

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA**

**FACULTAD DE INDUSTRIAS ALIMENTARIAS**

**Departamento Académico de Ciencia, Tecnología**

**e Ingeniería de Alimentos**



**"OPTIMIZACION DEL FILTRANTE EN BASE A TE VERDE  
(*Camellia sinensis*), HIERBA LUISA (*Cymbopogon citratus* Staph) Y  
PAMPA OREGANO (*Lippia alba*) MEDIANTE LA METODOLOGIA  
DE SUPERFICIE DE RESPUESTA"**

**TESIS**

PARA OPTAR EL TITULO DE :

**Ingeniero en Industrias Alimentarias**

**Luis Alberto Becerril Albornoz**

**Promoción 2000 - II**

**TINGO MARIA - PERU**

**2003**



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

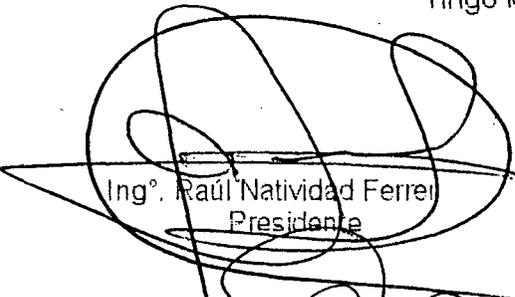
ACTA DE SUSSENTACIÓN DE TESIS

Los Miembros del Jurado que suscriben, reunidos en acto público el 22 de mayo del 2003, a horas 17:00, 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: **Luis Alberto BECERRIL ALBORNOZ**.

**“OPTIMIZACION DEL FILTRANTE EN BASE A TE VERDE  
(Camellia sinensis), HIERBA LUISA (Cymbopogon citratus Staph) Y  
PAMPA ORÉGANO (Lippia alba) MEDIANTE LA METODOLOGÍA  
DE SUPERFICIE DE RESPUESTA”**

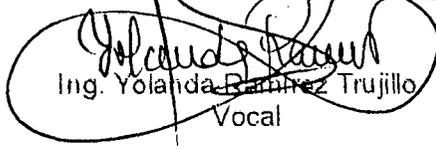
Después de haber escuchado la sustentación, las respuestas a las preguntas formuladas, lo declaran aprobado con el calificativo de **BUENO**, en consecuencia el Bachiller: **Luis Alberto BECERRIL ALBORNOZ**, queda apto para recibir el título de **Ingeniero en Industrias Alimentarias** del Consejo Universitario, 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, 02 de julio del 2003

  
Ing°. Raúl Natividad Ferrer  
Presidente



  
Ing°. Williams Roldan Carbajal  
Vocal

  
Ing. Yolanda Ramírez Trujillo  
Vocal

Ing°. Luis Alberto Condezo Hoyos  
Asesor

## DEDICATORIA

A Dios, por encima de todo,  
por concederme la vida.

A mi madre, Isabel Albornoz Rufino,  
por el amor, apoyo constante, tenaz  
y cariñoso al logro de todas mis  
aspiraciones.

A Gladys Noel Cajas, Alejandro, Miguel  
Angel, Karina, Katherine, Hugo,  
Tanaydú, Karina Gym, Farit, por el  
afecto y permanente aliento de lucha  
por un futuro mejor.

## AGRADECIMIENTO

Al Ing. M.Sc. Luis Alberto Condezo Hoyos, asesor del trabajo de investigación, por la dedicación y apoyo constante.

Al Ing. M.Sc Milagros Follegatti Romero, co-asesor, por la colaboración en la realización del trabajo.

Al Ing. M.Sc Elizabeth Ordóñez Gómez y al Ing. M.Sc Pedro Peláez Sánchez, por la revisión y las discusiones críticas al presente trabajo.

A mis amigos, Ing. José Luis Arteta Alegría, Bach. Moisés Benito Baylon, Pierre Cárdenas Ushiñahua, Ing. Seyer Estrella Cartagena, Bach. Kadir Domínguez Palpa, Concepción Ariza Espinoza, Ing. Quinto Estelo Celestino, Ing. Davy Hidalgo Chávez, Ing. Javier Príncipe Quevedo, Bach. Lizet Ramírez Yuzzelli, Ing. Fernando Ramos Escudero, Bach. Iris Ruíz Yance, Ing. Wilson Macarlupu Ushiñahua, Bach. Juan Edson Villanueva Tiburcio, Yuliana Marín Damián, por el apoyo y colaboración en el análisis sensorial para la realización del trabajo.

## INDICE

	Página
I. INTRODUCCION.....	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA .....	2
A. ASPECTOS GENERALES DE LOS RECURSOS.....	2
1. Té .....	2
2. Hierba Luisa.....	6
3. Pampa Orégano .....	8
B. METODOLOGIA DE SUPERFICIE DE RESPUESTA (RSM).....	9
1. Concepto.....	9
2. Metodología de superficie de respuesta para una mezcla .....	12
III. MATERIALES Y METODOS.....	17
A. LUGAR DE EJECUCIÓN .....	17
B. MATERIA PRIMA .....	17
1. Té .....	17
2. Hierba luisa.....	19
3. Pampa orégano .....	20
C. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS .....	20
1. Materiales de laboratorio .....	20
2. Equipos de laboratorio .....	20
3. Reactivos .....	21
4. Papel sellable .....	21

D. METODOS FISICO-QUIMICOS .....	21
1. Evaluación de los parámetros de cinética de inhibición .....	21
2. Evaluación de polifenoles totales .....	21
E. METODOLOGIA.....	22
1. Obtención de pampa orégano deshidratado .....	22
2. Formulación y preparación del filtrante .....	24
3. Evaluaciones en los filtrantes .....	24
a. Parámetros de cinética de inhibición de DPPH.....	24
b. Polifenoles totales.....	28
c. Análisis sensorial .....	29
4. Optimización mediante superficie de respuesta (RSM).....	35
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	37
A. OBTENCIÓN DE PAMPA OREGANO DESHIDRATADO.....	37
1. Secado de pampa orégano .....	37
2. Actividad antioxidante del pampa orégano.....	39
3. Evaluación sensorial del pampa orégano.....	41
B. FORMULACIÓN Y PREPARACIÓN DEL FILTRANTE.....	42
C. EVALUACIONES EN LOS FILTRANTES .....	43
1. Parámetros de cinética de inhibición de DPPH.....	43
a. Actividad antioxidante .....	43
b. Coeficiente de inhibición (IC <sub>50</sub> ) .....	44
c. Velocidad de reacción (K <sub>2</sub> ).....	47
d. Correlación del contenido de polifenoles totales frente al coeficiente de inhibición (IC <sub>50</sub> ) de los filtrantes.....	50

2.	Evaluación sensorial .....	53
a.	Pre-selección de panelistas .....	53
b.	Selección de panelistas.....	53
c.	Entrenamiento y selección final de panelistas.....	53
d.	Determinación del amargor y la astringencia de los filtrantes .....	59
e.	Correlación entre el contenido de polifenoles totales y el atributo sensorial astringencia.....	61
D.	OPTIMIZACION MEDIANTE SUPERFICIE DE RESPUESTA .....	62
1.	Coeficiente de inhibición ( $IC_{50}$ ) .....	62
2.	Velocidad de reacción ( $K_2$ ) .....	66
3.	Atributo sensorial olor .....	69
4.	Atributo sensorial sabor .....	72
5.	Formulación óptima.....	75
V.	CONCLUSIONES .....	77
VI.	RECOMENDACIONES .....	78
VII.	BIBLIOGRAFIA .....	79
ANEXO	.....	88

## INDICE DE CUADROS

	Página
<b>Cuadro 1.</b> Composición química de la hoja fresca de té. ....	3
<b>Cuadro 2.</b> Contenido de polifenoles en tres marcas de té verde chino. ....	4
<b>Cuadro 3.</b> Producción de hoja fresca de té en toneladas métricas.....	5
<b>Cuadro 4.</b> Evaluación de la actividad antioxidante del pampa orégano deshidratado a diferente temperatura. ....	40
<b>Cuadro 5.</b> Evaluación sensorial del pampa orégano deshidratado a temperaturas de 50, 60, 70 y 80°C.....	41
<b>Cuadro 6.</b> Composición de los filtrantes (fracción).....	42
<b>Cuadro 7.</b> Resolución de percepción.....	55
<b>Cuadro 8.</b> Prueba de ordenamiento para el atributo sensorial amargor y astringencia.....	56
<b>Cuadro 9.</b> Prueba de ordenamiento para el olor de hierba luisa y pampa orégano fresco.....	57
<b>Cuadro 10.</b> Calificativo para el atributo sensorial amargor de los filtrantes comerciales.....	58
<b>Cuadro 11.</b> Calificativo para el atributo sensorial astringencia de los filtrantes comerciales.....	58

## INDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Superficie de respuesta tridimensional. ....	11
Figura 2. Superficie de contornos. ....	11
Figura 3. Región experimental para una mezcla de tres componentes.....	14
Figura 4. Metodología seguida para optimizar el filtrante. ....	22
Figura 5. Diseño experimental para determinar la mejor temperatura de secado.....	23
Figura 6. Diseño experimental para determinar los parámetros de cinética de inhibición de los filtrantes.....	27
Figura 7. Gráfico utilizado para la selección de panelistas.....	30
Figura 8. Variación de peso durante el tiempo de secado.....	37
Figura 9. Efecto de la temperatura sobre el contenido de humedad de las hojas de pampa orégano. ....	38
Figura 10. Representación del diseño simplex centroide aumentado. ....	43
Figura 11. Coeficiente de inhibición ( $IC_{50}$ ) de cada uno de los filtrantes. ....	44
Figura 12. Variación de la constante de velocidad de primer orden frente a las diferentes concentraciones de los filtrantes.....	48
Figura 13. Velocidad de reacción ( $K_2$ ) de cada uno de los filtrantes.....	49
Figura 14. Correlación del contenido de polifenoles totales frente al coeficiente de inhibición ( $IC_{50}$ ) de los filtrantes.....	51



<b>Figura 30.</b> Gráfica de efecto de los componentes en la mezcla para el atributo sensorial sabor. ....	74
<b>Figura 31.</b> Región óptima para determinar la composición del filtrante [té verde ( $X_1$ ), hierba luisa ( $x_2$ ) y pampa orégano ( $X_3$ )] con buena actividad antioxidante y cualidades sensoriales aceptables.....	75

## RESUMEN

El presente trabajo se realizó en los laboratorios de Análisis de Alimentos y Evaluación Sensorial de la Universidad Nacional Agraria de la Selva, Tingo Maria - Perú, durante los meses de enero a diciembre del 2002. Se utilizó como materia prima, las hojas de pampa orégano (*Lippia alba*), hierba luisa (*Cymbopogon citratus* Staph) y té (*Camellia sinensis*).

Los objetivos fueron: establecer la temperatura de deshidratado del pampa orégano, así mismo, optimizar el filtrante en base a té verde, hierba luisa y pampa orégano mediante la metodología de superficie de respuesta, considerando los parámetros de cinética de inhibición de 1,1 difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) ( $IC_{50}$  y  $K_2$ ) y los atributos sensoriales de sabor y olor.

El pampa orégano deshidratado a 60°C/110 min mostró mayor actividad antioxidante ( $p < 0,01$ ), con un coeficiente de inhibición de 332,723  $\mu\text{g/mL}$ .

La composición de la formulación óptima fue 50% de té verde, 42% de hierba luisa y 8% de pampa orégano; así mismo, mediante las ecuaciones matemáticas se pronosticó un filtrante con las siguientes características: Coeficiente de inhibición ( $IC_{50}$ ) de 35,83  $\mu\text{g/mL}$  y velocidad de reacción ( $K_2$ ) de 4,42  $(\text{mg/mL})^{-1}\text{Ln}(\text{min}^{-1})$ ; y la aceptación respecto al olor y sabor resultaron ligera y moderadamente agradable, respectivamente; de acuerdo a la escala estructurada cualitativa relativa.

Los filtrantes no presentaron correlación lineal negativa entre el contenido de polifenoles totales y la actividad antioxidante medido por el método de 1,1 difenil-2-picrilhidrazil (DPPH).

## SUMMARY

The present work was carried out in laboratories of Foods Analysis and Sensorial Evaluation of the "Universidad Nacional Agraria de la Selva", Tingo María - Perú, during the months from January to December of 2002. It was used as material raw, marjoram pampa (*Lippia alba*), lemon grass (*Cymbopogon citratus* Staph) and tea (*Camellia sinensis*) leaves.

The aims were: to establish dehydrated temperature of marjoram pampa, likewise, to optimize the filtering bag based on green tea, lemon grass and marjoram pampa through response surface methodology, considering inhibition kinetics parameters of 1,1 diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) ( $IC_{50}$  and  $K_2$ ) and taste and smell sensorial attributes.

Marjoram pampa dried to 60°C/110 min showed bigger activity antioxidant  $p < 0,01$ , with a coefficient of inhibition of 332,723  $\mu\text{g/mL}$ .

The composition of the optimum formulation was 50% of green tea, 42% of lemon grass and 8% of marjoram pampa; likewise, through mathematical equations, it was predicted a filtering bag with the following characteristics: Inhibition coefficient ( $IC_{50}$ ) of 35,83  $\mu\text{g/mL}$  and reaction speed ( $K_2$ ) of 4,42  $(\text{mg/mL})^{-1}\text{Ln}(\text{min}^{-1})$ ; and acceptance regarding taste and smell was slight and moderately nice, respectively; according to relative qualitative structured scale.

The filtering bag did not present correlation lineal between total polyphenols content and antioxidant activity measured by the method of the 1,1 diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH).

## I. INTRODUCCION

Las infusiones de té negro y hierba luisa son bebidas muy consumidas en el Perú. El té se produce en las zonas del Cuzco y la cordillera azul (Divisoria) en tanto que la hierba luisa y el pampa orégano se producen en Chanchamayo, Satipo y el Valle del Huallaga. Estas infusiones son consumidas por sus características de buen estimulante, buen digestivo, antifatulento, antiespasmódico, antiinflamatorio y antidiarreico.

El té puede ser clasificado en tres tipos: Té verde, té oolong y té negro y los principales polifenoles en los tres tipos de té son las catequinas y las teaflavinas. Los polifenoles son compuestos ampliamente distribuidos en la naturaleza, en experimentos *in vivo* y *in vitro* han mostrado ser potencialmente beneficiosos para la salud humana, debido a que son agentes antioxidantes, anticancerígenos y antiinflamatorios.

En el Perú, el té negro es consumido como filtrante, no existiendo marcada comercialización de productos formulados en base a té verde, en éste contexto y con la visión de desarrollar un producto con buenas características antioxidantes y sensoriales, se planteó los siguientes objetivos:

- Establecer la temperatura de deshidratado del pampa orégano.
- Optimizar el filtrante en base a té verde, hierba luisa y pampa orégano mediante la metodología de superficie de respuesta, considerando los parámetros de cinética de inhibición de 1,1 difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) ( $IC_{50}$  y  $K_2$ ) y los atributos sensoriales de sabor y olor.

## II. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA

### A. ASPECTOS GENERALES DE LOS RECURSOS

#### 1. Té

##### a. Información taxonómica y botánica

El té presenta la siguiente clasificación taxonómica:

Reino	:	Vegetal
Sub-reino	:	Embriofitas
División	:	Antofitas
Clase	:	Dicotiledonea
Orden	:	Gufirales
Sub-orden	:	Teínas
Familia	:	Theaceas
Género	:	Campanulaceae
Especie	:	<i>Camellia sinensis</i>

Es una planta de arbustos de hoja perenne, que en régimen de explotación comercial se mantiene a baja altura y en continuo crecimiento vegetativo. Presenta polinización cruzada y por ello es altamente heterogénea; sin embargo se aceptan tres variedades principales: China, Asma y Cambod (Varnam y Sutherland, 1997).

Generalmente se acepta que la temperatura del aire es la óptima en el rango de 18 - 30°C para el desarrollo de los brotes, la temperatura óptima del suelo para el crecimiento está entre 20 - 25°C, en la mayoría de las áreas en las que se cultiva se registra

una precipitación anual de aproximadamente 1800 mm distribuido uniformemente a lo largo del año (Varnam y Sutherland, 1994).

Se cultiva en una amplia variedad de tipos de suelos: aluviales, turberas drenadas, sedimentarios derivados de gneis y de granito y de origen en cenizas volcánicas. El pH óptimo es de 5,0 - 5,6; pudiendo crecer en suelos con pH 4, más no aquellos con pH superior a 6,5 (Varnam y Sutherland, 1994).

#### b. Composición química

En el Cuadro 1, se muestra la composición química del té como hoja fresca.

**Cuadro 1.** Composición química de la hoja fresca de té.

Componentes	Porcentaje
Catequinas y Catequintaninos	26,0
Proteínas	15,7
Cafeína	2,7
Otros componentes nitrogenados	8,7
Azúcar	4,1
Almidón	1,9
Pectina	12,7
Celulosa	7,3
Lignina	6,0
Cenizas	4,9

Fuente: Hart y Fisher (1971).

Los principales flavonoides representan el 30 - 50% de los sólidos en el té verde y disminuye hasta 10% después del proceso de fermentación en el té negro, con el consecuente aumento de teaflavinas (3 - 6%) y tearubigenas (10 - 30%) (Dreosti, 2000). Estos componentes han mostrado un amplio rango de efectos biológicos incluyendo la acción antibacterial, antiviral, antiinflamatoria, antialérgica y acción vasodilatadora (Gadow *et al.*, 1997; Mazza, 1998 y Dreosti, 2000). En el Cuadro 2, se indican los polifenoles presentes en tres marcas de té verde chino.

**Cuadro 2.** Contenido de polifenoles en tres marcas de té verde chino en porcentaje.

Polifenoles	Yunnan	Guangdong	Jinghua
Catequina	0,56	0,57	0,35
Epigalocatequin galato	10,4	6,71	5,55
Epicatequina	13,3	7,22	7,50
Epicatequingalato	4,54	2,68	1,42
Epigalocatequina	6,22	7,92	3,94

Fuente: Ding *et al.* (1999).

### c. Producción en la zona de la Divisoria

La producción de hoja fresca de té en los años 1998 y 1999 se registra en el Cuadro 3, en las zonas de Río Azul, Margarita, Santa Rosa y Porvenir.

**Cuadro 3.** Producción de hoja fresca de té en toneladas métricas.

Meses	Año	
	1998	1999
Enero	31 834	20 068
Febrero	24 710	17 508
Marzo	36 630	22 182
Abril	29 594	18 754
Mayo	27 598	22 943
Junio	21 110	19 911
Julio	18 461	14 751
Agosto	27 811	27 003
Setiembre	36 493	24 976
Octubre	32 586	43 943
Noviembre	27 410	33 217
Diciembre	20 465	46 073
<b>Total</b>	<b>334 652</b>	<b>309 369</b>

Fuente: Jardines del té "el Porvenir" Ltda. (2000).

#### d. Formas de uso

El té es consumido en infusión, ya sea de las hojas sometidas o no a un proceso de fermentación, la forma comercial fermentada lo constituye el llamado té negro, caracterizado por su menor contenido en flavonoides, pero con presencia de teaflavinas y tearubigenas a los cuales también se les atribuye una buena actividad antioxidante (Dreosti, 2000).

El té verde es la forma no fermentada, y es el de mayor impacto en el mercado, en virtud a su habilidad para reducir riesgos de

varios tipos de cáncer en humanos (Gadow *et al.*, 1997). El contenido de flavonoides es superior a todas las formas de procesamiento, y es a ellos que se atribuye el efecto benéfico (Dreosti, 2000).

En un estudio efectuado por (Gadow *et al.*, 1997), encontraron el siguiente orden en cuanto a la actividad antioxidante: té no fermentado > fermentado > semifermentado, determinado por el método de 1,1 difenil-2-picrilhidrazil (DPPH).

## 2. Hierba Luisa

### a. Información taxonómica y botánica

La hierba luisa se clasifica de la siguiente manera:

Reino	:	Vegetal
División	:	Fanerogamas
Sub-división	:	Angiospermas
Clase	:	Monocotiledoneas
Orden	:	Glumiformes
Familia	:	Graminaceae
Género	:	Cymbopogon
Especie	:	<i>Cymbopogon citratus</i> Staph

Es una planta aromática, perenne, constituida por manojos densos de grama alta que pueden crecer hasta uno o dos metros de altura.

El tallo es corto, generalmente subterráneo, confundido con la raíz en un rizoma y frecuentemente de orientación oblicua. Hojas largas, lineares de bordes duros y cortantes, de superficie áspera, terminadas en punta ligeramente endurecidas, tienen generalmente más de un metro de largo y 2 cm de ancho. La base de la hoja es cilíndrica y se ajusta concéntricamente a las demás (Cabieses, 1993).

**b. Composición química**

Diversas investigaciones fitoquímicas realizadas en las hojas desecadas así como en el aceite esencial han permitido identificar los componentes como: Monoterpenos : citral, citral A, citral B, citronelol, geraniol, linaldol. Triterpenos: cymbopogonol, cymbopogona. Esteroide :  $\beta$ -sitosterol (Cabieses, 1993).

**c. Zona de producción**

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

**d. 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 y perfumes (Reeves, 1975).

En nuestro medio, es usada en infusiones, debido a sus características sensoriales atractivas, conferido por el alto contenido de citral (aldehído) de 70 a 90 % (Cabieses, 1993).

