</sub>	3,3	11,0	4,33 <sup>d</sup>
H <sub>3</sub> B <sub>2</sub>	3,5	9,0	2,44 <sup>de</sup>
H <sub>3</sub> B <sub>3</sub>	3,5	11,0	2,11 <sup>e</sup>

Datos expresados en media unidos por letras (a - e), estadísticamente los tratamientos son diferentes a  $p < 0,05$ .

De los resultados mostrados en el Cuadro 14, se observa que la muestra ajustada a un pH 3,1 obtuvo una mayor aceptación respecto a los demás tratamientos.

**Cuadro 15.** Evaluación sensorial del atributo dulzor.

Tratamientos	Descripción		Característica de calidad (Dulzor)
	° Brix	pH	
H <sub>3</sub> B <sub>2</sub>	11,0	3,3	8,33 <sup>a</sup>
H <sub>3</sub> B <sub>1</sub>	11,0	3,1	7,89 <sup>ab</sup>
H <sub>3</sub> B <sub>3</sub>	11,0	3,5	7,22 <sup>b</sup>
H <sub>2</sub> B <sub>3</sub>	9,0	3,5	5,11 <sup>c</sup>
H <sub>2</sub> B <sub>2</sub>	9,0	3,3	4,89 <sup>c</sup>
H <sub>2</sub> B <sub>1</sub>	9,0	3,1	4,11 <sup>d</sup>
H <sub>1</sub> B <sub>3</sub>	7,0	3,5	3,00 <sup>e</sup>
H <sub>1</sub> B <sub>2</sub>	7,0	3,3	2,44 <sup>ef</sup>
H <sub>1</sub> B <sub>1</sub>	7,0	3,1	2,00 <sup>f</sup>

Datos expresados en media unidos por letras ( a - f ), estadísticamente los tratamientos son diferentes a  $p < 0,05$ .

En el cuadro 15, se muestra que las muestras ajustadas a 11 °Brix, alcanzaron mayor aceptación que los otros tratamientos; por lo que consideramos que la bebida deberá ser ajustada a un pH de 3,1 y 11° Brix. Varnam y Sutherland (1997), reportan un pH palatable para refrescos acidificados con ácido cítrico entre 3,08 y 5,4. En cuanto al dulzor Ortega, (1988) y Carmona (1990), reportan que el contenido de azúcar expresado en ° Brix para un néctar de papayita de monte y cocona fue 12 y 14° Brix respectivamente.

## b. Lixiviación

En esta etapa se tomó en cuenta el contenido de catequinas y la evaluación sensorial de la bebida (color).

En el cuadro 16, se muestra el contenido de catequinas en la etapa de lixiviación. El contenido de catequinas totales de la bebida fue evaluada estadísticamente y se encontró diferencia a  $p < 0,05$ , según la prueba de Duncan.

**Cuadro 16.** Cantidad de catequinas totales durante la lixiviación a diferentes tiempos.

Tratamientos	Tiempo de lixiviación (minutos)	Catequinas totales	
		mg/100mL	
		pH 3.5	pH 6.8
Ht <sub>3</sub>	7,0	39,74±0,91 <sup>a</sup>	23,85±1,08
Ht <sub>2</sub>	5,0	36,18±0,71 <sup>b</sup>	25,14±0,67
Ht <sub>1</sub>	3,0	33,16±1,03 <sup>c</sup>	19,49±0,87

Datos expresados como media±SEM, n = 3. Diferencia estadística según Duncan a  $p < 0,05$

De los datos mostrados en el cuadro 16, se observa que a un tiempo de 7 minutos se obtuvo un mayor contenido de catequinas esto significa que hay un incremento a medida que aumenta el tiempo de lixiviación. Este mismo efecto se observa cuando se lixivía té negro a los 5 minutos alcanza su máximo contenido de catequinas luego comienza la degradación de las mismas (Arts *et al.*, 2000).

Este incremento de catequinas durante el tiempo de lixiviación probablemente sea por el ajuste del pH a 3,5, considerando que las catequinas son más estables a pH ácido (Zhu *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 1998). El incremento de las catequinas se observa a pH 3,5, más no así a pH 6,8, este último alcanza un mayor contenido de catequinas a los 5 minutos y luego se degradan.

Los resultados de la evaluación sensorial se presentan en el cuadro 17, los tratamientos fueron evaluados mediante la prueba de Friedman de Múltiples Comparaciones, encontrándose que los tratamientos son iguales a  $p < 0,05$ .

**Cuadro 17.** Evaluación sensorial para el color durante la lixiviación a diferentes tiempos.

Tratamientos	Tiempo de lixiviación	Característica de calidad
	Min	Color
Ht <sub>3</sub>	7,0	2,44 <sup>a</sup>
Ht <sub>2</sub>	5,0	1,89 <sup>bc</sup>
Ht <sub>1</sub>	3,0	1,67 <sup>c</sup>

Datos expresados en media unidos por letras (a - c), estadísticamente los tratamientos son iguales a  $p < 0,05$ .

De los resultados presentados en el cuadro 17, se observa que los panelistas no detectaron diferencias entre los tratamientos. Del que se deriva que el color es una característica sensorial muy importante en el té verde. Los flavanoles especialmente la EGCG y la EGC juegan un rol importante en el color y la calidad de té verde

durante la deshidratación. La formación del color marrón en las infusiones probablemente resulta de la oxidación de los flavanoles determinado por los ensayos de polifenoles totales y análisis por HPLC (Wang *et al.*, 2000).

De lo evaluado en esta etapa se considera que en 7 minutos, desarrolla un mayor contenido de catequinas y un mejor color según la prueba sensorial.

### **c. Pasteurización**

Para esta etapa se consideró el contenido de catequinas, la estabilidad microbiológica, la capacidad antioxidante de los mejores tratamientos.

En el cuadro 18, se muestran los resultados de la cantidad de catequinas durante la pasteurización de los diferentes tratamientos con respecto a la temperatura y tiempo.

Los efectos de la pasteurización en la elaboración de la bebida en base a té verde-hierba luisa, muestran una pérdida de catequinas a medida que se incrementa la temperatura y el tiempo del tratamiento térmico. Esta pérdida está relacionada con la estabilidad de las catequinas durante la pasteurización. Chen *et al.* (2001), reportaron que las catequinas son relativamente estables a pH 3 y 4, pero a pH 5 y 6 la degradación es grande durante el

autoclavado (120° C/20 min), de 80 % de pérdida de las catequinas del té verde.

**Cuadro 18.** Contenido de catequinas presentes en los tratamientos durante la pasteurización.

Tratamiento	Descripción		Catequinas totales mg/100mL
	T° C	Tiempo (min)	
TP <sub>1</sub> tp <sub>1</sub>	85	5	35,71±2,15 <sup>a</sup>
TP <sub>2</sub> tp <sub>1</sub>	90	5	32,79±0,84 <sup>b</sup>
TP <sub>1</sub> tp <sub>2</sub>	85	10	32,42±0,51 <sup>bc</sup>
TP <sub>2</sub> tp <sub>2</sub>	90	10	30,83±1,24 <sup>cd</sup>
TP <sub>1</sub> tp <sub>3</sub>	85	15	29,66±1,01 <sup>ed</sup>
TP <sub>3</sub> tp <sub>1</sub>	95	5	28,97±0,57 <sup>edf</sup>
TP <sub>2</sub> tp <sub>3</sub>	90	15	28,65±0,84 <sup>ef</sup>
TP <sub>3</sub> tp <sub>2</sub>	95	10	27,16±0,96 <sup>fg</sup>
TP <sub>3</sub> tp <sub>3</sub>	95	15	26,36±0,79 <sup>g</sup>

Datos expresados en media±SEM, n=3, unido por letras ( a – g ) difieren estadísticamente a p<0,05, según la prueba de Duncan.

De los resultados mostrados en el cuadro 18, se observa que a menor temperatura y tiempo de pasteurización se encontró mayor cantidad de catequinas. Los tratamientos con menor pérdida de catequinas fueron: TP<sub>1</sub>tp<sub>1</sub>, TP<sub>2</sub>tp<sub>1</sub> y TP<sub>1</sub>tp<sub>2</sub>, estos tratamientos tuvieron pérdidas de catequinas de 9 a 18 %.

Chen *et al.* (2001), reportaron este mismo efecto cuando sometió las botellas de "Japanese tea" en agua a 98 °C/7h, las pérdidas fueron del 20%, pero no encontró mayores pérdidas cuando sometió las muestras a 37 °C/7h.

En el cuadro 19, se muestra la estabilidad microbiológica de los diferentes tratamientos.

**Cuadro 19.** Estabilidad microbiológica de los tratamientos después de la pasteurización

Tratamientos	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>
TP <sub>1</sub> tp <sub>1</sub>	<10 ufc/mL	<10 ufc/mL	<10 ufc/mL
TP <sub>1</sub> tp <sub>2</sub>	<10 ufc/mL	<10 ufc/mL	<10 ufc/mL
TP <sub>1</sub> tp <sub>3</sub>	<10 ufc/mL	<10 ufc/mL	<10 ufc/mL
TP <sub>2</sub> tp <sub>1</sub>	<10 ufc/mL	<10 ufc/mL	<10 ufc/mL
TP <sub>2</sub> tp <sub>2</sub>	<10 ufc/mL	<10 ufc/mL	<10 ufc/mL
TP <sub>2</sub> tp <sub>3</sub>	<10 ufc/mL	<10 ufc/mL	<10 ufc/mL

Datos expresados en media n=2, no superior a 10 ufc/mL para una numeración de microorganismos mesofilos aerobios viables (NMMAV)

Los resultados demostraron para la (NMMAV), no excede a 10 ufc/mL; lo que significa que la pasteurización y los extractos de té verde contienen efectos antimicrobianos para inhibir el crecimiento de estos organismos. Scalbert (1991), reporta los efectos tóxicos de los taninos sobre los microorganismos. Así mismo Hara y Watanabe (1989), reportan los efectos tóxicos de los flavanoles y teaflavinas sobre algunos microorganismos como *Bacillus subtilis*,

*Bacillus stearothermophilus*, *Clostridium botulinum* y *Desulfotomaculum nigrificans*.