#### e. Acción farmacológica

El aceite esencial de hierba luisa ha sido examinado repetidamente en el laboratorio farmacológico comprobándose que tiene efectos fisiológicos; como la acción relajante y antiespasmódica sobre el músculo liso intestinal; además, no tiene acción hipotérmica, ni hipertérmica.

Estudios han logrado aislar una sustancia que tiene acción similar a la insulina; estos estudios continúan, pero no se ha logrado aún una estandarización de los resultados. Además, hay un alcaloide aún mal identificado (olaniyietal) que parece tener acción antimalárica (Cabieses, 1993).

### 3. Pampa Orégano

#### a. Información taxonómica y botánica

El pampa orégano se clasifica de la siguiente manera:

Reino	:	Vegetal
Familia	:	Verbenaceae
Género	:	Lippia
Especie	:	<i>Lippia alba</i>

Hierba arbustiva hasta 50 cm de alto, hojas elípticas hasta redondeado-ovadas, opuestos o terminales, aguda u obtusa, crenada mas o menos rugosa, canescente tomentosa-vellosa abajo, aserradas en el margen, ligeramente escabrosas en la superficie, flores con corola algo púrpura o blancas, cáliz de casi 2 mm de largo, bidentado (Silva, 1995).

**b. Composición Química**

Contiene aceites esenciales, lipiol, ácido tánico, citral, L-limoneno, geraniol y alcaloides (Mejía y Reng, 1995).

**c. Zona de producción**

Se encuentran distribuidos en los departamentos de Amazonas, Huánuco, la Libertad, Loreto, Pasco y San Martín (Mejía y Reng, 1995).

**d. Acción farmacológica**

En nuestro medio, es usada en infusión como calmante, soporífero y contra dolores cardiacos (Mejía y Reng, 1995), también es usado como antíflatulento y antipirético (Silva, 1995).

**B. METODOLOGIA DE SUPERFICIE DE RESPUESTA (RSM)**

**1. Concepto**

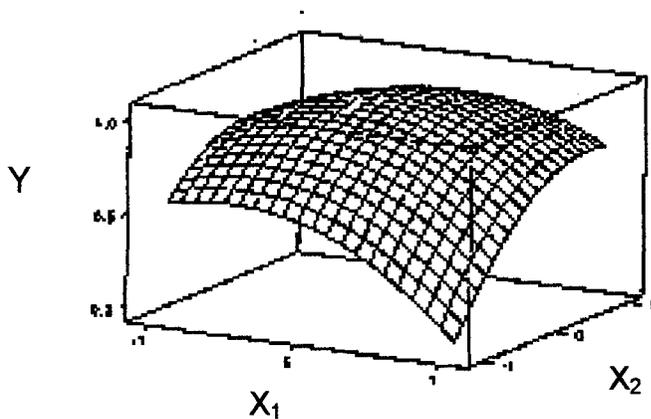
El uso de diseños de superficie de respuesta es la alternativa adecuada, en experimentos cuyo objetivo es establecer la relación entre los factores y la variable dependiente, dentro de la región

experimental. El término “Metodología en Superficies de Respuesta”, se refiere al paquete de diseños estadísticos e instrumentos de análisis que se emplean en las siguientes etapas:

- Diseño y recopilación de datos experimentales, los cuales se usan en la determinación de una ecuación matemática que se empleará para las predicciones.
- Aplicación de técnicas de regresión lineal múltiple para seleccionar la “mejor” ecuación que represente el comportamiento de los datos.
- Análisis de la superficie ajustada mediante gráficas de contorno y de otras técnicas matemáticas y numéricas (Lawson *et al.*, 1992).

Montgomery (1991) menciona que la metodología de superficie de respuesta es un conjunto de técnicas matemáticas y estadísticas útiles para modelar y analizar problemas en los cuales una respuesta de interés es influida por varias variables, y el objetivo eventual de la RSM consiste en determinar las condiciones de operación óptima para un sistema, o determinar la región del espacio de los factores en la que se satisfacen las condiciones de operación.

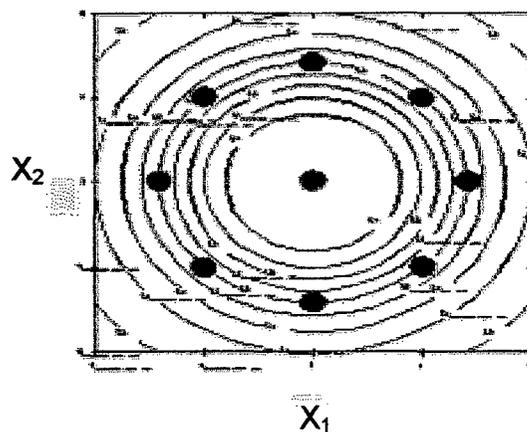
Con el fin de analizar mejor es posible representar gráficamente la superficie de respuesta como se muestra en la Figura 1, si la respuesta esperada se denota  $\varepsilon(y) = f(x_1, x_2) = \eta$ ; donde  $\eta$  se grafica contra los niveles de  $x_1$  y  $x_2$ . Obsérvese que la respuesta se representa como una superficie sólida en un espacio tridimensional.



**Figura 1.** Superficie de respuesta tridimensional.

Fuente : Montgomery (1991).

Para visualizar mejor la forma de una superficie de respuesta, a menudo se grafican los contornos de dicha superficie como se muestra en la Figura 2. En esta gráfica de contornos, se trazan líneas de respuesta constante en el plano  $x_1, x_2$ . Cada contorno corresponde a una altura específica de la superficie de respuesta, tal gráfica es útil para estudiar los niveles de  $x_1$  y  $x_2$  que dan por resultado cambios en la forma o altura de la superficie de respuesta.



**Figura 2.** Superficie de contornos.

Fuente : Montgomery (1991)

En la mayoría de los problemas de metodología de superficies de respuesta (RSM), la forma de la relación entre la respuesta y las variables independientes se desconoce. Por ello, el primer paso en la RSM consiste en determinar una aproximación apropiada a la relación funcional entre  $\eta$  y el conjunto de variables independientes; por lo general se emplea un polinomio de orden bajo y cuando existe curvatura en el sistema debe emplearse un polinomio de mayor grado (Montgomery, 1991).

## 2. Metodología de superficie de respuesta para una mezcla

Montgomery (1991), menciona que en experimentos de mezcla, los factores son los componentes o ingredientes de una mezcla, y en consecuencia, sus niveles no son independientes. Por ejemplo, si  $x_1, x_2, \dots, x_p$  denota las proporciones de  $p$  componentes de una mezcla, entonces:

$$0 \leq x_i \leq 1; \quad i = 1, 2, \dots, p \quad \text{y} \quad x_1 + x_2 + x_3 + \dots + x_p = 1$$

Los diseños simplex se emplean para estudiar los efectos de componentes de mezclas en la variable de respuesta. Un diseño de red simplex  $(p, m)$  para  $p$  componentes consiste en puntos definidos por las siguientes condiciones de coordenadas (las proporciones asumidas por cada componente toman los valores equiespaciados  $m+1$  desde 0 hasta 1).

$$x_i = 0, 1/m, 2/m, \dots, (1). \quad i = 1, 2, 3, \dots, p$$

y se emplean todas las posibles combinaciones (mezclas) de las proporciones de la ecuación 1.

Por ejemplo, sean  $\rho = 3$  y  $m = 2$ . Entonces

$$X_i = 0, \frac{1}{2}, 1; \quad i = 1, 2, 3$$

Y la red simplex consiste en las seis corridas siguientes:

$$(x_1, x_2, x_3) = (1, 0, 0); (0, 1, 0); (0, 0, 1); (\frac{1}{2}, \frac{1}{2}, 0); (\frac{1}{2}, 0, \frac{1}{2}); (0, \frac{1}{2}, \frac{1}{2})$$

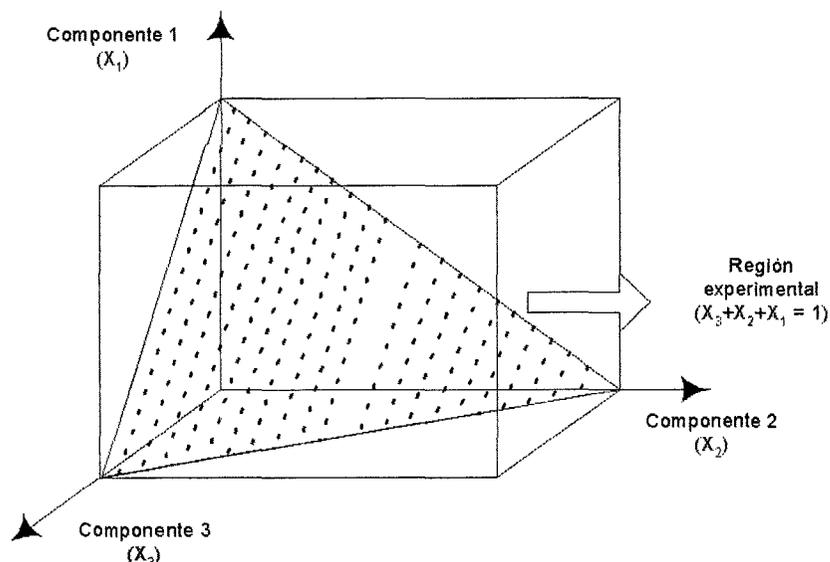
Una crítica a los diseños simplex es que la mayoría de las corridas experimentales se hacen en la frontera de la región y en consecuencia, sólo incluyen  $\rho - 1$  de los  $\rho$  componentes. Por lo tanto suele ser deseable aumentar la red o el centroide simplex con puntos extra en el interior de la región en que las mezclas consistirán en todos los  $\rho$  componentes (Montgomery, 1991).

#### a. Las coordenadas triangulares

Lawson *et al.*, 1992, mencionan que la región experimental en un experimento normal, es el área dentro del cuadrado o rectángulo, mientras que en un diseño de mezclas para tres elementos consiste en una superficie bidimensional del plano triangular tal como se muestra en la Figura 3, en lugar de un cubo. Para cuatro elementos, la región es el volumen de un tetraedro regular.

Las respuestas asociadas con las proporciones de las variables del componente ( $X_1$ ,  $X_2$  y  $X_3$ ) en un gráfico ternario son trazados

en una imagen de 3-dimensiones para cada nivel de la agrupación inconstante (el usuario define el subconjunto de datos).



**Figura 3.** Región experimental para una mezcla de tres componentes.

Un gráfico ternario puede usarse para examinar las relaciones entre tres o más dimensiones donde tres de esas dimensiones representan componentes de una mezcla (es decir, las relaciones entre ellos están forzadas tal que los valores de las tres variables agregan hacia arriba a la misma constante para cada caso). Una aplicación típica de este gráfico es cuando la respuesta medida de un experimento depende de las proporciones relativas de tres componentes (por ejemplo, tres químicos diferentes) que es variado para determinar una combinación óptima de esos componentes (por ejemplo, en los planes de mezcla) (Statística – Help versión 5,0, 1995).

**b. Superficies y contornos triangulares**

Puesto que ahora se puede adicionar al triángulo una cuarta dimensión, que es perpendicular a los otros 3 primeros. Usando aquella dimensión, uno puede plotear los valores para una variable dependiente, o una función que se ajuste a la variable dependiente. Nótese que ambas superficies de respuesta pueden ser mostradas en 3D, donde la respuesta pronosticada (ejemplo, la evaluación del sabor) se indica por la distancia de la superficie del plano triangular, o puede indicarse en un gráfico de contorno donde los contornos de altura constante son los graficados en el triángulo de 2D (Statistica –Help versión 5,0, 1995).

**c. Análisis de Varianza.**

Para decidir cual de los modelos de complejidad creciente nos proporciona un ajuste suficientemente bueno a los datos observados, uno compara usualmente los modelos en orden de jerarquía y usted puede escoger de cuatro funciones de regresión para ajustar los datos en un ploteo ternario (Statistica versión 5,0, 1995).

**Falta de ajuste**

Si los experimentos en el diseño fueron repetidos, entonces uno puede obtener un estimado de la variabilidad del error basado solamente sobre la variabilidad entre los experimentos repetidos. Esta variabilidad proporciona una buena indicación de la falta de

fiabilidad en las medidas, independiente del modelo que fue ajustado a los datos, puesto que está basado en factores fijados idénticamente (o mezclas en este caso). Uno puede probar la variabilidad residual después de adecuar el modelo actual contra este estimado del error puro. Si esta prueba es estadísticamente significativa; eso es, si la variabilidad residual es significativamente más grande que la variabilidad del error puro, entonces uno puede concluir que, hay diferencia significativa adicional entre las mezclas que no pueden ser contabilizadas por el modelo actual. De esta manera, habría una falta de ajuste global del modelo vigente. En este caso, probar un modelo más complejo (Statistica versión 5,0, 1995).

### **III. MATERIALES Y METODOS**

#### **A. LUGAR DE EJECUCIÓN**

El presente estudio se realizó durante los meses de enero a diciembre del 2002 en los laboratorios de Análisis de los Alimentos, Entomología y Evaluación Sensorial de la Universidad Nacional Agraria de la Selva (UNAS), ubicada en la ciudad de Tingo María, distrito de Rupa Rupa, provincia de Leoncio Prado, departamento de Huánuco a 09° 17' 08" de latitud sur; 75° 59' 52" de longitud oeste y 660 msnm, con una humedad relativa y temperatura promedio anual de 84% y 24 °C, respectivamente.

#### **B. MATERIA PRIMA**

##### **1. Té**

Se recolectaron hojas de té de la empresa "Jardines de Té" (La Divisoria), situada a 1600 msnm, con humedad relativa anual entre 85 a 99%, temperatura media anual de 20°C y precipitación anual de 3200 a 3800 mm, con época lluviosa entre los meses de octubre a abril.

Para la obtención de té verde se empleó el proceso Sen – Cha (Varnam y Sutherland, 1997), adaptado a las condiciones del laboratorio; con la descripción siguiente.

##### **a. Recolección y selección**

Las hojas de té tiernas fueron recolectadas en horas de la mañana.

**b. Lavado y oréo**

Se procedió a lavar las hojas de té con agua y se oreó a medio ambiente para eliminar el agua del lavado.

**c. Blanqueado**

Se realizó con vapor de agua (agua a ebullición) durante 60 segundos.

**d. Deshidratación**

**Primera etapa.** Se deshidrató utilizando un horno con aire circulante a 100°C, hasta que el contenido de humedad fue de 50%.

**Segunda etapa.** Se deshidrató utilizando un horno con aire circulante a 50 – 60°C durante 30 – 40 minutos. Esta etapa redujo el contenido de humedad a 30%. Inmediatamente se realizó la molienda en un molino de cuchillas tipo 335 - 1310.

**Tercera etapa.** El té molido se deshidrató en un horno con aire circulante a 80 – 90°C, éste proceso duró 40 minutos y el contenido de humedad se redujo a 6%.

**e. Tamizado**

Se uniformizó el tamaño de las partículas utilizando un tamiz N° 40.

**f. Pre-ensado**

El té verde se pre-ensadó en bolsas de polipropileno.

**2. Hierba luisa**

La hierba luisa fue recolectada de la localidad de Chalpón (Cayumba), ubicada en la provincia de Leoncio Prado, departamento de Huánuco.

El proceso seguido para obtener hierba luisa deshidratada de acuerdo a lo investigado por Vásquez (1987) y adaptado a las condiciones del laboratorio; fue como se describe.

**a. Recolección y selección**

Las hojas de hierba luisa se recolectaron en horas de la mañana, seleccionándolo en función a su frescura.

**b. Clasificación y acondicionamiento**

Se utilizó 20 cm de la hoja de hierba luisa a partir del ápice; luego se cortó en 3 partes.

**c. Lavado y oréo**

Se procedió al lavado con abundante agua y se oreó al medio ambiente para eliminar el agua del lavado.

**d. Deshidratación**

A 60°C/5 h aproximadamente utilizando un horno con aire circulante, hasta que el contenido de humedad fue de 6%.

**e. Molienda y tamizado**

Se realizó en un molino de cuchillas tipo 335 - 1310 y se uniformizó el tamaño de las partículas utilizando el tamiz N° 40.

**f. Pre-ensado**

Se pre-ensadó en bolsas de polipropileno.

**3. Pampa orégano**

Se recolectaron de la localidad de Tingo María, ubicada en la provincia de Leoncio Prado, departamento de Huánuco.

**C. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS****1. Materiales de laboratorio**

Vasos de precipitación de 50 y 100 mL; fiola de vidrio de 50 mL; micropipetas de 100 - 1000  $\mu\text{L}$  y de 0 – 200  $\mu\text{L}$  de capacidad; frascos de vidrio color ámbar; embudo de vidrio; probeta graduada de 100 mL; tubos de ensayo de vidrio; gradillas; tips de 200 y 1000  $\mu\text{L}$ ; tubos de plástico de 15 y 50 mL; cubetas de poliestireno (1 x 1 x 4,5 cm); vasos descartables.

**2. Equipos de laboratorio**

Balanza eléctrica, sensibilidad 0,1g, marca OHAUS Brainweigh, modelo B-5000; balanza analítica eléctrica, sensibilidad 0,0001 g, marca Sortorius, U.S.A; espectrofotómetro Genesys 8, Inglaterra; molino de cuchillas, marca Laboratory Mill, modelo 04, serie 641102,

tipo 335 - 1310; horno VWR Scientific 1370FM con aire circulante; refrigeradora, marca ADMIRAL, U.S.A; cronómetro.

### 3. Reactivos

1,1 difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) de Sigma Chemical Co, U.S.A.; ácido tánico de Riedel de Haën, Alemania; cafeína; ferrocianuro de potasio; ácido gálico; cloruro férrico; ácido clorhídrico de Panreac Química S.A; etanol al 96%.

### 4. Papel sellable

Las bolsitas filtrantes, llamadas también papel sellable tipo 746 de 16 g/m<sup>2</sup> (esfuerzo cortante), no hidrosoluble, no aglutinante.

## D. METODOS FISICO-QUIMICOS

### 1. Evaluación de los parámetros de cinética de inhibición

La actividad antioxidante y el coeficiente de inhibición (IC<sub>50</sub>) de los filtrantes fue determinado usando el radical libre 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH\*) (Brand - Williams *et al.*, 1995).

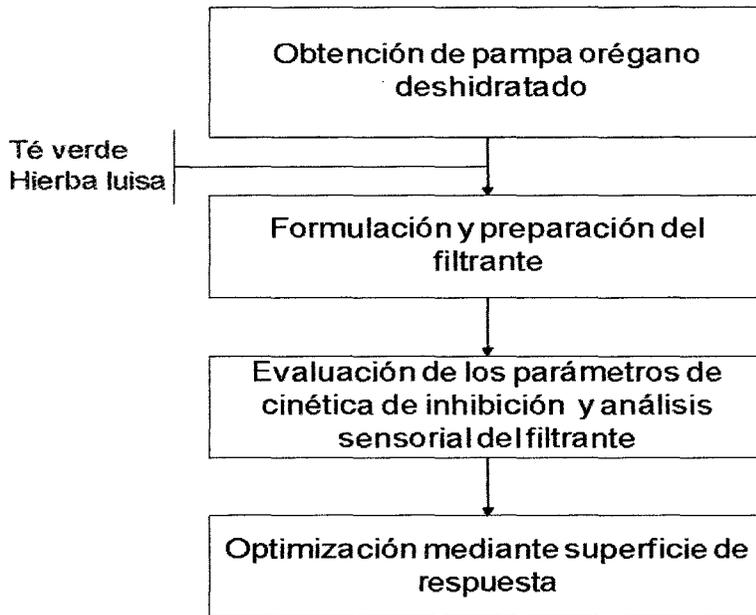
La velocidad de reacción (K<sub>2</sub>) se calculó mediante el modelo matemático multiplicativo que permitió ajustar las curvas de concentración de DPPH versus tiempo de reacción (Sánchez - Moreno *et al.*, 1998).

### 2. Evaluación de polifenoles totales

Se utilizó el método de azul de prusian (Price y Butler, 1977).

## E. METODOLOGIA

En la Figura 4, se presenta las etapas del trabajo.



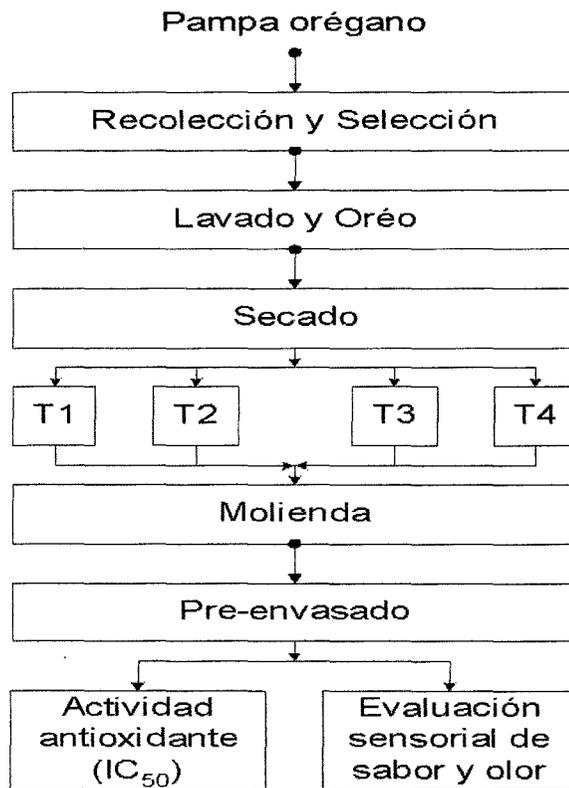
**Figura 4.** Metodología seguida para optimizar el filtrante.