De los análisis microbiológicos, el tratamiento TP<sub>2</sub>tp<sub>1</sub> mostró tener menor cantidad de microorganismos que el tratamiento TP<sub>1</sub>tp<sub>1</sub> a pesar de tener un mayor contenido de catequinas por lo que se atribuye al efecto temperatura como el factor importante para inhibir el crecimiento de los microorganismos.

De los resultados de catequinas, se seleccionaron tres mejores tratamientos con la mayor cantidad de este componente comparado con los análisis microbiológicos.

Para la selección de la bebida se realizó una prueba de capacidad antioxidante los resultados se muestran en el cuadro 20.

**Cuadro 20.** Capacidad antioxidante para los tres mejores tratamientos.

Trat.	Descripción		Radical	
	T° C	Min.	DPPH*	ABTS*
			μM trolox equivalente/L	MM trolox equivalente/L
TP <sub>1</sub> tp <sub>1</sub>	85	5	10,87±0,33 <sup>a</sup>	13,23±0,12 <sup>b</sup>
TP <sub>2</sub> tp <sub>1</sub>	90	5	10,65±0,41 <sup>b</sup>	16,83±0,35 <sup>a</sup>
TP <sub>1</sub> tp <sub>2</sub>	85	10	10,15±0,47 <sup>c</sup>	

Capacidad antioxidante expresado en trolox equivalente para los tres mejores tratamientos, medido por el DPPH\* y ABTS+ radical. Datos expresados como media±SEM, n=3. Media unido a letras (a – b) para ABTS+ radical diferencia estadística a p<0,05 según la prueba de t. Media unido a letras (a – c) para DPPH\* radical diferencia estadística a p<0,05 según la prueba de Duncan.

De los resultados observados se muestra que la bebida formulada presenta una buena actividad antioxidante. Considerando la cantidad de té verde y hierba luisa utilizada. Campos y Lissi (1996), reportan en el vino tinto y blanco un potencial antiradical total (TRAP) de 29,1 y 4,2 mM de trolox equivalente para el radical catiónico ABTS<sup>+</sup>.

El tratamiento TP<sub>2</sub>tp<sub>1</sub> se tomó como el mejor tratamiento por encontrarse en el punto medio de los mejores tratamientos y porque presentó un contenido aceptable de catequinas. Se seleccionó el tratamiento TP<sub>2</sub>tp<sub>1</sub> para ser sometida a las pruebas de almacenamiento debido a que presentó menor contenido de microorganismos, el contenido de catequinas aceptable y contenido de antioxidantes dietario ligeramente superior al tratamiento TP<sub>1</sub>tp<sub>2</sub> con 10,65 µM de trolox equivalente/L de bebida para el DPPH\* y 16,83 mM de trolox equivalente/L de bebida para el ABTS<sup>+</sup>.

De los resultados obtenidos hasta esta etapa se determinó que el flujo de operaciones para la formulación de la bebida en base a de té verde – hierba luisa es como indica la figura 21.

**d. Flujo de operaciones para la elaboración de la bebida en base a té verde – hierba luisa**

- **Lixiviación**

A una concentración té verde – hierba luisa (10 mg/mL; 50% té verde, 50% hierba luisa), ajustada con ácido cítrico a un pH 3, 1 y sé lixiviado durante 7 minutos temperatura de ebullición.

- **Filtrado**

Empleando una malla de tela de un diámetro de 250  $\mu$ m, con la finalidad de eliminar todas las partículas de hojas y tallos.

- **Estandarizado**

Regular a una concentración de 11 °Brix, y con adición de 0,05% de benzoato de sodio.

- **Pasteurización**

A 90°C/5min.

- **Envasado y tapado**

En forma manual, en envases de vidrio de 500 mL.

- **Enfriado**

Empleando agua fría a temperatura ambiente.

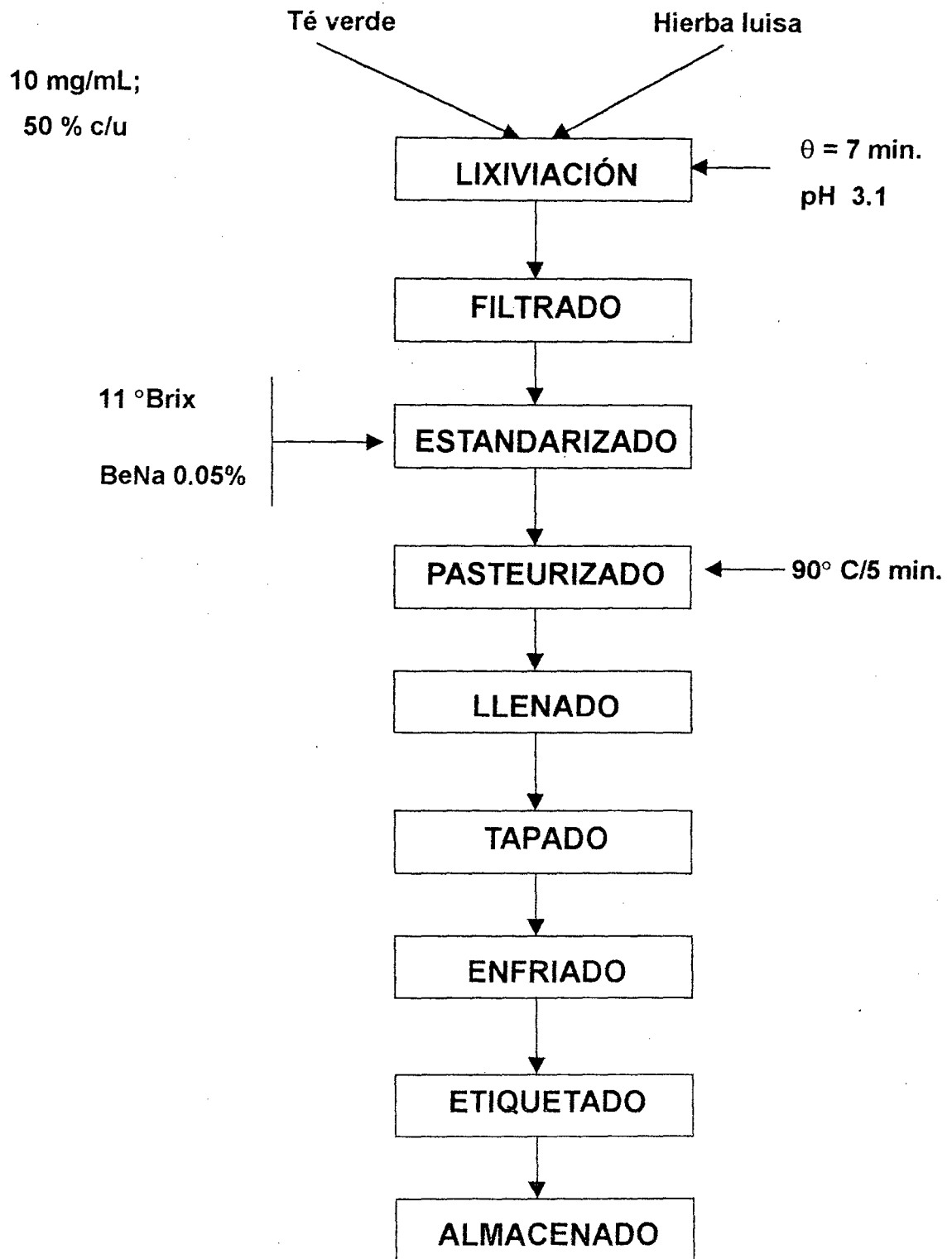
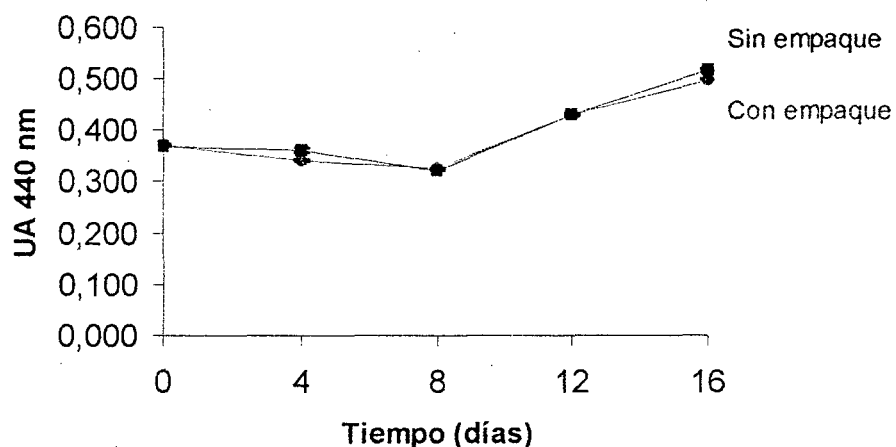


Figura 21. Flujograma para la obtención de la bebida de té verde - hierba luisa.

## e. Elección y diseño de la etiqueta

### 1. Efecto de la luz

En la figura 22, se muestran los resultados de pardeamiento cuando la bebida fue sometida a temperatura ambiente para dos tratamientos con empaque y sin empaque.



**Figura 22.** Pardeamiento de la bebida a temperatura ambiente con empaque y sin empaque. Datos expresados como  $\text{media} \pm \text{SEM}$ ,  $n=3$ .

De los resultados mostrados en la figura 22, se observa claramente, que el pardeamiento de la bebida se dió ligeramente en la misma proporción para ambos tratamientos. El tratamiento sin empaque tuvo un pardeamiento ligeramente superior que el tratamiento con empaque, de lo que deriva que la luz no es un factor preponderante para el pardeamiento de la bebida, ésto significa que la degradación de las catequinas es proporcional para

ambos tratamientos. Existiendo otros factores que afectan en una mayor proporción el contenido de catequinas, la preparación del producto, la variedad del té, tiempo de infusión, la temperatura del agua, pH entre otros (Astill *et al.*, 2001).

El factor degradante para el pardeamiento y que presenta una correlación con la degradación de las catequinas es el pH (Chen *et al.*, 2001). Otros factores que afectan de una manera muy reducida es el contenido de oxígeno (Bradshaw *et al.*, 2001). Las características de la etiqueta se muestran en el Anexo – 16. Los envases de vidrio de 500 mL, en el Anexo – 17, se muestra las características del envase.