### 1. Obtención de pampa orégano deshidratado

En la Figura 5, se muestra la metodología seguida para obtener pampa orégano deshidratado, evaluando el efecto de la temperatura de secado sobre las propiedades antioxidantes ( $IC_{50}$ ) y sensoriales de sabor y olor, eligiendo la temperatura que mejor conservó las propiedades antes mencionadas; para el análisis sensorial se usó la prueba de Friedman en una categorización cualitativa de 5 puntos; donde el valor mínimo “1” tiene el calificativo de “me desagrada mucho” y “5” tiene “me agrada mucho”. La ficha utilizada se muestra en el Anexo XXIV.

### a. Recolección y selección

La recolección de las hojas de pampa orégano se realizó en función a su frescura.



Donde:

T1, T2, T3, T4: Temperaturas de secado a 50, 60, 70 y 80°C respectivamente.

**Figura 5.** Diseño experimental para determinar la mejor temperatura de secado.

### b. Lavado y oreo

Se procedió al lavado con agua y se dejó a medio ambiente para eliminar el agua del lavado.

**c. Secado**

Se realizó a temperaturas de 50, 60, 70 y 80°C.

**d. Molienda y tamizado**

Se realizó en un molino de cuchillas tipo 335 - 1310 y se uniformizó el tamaño de las partículas utilizando el tamiz N° 40.

**e. Pre-ensado**

Se pre-ensó en bolsas de polipropileno.

**2. Formulación y preparación del filtrante**

La formulación de los filtrantes se hizo en base al diseño simplex centroide aumentado y fue generado por el programa Statistica versión 5,0, 1995.

El té verde, la hierba luisa y el pampa orégano se envasaron en bolsitas filtrantes, llamadas también papel sellable, no hidrosoluble, no aglutinante para estar en contacto con el producto.

**3. Evaluaciones en los filtrantes****a. Parámetros de cinética de inhibición de DPPH****1) Actividad antioxidante****a) Curva de calibración de DPPH**

Se graficó las soluciones de DPPH a concentraciones de 100, 80, 60, 40, 20 y 0  $\mu\text{M}$  versus la respectiva

absorbancia, luego los datos se ajustaron mediante regresión lineal; la ecuación obtenida sirvió para transformar la lectura de la absorbancia en su concentración respectiva de DPPH. En el Anexo III, se muestra la curva de calibración.

#### **b) Preparación de la muestra**

Se prepararon soluciones stock de 100 mg/mL (10 g enraizado a 100 mL con agua) de cada filtrante mediante infusiones (5 min en agua recién hervida), luego fueron filtrados en papel filtro rápido, posteriormente a partir de la solución stock se prepararon disoluciones de 1000, 300, 100, 30, 10, 3, 1  $\mu\text{g/mL}$  que sirvieron para el análisis de DPPH.

#### **c) Coeficiente de inhibición ( $\text{IC}_{50}$ )**

Se hizo reaccionar 50  $\mu\text{L}$  de la disolución acuosa de las diferentes infusiones de los filtrantes con 950  $\mu\text{L}$  de DPPH en etanol al 96%. Se registró la absorbancia de la mezcla a 515 nm durante 12 minutos a intervalos de 0,5 minutos. El porcentaje remanente de DPPH fue determinado a los 12 minutos usando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Remanente de DPPH} = ([\text{DPPH}_{\text{final}}]/[\text{DPPH}_{\text{inicial}}]) * 100$$

Para el cálculo del valor del coeficiente de inhibición ( $IC_{50}$ ), se graficó el % remanente de DPPH versus la concentración de la infusión y se ajustaron mediante la siguiente ecuación:

$$A = a * e^{(b * Q)}$$

Donde:

A = % remanente de DPPH

Q = concentración de la infusión

a y b son constantes.

## 2) Velocidad de reacción ( $K_2$ )

Los datos se procesaron con la ayuda del programa Statistica versión 5,0, 1995 y se ajustaron mediante el siguiente modelo matemático multiplicativo:

$$A = a * (t + 1/8)^b$$

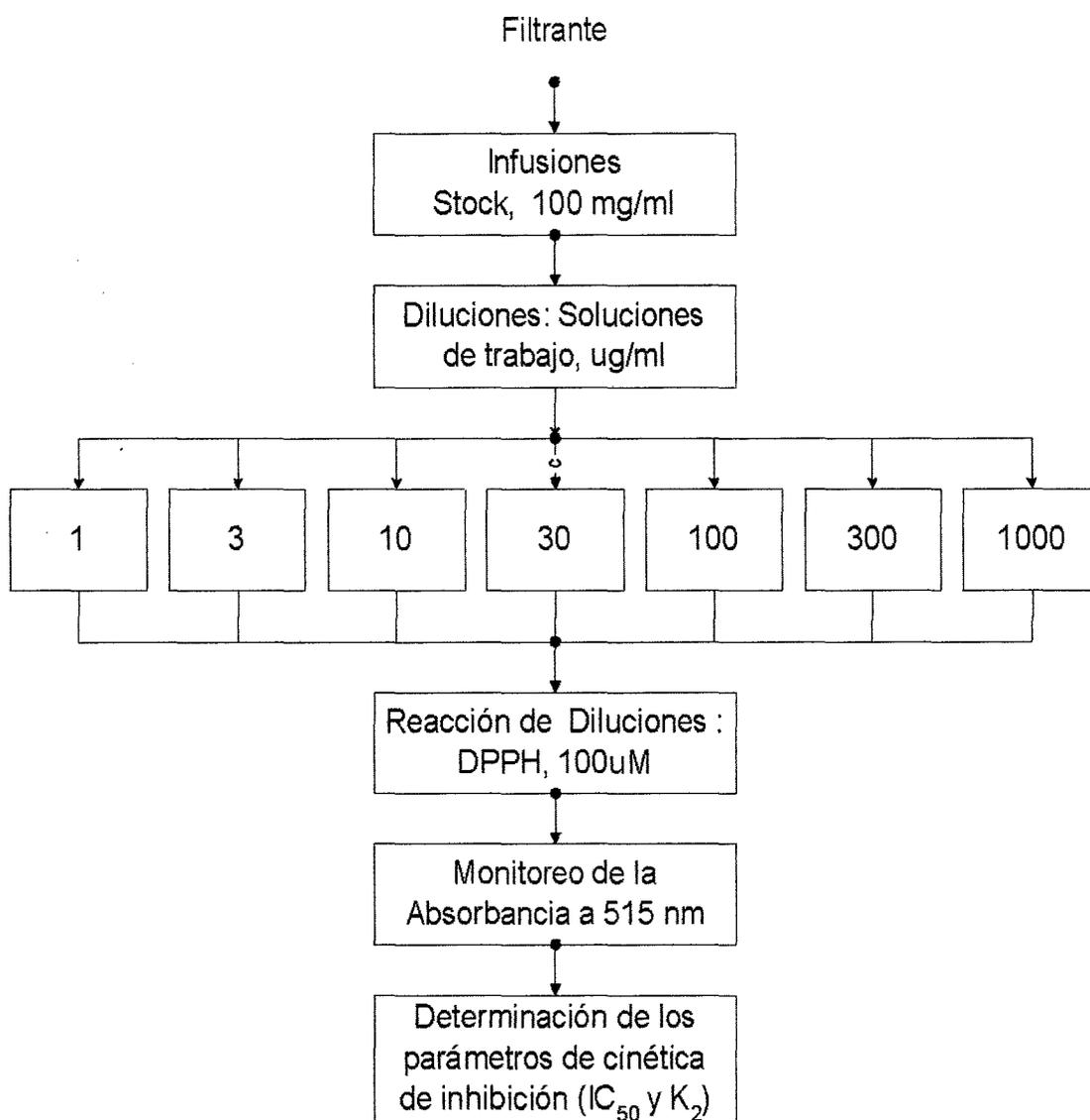
Donde:

A = Concentración de DPPH a diversos tiempos "t"

a y b son constantes.

Con cada una de las concentraciones versus cada valor absoluto de la pendiente "b" de la infusión se realizó una regresión lineal, la pendiente de ésta línea es el valor de  $K_2$ .

En la Figura 6, se muestra la metodología seguida para determinar los parámetros de cinética de inhibición de DPPH de los filtrantes.



**Figura 6.** Diseño experimental para determinar los parámetros de cinética de inhibición de los filtrantes.

**b. Polifenoles totales****1) Preparación de la curva patrón**

Se preparó una solución stock de ácido gálico a 1 mM, a partir de ésta se prepararon soluciones de 0,1; 0,08; 0,06; 0,04; 0,02 y 0,01 mM, que se hicieron reaccionar con cloruro férrico y ferrocianuro de potasio, finalmente se registraron las respectivas absorbancias a 720 nm. Graficándose la absorbancia versus la concentración respectiva y ajustándolo mediante regresión lineal. En el Anexo III, se muestra la curva patrón.

**2) Preparación de las muestras**

Se prepararon soluciones stock de 100 mg/mL de cada filtrante mediante infusiones (5 min en agua recién hervida), luego fueron filtrados en papel filtro rápido, posteriormente a partir de la solución stock se prepararon disoluciones de 10; 1,0; 0,1 y 0,07 mg/mL que sirvieron para el análisis de polifenoles totales.

**3) Polifenoles totales**

Se hizo reaccionar 200  $\mu$ L de las disoluciones con 600  $\mu$ L de cloruro férrico, 10 minutos después se adicionó 600  $\mu$ L de ferrocianuro de potasio, luego de 10 min se registró la absorbancia a 720 nm.

### **c. Análisis sensorial**

#### **1) Pre-selección de panelistas**

Se realizó con la ayuda de una ficha para determinar a los panelistas idóneos (Pedrero *et al.*, 1989).

Se pre-seleccionaron los panelistas considerando su disponibilidad de tiempo, interés de participar, buena salud y los fumadores fueron excluidos. En el Anexo XV, se muestra la ficha utilizada.

#### **2) Selección de panelistas**

Se realizó la prueba del triángulo para seleccionar a los panelistas con aptitud (Anzaldúa, 1992; Ureña y D'arrigo, 1999).

Para ésta prueba se usaron filtrantes comerciales de hierba luisa (Novel's) y té verde (China Green Tea), además de filtrantes de té verde y hierba luisa preparados en el laboratorio.

En la prueba del triángulo, los panelistas recibieron las muestras en vasos descartables codificados con 3 dígitos, 25 mL de cada infusión. Dos de las muestras fueron iguales y una diferente (filtrante comercial y filtrante preparado en el laboratorio). Se solicitó al panelista indicar en la ficha, mostrado en el Anexo XVI, el código de la muestra diferente.

Se realizaron 22 pruebas para cada panelista; 11 para el té verde y las restantes para la hierba luisa, en 11 sesiones realizadas 3 veces por semana, posteriormente los datos fueron procesados mediante el análisis secuencial.

#### a) Análisis secuencial

La figura base para la selección de panelistas, obtenido a partir de los valores mencionados se presenta en la Figura 7.

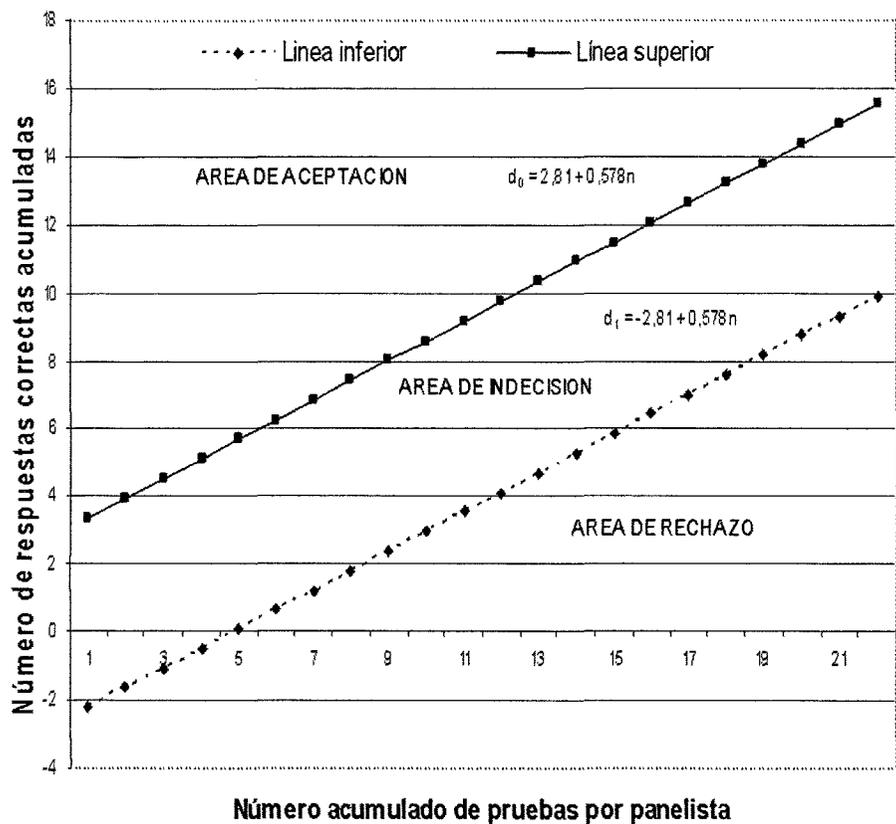


Figura 7. Gráfico utilizado para la selección de panelistas.

Las rectas que establecen las áreas de aceptación, indecisión y rechazo, se concibieron teniendo en cuenta los valores de  $P_0 = 0,45$  (máxima inhabilidad aceptable),  $P_1 = 0,70$  (mínima habilidad aceptable); además se establecieron los valores de  $\alpha = 0,05$  (probabilidad de aceptar un candidato sin cualidades sensoriales y  $\beta = 0,05$  (probabilidad de rechazar un candidato con cualidades sensoriales).

### **3) Entrenamiento y selección final de panelistas**

Se procedió de acuerdo a lo mencionado por Meilgaard *et al.* (2000); Witting de Penna; Mackey *et al.* (1984) y Pedrero *et al.* (1989).

**Entrenamiento.** Los panelistas fueron entrenados por un periodo de 3 meses (Setiembre – Noviembre) en sesiones de 1,5 horas, 3 veces a la semana (54 horas en total); con el fin de aumentar la habilidad de percepción o al menos la mantengan, de manera que estén totalmente instruidos y aptos para iniciar las pruebas definitivas programadas, considerando las siguientes etapas:

- **Charlas sobre los sentidos y las propiedades sensoriales**

Con respecto a los sentidos se explicó acerca del órgano de olfacción y donde se percibe el olor; también del

sentido del gusto y acerca de los receptores de éste sentido; con respecto a las propiedades sensoriales se explicó el concepto de olor, gusto, aroma y sabor.

- **Umbral y resolución de percepción.**

Se determinó el umbral de percepción del amargor utilizando soluciones de cafeína pura a concentraciones de 0,1; 0,08; 0,06; 0,04; 0,03; 0,02; 0,01 y 0% y el umbral de percepción de la astringencia utilizando soluciones de ácido tánico a concentraciones de 0,03; 0,02; 0,015; 0,012; 0,010; 0,008; 0,006 y 0%, en el Anexo XVII, se muestra la ficha utilizada para ambos casos.

Se determinó además la resolución de percepción utilizando la prueba de Dúo-Trío direccionada utilizando soluciones de cafeína (0,030 y 0,045%) y ácido tánico (0,010 y 0,015%) para el amargor y la astringencia respectivamente, en el Anexo XVIII, se muestran las fichas utilizadas.

- **Calibración del panel**

Se utilizó 4 soluciones a diferentes concentraciones para la prueba de ordenamiento y además se pidió a los panelistas calificar las soluciones utilizando para esto una escala cuantitativa absoluta, donde la calificación fue de 0 - 10; utilizando soluciones de cafeína a

concentraciones de 0,1; 0,08; 0,06 y 0,04% y ácido tánico a concentraciones de 0,03; 0,025; 0,019 y 0,012% para el amargor y la astringencia respectivamente. Considerando que previamente los panelistas recibieron muestras patrón a una concentración de 0,12% (10 en la escala) de cafeína para el amargor y 0,038% (10 en la escala) de ácido tánico para la astringencia, en el Anexo XIX, se muestran la fichas utilizadas.

Se realizó también la prueba de ordenamiento en función al olor presentando a los panelistas infusiones a diferentes concentraciones de hojas frescas de hierba luisa (8; 6; 3 y 1%) y hojas frescas de pampa orégano (6; 4; 2 y 1%). En el Anexo XX, se muestran las fichas utilizadas.

**Selección final de los panelistas.** Se pidió al panel calificar las infusiones en función al amargor y la astringencia utilizando muestras comerciales de té verde y hierba luisa, en una escala cuantitativa absoluta; realizándose en 3 sesiones diferentes; previo a cada análisis los panelistas probaron muestras patrón en las concentraciones mencionadas anteriormente, en el Anexo XXI, se muestra la ficha utilizada.

Se seleccionaron a los jueces que no presentan diferencia estadística, utilizándose el diseño de bloque completamente

al azar y las comparaciones múltiples se realizaron con la prueba de Duncan a un nivel de significancia de 0,01.

#### **4) Análisis sensorial de las infusiones de los filtrantes**

El diseño de bloques incompletos balanceados ( $t = 10$ ,  $k = 4$ ,  $r = 6$ ,  $b = 15$ ,  $\lambda = 2$ ,  $E = 0,83$ , tipo III) descrito por Cochran y Cox (1957) fue usado debido a que los jueces seleccionados encontrarían dificultad para evaluar un alto número de muestras. Este diseño permitió a cada juez evaluar 4 de los 10 filtrantes; con tres repeticiones, cada uno de los 10 filtrantes fue evaluado 18 veces.

##### **a) Olor y sabor**

En el Anexo XXII, se muestran los formatos utilizados, empleando una escala estructurada cualitativa relativa donde la calificación fue de 1 a 9 (desde extremadamente desagradable hasta extremadamente agradable).

##### **b) Amargor y astringencia**

En el Anexo XXIII, se muestran los formatos utilizados, empleando una escala cuantitativa absoluta donde la calificación fue de 0 a 10.

#### 4. Optimización mediante superficie de respuesta (RSM)

Se utilizó el análisis simplex – centroide aumentado (Shirose, I y Mori, E, 1966) y el programa Statistica versión 5,0, 1995.

La formulación de la mezcla consistió de té verde ( $X_1$ ), hierba luisa ( $X_2$ ) y pampa orégano ( $X_3$ ) y la suma de las proporciones de los componentes es siempre igual a la unidad.

La formulación óptima del filtrante se obtuvo mediante superficie de respuesta considerando como factores para la optimización las siguientes variables respuesta: Parámetros de cinética de inhibición de DPPH ( $IC_{50}$  y  $K_2$ ) y la evaluación sensorial de olor y sabor.

El análisis de regresión múltiple nos proporciona una relación entre las variables independientes y las respuestas. Los resultados experimentales fueron analizados usando la metodología de superficie de respuesta. El modelo polinomial canónico cúbico reducido y un modelo cúbico especial de Scheffé fue usado para ajustar los datos experimentales.

$$Y = b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{12}X_1X_2 + b_{13}X_1X_3 + b_{23}X_2X_3 + b_{123}X_1X_2X_3 \\ + b_{1'2}X_1X_2(X_1-X_2) + b_{1'3}X_1X_3(X_1-X_3)$$

$$Y_1 = b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{12}X_1X_2 + b_{13}X_1X_3 + b_{23}X_2X_3 + \\ b_{123}X_1X_2X_3$$

Donde:

Y = Variable dependiente pronosticada [parámetros de cinética de inhibición ( $IC_{50}$  y  $K_2$ ) y el análisis sensorial de olor].

$Y_1$  = Variable dependiente pronosticada (análisis sensorial de sabor).

$b$  = Coeficientes del polinomio.

$X_1$  = Té verde;  $X_2$  = Hierba luisa;  $X_3$  = Pampa orégano.

Debido a que fue significativa la falta de ajuste en el ANVA de los modelos usando los datos experimentales originales de los parámetros de cinética de inhibición de DPPH ( $IC_{50}$  y  $K_2$ ), los datos experimentales usados fueron  $\log IC_{50}$  y  $\log K_2$ ; tal como lo realizó Ge *et al.* (2002).

Los modelos matemáticos encontrados fueron usados para generar gráficos de superficie y de contornos para los parámetros de cinética de inhibición ( $IC_{50}$  y  $K_2$ ) y el análisis sensorial de olor y sabor. El área óptima fue obtenida superponiendo los 4 gráficos de superficie de contornos que reúne los criterios para que el producto sea aceptado.

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### A. OBTENCIÓN DE PAMPA OREGANO DESHIDRATADO

Se procedió de acuerdo a lo mencionado en la metodología, teniendo como criterio para definir la temperatura y el tiempo de secado de las hojas de pampa orégano el coeficiente de inhibición ( $IC_{50}$ ) y el análisis sensorial de olor y sabor.

#### 1. Secado de pampa orégano

En la Figura 8, se muestra las curvas de secado a temperaturas de 50, 60, 70 y 80°C, respectivamente.

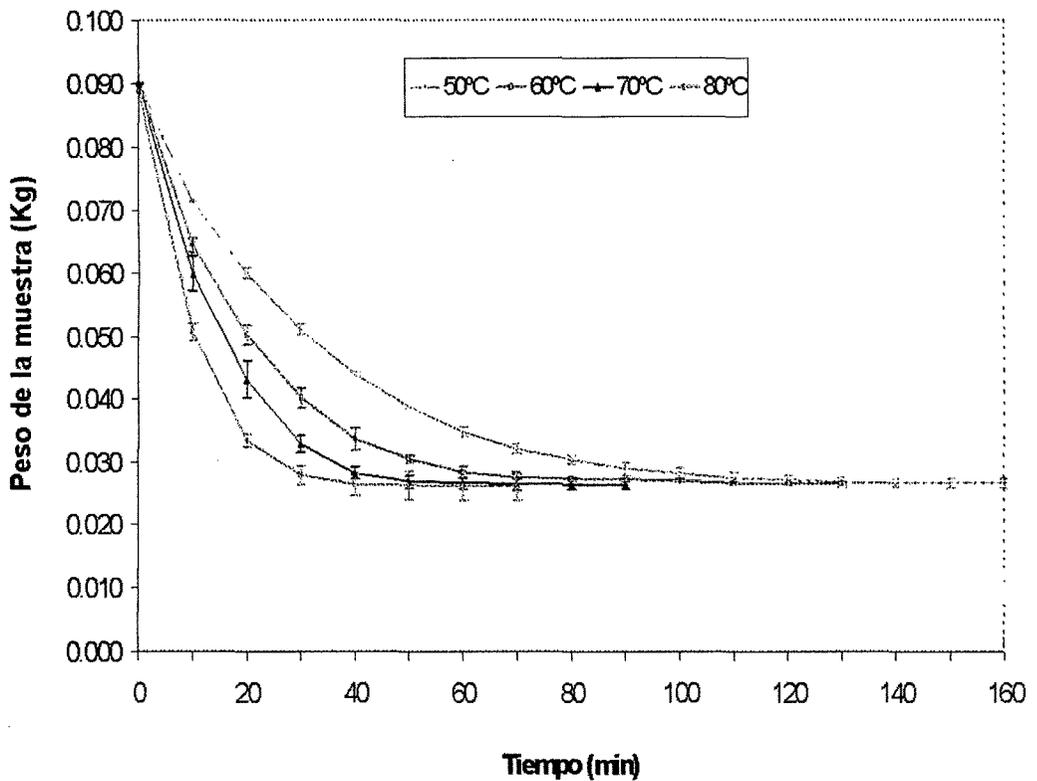
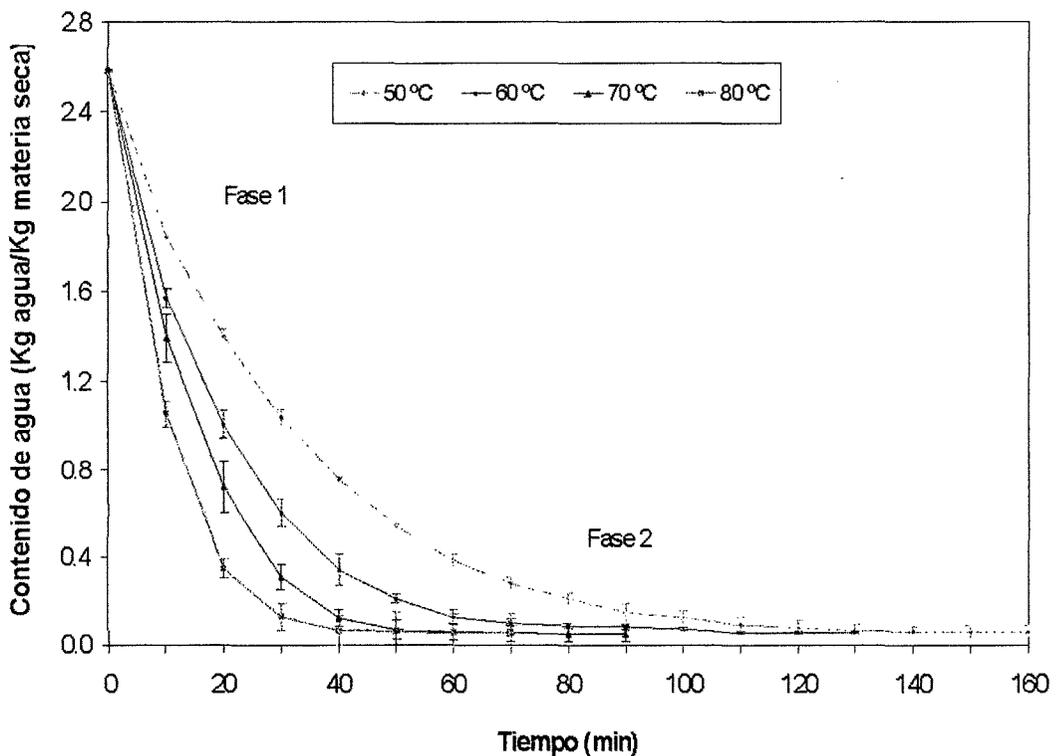


Figura 8. Variación de peso durante el tiempo de secado. Cada valor representa promedios  $\pm$  SD,  $n=3$ .

Barboza y Vega (2000), mencionan que a mayor temperatura el tiempo de secado es menor, coincidiendo con lo mostrado en la Figura 8, donde el tiempo de secado de las hojas de pampa orégano es inversamente proporcional a la temperatura. Singh y Heldman (1997), indican que para evaporar el agua de los alimentos es necesario calor, mediante su difusión en fase líquida y/o vapor a través de su estructura interior; por lo expuesto se graficó en la Figura 9, el efecto de la temperatura sobre el contenido de humedad de las hojas de pampa orégano.



**Figura 9.** Efecto de la temperatura sobre el contenido de humedad de las hojas de pampa orégano. Cada valor representa promedios  $\pm$  SD, n=3.

Curvas de deshidratación similares a los mostrados en la Figura 9 fueron obtenidos por otros autores secando hoja de canela (Angulo, 1993) y plátano verde (Vicente, 1994).

La velocidad de deshidratación para cada temperatura fue obtenida de la pendiente, calculadas en la fase 1 de las curvas mostradas en la Figura 9, por análisis de regresión lineal, de las siguientes ecuaciones:

$$Y_{50^{\circ}\text{C}} = 2,35 - 0,0395 X \quad r = -0,9753$$

$$Y_{60^{\circ}\text{C}} = 2,417 - 0,0651 X \quad r = -0,9777$$

$$Y_{70^{\circ}\text{C}} = 2,378 - 0,075 X \quad r = -0,9732$$

$$Y_{80^{\circ}\text{C}} = 2,444 - 0,1117 X \quad r = -0,9779$$

La velocidad de deshidratación a 60°C fue 1,65 veces más rápido que a 50°C, pero 0,87 y 0,58 veces más lento que a 70 y 80°C, respectivamente. Además, el contenido de agua limite (0,06 Kg de agua/Kg de materia seca) de las muestras fue alcanzada después de 150, 60 y 50 min a 50, 70 y 80°C, respectivamente; mientras que tomó 110 min para la muestra deshidratada a 60°C.

## 2. Actividad antioxidante del pampa orégano

Es importante conocer la actividad antioxidante del pampa orégano deshidratado, para esto se determinó el valor del coeficiente de inhibición ( $IC_{50}$ ).

En el Cuadro 4, se muestra los valores de  $IC_{50}$  del pampa orégano deshidratado a diferente temperatura, observándose que entre los tratamientos existe diferencia estadística ( $p < 0,01$ ) - Anexo X;

notándose que a medida que aumenta la temperatura de secado a partir de 60°C la actividad antioxidante disminuye, coincidiendo con Larrauri *et al.* (1997), quienes encontraron reducciones de 28% y 50% en la actividad antioxidante de la cáscara de uva roja cuando se aplicaron temperaturas de deshidratado de 100 y 140°C, respectivamente.

**Cuadro 4.** Evaluación de la actividad antioxidante del pampa orégano deshidratado a temperaturas de 50, 60, 70 y 80°C.

Temperaturas de secado	IC <sub>50</sub> (µg/mL)
50°C	506,513 ± 9,112 <sup>a</sup>
60°C	332,723 ± 12,140 <sup>c</sup>
70°C	407,007 ± 1,936 <sup>b</sup>
80°C	425,19 ± 6,342 <sup>b</sup>

Los valores representan promedios ± SD, cada uno analizado por triplicado. Los superíndices provienen de la prueba de Tukey (P < 0,01).

Del pampa orégano deshidratado a 50°C se esperó mayor actividad antioxidante pero no fue así; debiéndose posiblemente a que la muestra estuvo mayor tiempo expuesto al calor, coincidiendo con lo reportado por Fellows (1994) quien menciona que se utiliza tiempos cortos a temperaturas altas con el fin de conservar las propiedades del alimento.

### 3. Evaluación sensorial del pampa orégano

Barboza y Vega (2000), mencionan que el proceso de deshidratado de los alimentos no sólo afecta al contenido en agua, sino también otras características físicas, químicas y organolépticas, por lo cual se evaluó sensorialmente el sabor y olor de las infusiones de pampa orégano; en el Anexo IV, se muestran los datos y el desarrollo de la prueba estadística.

Los resultados del análisis sensorial se muestran en el Cuadro 5, donde se puede apreciar que no existe diferencia estadística ( $p < 0,01$ ) entre los atributos sabor y olor del pampa orégano deshidratado a diferente temperatura.

**Cuadro 5.** Evaluación sensorial del pampa orégano deshidratado a temperaturas de 50, 60, 70 y 80°C.

Suma de rangos de los tratamientos	Atributo	
	Sabor	Olor
R <sub>50°C</sub>	55,5 <sup>a</sup>	58,0 <sup>a</sup>
R <sub>60°C</sub>	54,5 <sup>a</sup>	56,0 <sup>a</sup>
R <sub>70°C</sub>	64,0 <sup>a</sup>	65,0 <sup>a</sup>
R <sub>80°C</sub>	66,0 <sup>a</sup>	61,0 <sup>a</sup>

Los superíndices dentro de cada columna indican diferencia estadística. Se realizó mediante una prueba de Friedman con 24 panelistas a  $p < 0,01$ .

Teniendo en cuenta los Cuadros 4 y 5, se eligió deshidratar a 60°C/110 min por ser aquella la temperatura que mejor actividad antioxidante ( $IC_{50}$ ) presenta.

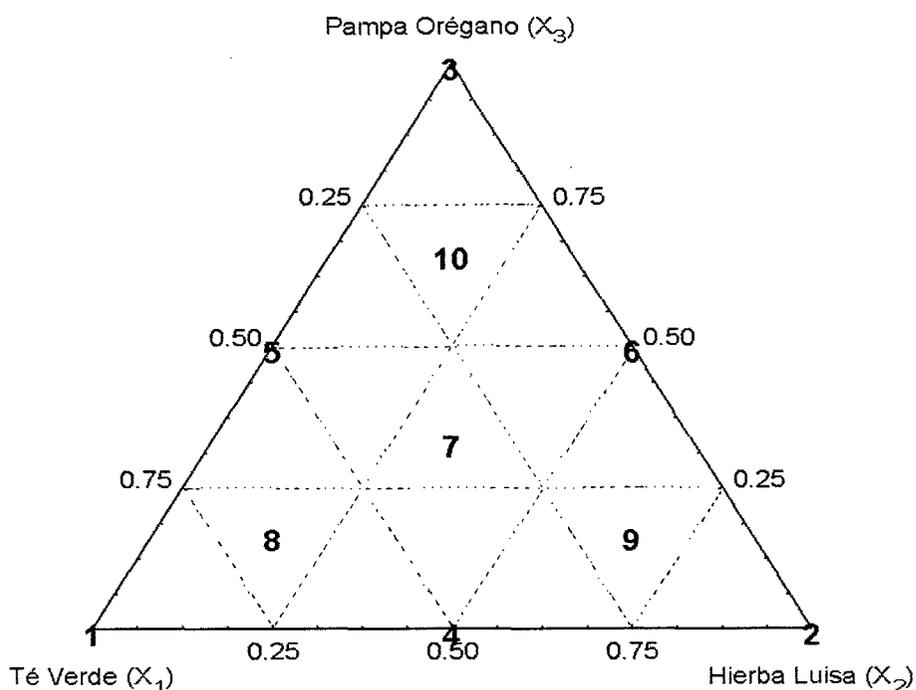
## B. FORMULACIÓN Y PREPARACIÓN DEL FILTRANTE

La formulación de los filtrantes se efectuó en base al diseño simplex centroide aumentado. En el Cuadro 6, se muestra la composición de los filtrantes y la representación del diseño simplex centroide aumentado es presentado en la Figura 10; además se prepararon los filtrantes de acuerdo a lo mencionado en la metodología.

Nótese que la suma de cada componente ( $X_1 + X_2 + X_3$ ) en la mezcla es igual a 1. Este diseño también lo aplicaron Prinyawiwatkul *et al.* (1997); Matringe *et al.* (1999) y Shieh *et al.* (1996).

**Cuadro 6.** Composición de los filtrantes (fracción).

Filtrantes	Té verde ( $X_1$ )	Hierba luisa ( $X_2$ )	Pampa orégano ( $X_3$ )
1	1	0	0
2	0	1	0
3	0	0	1
4	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{2}$	0
5	$\frac{1}{2}$	0	$\frac{1}{2}$
6	0	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{2}$
7	$\frac{1}{3}$	$\frac{1}{3}$	$\frac{1}{3}$
8	$\frac{4}{6}$	$\frac{1}{6}$	$\frac{1}{6}$
9	$\frac{1}{6}$	$\frac{4}{6}$	$\frac{1}{6}$
10	$\frac{1}{6}$	$\frac{1}{6}$	$\frac{4}{6}$



**Figura 10.** Representación del diseño simplex centroide aumentado. Los números de 1 – 10 representan a los filtrantes.

## C. EVALUACIONES EN LOS FILTRANTES

### 1. Parámetros de cinética de inhibición de DPPH

#### a. Actividad antioxidante

En el Anexo I, se muestra la cinética de inhibición de 1,1 difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) para los 10 filtrantes, pudiéndose notar que existe una relación inversamente proporcional con el porcentaje remanente de DPPH frente a la concentración de la infusión de los filtrantes; es decir a mayor concentración de la infusión se produce mayor porcentaje de inhibición, encontrando coincidencias con lo reportado por Brand-Williams *et al.* (1995), Lai *et al.* (2001) y Lebeau *et al.* (2000).

**b. Coeficiente de inhibición ( $IC_{50}$ )**

Thomas (2000), menciona que los antioxidantes son un elemento de una colección de procesos que retardan *in vivo* la oxidación de los radicales libres. El término antioxidación incluyen todos los procesos que retardan o detienen la oxidación de los radicales libres. En la Figura 11, se muestran los valores del coeficiente de inhibición ( $IC_{50}$ ) que nos indica la actividad antioxidante de los filtrantes; en el Anexo V, se muestran los datos.

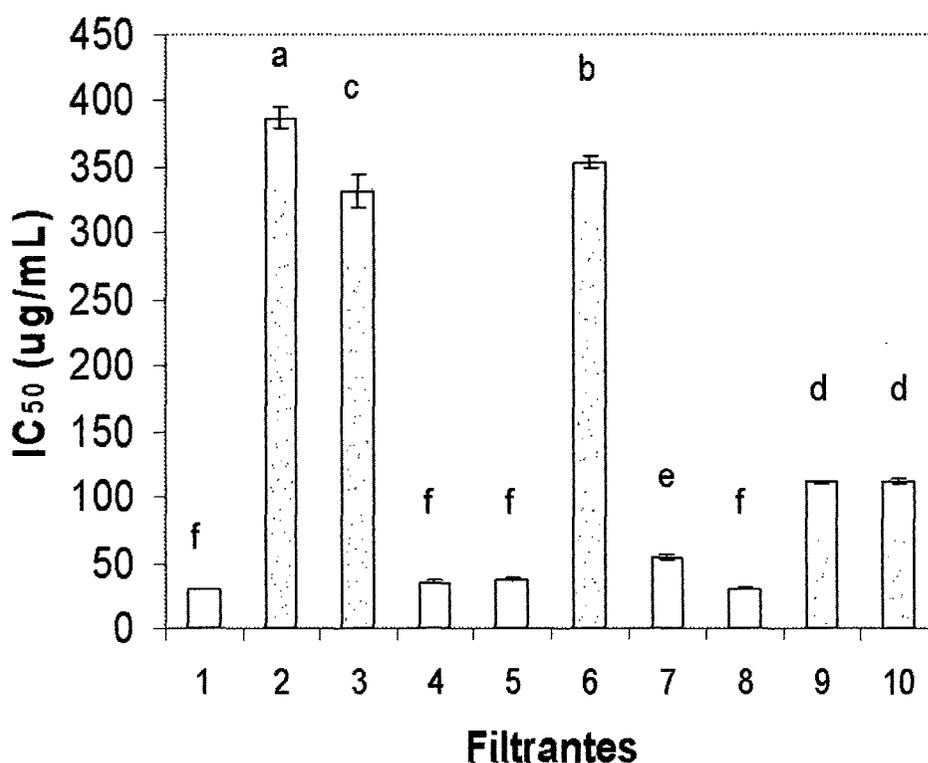


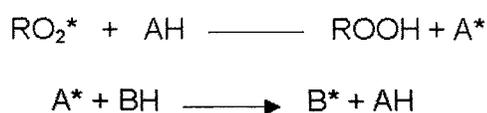
Figura 11. Coeficiente de inhibición ( $IC_{50}$ ) de cada uno de los filtrantes. Letras diferentes indican diferencia estadística y provienen de la prueba de Tukey ( $p < 0,01$ ).

Observándose que el valor de  $IC_{50}$  ( $29,66 \mu\text{g/mL}$ ) del filtrante 1 (100% de té verde) mostró 8,5% mayor actividad antioxidante que el valor de  $IC_{50}$  ( $32,43 \mu\text{g/mL}$ ) obtenido por Ramos (2002) para el té verde, esto posiblemente se deba a la granulometría, puesto que trabajamos con hojas de té molidas, obteniendo así mayor área de contacto, concordando con lo mencionado por Singh y Heldman (1997); además, Yokozawa *et al.* (1998), reportaron para muestras liofilizadas de té verde, té oolong y té negro valores de  $IC_{50}$  de 4,14; 27,02 y  $47,12 \mu\text{g/mL}$ , respectivamente.

Por otro lado Ramos (2002) reportó para la hierba luisa  $1345,79 \mu\text{g/mL}$  ( $IC_{50}$ ) y en nuestro estudio el valor fue de  $387,49 \mu\text{g/mL}$  que corresponde al filtrante 2 (100% de hierba luisa), esta diferencia posiblemente se deba a múltiples factores destacando el lugar de procedencia; Zheng y Wang (2001) encontraron que las condiciones climáticas afecta el contenido de ácidos fenólicos, flavonoides y antocianinas en la planta, mostrando que cuando las condiciones climáticas son adversas a la planta, ésta para defenderse produce mayor cantidad de componentes antioxidantes, al respecto Vasconcellos (2001), menciona que los fenoles protegen a las plantas contra los daños oxidativos y llevan a cabo la misma función en el organismo humano.

La actividad antioxidante del filtrante "1" (100% de té verde) fue 13,06 y 11,22 veces mayor que la actividad antioxidante del filtrante "2" (100% de hierba luisa) y el filtrante "3" (100 % de

pampa orégano), respectivamente. Los filtrantes "4" (50% de té verde – 50% de Hierba luisa), "5" (50% de té verde – 50% de pampa orégano), "8" (66,7% de té verde – 16,7 % de hierba luisa – 16,6% de pampa orégano) y el "1" (100% de té verde); no presentaron diferencia estadística ( $p < 0,01$ ) – Anexo XI, aún cuando las proporciones de los componentes (té verde principalmente) en la mezcla han cambiado, mostrando así efectos sinérgicos entre los mismos, al respecto Fenemma (2000) menciona que se habla de sinergismo cuando una mezcla de antioxidantes tiene una actividad superior a la suma de las actividades de los antioxidantes individualmente analizados. Yokozawa *et al.* (1998) también encontraron mayores efectos para secuestrar los radicales libres usando células cultivadas con una mezcla de té verde y taninos. Una posible explicación de cómo interactúan estos antioxidantes fue reportado por Fenemma (2000), mencionando que teniendo dos aceptores de radicales libres, AH y BH. El esquema de la reacción que tendría lugar sería la siguiente:



De modo, que la presencia de BH se traduciría en una regeneración del antioxidante primario.