#### **f. Estabilidad de la bebida**

En esta etapa la bebida preparada con la metodología adecuada y envasada en botellas de vidrio de 500 mL, fue almacenada y en ella se evaluó el contenido de catequinas, pardeamiento, capacidad antioxidante y el análisis microbiológico.

##### **1. Catequinas**

En el cuadro 21, se presenta el contenido de catequinas de la bebida a diferentes temperaturas durante la etapa de almacenamiento.

A temperaturas de 35, 25 y 15° C las pérdidas son de 45, 21 y 1 % respectivamente al final de los 16 días de almacenamiento.

**Cuadro 21.** Cantidad de catequinas presentes durante el almacenamiento a temperaturas diferentes.

Día	15° C	25° C	35° C
4	31,98±0,75 <sup>a</sup>	30,86±0,38 <sup>a</sup>	30,23±0,43 <sup>a</sup>
8	31,86±0,57 <sup>a</sup>	29,85±0,95 <sup>ab</sup>	29,60±0,57 <sup>a</sup>
12	31,86±0,22 <sup>a</sup>	28,48±0,57 <sup>b</sup>	25,47±1,42 <sup>b</sup>
16	31,73±0,43 <sup>a</sup>	25,85±1,21 <sup>c</sup>	19,58±1,30 <sup>c</sup>

Estabilidad de las catequinas de la bebida a diferentes temperaturas. Datos expresados como media±SEM, n=3. Para 15° C estadísticamente son iguales, a 25 y 35° C estadísticamente son diferentes. Según la prueba de Duncan a  $p < 0,05$ .

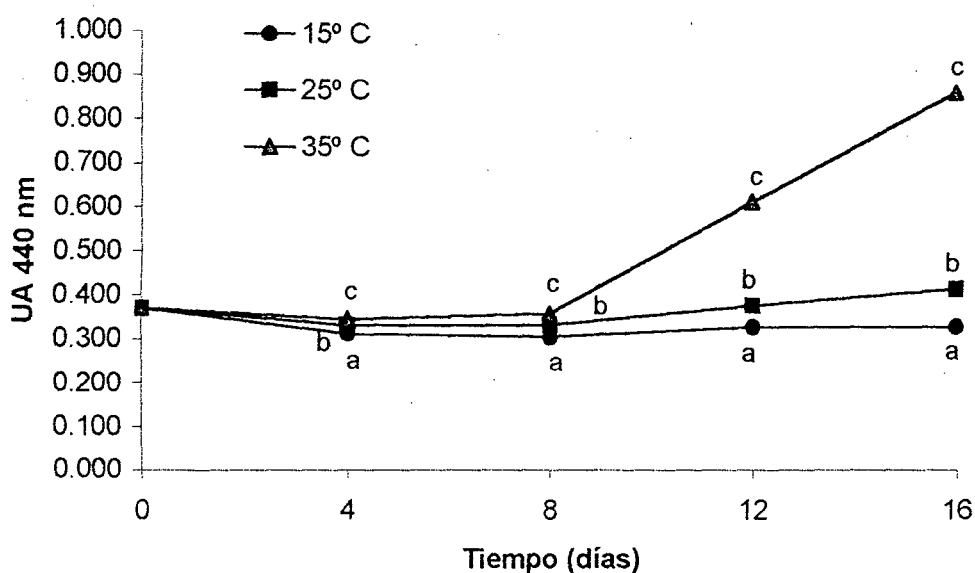
Uno de los factores de las cuales depende mucho la estabilidad de las catequinas es el pH (Chen *et al.*, 2001; Zhu *et al.*, 2001).

## 2. Pardeamiento de la bebida

En la figura 23, se muestra el efecto de la temperatura sobre el pardeamiento de la bebida. A temperatura de 35 ° C las catequinas son más inestables por lo que producen reacciones de pardeamiento y mientras a temperaturas de 25 y 15° C esta produce menor pardeamiento medido por las absorbancias.

Bradshaw *et al.* (2001), reportaron que el rol crítico de las moléculas de oxígeno son responsables de la iniciación de los procesos de pardeamiento.

En la figura 23, se muestra el efecto de la temperatura sobre el pardeamiento de la bebida.



**Figura 23.** Pardeamiento de la bebida. Datos expresados como media $\pm$ SEM  $n=3$ . Letras unidas a media (a – c), diferencia significativa a  $p<0,05$  según la prueba de Duncan.

El periodo previo para el incremento de las absorbancias se inicia al termino del periodo de inducción para nuestro trabajo este fue de 8 días, considerando que nuestra mayor temperatura fue de 35° C a un pH de 3.1.

Bradshaw *et al.* (2001), reportaron que el periodo de inducción de 2 días para una temperatura de 45° C, con la utilización de ácido ascórbico - catequina.

El incremento de la temperatura produce una alta absorbancia hasta el día 16, este incremento se observa después del periodo de inducción.

En el cuadro 22, se observa la influencia de la temperatura sobre el pardeamiento de la bebida.

**Cuadro 22.** Influencia de la temperatura sobre el periodo de inducción, absorbancia máxima y rango de pardeamiento.

Temperatura	Periodo de inducción <sup>b</sup>	Abs <sub>440</sub> Día 16	Pendiente	Rango de pardeamiento <sup>a</sup>
15° C	8	0,327	0,003	0,012
25° C	8	0,411	0,010	0,040
35° C	8	0,858	0,063	0,251

<sup>a</sup>Rango de pardeamiento calculado como el incremento de las absorbancias en el tiempo al final del periodo de inducción.

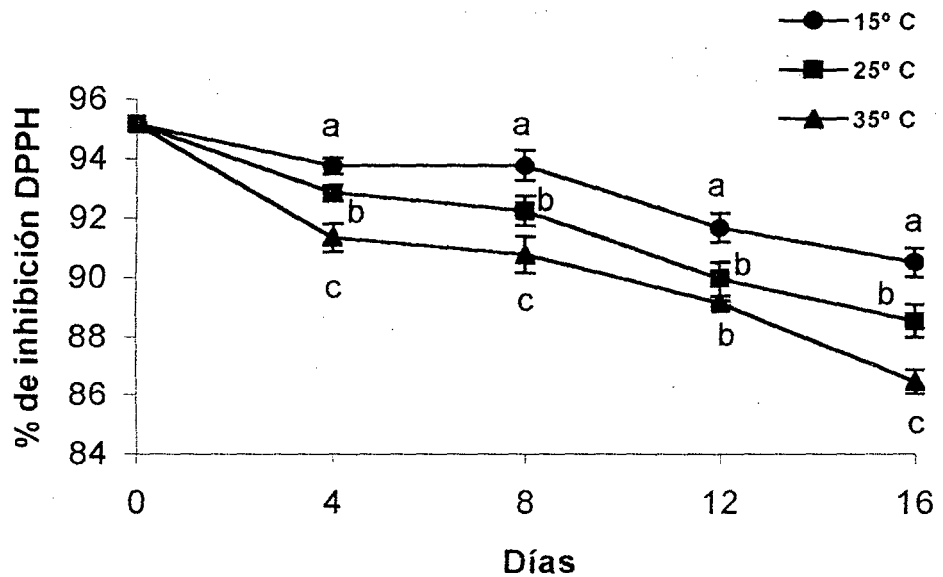
<sup>b</sup>Tiempo necesario para generar los compuestos pardos.

De los resultados mostrados en el cuadro 22, se demuestra que a la mayor temperatura de almacenamiento induce a un rápido pardeamiento, de lo que queda demostrado que las catequinas son muy inestables cuando no se encuentran en condiciones favorables produciéndose un rápido pardeamiento de la bebida.

Chen *et al.* (2001), reportaron que hay una mayor estabilidad de las catequinas a 37° C que a 98° C.

### 3. Capacidad antioxidante

En la figura 24, se presenta la capacidad antioxidante de la bebida sometida a varias temperaturas de almacenamiento.



**Figura 24.** Capacidad antioxidante de la bebida sometida a 15, 25 y 35° C durante el almacenamiento.

La capacidad antioxidante de la bebida fue medido por el % inhibición del radical DPPH\*, comparando con el efecto temperaturas sobre su actividad antioxidante. Se observa que al cabo de los 16 días a temperatura de 15° C presenta una mayor % de inhibición del radical DPPH\*, ligeramente superior que cuando la bebida fue almacenada a las otras temperaturas. El decremento

de la actividad antioxidante para las temperaturas de almacenamiento de 15, 25 y 35° C fueron de 5, 7 y 9 % respectivamente. De aquí se supondría que los subproductos de degradación o epimerización de las catequinas también poseen actividad secuestrante sobre los radicales libres.

La capacidad antioxidante para nuestros resultados después del día 16, de almacenamiento para las temperaturas de 15, 25 y 35° C fueron de 90,53; 88,55 y 86,43 % de inhibición de radicales DPPH respectivamente. Leung *et al.* (2001), indican que las teaflavinas que son subproductos de la epimerización del té verde son al menos tan efectivas como sus precursores protegiendo la oxidación de la LDL "colesterol malo" en humanos. Leung *et al.* (2001), también indica que la conversión de las catequinas a teaflavinas durante la manufactura del té negro no afecta la potencia para secuestrar radicales libres.

Los polifenoles son el grupo más abundante de los componentes de las hojas y las catequinas constituyen los mejores componentes y no dejan de ser los principales responsables de la actividad antioxidante (Yen y Chen, 1995). Lunder (1992), reporta que hay una buena correlación entre la actividad antioxidante y el contenido de epigallocatequin galato (EGCG).

#### 4. Análisis microbiológico

En el cuadro 23, se muestra la estabilidad microbiológica durante el almacenamiento de la bebida.

Como se puede observar en el cuadro 23, no hubo crecimiento de microorganismos para las diferentes temperaturas durante los días de almacenamiento para la numeración de mesófilos aerobios viables.

**Cuadro 23.** Estabilidad microbiológica a diferentes temperaturas de almacenamiento.

Día	Diluciones	15° C	25° C	35° C
		ufc/mL	ufc/mL	ufc/mL
0	10 <sup>-1</sup>	<10	<10	<10
	10 <sup>-2</sup>	<10	<10	<10
	10 <sup>-3</sup>	<10	<10	<10
8	10 <sup>-1</sup>	<10	<10	<10
	10 <sup>-2</sup>	<10	<10	<10
	10 <sup>-3</sup>	<10	<10	<10
16	10 <sup>-1</sup>	<10	<10	<10
	10 <sup>-2</sup>	<10	<10	<10
	10 <sup>-3</sup>	<10	<10	<10

Datos expresados como media de n=2, no superior a 10 ufc/mL para una (NMMAV).