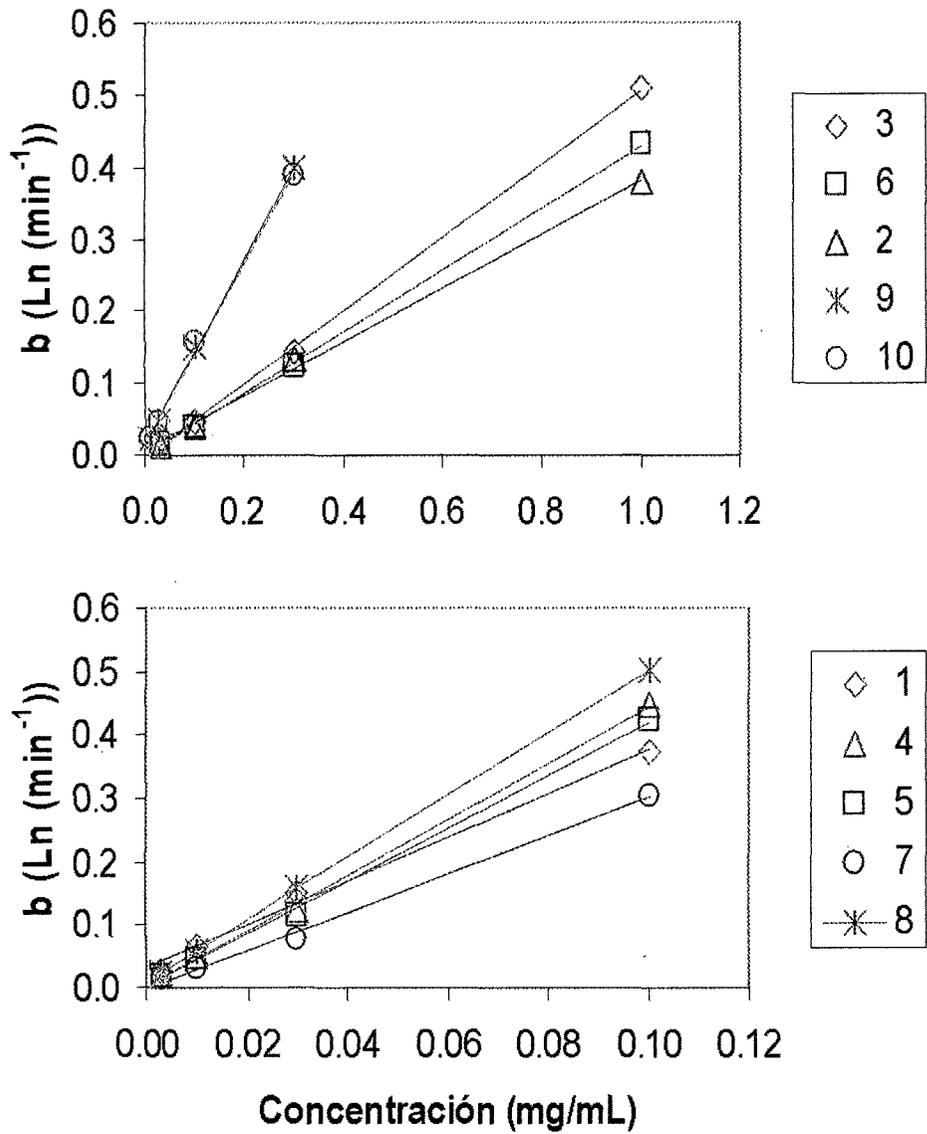
Se comparó además los valores de  $\text{IC}_{50}$  de los antioxidantes usados en la industria alimentaria con los datos obtenidos en el

presente estudio; Lai *et al.* (2001), reportaron para el  $\alpha$ -tocoferol y el BHT valores de  $IC_{50}$  de 0,15 y 0,09 mg/mL, comparándolo con el filtrante con menor actividad antioxidante (Filtrante 2 – 100% de hierba luisa), es 2,6 y 4,3 veces menor que el  $\alpha$ -tocoferol y el BHT, respectivamente y comparándolo con el filtrante con mayor actividad antioxidante (filtrante 1 – 100% de té verde), es 5,1 y 3,0 veces mayor que el  $\alpha$ -tocoferol y el BHT, respectivamente; así mismo, Cao *et al.* (1996), demostraron que el té verde y el té negro tuvieron actividades de  $ORAC_{ROO^{\bullet}}$  mucho más altas que cualquiera de los otros 22 vegetales utilizados normalmente (4,5 – 5,0 veces más alto que el repollo y 60 – 70 veces más alto que el apio), entre los vegetales estudiados los más resaltantes debido a su actividad antioxidante son el ajo, el repollo, las espinacas, la remolacha, la berenjena, el pepino y el apio; demostrando así que el té verde es uno de los alimentos con mayor actividad antioxidante.

### c. Velocidad de reacción ( $K_2$ )

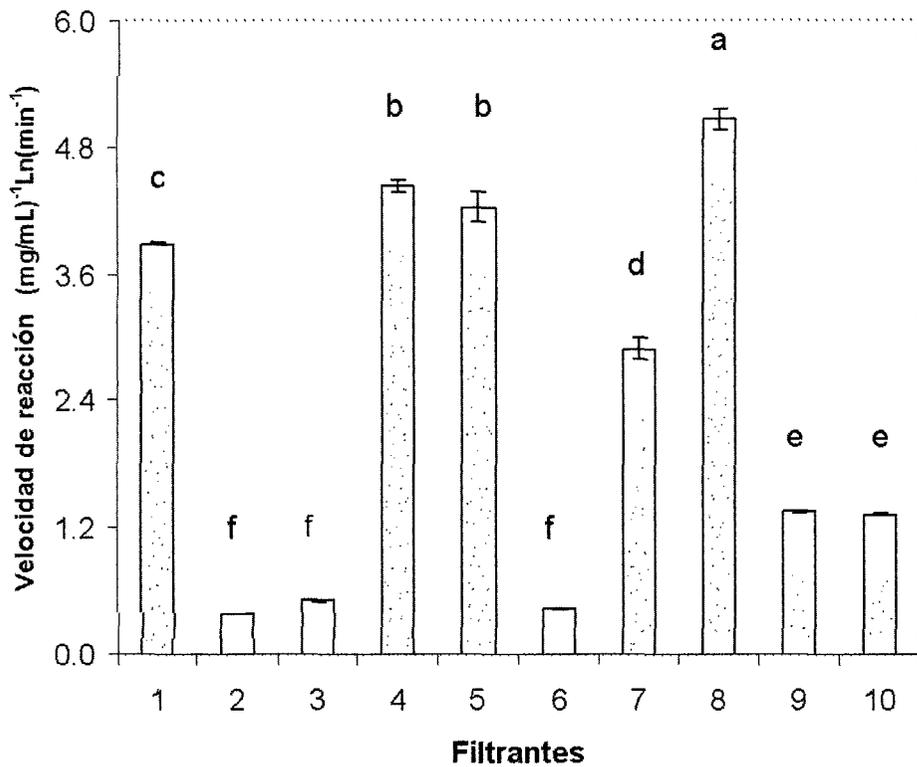
En la Figura 12, se muestra el cambio de la constante de primer orden "b", en función a la variación de las diferentes concentraciones de los filtrantes, apreciándose que existe una relación lineal entre estas variables lo cual indica que las concentraciones tomadas en el presente estudio son las

adecuadas tal como lo menciona Espín *et al.* (2000) y Lebeau *et al.* (2000).



**Figura 12.** Variación de la constante de velocidad de primer orden frente a las diferentes concentraciones de los filtrantes.

En la Figura 13, se muestran los valores de la velocidad de reacción ( $K_2$ ) calculados para los filtrantes, en el Anexo V, se muestran los datos.



**Figura 13.** Velocidad de reacción ( $K_2$ ) de cada uno de los filtrantes. Letras diferentes indican diferencia estadística y provienen de la prueba de Tukey ( $p < 0,01$ ).

En la Figura 13, la velocidad de reacción del filtrante "1" (100% de té verde) fue 10,09 y 7,66 veces más rápido que la velocidad de reacción del filtrante "2" (100% de hierba luisa) y el filtrante "3" (100 % de pampa orégano), respectivamente. Entre los filtrantes en estudio se encontró que existe diferencia estadística significativa ( $p < 0,01$ ) – Anexo XI, mostrando como el mejor al

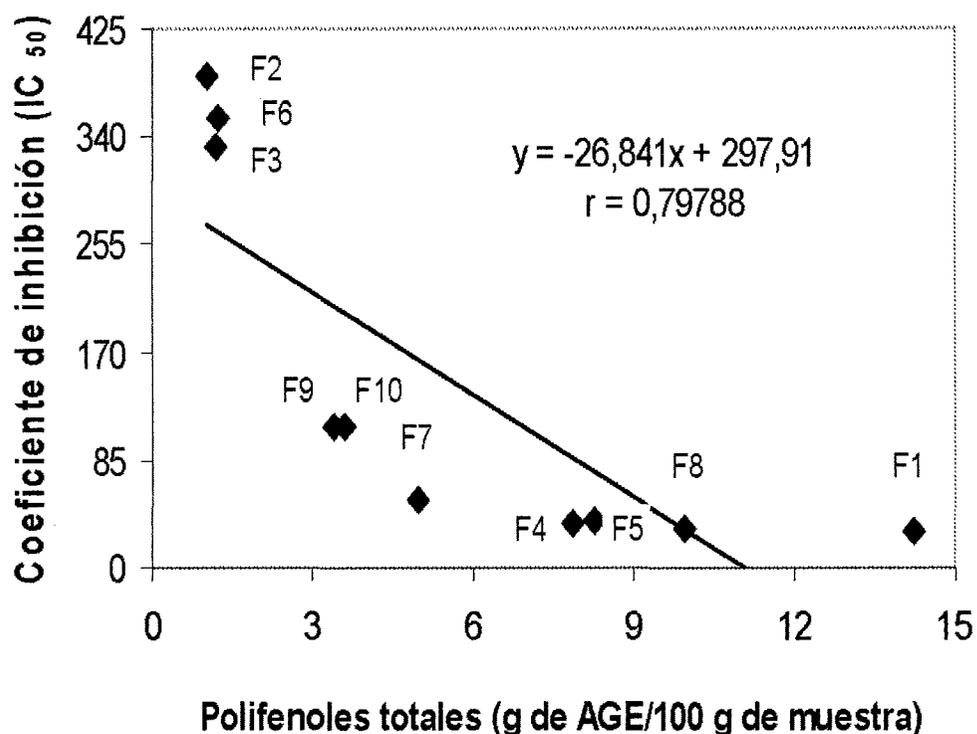
filtrante "8" (66,7% de té verde – 16,7 % de hierba luisa – 16,6% de pampa orégano), además posee 1,14; 1,20 y 1,3 veces más velocidad de secuestro que los filtrantes "4" (50% de té verde – 50% de hierba luisa), "5" (50% de té verde - 50% de pampa orégano) y "1" (100% de té verde), respectivamente; por lo expuesto se notan efectos sinérgicos, al respecto Fenemma (2000) menciona que se habla de sinergismo cuando una mezcla de antioxidantes tiene una actividad superior a la suma de las actividades de los antioxidantes individualmente analizados.

Ramos (2002), reportó valores  $K_2$  de 2,3 y 0,06 (mg/mL)<sup>-1</sup>Ln(s<sup>-1</sup>) para el té verde y hierba luisa, respectivamente usando un modelo multiplicativo para ajustar sus datos; por otra parte Espín *et al.* (2000), reportaron valores  $K_2$  de 1,87 y 0,05 (mg/mL)<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> para el  $\alpha$ -tocoferol y el BHT, respectivamente usando un algoritmo de Gauss-Newton; así mismo Porto *et al.* (2000), reportaron valores  $K_2$  de 189,4 (-OD<sup>-3</sup> min<sup>-1</sup> mg de AGE<sup>-1</sup>) para el cognac utilizando un modelo de cuarto orden.

**d. Correlación del contenido de polifenoles totales frente al coeficiente de inhibición (IC<sub>50</sub>) de los filtrantes.**

Simonetti *et al.* (1997), Landrault *et al.* (2001) y Matsingou *et al.* (2000), encontraron una buena correlación ( $r > 0,9$ ) entre los polifenoles totales y la actividad antioxidante total (TAA), éste último lo demostró bajo condiciones gastrointestinales simuladas.

En la Figura 14, se muestra la correlación que existe entre el contenido de polifenoles totales frente al coeficiente de inhibición de los filtrantes.



**Figura 14.** Correlación del contenido de polifenoles totales frente al coeficiente de inhibición (IC<sub>50</sub>) de los filtrantes. Las letras "F" indican el número del filtrante.

En la Figura 14, se observa que entre los datos experimentales obtenidos en este estudio no existe correlación negativa (Steel y Torrie, 1988), indicando que sólo el 79% de la actividad antioxidante es explicado por el contenido de polifenoles totales, debiéndose posiblemente a que los polifenoles no presentan la misma actividad antioxidante, al respecto Nanjo *et al.* (1996); Seeram y Nair (2002), mencionan que su actividad tiene una

relación directa con su estructura molecular y específicamente, por la posición y el número de grupos hidróxilos presentes en el anillo aromático B, así mismo, Yen y Chen (1995) indican que la actividad antioxidante no puede ser completamente atribuida al contenido de polifenoles; además, se demostró que existe sinergismo entre los componentes del filtrante; por lo tanto el contenido de polifenoles no explica de manera eficaz su actividad antioxidante.

Ramos (2002), reportó 14,11 y 0,81 g de AGE/100g de muestra para té verde y hierba luisa, respectivamente, notando que estos datos son congruentes con nuestros resultados; por otro lado, Kähkönen *et al.* (1999), reportaron 1,27; 1,77 y 1,21 (g de AGE/100 g de muestra seca) para la manzanilla, fresa y manzana respectivamente; en el Anexo VI, se muestran el contenido de polifenoles totales presente en los filtrantes.

Matsingou *et al.* (2000) y Martínez *et al.* (2000), mencionan que los polifenoles pueden ser capaces de reaccionar con especies oxigenadas reactivas implicadas en el daño biológico; Yildirim *et al.* (2001), mencionan que el alto potencial de los compuestos fenólicos para reaccionar con los radicales libres puede ser explicado por su habilidad para donar un átomo de hidrógeno desde sus grupos hidroxílicos fenólicos; Martínez *et al.* (2000), mencionan que la actividad antioxidante descrita para los polifenoles se puede considerar como la actividad biológica

responsable del efecto preventivo que se les atribuye sobre determinadas enfermedades frecuentes en los países desarrollados como son la enfermedad cardiovascular y el cáncer epitelial, combinando todos éstos efectos con los resultados obtenidos podemos decir que conforme aumenta la cantidad de compuestos fenólicos aumenta su actividad antioxidante.

## **2. Evaluación sensorial**

### **a. Pre-selección de panelistas**

De las 25 personas encuestadas se pre-seleccionaron 16 panelistas.

### **b. Selección de panelistas**

De los 16 panelistas pre-seleccionados solamente 14 terminaron la prueba seleccionándose 10 panelistas (Panelista A, C, D, G, H, J, K, L, M y N) 8 varones y 2 mujeres entre 19 – 42 años, puesto que ellos cruzaron la línea superior (Ureña y D'Arrigo, 1999), denotando una tendencia a seguir acertando en sus calificaciones. Los resultados del análisis secuencial para decidir la selección de los 14 panelistas son mostrados en el Anexo II.

### **c. Entrenamiento y selección final de panelistas**

#### **1) Entrenamiento**

De los 10 panelistas seleccionados sólo continuaron 8 (panelistas C, H, M, G, J, K, N, L) 6 varones y 2 mujeres,

quienes siguieron de acuerdo a lo mencionado en la metodología.

#### a) Umbral y resolución de percepción

Con la ayuda de la Figura 15, se determinó el umbral de percepción del atributo amargor y astringencia para determinar la concentración mínima percibida por el panel resultando 0,03% y 0,01%, respectivamente, teniendo en cuenta que los panelistas deben de coincidir en un 75% de respuestas (Ureña y D'Arrigo, 1999; Meilgaard *et al.* 2000).

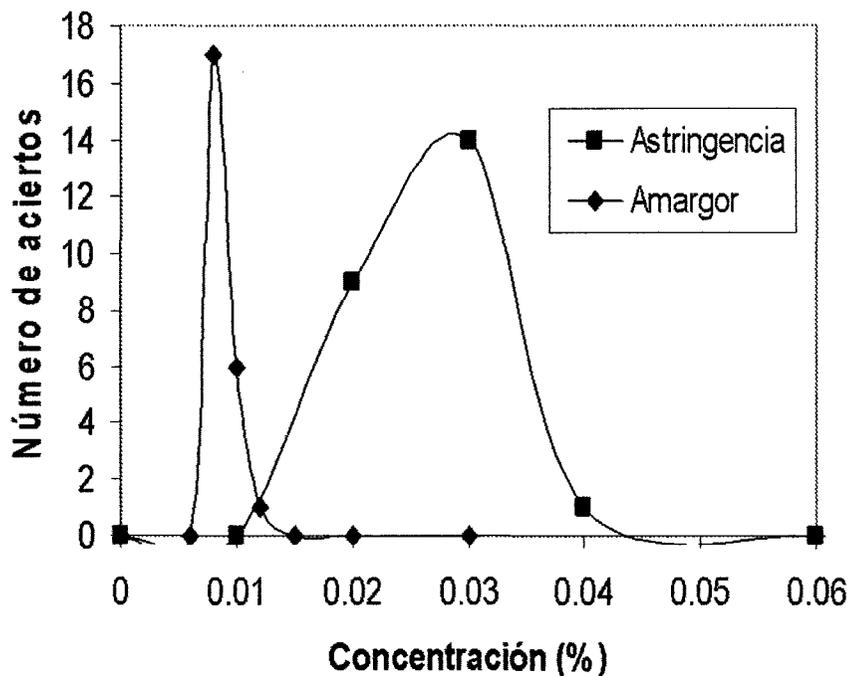


Figura 15. Gráfico para determinar el umbral de percepción. Este se realizó con 3 repeticiones y los datos obtenidos se muestran en el Anexo IX.

Se determinó además la resolución de percepción para el amargor y la astringencia con el fin de determinar la mínima diferencia de concentración de ésta que puede ser percibida por el panel resultando 0,015% y 0,05%, respectivamente, teniendo en cuenta que los panelistas deben de coincidir en un 75% de respuestas (Urefña y D'Arrigo, 1999; Meilgaard *et al.* 2000), en el Cuadro 7, se muestran los resultados.

**Cuadro 7.** Resolución de percepción.

Panelistas	Aciertos			
	Amargor ( $\Delta C = 0,015\%$ )		Astringencia ( $\Delta C = 0,05\%$ )	
	Repetición (1)	Repetición (2)	Repetición (1)	Repetición (2)
Panelista C	1	1	1	1
Panelista H	1	1	1	1
Panelista M	0	1	1	0
Panelista G	1	1	1	1
Panelista J	1	0	1	0
Panelista K	1	1	0	1
Panelista N	1	1	1	1
Panelista L	1	1	1	0
<b>Total de aciertos</b>	<b>14</b>		<b>12</b>	

El número 1 y 0 representan aciertos o no en la prueba respectivamente.

## b) Calibración del panel

Se calibró al panel para el amargor y la astringencia mediante la prueba de ordenamiento en la cual se pidió a los panelistas ordenar las muestras en orden ascendente a la concentración que percibe para conocer su perfil y su progreso (IFT, 1981). Considerando positiva la prueba cuando los panelistas ordenaron las muestras correctamente o que invirtieron solamente parejas adyacentes (Ureña y D'Arrigo, 1999; Meilgaard *et al.* 2000), en el Cuadro 8, se muestran los resultados.

**Cuadro 8.** Prueba de ordenamiento para el atributo sensorial amargor y astringencia.

Panelistas	Prueba de ordenamiento			
	Amargor		Astringencia	
	Repetición (1)	Repetición (2)	Repetición (1)	Repetición (2)
Panelista C	+	+	+	-
Panelista H	-	+	-	+
Panelista M	+	+	+	+
Panelista G	+	+	+	+
Panelista J	-	+	+	+
Panelista K	+	+	-	+
Panelista N	+	+	+	-
Panelista L	-	+	-	+

Los signos “+” y “-” representan pruebas positivas y negativas respectivamente.

Se calibró también al panel mediante la prueba de ordenamiento; para el atributo sensorial olor se utilizó hierba luisa y pampa orégano fresco, teniendo como criterio para considerar positiva la prueba los mismos mencionados anteriormente. En el Cuadro 9, se muestran los resultados.

**Cuadro 9.** Prueba de ordenamiento para el olor de hierba luisa y pampa orégano fresco.

Panelistas	Prueba de ordenamiento			
	Hierba luisa		Pampa orégano	
	Repetición (1)	Repetición (2)	Repetición (1)	Repetición (2)
Panelista C	+	+	-	+
Panelista H	-	+	+	+
Panelista M	+	+	+	+
Panelista G	+	+	+	-
Panelista J	+	+	+	+
Panelista K	+	+	+	+
Panelista N	-	+	-	+
Panelista L	-	+	-	+

Los signos “+” y “-” representan pruebas positivas y negativas respectivamente.

## 2) Selección final de panelistas

En los Cuadros 10 y 11, se muestran los resultados para la selección final de panelistas, realizándose la prueba con filtrantes comerciales.

**Cuadro 10. Calificativo para el atributo sensorial amargor de los filtrantes comerciales.**

Panelistas	Té verde	Hierba luisa
Panelista C	6,7 ± 0,7024 <sup>a</sup>	1,0 ± 0,3000 <sup>c</sup>
Panelista H	5,5 ± 1,2858 <sup>ab</sup>	1,2 ± 0,6658 <sup>c</sup>
Panelista M	6,4 ± 1,0599 <sup>a</sup>	0,9 ± 0,1528 <sup>c</sup>
Panelista G	6,9 ± 0,5000 <sup>a</sup>	3,6 ± 0,4042 <sup>a</sup>
Panelista J	6,8 ± 0,2517 <sup>a</sup>	1,2 ± 0,2000 <sup>c</sup>
Panelista K	6,5 ± 0,5000 <sup>a</sup>	1,0 ± 0,0558 <sup>c</sup>
Panelista N	6,1 ± 0,7768 <sup>ab</sup>	1,0 ± 0,2082 <sup>c</sup>
Panelista L	4,4 ± 0,6351 <sup>b</sup>	2,0 ± 0,0577 <sup>b</sup>

Los valores representan promedios ± SD, cada uno realizado por triplicado. Letras diferentes indican diferencia estadística y provienen de la prueba de Duncan ( $p < 0,01$ ).

**Cuadro 11. Calificativo para el atributo sensorial astringencia de los filtrantes comerciales.**

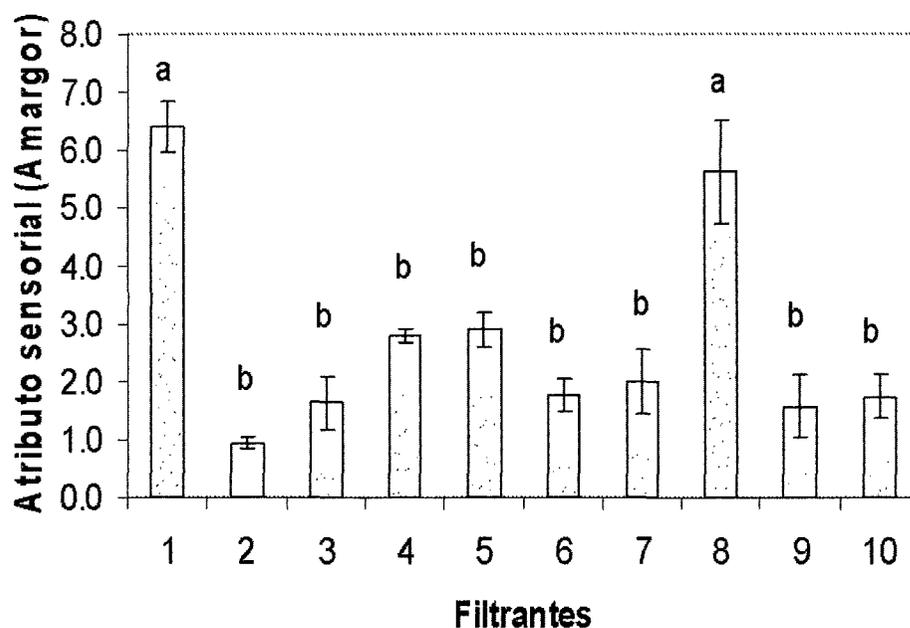
Panelistas	Té verde	Hierba luisa
Panelista C	6,2 ± 0,2887 <sup>b</sup>	1,4 ± 0,5508 <sup>b</sup>
Panelista H	7,1 ± 0,8083 <sup>ab</sup>	1,5 ± 1,3614 <sup>b</sup>
Panelista M	6,5 ± 0,5000 <sup>ab</sup>	1,1 ± 0,0577 <sup>b</sup>
Panelista G	6,5 ± 0,5000 <sup>ab</sup>	3,8 ± 0,7211 <sup>a</sup>
Panelista J	7,7 ± 0,5774 <sup>a</sup>	1,3 ± 0,5774 <sup>b</sup>
Panelista K	6,6 ± 0,1732 <sup>ab</sup>	1,8 ± 0,3512 <sup>b</sup>
Panelista N	6,1 ± 0,4726 <sup>b</sup>	1,6 ± 0,1732 <sup>b</sup>
Panelista L	6,7 ± 0,5774 <sup>ab</sup>	2,7 ± 0,5774 <sup>ab</sup>

Los valores representan promedios ± SD, cada uno analizado por triplicado. Letras diferentes indican diferencia estadística y provienen de la prueba de Duncan ( $p < 0,01$ ).

Se seleccionaron a los jueces idóneos teniendo como criterio de selección final que entre panelistas no presenten diferencia significativa ( $p < 0,01$ )-Anexo XII (Meilgaard, 2000), tanto en filtrantes de hierba luisa como de té verde. Los seleccionados para calificar el atributo sensorial amargor fueron los jueces: C, M, J, K, N y para la astringencia fueron los jueces: C, H, M, K, N.

#### d. Determinación del amargor y la astringencia de los filtrantes

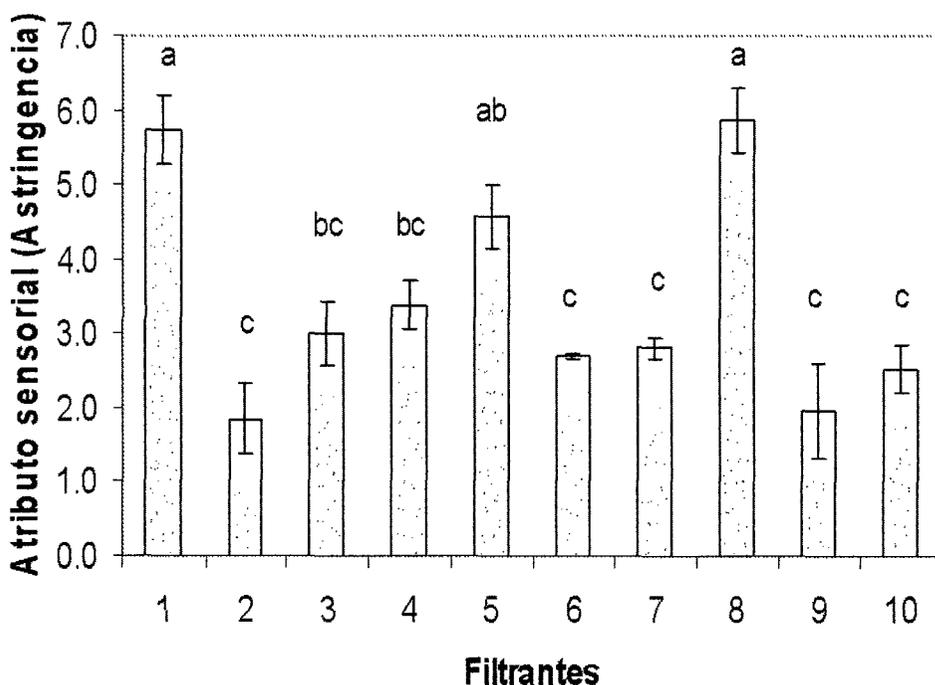
En la Figura 16, se muestra los resultados para el atributo amargor, obtenidos con los panelistas seleccionados, los datos y el análisis de varianza se muestran en los Anexos VIII y XIII, respectivamente.



**Figura 16.** Calificativo para el atributo sensorial amargor de los filtrantes. Letras diferentes indican diferencia estadística y provienen de la prueba de Duncan ( $p < 0,01$ ).

Al respecto Martínez *et al.* (2000), mencionan que los compuestos fenólicos como las flavonas son los responsables del sabor amargo en los cítricos. Así la niringina es el componente amargo mayoritario del pomelo, mientras que la neoherperidina lo es de la naranja; también el ácido clorogénico ha sido asociado al sabor amargo de la cerveza, el vino y la sidra.

En la Figura 17, se muestra los resultados para el atributo sensorial astringencia; los datos y el análisis de varianza se muestran en los Anexos VIII y XIII, respectivamente, obtenidos con los panelistas seleccionados.



**Figura 17.** Calificativo para el atributo sensorial astringencia de los filtrantes. Letras diferentes indican diferencia estadística y provienen de la prueba de Duncan ( $p < 0,01$ ).

Al respecto Martínez *et al.* (2000), mencionan que las proantocianidinas o taninos condensados constituyen la principal fracción fenólica responsables de las características de la astringencia de los alimentos vegetales, aunque la intensidad de estas sensaciones dependen del peso molecular del compuesto presente en el alimento, observándose que sólo los taninos con un peso molecular entre 500 y 3000, pueden desarrollar una sensación de astringencia. Remesy *et al.* (1996), Scalbert y Williamson (2000), también coinciden en mencionar que las proantocianidinas son responsables por la astringencia de los alimentos y están usualmente presentes en asociación con el flavanol catequina; las fuentes son frutas tales como manzana, pera y uvas, bebidas tales como el vino rojo y el té.

**e. Correlación entre el contenido de polifenoles totales y el atributo sensorial astringencia**

En la Figura 18, se aprecia que existe correlación positiva (Steel y Torrie, 1988) de 88,86% entre los polifenoles totales y la astringencia, lo cual nos indica que la astringencia está explicada en gran parte por la presencia de los polifenoles mostrando congruencia con lo expuesto por Martínez *et al.* (2000).

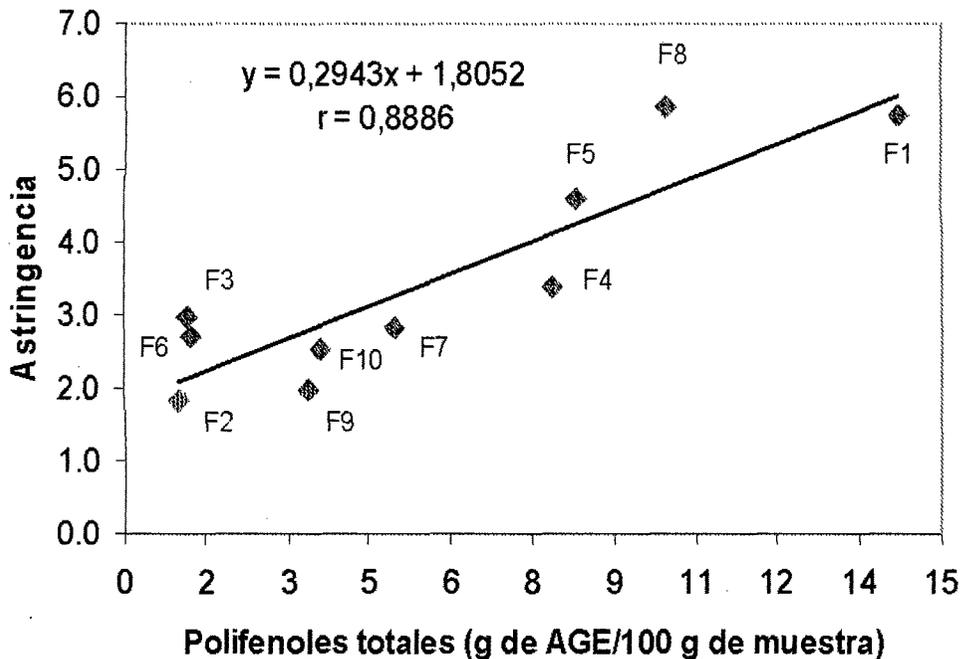


Figura 18. Correlación del contenido de polifenoles totales frente al atributo sensorial astringencia de los filtrantes. Las letras "F" indican el número del filtrante.

## D. OPTIMIZACION MEDIANTE SUPERFICIE DE RESPUESTA

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

En el Anexo XIV, se muestra el análisis de varianza de los modelos matemáticos en orden creciente a su complejidad, donde se puede apreciar que el modelo cúbico reducido es el más adecuado; el valor del  $F_{\text{modelo}}$  es mucho más alto comparado al  $F_{\text{tabulado}}$  ( $p < 0,001$ ). El coeficiente de determinación ( $R^2 = 0,9997$ ) indica que el modelo representa adecuadamente la relación real entre la composición de la mezcla y la variable respuesta. Adicionalmente en el Anexo XIV, se presenta el análisis de varianza del modelo cúbico reducido, donde se

puede apreciar que la falta de ajuste no es significativo ( $p < 0,001$ ) lo que indica que el modelo es adecuado para describir los datos experimentales. Por lo tanto el modelo cúbico reducido obtenido fue:

$$\text{Log}(\text{IC}_{50}) = 1,472 \cdot X_1 + 2,588 \cdot X_2 + 2,522 \cdot X_3 - 1,911 \cdot X_1 \cdot X_2 - 1,703 \cdot X_1 \cdot X_3 - 0,025 \cdot X_2 \cdot X_3 - 1,51 \cdot X_1 \cdot X_2 \cdot X_3 + 0,88 \cdot X_1 \cdot X_2 \cdot (X_1 - X_2) + 0,616 \cdot X_1 \cdot X_3 \cdot (X_1 - X_3);$$

con la ayuda de este modelo se trazó la superficie de respuesta y el gráfico de contorno que se muestran en las Figuras 19 y 20, respectivamente.

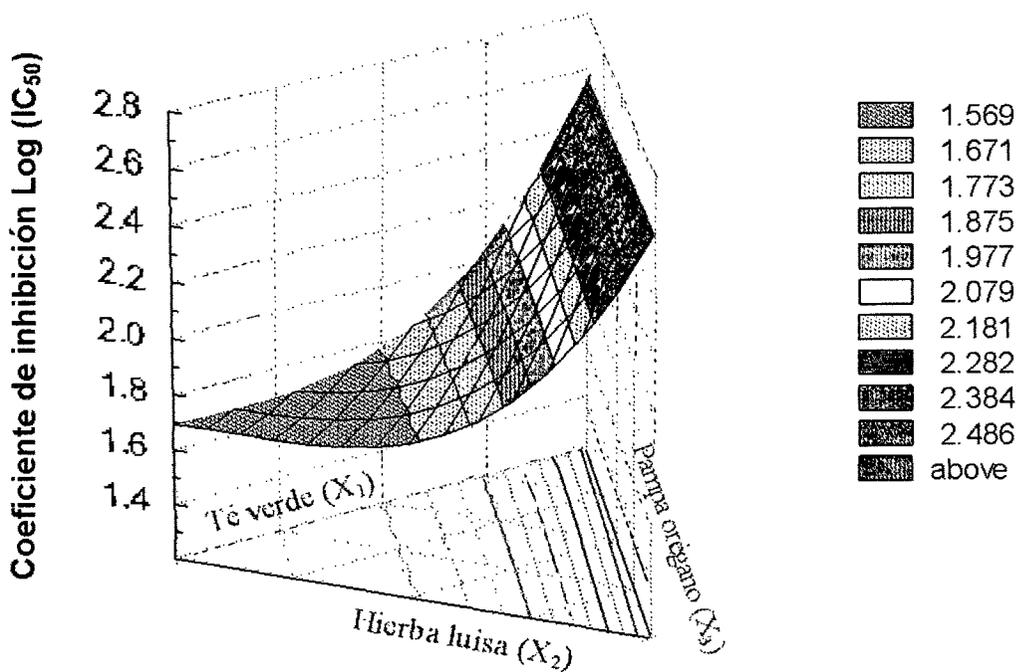
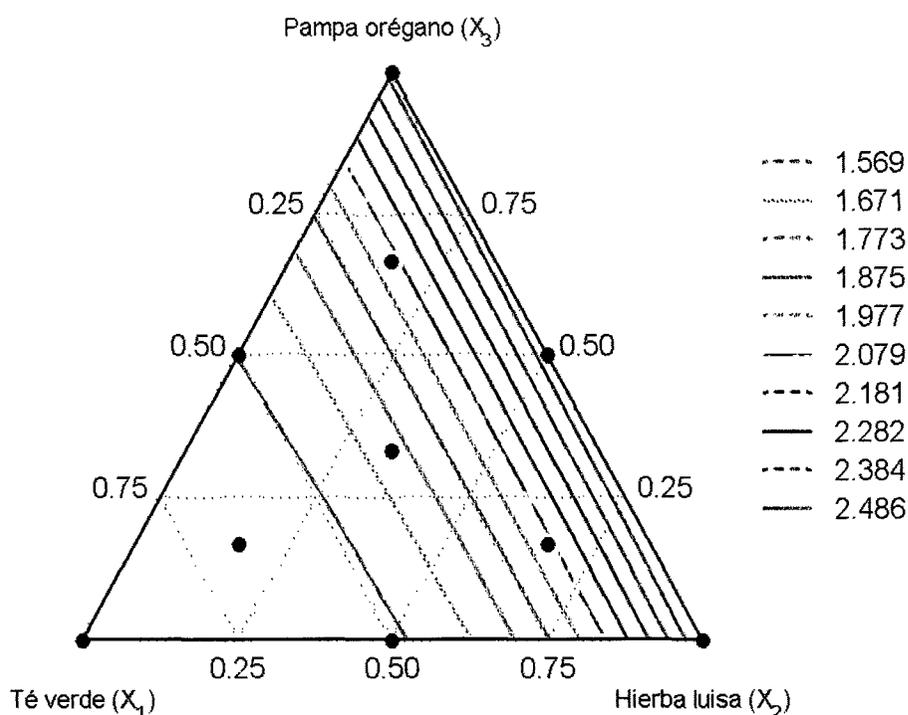


Figura 19. Superficie de respuesta para el coeficiente de inhibición  $\text{Log}(\text{IC}_{50})$ .

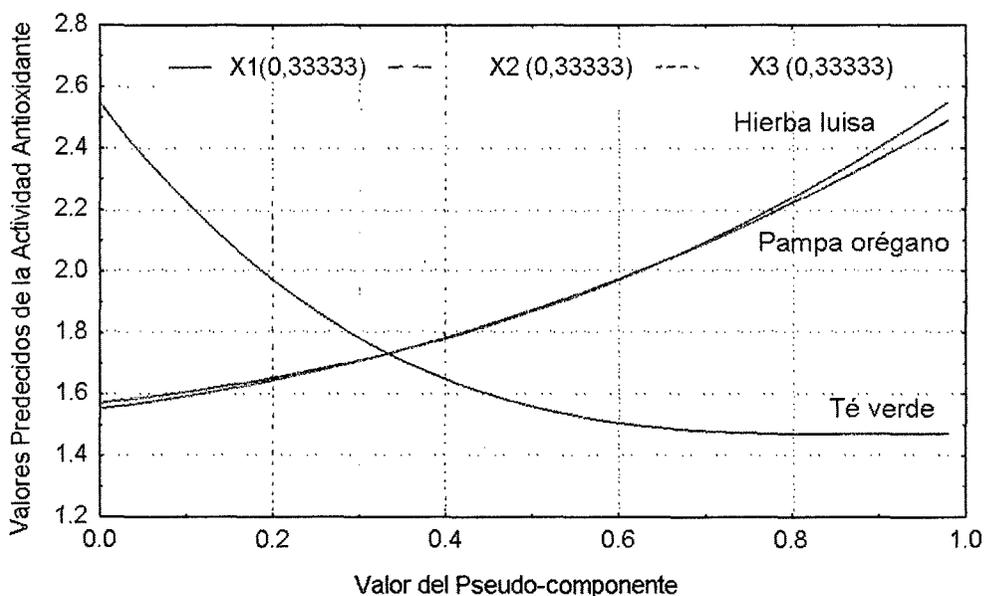


**Figura 20.** Gráfico de contornos para el coeficiente de inhibición  $\text{Log}(IC_{50})$ .

En la Figura 20, se observa que la actividad antioxidante del filtrante pierde poder a medida que la cantidad de té verde disminuye ( $< 50\%$ ) en la mezcla del filtrante; además, se aprecian efectos sinérgicos en los filtrantes 1, 4, 5 y 8 (ver Figura 10, para coordinar los puntos ( $X_1$ ,  $X_2$  y  $X_3$ ) y los números de la formulación) debido a la interacción de los componentes de la mezcla, similar comportamiento encontraron Zheng y Wang (2001), puesto que los filtrantes presentan igual valor (isorespuesta = 1,569) y elevada actividad antioxidante; al respecto, Moure *et al.* (2000) y Fennema (2000), mencionan que la mezcla de antioxidantes ejercen en ocasiones acción sinérgica atribuyéndosele a ambos actividad antioxidante a la vez, de lo contrario, uno se

comporta como antioxidante y el otro como agente quelante, además, Johnson (1995), menciona que los ascorbatos y los tocoferoles tienen efecto sinérgico prolongando de esta manera sus funciones antioxidantes químicas; los ascorbatos también han sido usados para proteger el  $\beta$ -caroteno en las bebidas.

Para apreciar mejor el efecto de cada componente en la mezcla, Lawson *et al.* 1992, recomiendan elaborar una gráfica de efecto, ya que nos permitirá comparar los efectos de los tres componentes con mayor precisión, en la Figura 21, se muestra la gráfica de efecto para el Log  $IC_{50}$ .



**Figura 21.** Gráfica de efecto de los componentes en la mezcla para el coeficiente de inhibición Log ( $IC_{50}$ ).

De la Figura 21, se puede indicar que el té verde ( $X_1$ ) tiene un efecto positivo, mientras que la hierba luisa ( $X_2$ ) y el pampa orégano ( $X_3$ )

contribuyen negativamente a la actividad antioxidante, además, los tres componentes reflejan efectos cuadráticos, lo que refleja la existencia de sinergismo y antagonismo.