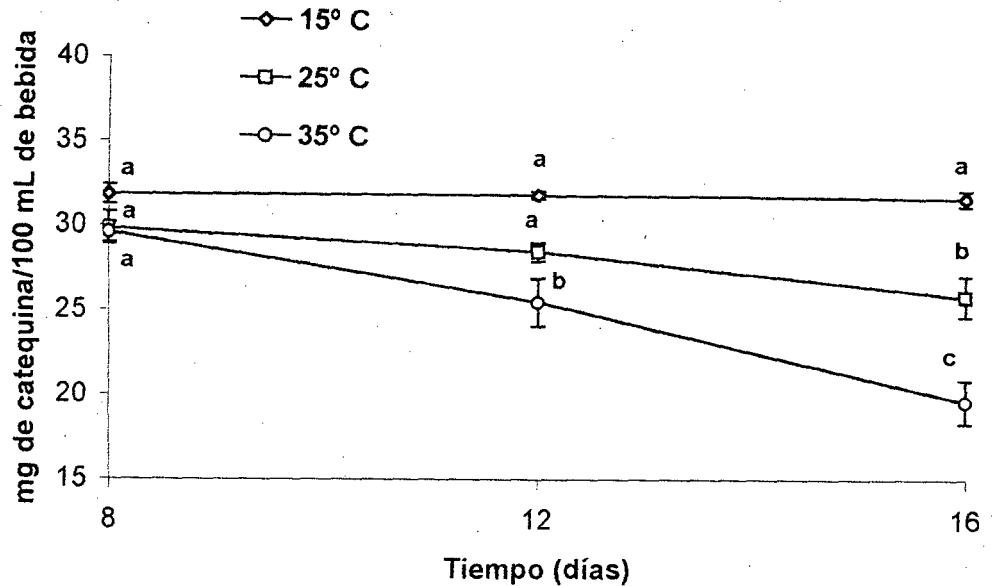
Diferentes investigaciones demuestran este mismo efecto debido a que los componentes del té verde presentan una actividad para inhibir el crecimiento de bacterias, mohos y levaduras por su efecto bacteriostático y bactericida (Hamilton-Miller, 1995).

Para los días de almacenamiento no presentó crecimiento de microorganismos por encima de 10 ufc/mL para las temperaturas en estudio, a pesar que hubo degradación de las catequinas lo que hace suponer que los productos obtenidos por epimerización como la galocatequin galato (GCG), también presentan actividad antimicobiana (Hamilton-Miller, 1995). Sin descartar la presencia de los otro componentes que se encuentran en menor proporción como la epigalocatequina (EGC), epicatequina (EC), epicatequin galato (ECG) y la epigalocatequin galato (EGCG) que también poseen esta interesante propiedad antibacterial (Hu *et al.*,2001).

## **5. Degradación cinética de catequinas**

En la figura 25, se presenta la degradación cinética del contenido de catequinas en la bebida sometida a diferentes temperaturas de almacenamiento, se observa que para 25 y 35° C, estadísticamente son diferentes, para 15° C, no hay diferencia estadística. Evaluado mediante una prueba de Duncan a  $p < 0,05$ . La pérdida de catequinas se observa desde el día 8, notándose que a 25.y 35° C las pérdidas de este componente son mayores. En contraste a 15° C la pérdida es aproximadamente del 1%. Para la determinación de la vida útil en función al contenido de catequinas es necesario que las pérdidas sean de orden zero o de primer orden, tal como determinaron para capsantina y miosina

donde la degradación de los componentes son de primer orden (Shin *et al.*, 2001; Yongsawatdigul *et al.*, 1997).



**Figura 25.** Degradación de las catequinas en la bebida después del periodo de inducción durante el almacenamiento a diferentes temperaturas.

En el cuadro 24, se muestran los resultados de plotear el tiempo (días) con la cantidad de catequinas presentes en la bebida durante el almacenamiento a las temperaturas ya referidas.

El modelo de regresión de mayor ajuste fue el de orden zero. En el cuadro 24, se observa que el modelo de orden zero presenta un  $R^2$  ligeramente superior al del primer orden, cabe mencionar que para las pruebas aceleradas tanto el modelo de orden zero como el de primer orden tuvieron mayor bondad de ajuste a temperaturas de 25 y 35° C, debido a las pérdidas de catequinas que estas

mostraron durante el almacenamiento como se muestra en la figura 25.

**Cuadro 24.** Modelos de regresión para la degradación de las catequinas.

T° C	Modelos de regresión	R <sup>2</sup>
<b>Orden zero rango de reacción</b>		
<b>C = -K t + C<sub>o</sub> (1)</b>		
15	C = -0,1562 t + 32,004	0,750
25	C = -5,0113 t + 34,071	0,970
35	C = -12,5288 t + 39,91	0,990
<b>Orden uno rango de reacción</b>		
<b>Ln C = -K t + Ln C<sub>o</sub> (2)</b>		
15	D = -0,00049 t + 32,005	0,750
25	D = -0,01773 t + 34,652	0,960
35	D = -0,04975 t + 44,627	0,980

<sup>1 y 2</sup> **Adaptado:** Labuza y Riboh (1982)

K = Constante de reacción (días-1)

Ln C = D

Co = Concentración inicial de las catequinas (mg/100 mL)

En contraste a la temperatura de 15° C se encontraron pequeñas pérdidas de catequinas debido a esto es que su bondad de ajuste es bajo, comparado con los otros tratamientos. Para el cálculo del Q<sub>10</sub> es necesario que las temperaturas de almacenamiento presenten mayor ajuste. La cinética química de los alimentos para datos de vida útil o cambio de una característica de calidad, siguen un modelo de orden zero o de primer orden (Labuza, 1993).

## V. CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos podemos establecer las siguientes conclusiones.

1. El coeficiente de inhibición 50% ( $IC_{50}$ ), para el té verde y la hierba luisa fueron de 32,43 y 1345,79  $\mu\text{g/mL}$  respectivamente. La velocidad de inhibición del radical DPPH<sup>\*</sup>, para el té verde y la hierba luisa fueron de 2,4 y 0,06  $(\text{mg/mL})^{-1} \text{Ln (s)}^{-1}$  respectivamente.
2. Los parámetros tecnológicos para la bebida fueron: relación té verde – hierba luisa 10 mg/mL; 50% té verde: 50% hierba luisa, lixiviación a 7 minutos, pH de 3,1, pasteurización a 90° C/5 minutos.
3. La capacidad antioxidante del mejor tratamiento presentó 10,65  $\mu\text{M}$  de trolox equivalente/L de bebida para el radical DPPH<sup>\*</sup> y 16,83 mM de trolox equivalente/L de bebida para el radical ABTS<sup>+</sup>.
4. Durante los días de almacenamiento se alcanzó una mejor estabilidad de la bebida a 15° C, para todas las pruebas analizadas.

## VI. RECOMENDACIONES

1. Realizar estudios *in vivo* de la bebida formulada evaluando la actividad antioxidante y cuantificación de catequinas a nivel del plasma en humanos.
2. Realizar estudios sobre la predicción de la vida útil de la bebida.
3. Realizar estudios sobre modelos de bebidas con otras materias primas con la finalidad de incrementar su actividad antioxidante.

## VII. BIBLIOGRAFIA

- Aggett, P.J.; Ashwell, M.; Borneo, F.; Diplock, A.; Ferm, E.; Roberfroid, M. 1999. Scientific concepts of functional foods in Europe. *British. J. Nutr.* 81 (suppl. 1), S1 - S27
- Alvarez, B.L.A. 2001. Predicción de ganancia de humedad en harina de platano (*Musa paradisiaca*, var ingiri) empacado mediante modelos matematicos deterministas. Tesis Ind. Alim. UNAS. 69 p.
- Anónimo. 1991. When food meets medicine. *Food Manuf.* 66: 26
- Arai, S. 1996. Studies on functional foods in Japan. State of the art. *Biosci. Biotech. Biochem.* 60: 9 – 15
- Arts, I.C.W.; Putte van de, B.; Hollman, P.C.H. 2000. Catechins contents of food commonly consumed in the Netherlands. 2. Tea, wine, fruit juices and chocolate milk. *J. Agric. Food Chem.* 48: 1752 – 1757.
- Astill, C.; Birch, M.R.; Dacombe, C.; Humphrey, P.G.; Martin, P.T. 2001. Factors affecting the caffeine and polyphenol contents of black and green tea infusions. *J. Agric. Food Chem.* 49: 5340 – 5347.
- Balentine, D. 1992. Manufacturing and chemistry of tea. Ed. American Chemical Society. Washington, USA. pp 102 – 117.
- Belitz, H. D.; Grosch, W. 1988. Química de los alimentos. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza, España. 813 p.
- ....., W. 1999. Food chemistry. Editorial Springer. Berlin (Alemania). pp 25 – 27.

- Bellisle, F.; Diplock, S.; Hornstra, G.; Koletzko, B.; Roberfroid, M.; Salminen, S.; Saris, W. 1998. Functional food science in Europe. *British J. Nutr.* 80 (suppl. 1), S1 – S193
- Best, D. 1997. All natural and nutraceutical. *Prepared foods.* 166: 32 – 38
- Bradshaw, M.P.; Prenzler, P.D.; Scollary, G.R. 2001. Ascorbic acid induced browning of (+)-catechin in model wine system. *J. Agric. Food Chem.* 49: 934 – 939.
- Brand-Williams, W.; Cuvelier, M.E.; Berset, C. 1995. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. Wiss. Technol.* 28: 25 – 30.
- Bratman, S.; Kroll, D. 2001. *Natural health bible: The natural pharmacist.* Editorial prima. Publishing. USA. pp 75 – 84.
- Cabieses, F. 1993. *Apuntes de Medicina.* Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONCYTEC). Lima, Perú. 477 p.
- Campos, A.M, Lissi, E.A. 1996. Total antioxidant potential of Chilean wines. *Nutrition Research.* 16: 385 – 389.
- Cao, G.; Sofic, E.; Prior, R.L. 1997. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure – activity relationships. *Free Radical Biol. Med.* 22: 827 – 760.
- Carbajal, D.; Casaco, A.; Arruzazabala, L.; Gonzales, R.; Tolon, Z. 1989. Pharmacological study of *Cympopogom citratus* leaves. *J. Ethopharmacol.* 25: 103 – 107.