## 2. Velocidad de reacción ( $K_2$ )

En el Anexo XIV, se muestra el análisis de varianza de los modelos matemáticos en orden creciente a su complejidad, donde se puede apreciar que el modelo cúbico reducido es el más adecuado; el valor del  $F_{\text{modelo}}$  es mucho más alto comparado al  $F_{\text{tabulado}}$  ( $p < 0,001$ ). El coeficiente de determinación ( $R^2 = 0,9997$ ) indica que el modelo representa adecuadamente la relación real entre la composición de la mezcla y la variable respuesta. Adicionalmente en el Anexo XIV, se presenta el análisis de varianza del modelo cúbico reducido, donde se puede apreciar que la falta de ajuste es no significativo ( $p < 0,001$ ) lo que indica que el modelo es adecuado para describir los datos experimentales. Por lo tanto el modelo cúbico reducido obtenido fue:

$$\text{Log}(K_2) = 0,589 \cdot X_1 - 0,415 \cdot X_2 - 0,296 \cdot X_3 + 2,239 \cdot X_1 \cdot X_2 + 1,912 \cdot X_1 \cdot X_3 - 0,047 \cdot X_2 \cdot X_3 + 1,085 \cdot X_1 \cdot X_2 \cdot X_3 - 0,777 \cdot X_1 \cdot X_2 \cdot (X_1 - X_2) - 0,057 \cdot X_1 \cdot X_3 \cdot (X_1 - X_3);$$

con la ayuda de este modelo se trazó la superficie de respuesta y el gráfico de contorno que son mostrados en las Figuras 22 y 23, respectivamente.

En la Figura 23, se observa que la velocidad de reacción de los filtrantes aumenta a medida que la cantidad de té verde se incrementa (< 50%) en la mezcla del filtrante; además, son notados

efectos sinérgicos en los filtrantes 4, 5 y 8 (ver Figura 10, para coordinar los puntos ( $X_1$ ,  $X_2$  y  $X_3$ ) y los números de la formulación) debido a la interacción de los componentes de la mezcla (Moure *et al.*, 2000 y Fennema, 2000), puesto que ellos tienen mayor velocidad de reacción que el filtrante 1, es decir, secuestran con mayor rapidez los radicales libres, Rice-Evans (1999), menciona que esto garantiza la formación de productos más estables en los sistemas de reacción e intercepta la propagación de las reacciones en cadena de la peroxidación lipídica; además éstos procesos tienen efectos cardioprotectores y anticancerígenos.

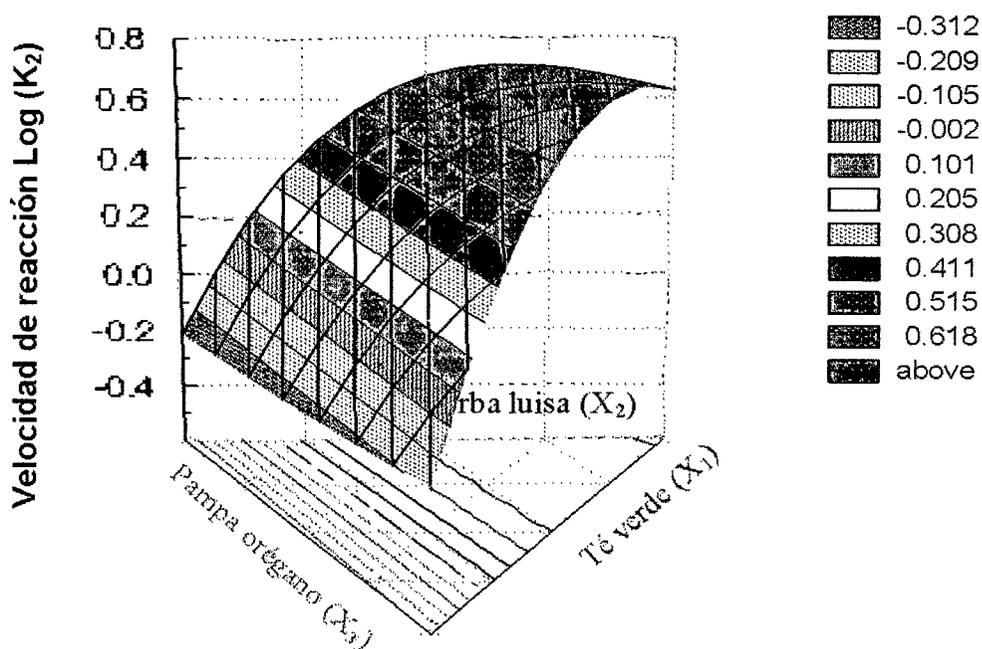
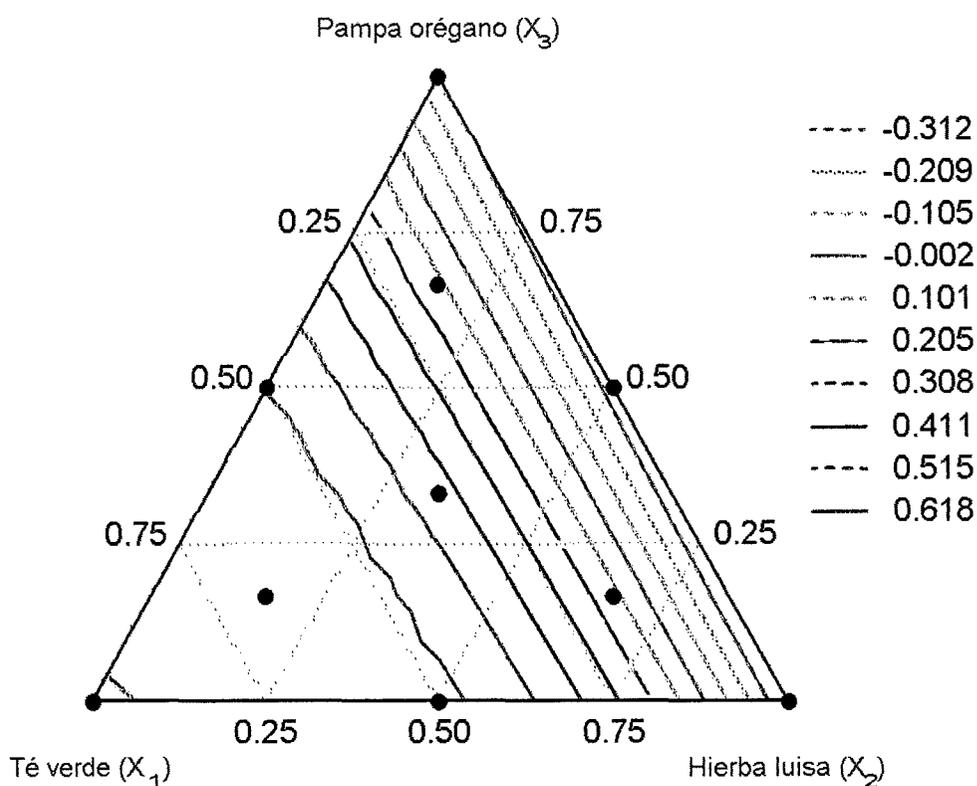


Figura 22. Superficie de respuesta para la velocidad de reacción Log ( $K_2$ ).



**Figura 23.** Gráfico de contornos para la velocidad de reacción  $\text{Log}(K_2)$ .

Para apreciar mejor el efecto de cada componente en la mezcla, Lawson *et al.* 1992, recomiendan elaborar una gráfica de efecto, ya que esto nos permitirá comparar los efectos de los tres componentes con mayor precisión, en la Figura 24, se muestra la gráfica de efecto para el  $K_2$ .

De la Figura 24, se puede indicar que el té verde ( $X_1$ ) tiene un efecto positivo, mientras es contrario el efecto de la hierba luisa ( $X_2$ ) y el pampa orégano ( $X_3$ ) a la velocidad de reacción, además, los tres componentes reflejan efectos cuadráticos, lo que refleja la existencia de sinergismo y antagonismo.

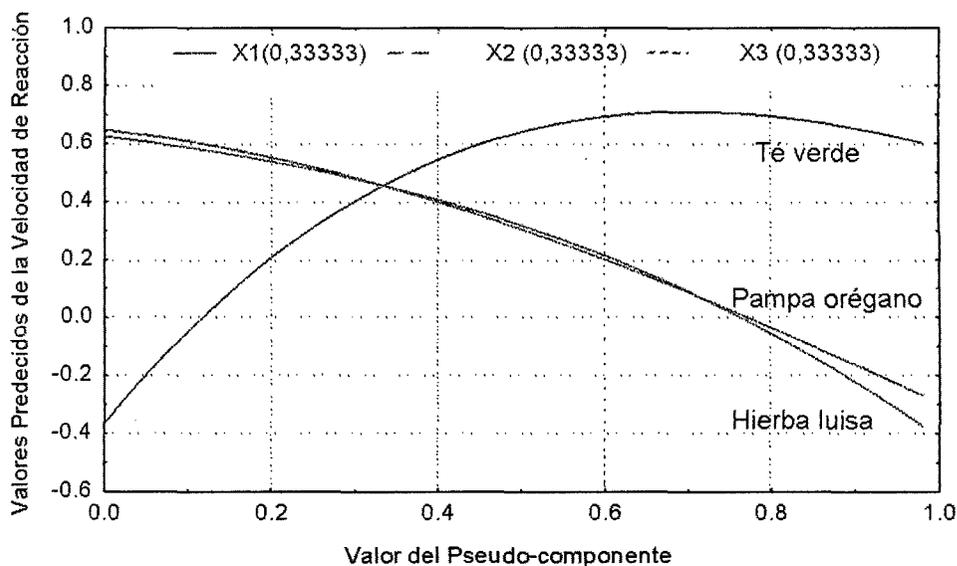


Figura 24. Gráfica de efecto de los componentes en la mezcla para  $K_2$ .

### 3. Atributo sensorial olor

En el Anexo XIV, se muestra el análisis de varianza de los modelos matemáticos en orden creciente a su complejidad, donde se puede apreciar que el modelo cúbico reducido es el más adecuado; el valor del  $F_{\text{modelo}}$  es mucho más alto comparado al  $F_{\text{tabulado}}$  ( $p < 0,001$ ). El coeficiente de determinación ( $R^2 = 0,9793$ ) indica que el modelo representa adecuadamente la relación real entre la composición de la mezcla y la variable respuesta. Adicionalmente en el Anexo XIV, se presenta el análisis de varianza del modelo cúbico reducido, donde se puede apreciar que la falta de ajuste no es significativo ( $p < 0,001$ ) lo que indica que el modelo es adecuado para describir los datos experimentales. Por lo tanto el modelo cúbico reducido obtenido fue:

Olor =  $5,527 \cdot X_1 + 8,295 \cdot X_2 + 2,532 \cdot X_3 - 1,997 \cdot X_1 \cdot X_2 - 3,05 \cdot X_1 \cdot X_3 - 1,866 \cdot X_2 \cdot X_3 + 31,543 \cdot X_1 \cdot X_2 \cdot X_3 - 11,854 \cdot X_1 \cdot X_2 \cdot (X_1 - X_2) + 32,254 \cdot X_1 \cdot X_3 \cdot (X_1 - X_3)$ ; con la ayuda de este modelo se trazó la superficie de respuesta y el gráfico de contorno que son mostrados en las Figuras 25 y 26, respectivamente; los datos se muestran en el Anexo VII.

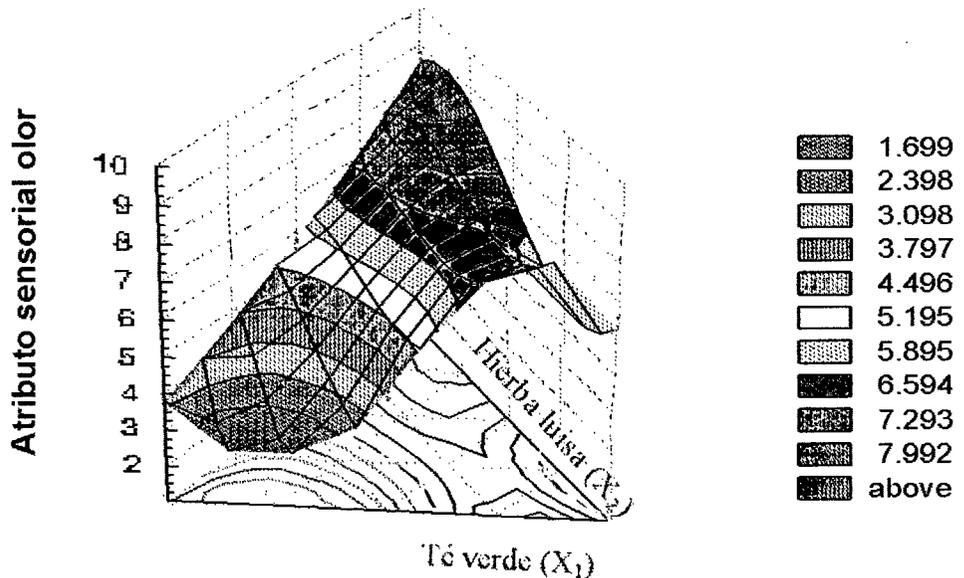


Figura 25. Superficie de respuesta para el atributo sensorial olor.

Anzaldúa, (1994), menciona que la evaluación sensorial es una técnica de medición y análisis tan importante como los métodos químicos, físicos y microbiológicos. La Figura 26, es más compleja, indicando que el atributo sensorial olor fue afectado por al menos 2 componentes simultáneamente, observándose más puntaje a medida que los componentes de la mezcla (hierba luisa y té verde) se incrementaron (isorespuesta = 7,992); al respecto, Cabieses (1993), menciona que la hierba luisa tiene características sensoriales atractivas, conferido por el

alto contenido de aceites esenciales, lo cual explicaría lo obtenido. Por el contrario el pampa orégano influye negativamente; todo lo mencionado se puede apreciar mejor observando la gráfica de efecto del atributo sensorial olor (Figura 27).

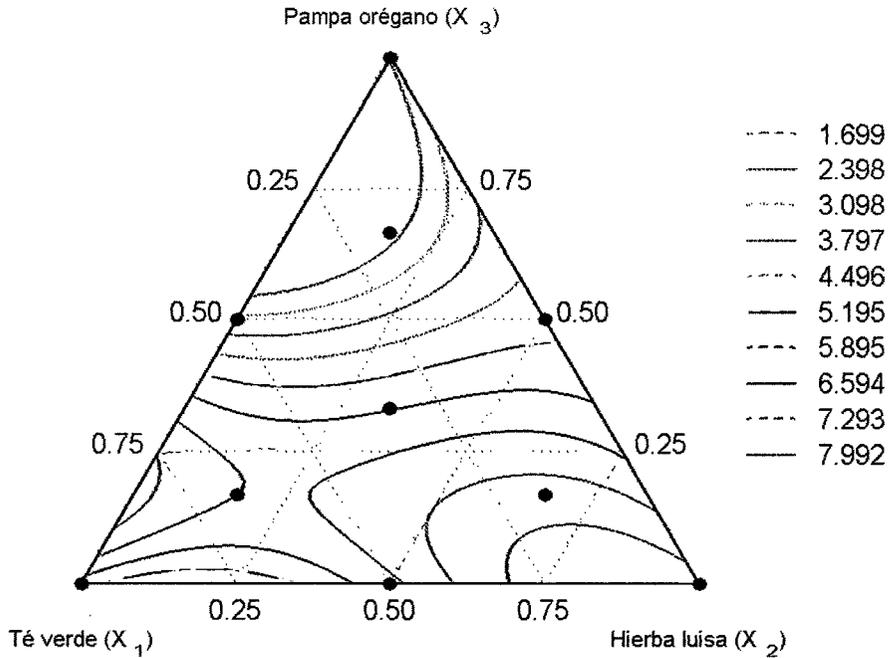


Figura 26. Gráfico de contornos para el atributo sensorial olor.

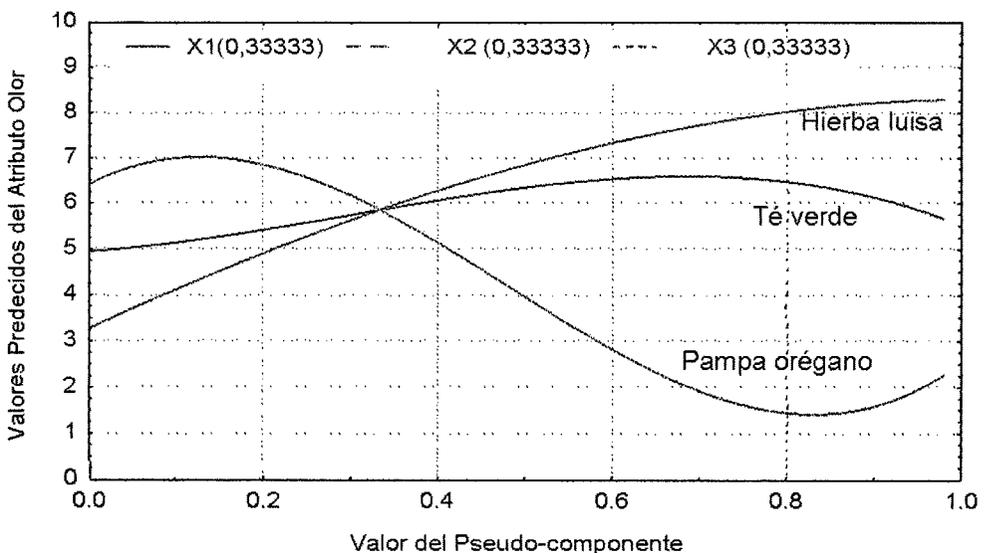


Figura 27. Gráfica de efecto de los componentes en la mezcla para el olor.

#### 4. Atributo sensorial sabor

En el Anexo XIV, se muestra el análisis de varianza de los modelos matemáticos en orden creciente a su complejidad, donde se puede apreciar que el modelo cúbico reducido es el más adecuado; el valor del  $F_{\text{modelo}}$  es mucho más alto comparado al  $F_{\text{tabulado}}$  ( $p < 0,05$ ). El coeficiente de determinación ( $R^2 = 0,9233$ ) indica que el modelo representa adecuadamente la relación real entre la composición de la mezcla y la variable respuesta. Adicionalmente en el Anexo XIV, se presenta el análisis de varianza del modelo cúbico reducido, donde se puede apreciar que la falta de ajuste no es significativo ( $p < 0,001$ ) lo que indica que el modelo es adecuado para describir los datos experimentales. Por lo tanto el modelo cúbico reducido obtenido fue:

Sabor =  $3,756 \cdot X_1 + 6,976 \cdot X_2 + 2,842 \cdot X_3 + 6,896 \cdot X_1 \cdot X_2 + 1,531 \cdot X_1 \cdot X_3 + 0,761 \cdot X_2 \cdot X_3 + 18,633 \cdot X_1 \cdot X_2 \cdot X_3$ ; con la ayuda de este modelo se trazó la superficie de superficie y el gráfico de contorno que son mostrados en las Figuras 28 y 29, los datos se muestran en el Anexo VII.

Johnson (1995), menciona que el sabor de los alimentos es una preocupación real para los consumidores y para el fabricante; el consumidor no bebe lo que no le atrae. En la Figura 29, se observa una relación directa entre el componente de la mezcla (hierba luisa > 50%) y el puntaje obtenido, siendo los filtrantes 2, 4, y 9 (ver Figura 10, para coordinar los puntos ( $X_1$ ,  $X_2$  y  $X_3$ ) y los números de la formulación) los mejores en cuanto al sabor (isorespuesta = 6,765), esta mayor aceptación se explicaría debido a que los filtrantes

mencionados son menos amargos y astringentes, como se aprecia en las Figuras 15 y 16, respectivamente; al respecto, Cabieses (1993), menciona que la hierba luisa tiene características sensoriales atractivas, conferido por el alto contenido de citral, lo cual explicaría lo obtenido. Por el contrario el pampa orégano influye negativamente, Mejia-Reng (1995) menciona que contiene ácido tánico, este compuesto es astringente, lo que explicaría este comportamiento; todo lo mencionado se puede apreciar mejor observando la gráfica de efecto del atributo sensorial sabor (Figura 30).