- Carmona, R.A. 1990. Evaluación de las propiedades reológicas de la pulpa y néctar de dos tipos de cocona (*Solanum tojiro*). Tesis Ing<sup>o</sup> Ind. Alim. Tingo María, Perú. Universidad Nacional Agraria de la Selva. 153 p.
- Cerón, J.; Adiazola, J.; Miranda, C.; Silva, F. 1996. Evaluación agronómica de la hierba luisa (*Cymbopogum citratus* Staph.) con diferentes niveles de nitrógeno y momentos de cosecha en un suelo ex - cocal de Tingo María. *Tropicultura*. 8: 66 - 82.
- Cook, N.C.; Samman, S. 1996. Flavonoids: chemistry, metabolism, cardioprotective effects and dietary sources. *J. Nutr.* 7: 66 – 76.
- Chen, Z.Y.; Zhu, Q.Y.; Tsang, D.; Huang, Y. 2001. Degradation of green tea catechins in tea drinks. *J. Agric. Food Chem.* 49: 477 – 482.
- Chen, Z.; Zhu, Q.Y.; Wong, Y.F.; Zhang, Z.; Chung, H.Y. 1998. Stabilizing effect of ascorbic acid on green tea catechins. *J. Agric. Food Chem.* 46: 2512 – 2516.
- Dreosti, I. E. 2000. Antioxidant Polyphenols in Tea, Cocoa, and Wine. *Nutr.* 16: 692 – 693.
- Duke, J.A. 1992. Handbook of phytochemical constituents of grass herbs and other economic plants. Boca. Rainf. 214 – 216
- Espín, J.C.; Soler, R.C.; Wichers, H.J.; García, V.C. 2000. Anthocyanin – based natural colorants: A new source of antiradical activity for foodstuff. *J. Agric. Food Chem.* 48: 1588 – 1592.

- Fernandez, S.; Pezoa, N.; Brito, E.; Albuquerque, E.; Pastore, G. 2002. Influencia de la polifenol oxidasa extraída de la chirimoya (*Annona squamosa* .L), en la disminución de los compuestos polifenolicos de nibs de cacao. Universidad Estatal de Campinas. Sao Paulo, Brazil. 8 p.
- FooK, W.T.H. 1980. The medicinal plants of Mauritius. Document. 10 p
- Gadow, A.; Joubert., E.; Hansmann, C.1996. Comparison of the antioxidant activity of rooibos tea with green, oolong and black tea. Food Chemistry. 60: 73 – 77.
- González, T.M.C.; Betanncourt, R.M.; Ortiz, M.R. 2000. Daño oxidativo y antioxidantes. Bioquímica. 25: 3 – 9.
- Halliwell, B. 1991. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry and role in human disease. Am. J. Med. 91: 14 – 22.
- Hamilton-Miller, J.M.T. 1995. Antimicrobial properties of tea (*Camellia sinensis*. L). Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 39: 2375 – 2377.
- ....., 2001. Anti-carcinogenic properties of tea (*Camellia sinensis*). J. Med. Microbiol. 50: 299 – 302.
- Hara, Y.; Watanabe, M. 1989. Antibacterial activity of tea polyphenols against *Clostridium botulinum*. J. Jpn. Soc. Food Sci. Technol. 36: 951 – 955.
- Hardy, G. 2000. Nutraceuticals and funcional foods: introduction and meanig. Nutr. 16: 688 – 689.

- Herbert, V.; Shaw, S.; Jayatilleke, E. 1996. Vitamin C driven free radical generation from iron. *J. Nutr.* 126: 1213 – 1220.
- Hirechhorn, H.H. 1983. Botanical remedies of the former Dutch East Indies (Indonesia). Parte I; *eumicetes; pteridophita; gymnospermae; angiospermae; monocotyledonae* only. *Etnopharmacol.* 7: 56 – 123.
- Hollingsworth, P. 1997. Mainstreaming healthy foods. *Food technology.* 51: 55 – 58.
- Hollingsworth, P. 2000. Functional beverage juggernaut faces tighter regulation. *Food Technology.* 54: 50 – 54.
- Hollman, P.C.H. 2002. "Contenido de catequinas en infusiones de té verde" [p.c.h.hollman@rikilt.wag-ur.nl](mailto:p.c.h.hollman@rikilt.wag-ur.nl) (enero 22).
- Horie, H.; Kohata, K. 2000. Analysis of tea components by High-performance liquid chromatography and High-performance capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography.* 800: 425 – 438.
- Hu, Z.Q.; Zhao, W.H.; Hara, Y.; Shimamura, T. 2001. Epigallocatechin gallate synergy with ampicillin/sulbactam against 28 clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal Antimicrobial Chemotherapy.* 48: 361 – 364.
- ICMSF. 1980. Microorganismos de los alimentos 1: técnicas de análisis microbiológico. Editorial Acribia. Zaragoza, España. 431 p.

- Jankun, J.; Selman, S.H.; Swiercz, R. 1997. Why drinking green tea could prevent cancer. *Nature*. 383: 561 – 562.
- Katiyar, S.K.; Ahmad, N.; Mukhtar, H. 2000. Green tea and skin. *Arch. Dermatol.* 136: 989 – 994.
- Komori, A. 1994. Anticarcinogenic activity of green tea polyphenols. *J. Clin. Oncol.* 23: 186 – 190.
- Labuza, T. Estudio integrado de la química de los alimentos: ejemplos típicos. En: *Química de los alimentos*. Fennema. O.R. 1993. Editorial Acribia. Zaragoza, España. pp 1025 – 1047.
- Labuza, T.; Riboh, D. 1982. Theory and application of Arrhenius kinetic the prediction of nutrient losses in food. *Food Technol.* 30: 66 – 72.
- León, J. 1968. Botánica de los cultivos tropicales. Instituto Americano de Ciencias Agrícolas (IICA). San José- Costa Rica. pp 154 – 155.
- Leung, L.K.; Su, Y.; Chen, R.; Zhang, Y.H.; Chen, Z.Y. 2001. Theaflavins in black tea and catechins in green tea are aqually effective antioxidants. *J. Nutr.* 131: 2248 – 2251.
- Lin, J.; Lin, C.; Liang, Y.; Lin-Shian. S. 1998. Survey of catechins, galic acid, and methylxanthines in green, oolong, pu-erh and black teas. *J. Agric. Food Chem.* 46: 3635 – 3642.
- Lunder, L.K.; 1992. Catechins of green tea: Antioxidants activity. Symposium series 506; American Chemical Society: Washington, D.C. pp 114 – 120.

- Maluf, E.; Assolant, K.R. 1985. Toxicología clínica do capim cidrao *Cymbopogon citratus*. Programa de pesquisas en plantas medicinales. pp 46 – 51.
- Mazza, G. 1998. Funcional Foods: Biochemical and processing aspects. Technomic Publishing Company. Lancaster, PA-USA. 458 p.
- Meyer, A. 1998. The 1998 top 100 R y D Survey. Food Processing. 58: 32 – 40.
- Okawa, M.; Kinjo, J.; Nohara, T.; Ono, M. 2001. DPPH (1,1-diphenyl-2-picrilhydrazil) radical scavenging activity of flavonoids obtained from medicinal plants. Biol. Pharm. Bull. 24: 1202 – 1205.
- Olaniyi, A.A.; Sofowora, E.A.; Oguntimehin, B.O. 1975. Phytochemicals investigation of some Nigerian plants used against fever. II *Cymbopogon citratus*. Plant Med. 28: 179 – 186.
- Ortega, R.A. 1988. Obtención del néctar de papayita de monte (*Carica candinamaecensis* Hook) y su preservación por los métodos de enlatado y embotellado. Tesis Ing<sup>o</sup> Ind. Alim. Tingo María, Perú. Universidad Nacional Agraria de la Selva. 98 p.
- Osada, K.; Takahashi, M.; Hoshina, S.; Nakamura, S.; Sugano, M. 2001. Tea catechins inhibit cholesterol oxidation accompanying oxidation of low density lipoprotein *in vitro*. Biochen. Physiol. Toxicol. Pharmacol. 128: 153 – 154.
- Podmore, I.D.; Griffiths, H.R.; Herbert, T.E. 1998. Vitamin C exhibits prooxidant properties. Nature. 392: 558 – 559.

- Porto Da, C.; Calligaris, S.; Celotti, E.; Nicoli, M.C. 2000. Antiradical properties of commercial cognacs assessed by DPPH• test. *J. Agric. Food Chem.* 48: 4241 – 4245.
- Price, M.L.; Butler, L.G. 1977. Rapid visual estimation and spectrophotometric determination of tannin content of sorghun grain. *J. Agric. Food Chem.* 25: 1268 – 1273.
- PROMPEX, 1997. Marco orientador para promover la inversión privada en cultivos de exportación en zonas de desarrollo alternativo. Lima, Perú. 215 p.
- Pryor, W.A. 1976. Free radicals in biology. Academic Press. New York. pp 1 – 3.
- Reeves, I. D. 1975. Estudio de la extracción, almacenaje y elaboración de bebidas gaseosas con aceite esencial de la hierba luisa. Tesis Industrias Alimentarias. Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima, Perú. 92 p.
- Roberfroid, M.B. 2000. A european consensus of scientific concepts of functional foods. *Nurt.* 16: 690 – 691.
- Robineau, L. 1992. Hacia una farmacopea caribeña. Seminario tramil V y VI. Santo Domingo. 42 – 139.
- Roig y Mesa, J.T. 1988. Diccionario botánico de nombres vulgares cubanos. Editorial Científico - Técnico. La Habana, Cuba. 243 p

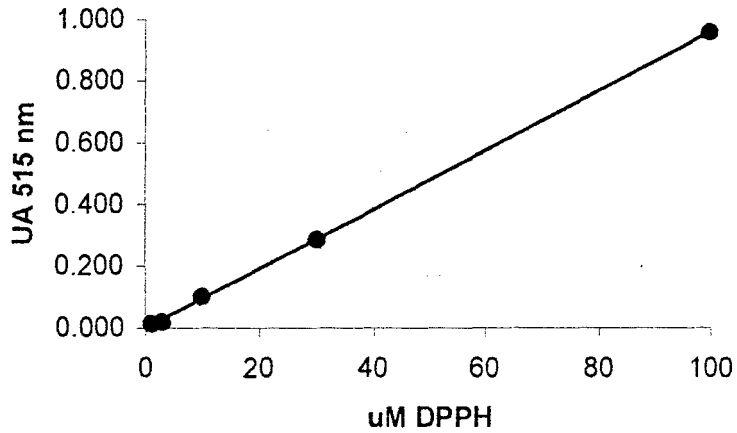
- Scalbert, A. 1991. Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*. 30: 3875 – 3883.
- Shin, J.H.; Chung, H.L.; Seo, J.K.; Sin, J.H.; Huh, C.S.; Kin, S.K.; Baek, Y.J. 2001. Degradation kinetic of capsanthin in paprika (*Capsicum annuum*. L) as affected by heating. *J. Food Sci.* 66: 15 – 19.
- Silva, J.M.R.D.; Darman, N.; Fernandez, Y.; Mitjavila, M. 1991. Oxygen free radical scavenger capacity in aqueous models of different procyanidins from grape seeds. *J. Agric. Food Chem.* 39: 1549 – 1552.
- Singh, H.P.; Ravindranath, S.D.; Singh, C. 1999. Analysis of tea shoot catechins: Spectrophotometric quantitation and selective visualization on two-dimensional paper chromatograms using diazotized sulfanilamide. *J. Agric. Food Chem.* 47: 1041 – 1045.
- Singlenton, V.L.; Orthofer, R.; Lamuela, R.M. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin – ciocalteu reagent. In: *Methods Enzimology*. Academic Press. San Diego, USA. Pp 152 – 178.
- Sohal, R.S.; Weindruch, R. 1996. Oxidative stress caloric restriction and aging. *Science*. 273: 59 – 63
- Subramanian, N.; Venkatesh, P.; Ganguli, S.; Sinkar, V.P. 1999. Role of polyphenol oxidase and peroxidase in the generation of black tea theaflavins. *J. Agric. Food Chem.* 47: 2571 – 2578.y76

- Thomas, M. J. 2000. The role of free radicals and antioxidants. *Nutr.* 16: 716 – 718.
- Torres, A. 1991. Conceptos modernos de prevención de alimentos en el mercado norteamericano. Universidad Nacional Agraria la Molina. 121 p.
- Ureña, P.; D'arrigo, M. 1999. Evaluación sensorial de los alimentos. Editorial Agraria. Lima, Perú. 197p.
- Varnam, A. H.; Sutherland, J. P. 1997. Bebidas: tecnología, química y microbiología. Editorial Acribia. Zaragoza, España. 487 p.
- Wang, L.F.; Kin, D.M.; Lee, C. 2000. Effect of heat processing and storage on flavonols and sensory qualities of green tea beverage. *J. Agric. Food Chem.* 48: 4227 – 4232.
- Wolinsky, L.E.; Cuom, J.; Quesada, K.; Bato, T.; Camargo, P.M. 2000. A comparative pilot study of the effect of a dentrifie containing green tea bioflavonoids, sanguinarine or triclosan on oral bacterial biofilm formation. *J.Clin.* 11: 50 – 53.
- Yamaguchi, M.; Henderson, H.M.; Hwang, P.M.; Cambell, I.D. Effect of oxigen concentration on *o* – *diphenol* oxidase activity. *Anal. Biochem.* 32: 178 – 180. In: Combined acrbon dioxide and high presssure inactivation of pectin methylesterase, polyphenol oxidase, *Lactobacillus plantarum* and *Echerichia coli*. Corwin, H.; Shellhammer, H. 2002. *J. Food Sci.* 67: 697 – 701.

- Yen, G.C.O.; Chen, H.Y. 1995. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. *J. Agric. Food Chem.* 43: 27 – 32.
- Yokozawa, T.; Dong, E.; Nakagawa, T.; Kashiwagi, H.; Nakagawa, H.; Takeuchi, S.; Chung, H.Y. 1998. In vitro and in vivo studies on the radical scavenging activity of tea. *J. Agric. Food Chem.* 46: 2143 – 2150.
- Yongsawatdigul, J.; Park, J.; Kolbe, E. 1997. Degradation kinetic of miosin heavy chain of pacific whiting surimi. *J. Food Sci.* 62: 724 – 728.
- Zapelena, M.J. 2000. Bebidas: aguas, bebidas alcohólicas y bebidas no alcohólicas. Editorial McGrau-Hill Interamericana. Madrid (España). pp 291 – 315.
- Zaracostas, J. 1998. Tecnología y empleo en la industria de producción de alimentos y bebidas. Informe para el debate en la reunión tripartita sobre tecnología y empleo en la industria de alimentos y bebidas. Ginebra, Suiza. 30 p.
- Zhu, Q.Y.; Holt, R.R.; Lazarus, S.A.; Ensunsa, J.L.; Hammerstone, J.F.; Schmitz, H.H.; Keen, C.L. 2001. Stability of the flavan – 3 – ols epicatechins and catechin and related dimeric procianidins derived from cocoa. *J. Agric. Food Chem.* PAGE EST: 5.3. A – F.
- Zhu, Q.Y.; Zhang, A.; Tsang, D.; Huang, Y.; Chen, Z. 1997. Stability of gren tea catechins. *J. Agric. Food Chem.* 45: 4624 – 4628.

# **ANEXOS**

## Anexo 1



**Figura 26.** Curva de calibración DPPH.

Regression Analysis - Linear model:  $Y = a + b \cdot X$

Dependent variable: Col\_2  
Independent variable: Col\_1

Parameter	Estimate	Standard Error	T Statistic	P-Value
Intercept	-0.00285011	0.00345873	-0.824035	0.4703
Slope	0.00959202	0.0000737069	130.137	0.0000

### Analysis of Variance

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Model	0.631424	1	0.631424	16935.72	0.0000
Residual	0.000111851	3	0.0000372836		
Total (Corr.)	0.631536	4			

Correlation Coefficient = 0.999911  
R-squared = 99.9823 percent  
Standard Error of Est. = 0.00610603  
Col\_2 = -0.00285011 + 0.00959202 Col\_1

## Anexo 2

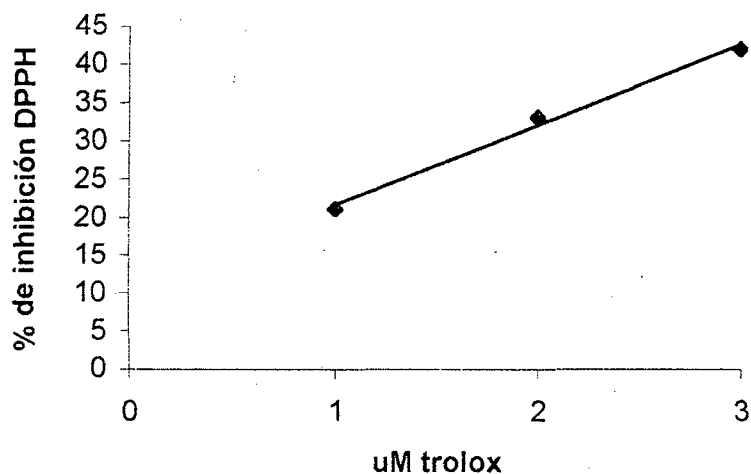


Figura 27. Curva de calibración DPPH - TROLOX.

Regression Analysis - Linear model:  $Y = a + b \cdot X$

Dependent variable: Col\_2

Independent variable: Col\_1

Parameter	Estimate	Standard Error	T Statistic	P-Value
Intercept	11.235	0.0		
Slope	10.437	0.0		

### Analysis of Variance

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Model	217.862	1	217.862		
Residual	0.0	1	0.0		
Total (Corr.)	217.862	2			

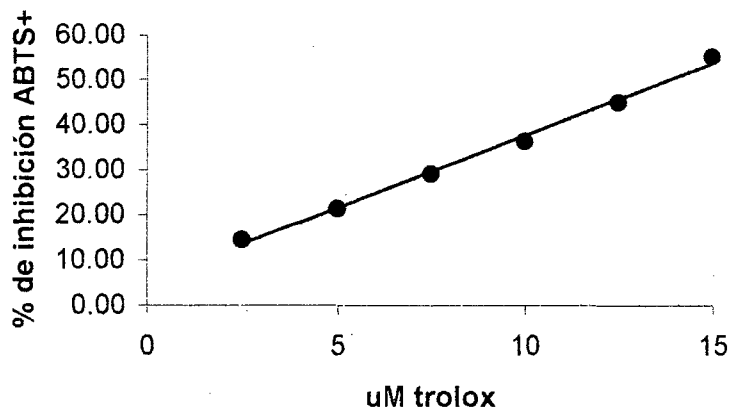
Correlation Coefficient = 1.0

R-squared = 100.0 percent

Standard Error of Est. = 0.0

Col\_2 = 11.235 + 10.437\*Col\_1

### Anexo 3



**Figura 28.** Curva de calibración ABTS<sup>+</sup>-TROLOX.

Regression Analysis - Linear model:  $Y = a + b \cdot X$

-----  
 Dependent variable: Col\_2  
 Independent variable: Col\_1  
 -----

Parameter	Estimate	Standard Error	T Statistic	P-Value
Intercept	5.56933	1.14286	4.87316	0.0082
Slope	3.19531	0.117384	27.2211	0.0000

-----  
 Analysis of Variance  
 -----

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Model	1116.72	1	1116.72	740.99	0.0000
Residual	6.02828	4	1.50707		
Total (Corr.)	1122.75	5			

-----  
 Correlation Coefficient = 0.997312  
 R-squared = 99.4631 percent  
 Standard Error of Est. = 1.22763  
 Col\_2 = 5.56933 + 3.19531Col\_1  
 -----

## Anexo 4

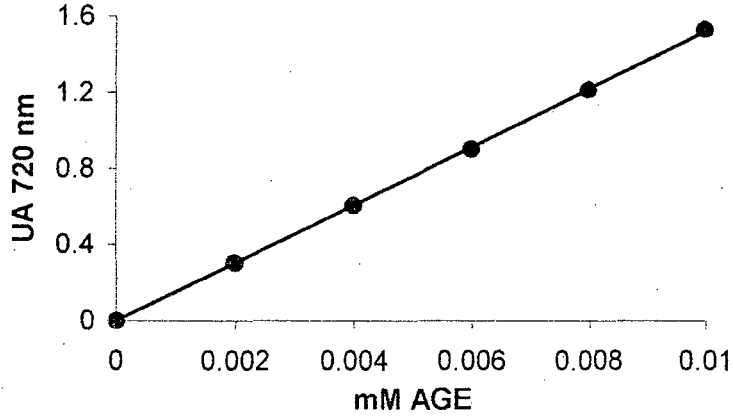


Figura 29. Curva de calibración para cuantificar polifenoles totales.

Regression Analysis - Linear model:  $Y = a + b \cdot X$

Dependent variable: Col\_2

Independent variable: Col\_1

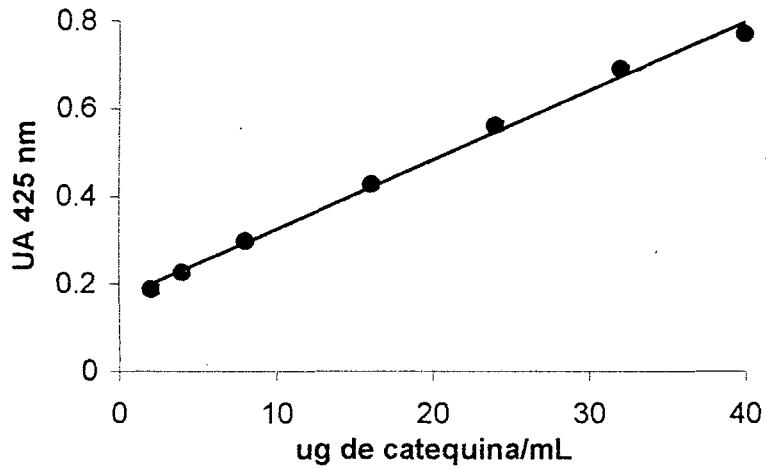
Parameter	Estimate	Standard Error	T Statistic	P-Value
Intercept	-0.00295238	0.00604561	-0.488351	0.6509
Slope	151.657	0.9984	151.9	0.0000

### Analysis of Variance

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Model	1.60999	1	1.60999	23073.66	0.0000
Residual	0.000279105	4	0.0000697762		
Total (Corr.)	1.61027	5			

Correlation Coefficient = 0.999913  
R-squared = 99.9827 percent  
Standard Error of Est. = 0.00835321  
Col\_2 = -0.00295238+151.557 Col\_1

## Anexo 5



**Figura 30.** Curva de calibración para cuantificar catequinas totales.

Regression Analysis - Linear model:  $Y = a + b \cdot X$

Dependent variable: Col\_2  
Independent variable: Col\_1

Parameter	Estimate	Standard Error	T Statistic	P-Value
Intercept	0.169035	0.0109076	15.4969	0.0000
Slope	0.0157044	0.000485041	32.3775	0.0000

### Analysis of Variance

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Model	0.313711	1	0.313711	1048.30	0.0000
Residual	0.00149628	5	0.000299257		
Total (Corr.)	0.315207	6			

Correlation Coefficient = 0.997624  
R-squared = 99.5253 percent  
Standard Error of Est. = 0.017299  
Col\_2 = 0.169035 + 0.0157044 Col\_1

## Anexo 6

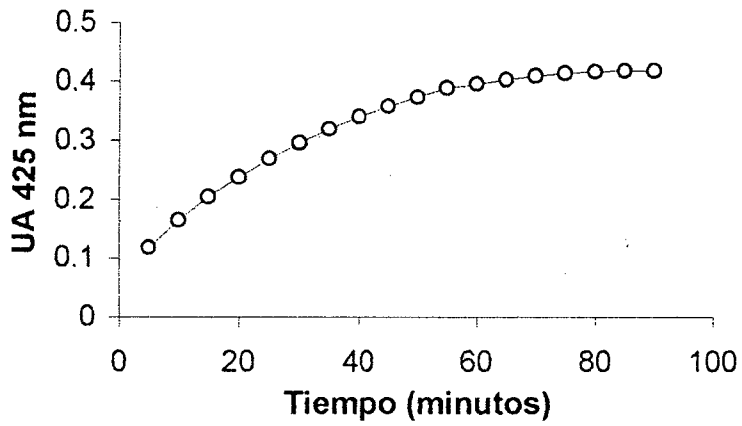


Figura 31. Desarrollo del color sulfanilamide – catequina

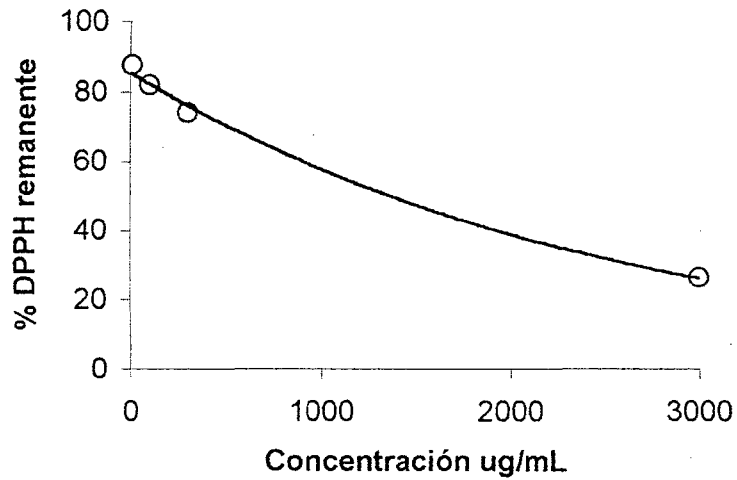
---

### SUMMARY STATISTICS

	Tiempo (s)	Absorbancia
Count	18.00	18.00
Average	47.50	0.33
Variance	712.50	0.0090
Standard desviation	26.6927	0.0950
Minimum	5.0	0.118
Maximum	90.0	0.418

---

## Anexo 7



**Figura 32.** Curva para el cálculo del coeficiente de inhibición 50%, para la hierba luisa.

Regression Analysis - Exponential model:  $Y = \exp(a + b \cdot X)$

Dependent variable: Col\_2

Independent variable: Col\_1

Parameter	Estimate	Standard Error	T Statistic	P-Value
Intercept	4.45034	0.0168889	263.507	0.0000
Slope	-0.000392875	0.0000111972	-35.087	0.0008

### Analysis of Variance

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Model	0.955906	1	0.955906	1231.10	0.0008
Residual	0.00155293	2	0.000776467		
Total (Corr.)	0.957459	3			

Correlation Coefficient = -0.999189

R-squared = 99.8378 percent

Standard Error of Est. = 0.0278652

Col\_2 =  $\exp(4.45034 - 0.000392875 \cdot \text{Col}_1)$

## Anexo 8

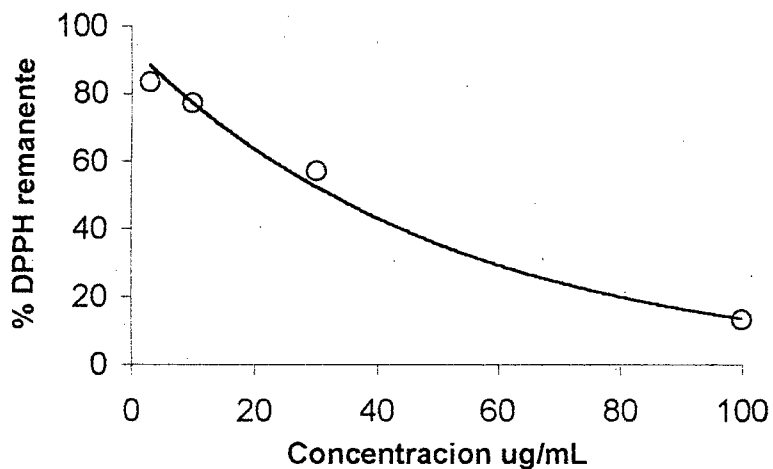


Figura 33. Curva de para el calculo del coeficiente de inhibición 50% para el té verde.

Regression Analysis - Exponential model:  $Y = \exp(a + b \cdot X)$

Dependent variable: Col\_2

Independent variable: Col\_1

Parameter	Estimate	Standard Error	T Statistic	P-Value
Intercept	4.53793	0.0500585	90.6525	0.0001
Slope	-0.0193106	0.000954188	-20.2377	0.0024

### Analysis of Variance

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Model	2.19889	1	2.19889	409.56	0.0024
Residual	0.0107377	2	0.00536885		
Total (Corr.)	2.20962	3			

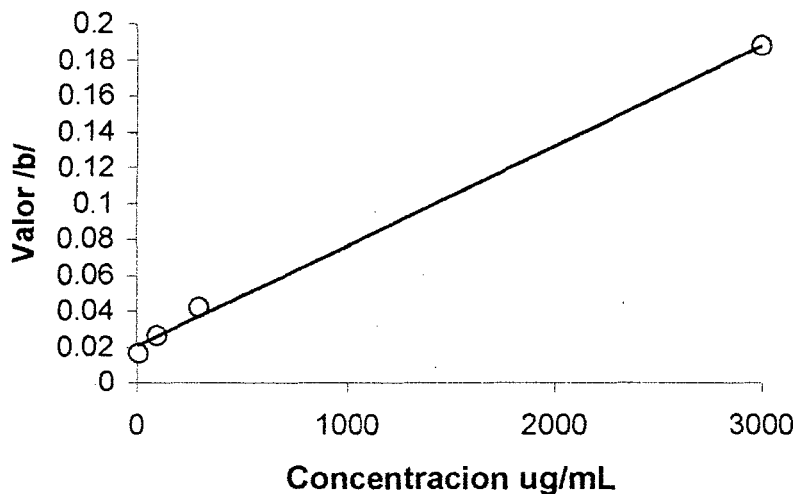
Correlation Coefficient = -0.997567

R-squared = 99.514 percent

Standard Error of Est. = 0.0732724

Col\_2 =  $\exp(4.53793 - 0.0193106 \cdot \text{Col}_1)$

## Anexo 9



**Figura 34.** Curva para el cálculo de la constante de velocidad de orden 2 ( $K_2$ ), para la hierba luisa

Regression Analysis - Linear model:  $Y = a + b \cdot X$

-----  
 Dependent variable: Col\_2

Independent variable: Col\_1  
 -----

Parameter	Estimate	Standard Error	T Statistic	P-Value
Intercept	0.0205012	0.00292832	7.00102	0.0198
Slope	0.0000558285	0.00000194145	28.7561	0.0012

-----  
 Analysis of Variance  
 -----

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Model	0.0193027	1	0.0193027	826.91	0.0012
Residual	0.0000466861	2	0.000023343		
Total (Corr.)	0.0193494	3			

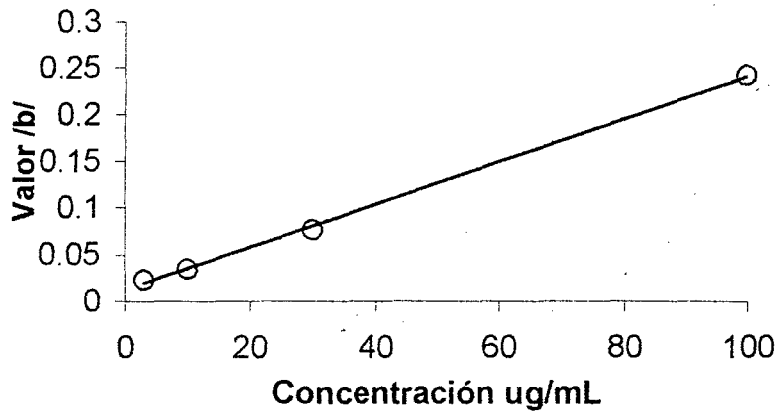
Correlation Coefficient = 0.998793

R-squared = 99.7587 percent

Standard Error of Est. = 0.00483146

Col\_2 = 0.0205012 + 0.0000558285 \* Col\_1

## Anexo 10



**Figura 35.** Curva para el cálculo de la constante de velocidad de orden 2 ( $K_2$ ), para el té verde.

Regression Analysis - Linear model:  $Y = a + b \cdot X$

Dependent variable: Col\_2

Independent variable: Col\_1

Parameter	Estimate	Standard Error	T Statistic	P-Value
Intercept	0.0124243	0.00285441	4.35267	0.0489
Slope	0.00227338	0.0000544093	41.7829	0.0006

### Analysis of Variance

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Model	0.0304758	1	0.0304758	1745.81	0.0006
Residual	0.0000349131	2	0.0000174566		
Total (Corr.)	0.0305107	3			

Correlation Coefficient = 0.999428

R-squared = 99.8856 percent

Standard Error of Est. = 0.0041781

Col\_2 = 0.0124243 + 0.00227338 \* Col\_1

Anexo 11

HOJA DE EVALUACION SENSORIAL

Nombre del panelista: \_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_\_

Hora : \_\_\_\_\_

Antes de probar cada muestra enjuáguese bien la boca con agua.

Ordene las nueve muestras de menor a mayor preferencia del color, olor y sabor, para lo cual deberá poner el código de cada muestra secuencialmente de izquierda a derecha.

ENSAYO	MUESTRAS ORDENADAS DE MENOR.....A.....MAYOR PREFERENCIA
COLOR	_____, _____, _____, _____, _____, _____, _____, _____, _____
OLOR	_____, _____, _____, _____, _____, _____, _____, _____, _____
SABOR	_____, _____, _____, _____, _____, _____, _____, _____, _____

Comentario: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

.....  
Firma

Anexo 12

RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN SENSORIAL EN LA  
FORMULACIÓN PARA LA CARACTERÍSTICA DE CALIDAD DEL  
SABOR

Panelistas	5.0 mg/mL			7.5 mg/mL			10 mg/mL		
	100 %	75 %	50 %	100%	75%	50%	100%	75%	50%
	$\pi$	$\theta$	$\mu$	$\lambda$	$\beta$	$\alpha$	$\phi$	$\omega$	$\eta$
1	4	3	2	7	1	5	6	8	9
2	8	7	9	3	5	6	4	2	1
3	2	8	7	5	4	6	3	1	9
4	2	6	9	1	7	8	3	4	5
5	1	2	3	6	4	5	7	8	9
6	1	2	3	4	5	6	7	8	9
7	4	9	5	1	7	6	2	8	3
8	2	1	4	7	3	5	6	8	9
9	1	9	6	8	3	2	4	5	7
<b>Total</b>	<b>25</b>	<b>47</b>	<b>48</b>	<b>42</b>	<b>39</b>	<b>49</b>	<b>42</b>	<b>52</b>	<b>61</b>

Datos transformados a partir de los resultados arrojados por los panelistas para el sabor.

### Anexo 13

## RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN SENSORIAL EN LA FORMULACIÓN PARA LA CARACTERÍSTICA DE CALIDAD DEL COLOR

Panelistas	5.0 mg/mL			7.5 mg/mL			10 mg/mL		
	100 %	75 %	50 %	100%	75%	50%	100%	75%	50%
	$\pi$	$\theta$	$\mu$	$\lambda$	$\beta$	$\alpha$	$\phi$	$\omega$	$\eta$
1	3	2	1	6	4	5	7	8	9
2	3	1	2	6	5	4	8	7	9
3	1	2	3	4	5	6	8	7	9
4	2	4	1	6	5	3	7	8	9
5	4	1	2	8	3	5	7	6	9
6	2	3	1	7	5	4	6	8	9
7	4	3	2	7	1	5	6	8	9
8	4	2	1	6	3	5	8	7	9
9	2	3	1	6	5	4	7	8	9
<b>Total</b>	<b>25</b>	<b>21</b>	<b>14</b>	<b>56</b>	<b>36</b>	<b>41</b>	<b>64</b>	<b>67</b>	<b>81</b>

Datos transformados a partir de los resultados arrojados por los panelistas para el color.

Anexo 14

RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN SENSORIAL EN LA  
FORMULACIÓN PARA LA CARACTERÍSTICA DE CALIDAD DEL  
OLOR

Panelistas	5.0 mg/mL			7.5 mg/mL			10 mg/mL		
	100 %	75 %	50 %	100%	75%	50%	100%	75%	50%
	$\pi$	$\theta$	$\mu$	$\lambda$	$\beta$	$\alpha$	$\phi$	$\omega$	$\eta$
1	2	1	3	9	6	5	4	7	8
2	3	1	5	6	2	7	4	8	9
3	4	1	2	8	5	3	9	6	7
4	1	2	3	4	5	6	7	8	9
5	2	1	3	6	4	5	9	7	8
6	1	7	4	2	8	5	3	6	9
7	4	1	8	2	5	9	3	6	7
8	1	2	9	4	7	8	3	5	6
9	4	3	2	7	1	5	6	8	9
<b>Total</b>	<b>22</b>	<b>19</b>	<b>39</b>	<b>48</b>	<b>43</b>	<b>53</b>	<b>48</b>	<b>61</b>	<b>72</b>

Datos transformados a partir de los resultados arrojados por los panelistas para el olor.

Anexo 15

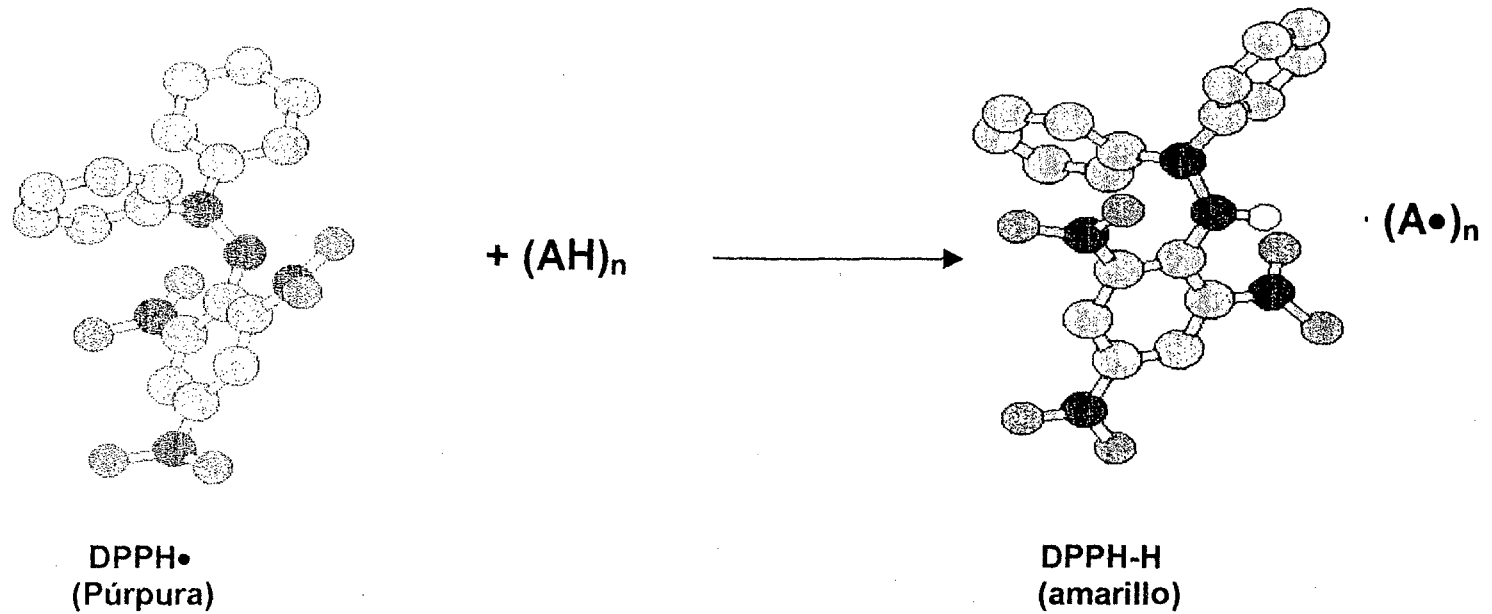


Figura 36. Secuestro del radical DPPH por una especie antiradical (DPPH-H, reducido 1,1-dipheyl-2-picrylhydrazyl radical; (AH)<sub>n</sub>, especie antiradical "n" indica la presencia de n=1 ó n>1, especies radicales)



Fuente: Espin *et al.* (2000)