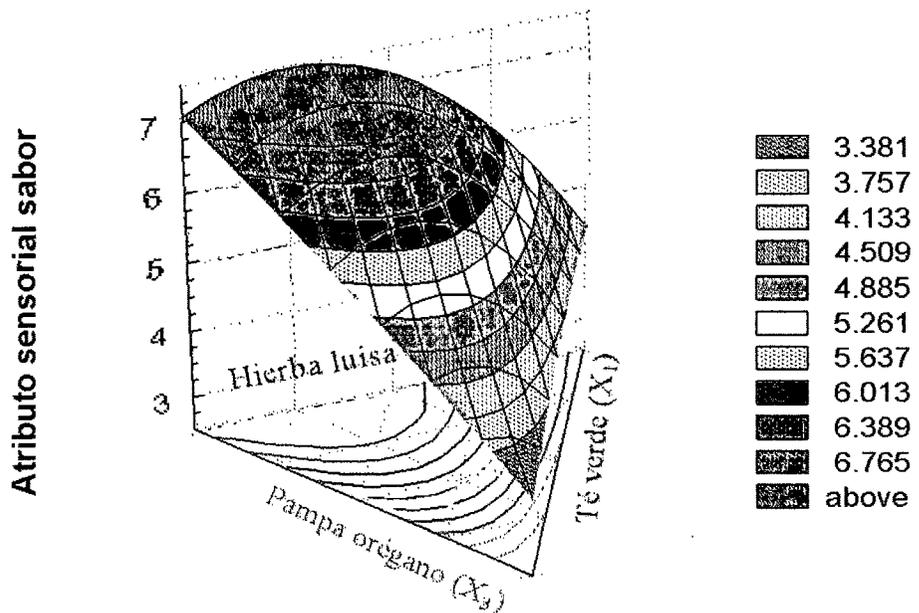
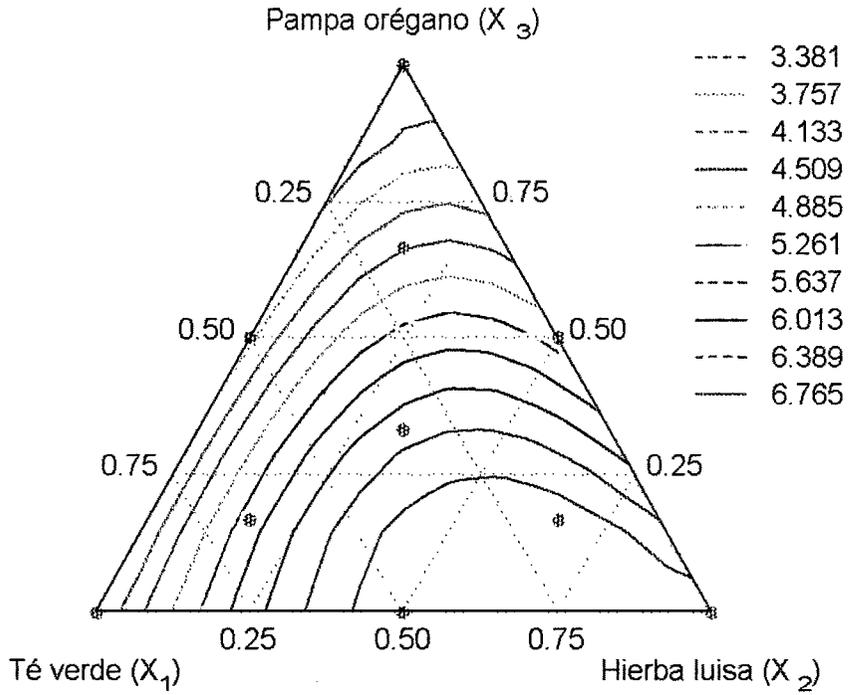
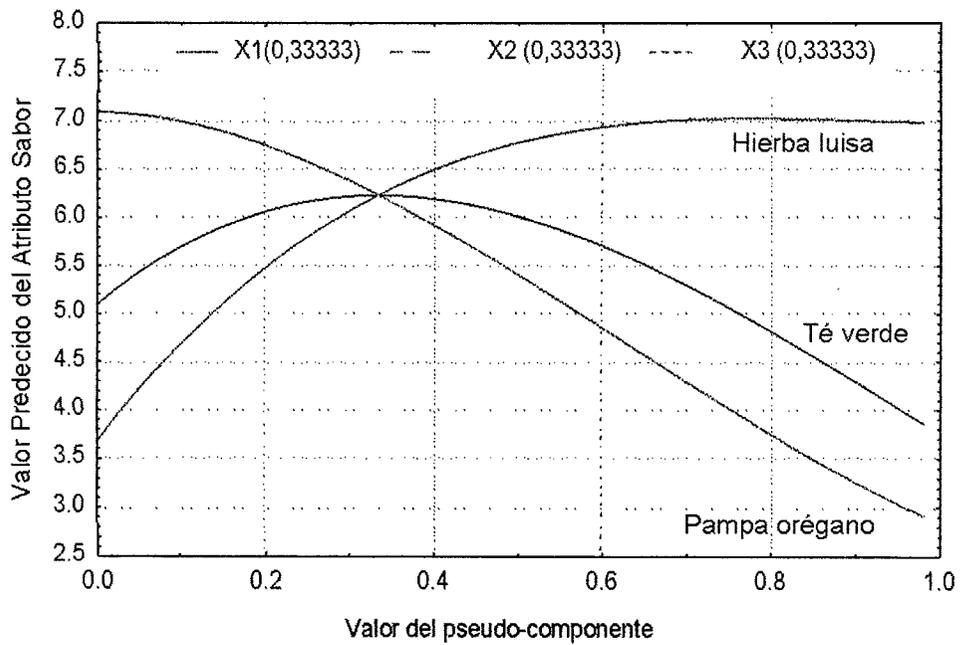


Figura 28. Superficie de respuesta para el atributo sensorial sabor.



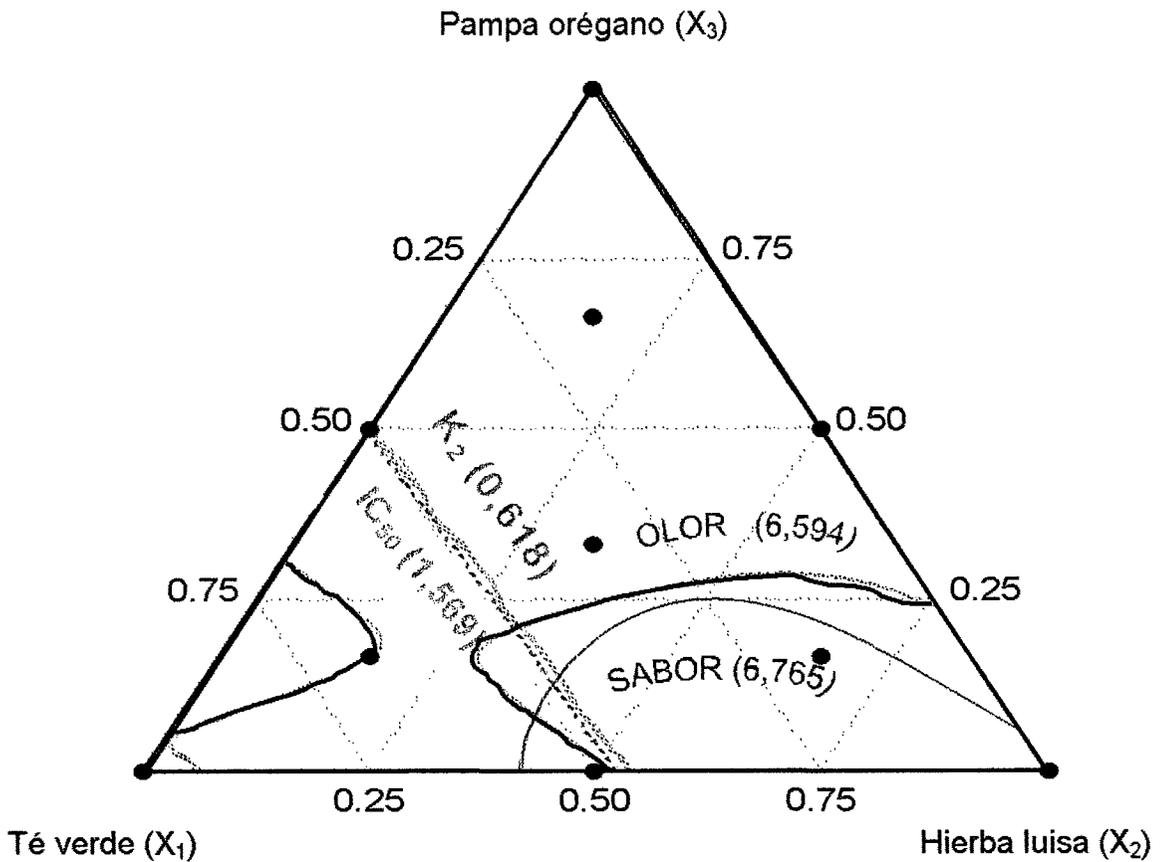
**Figura 29.** Gráfico de contornos para el atributo sensorial sabor.



**Figura 30.** Gráfica de efecto de los componentes en la mezcla para el sabor.

## 5. Formulación óptima

En la Figura 31, se muestran los 4 gráficos de contornos superpuestos para determinar la formulación óptima.



**Figura 31.** Región óptima para determinar la composición del filtrante [té verde ( $X_1$ ), hierba luisa ( $x_2$ ) y pampa orégano ( $X_3$ )] con buena actividad antioxidante y cualidades sensoriales aceptables.

En la evaluación sensorial, la optimización es definido como un procedimiento para desarrollar el mejor (el más preferido) producto posible en su clase (Sidel *et al.*, 1974). Una formulación óptima debe maximizar la aceptación del consumidor de un juego dado de

formulaciones (Fishken, 1983). En la mayoría de las aplicaciones sería favorable desarrollar un producto con todas las cualidades sensoriales deseables que satisficiera a los consumidores, pero sería imposible alcanzar éste resultado (Meilgaard *et al.*, 2000). La superimposición de los cuatro gráficos de contorno (Figura 31) revelaron que todos los factores considerados en este estudio fueron limitantes para alcanzar el óptimo. La composición del filtrante que optimiza todos los factores, obtenida de la intersección de todos los gráficos de contornos superpuestos, fueron 50 % de té verde, 42% de hierba luisa y 8% de pampa orégano; con la ayuda de la ecuaciones matemáticas, ésta formulación pronosticó un producto con las siguientes características: Coeficiente de inhibición ( $IC_{50}$ ) de 35,83  $\mu\text{g/mL}$  y velocidad de reacción ( $K_2$ ) de 4,42  $(\text{mg/mL})^{-1}\text{Ln}(\text{min}^{-1})$ ; así mismo, las puntuaciones para los atributos sensoriales de olor y sabor fueron 5,75 y 6,88, respectivamente; éstos valores en la escala estructurada cualitativa relativa corresponden a ligera y moderadamente agradable.

## V. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos, podemos concluir lo siguiente:

- Las condiciones para el deshidratado de las hojas de pampa orégano fueron 60°C/110 min; presentando éstas un coeficiente de inhibición ( $IC_{50}$ ) de 332,723  $\mu\text{g/mL}$ .
- La composición del filtrante en base a la metodología de superficie de respuesta fue: 50% de té verde, 42% de hierba luisa y 8% de pampa orégano.
- El filtrante, considerando las ecuaciones matemáticas, pronosticó un producto con las siguientes características.

Parámetros de cinética de inhibición de DPPH\*: Coeficiente de inhibición ( $IC_{50}$ ) de 35,83  $\mu\text{g/mL}$  y velocidad de reacción ( $K_2$ ) de 4,42  $(\text{mg/mL})^{-1}\text{Ln}(\text{min}^{-1})$ .

Atributos sensoriales: la aceptación respecto al olor y sabor resultaron ligera y moderadamente agradable, respectivamente; de acuerdo a la escala estructurada cualitativa relativa.

- No hubo correlación lineal negativa entre el contenido de polifenoles totales y la actividad antioxidante de los filtrantes medido por el método del radical DPPH.
- El filtrante obtenido es una fuente potencial efectiva de antioxidantes naturales.

## VI. RECOMENDACIONES

- Comprobar el efecto antioxidante del filtrante óptimo usando otros modelos (Rancimat, capacidad de absorbanza del radical oxígeno (ORAC) peróxilo, etc), su mecanismo de acción y sus efectos antioxidantes interactivos entre los antioxidantes.
- Realizar estudios *in vivo* para demostrar si el filtrante óptimo tiene propiedades benéficas para la salud, tal como lo demuestran aisladamente.
- Aislar e Identificar los componentes antioxidantes de hierba luisa y pampa orégano.
- Averiguar el efecto de la variación de la actividad antioxidante dentro de la especie de hierba luisa, a diferentes condiciones de cultivo y crecimiento.

## VII. BIBLIOGRAFIA

- ANGULO, F. 1993. Deshidratación y caracterización de la hoja de canela (*Cinnamomum zeylanicum*). Tesis Ing. Industrias Alimentarias. Universidad Nacional Agraria de la Selva. Tingo María. Perú. 92 p.
- ANZALDUA, M. A. 1994. La evaluación sensorial de los alimentos en la teoría y la práctica. Editorial Acribia S.A. Zaragoza. España.
- BARBOZA, G.; VEGA, H. 2000. Deshidratación de alimentos. Editorial Acribia S.A. Zaragoza. España.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.; BERSET, C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. p. 25 - 30.
- CABIESES, F. 1993. Apuntes de Medicina. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONCYTEC). Lima. Perú. 477 p.
- CAO, G.; SOFIC, E.; PRIOR, R. 1996. Antioxidant capacity of tea and common vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol 44. p. 3426 – 3431.
- CERÓN, J.; ADRIAZOLA, J.; MIRANDA, C.; SILVA, F. 1996. Evaluación agronómica de la hierba luisa (*Cymbopogon citratus* Staph.) con diferentes niveles de nitrógeno y momentos de cosecha en un suelo ex-cocal de Tingo María. Tesis Ing. Agronomía. Universidad Nacional Agraria de la Selva. Tingo María. Perú. 62 p.

- COCHRAN, W.; COX, G. 1957. Diseños experimentales. Editorial Trillas S.A. México. p. 482 – 525.
- DING M.; YANG, H.; XIAO, S. 1999. Rapid direct determination of polyphenols in tea by reversed-phase column liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 849. p. 637 - 640.
- DREOSTI, I. E. 2000. Antioxidant polyphenols in tea, cocoa, and wine. *Nutrition*. Vol 16. No 7/8. p. 692 - 693.
- ESPÍN, J.; SOLER-RIVAS, C.; WICHERS, H.; GARCÍA-VIGUERA, C. 2000. Anthocyanin-Based Natural Colorants: A New Source of Antiradical Activity for Foodstuff. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol 48. p. 1588 – 1592.
- FELLOWS, P. 1994. Tecnología del procesado de los alimentos. Editorial Acribia S.A. Zaragoza. España. 628 p.
- FENEMMA, O. 2000. Química de los alimentos. Editorial Acribia S.A. Madrid. España. 1850 p.
- FISHKEN, D. 1983. Consumer-oriented product optimization. *Food Technology*. p. 49 – 52.
- GADOW, A.; JOUBERT. E.; HANSMANN, C. 1997. Comparison of the antioxidant activity of rooibos tea with green, oolong and black tea. *Food Chemistry*. Vol. 60. No 1. p. 73 - 77.

- GE, Y.; NI, Y.; YAN, H.; CHEN, Y.; CAI, T. 2002. Optimization of the supercritical fluid extraction of natural vitamin E from wheat germ using response surface methodology. *Journal of Food Science*. Vol. 67. No 1. p. 239 – 243.
- HART, F.; FISHER H. 1971. *Análisis moderno de los alimentos*. Editorial Acribia S.A. Zaragoza. España. 316 p.
- IFT. 1981. *Sensory evaluation guide for testing food and beverage products*. Sensory Evaluation Div., Inst. of Food Technologist. *Food Technology*. p. 50 – 59.
- JARDINES DE TE "EL PORVENIR" Ltda. 2000.
- JOHNSON, L. E. 1995. Food technology of the antioxidant nutrients. *Critical Reviews in Food Science and nutrition*. CRC Press, Inc. 35(1&2). p. 149 – 159.
- KÄHKÖNEN, M. P.; HOPIA, A.; VUORELA, H. J.; RAÚHA, J.; PIHLAJA, K.; KUJALA, T.; HEINONEN, M. 1999. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol 47. No 10. p. 3954 - 3962.
- LAI, L. S.; CHOU, S. T.; CHAO, W. W. 2001. Studies on the antioxidative activities of Hsian-tsao (*Mesona procumbens* Hemsl) leaf gum. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol 49. p. 963 – 968.

- LARRAURI, J.; RUPÉREZ, P. ; SAURA-CALIXTO, F. 1997. Effect of drying temperature on the stability of polyphenols and antioxidant activity of red grape pomace peels. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. Vol 45. p. 1390 – 1393.
- LAWSON, J.; MADRIGAL, J.; ERJAVEC, J. 1992. Estrategias experimentales para el mejoramiento de la calidad en la industria alimentaria. Grupo editorial Iberoamérica, S.A. de C.V. México. p. 181 – 287.
- LEBEAU, J.; FURMAN, C.; BERNIER, J.; DURIEZ, P.; TEISSIER, E. ; COTELLE, N. 2000. Antioxidant properties of Di-*Tert*-Butylhydroxylated flavonoids. *Free Radical Biology & Medicine*. Vol 29. No 9. p. 900 – 912.
- MACKEY, A.; FLORES DE MÁRQUEZ, I.; SOSA, M. 1984. Evaluación sensorial de los alimentos. Segunda edición. Ediciones CIEPE. San Felipe. Venezuela. P. 15 – 26.
- MARTINEZ, V. I.; PERIAGO, M. J.; ROS, G. 2000. Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. Vol 50. No 1. p. 5 – 15.
- MATRINGE, E.; LUU, T. P.; LORIENT, D. 1999. Functional properties of milk-egg mixtures. *Journal of Food Science*. Vol 64. No 5. p. 787 – 790.
- MATSINGOU, T. C.; KAPSOKEFALOU, M.; SALIFOGLOU. 2000. In vitro antioxidant activity of black tea and Mediterranean herb infusions toward

- iron under simulated gastrointestinal conditions. *Journal of Food Science*. Vol 65. No 6. p. 1060 – 1065.
- MAZZA, G. 1998. *Functional Foods: Biochemical and processing aspects*. Technomic Publishing Company. Lancaster, PA-USA. 458 p.
- MEILGAARD, D.; CIVILLE, G. V.; CARR, T. 2000. *Sensory evaluation techniques*. Vol 2. CRC Press, Inc. Florida. U.S.A. 159 p.
- MEJIA, K.; RENG, E. 1995. *Plantas medicinales de uso popular en la amazonía peruana*. Primera edición. Lima. Perú. 249 p.
- MONTGOMEREY, D. C. 1991. *Diseño y análisis de experimentos*. Grupo Editorial Iberoamérica. México. p. 467 – 509.
- MOURE, A.; FRANCO, D.; SINEIRO, J.; DOMÍNGUEZ, H.; JOSÉ, N. M.; LEMA, J. 2000. Evaluation of extracts from *Gevuina avellana* Hulls as antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol 48. p. 3890 - 3897.
- NANJO, F.; GOTO, K.; SETO, R.; SUZUKI, M.; SAKAI, M.; HARA, Y. 1996. Scavenging effects of tea catechins and their derivates on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Free Radical Biology & Medicine*. Vol 21. No 6. p. 895 – 902.
- PEDRERO, D.; PANGBORN, R. 1989. *Evaluación sensorial de los alimentos. Métodos analíticos*. Primera edición. Editorial Alambra mexicana, S.A. México. 209 p.

- PORTO, C.; CALLIGARIS, S.; CELOTTI, E.; NICOLI, M. C. 2000. Antiradical properties of commercial cognacs assessed by the DPPH\* test. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol 48. p. 4241 – 4245.
- PRICE, M.; BUTLER, L. 1977. Rapid visual estimation and spectrophotometric determination of tannin content of sorghum grain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol 25. p. 1268 – 1273.
- PRINYAWIWATKUL, W.; MCWATTERS, K.; BEUCHAT, L.; PHILLIPS, R. 1997. Optimizing acceptability of chicken nuggets containing fermented cowpea and peanut flours. *Journal of Food Science*. Vol. 62. No 4. p. 889 – 893.
- RAMOS, F. 2002. Diseño y evaluación de la capacidad antioxidante *in vitro* de una bebida en base a té verde (*Camellia sinensis*) y hierba luisa (*Cymbopogon citratus*. Staph). Tesis Ing. Industrias Alimentarias. Universidad Nacional Agraria de la Selva. Tingo María. Perú. 120 p.
- REEVES, I. D. 1975. Estudio de la extracción, almacenaje y elaboración de bebidas gaseosas con aceite esencial de la hierba luisa. Tesis Ing. Industrias alimentarias. Universidad Nacional Agraria la Molina. Lima. Perú. 92 p.
- REMESY, C.; MANACH, C.; DEMIGNE, C.; TEXIER, O.; REGERAT, F. 1996. Intéret nutritionnel des flavonoïdes. *Méd. et Nut.* T. 32. No 1. p. 17 – 27.

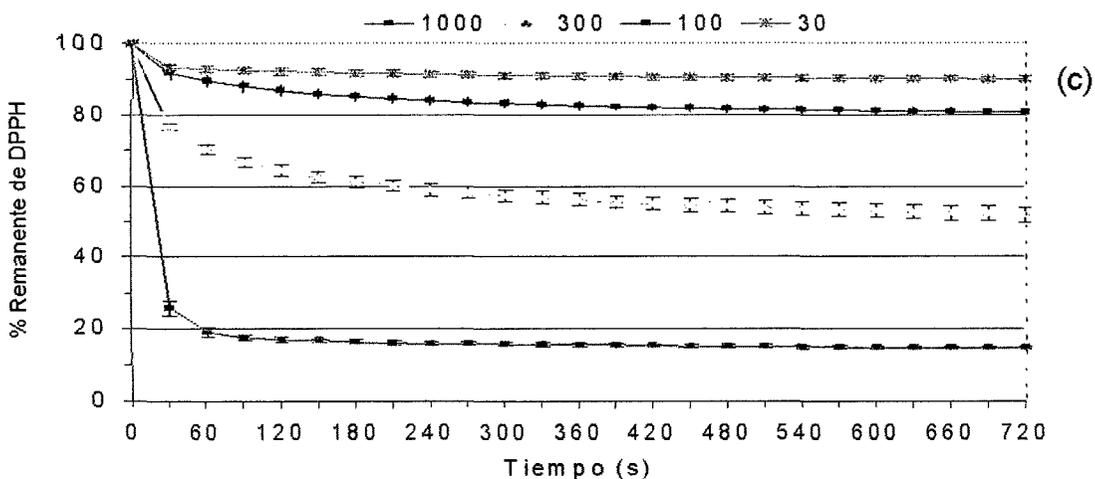
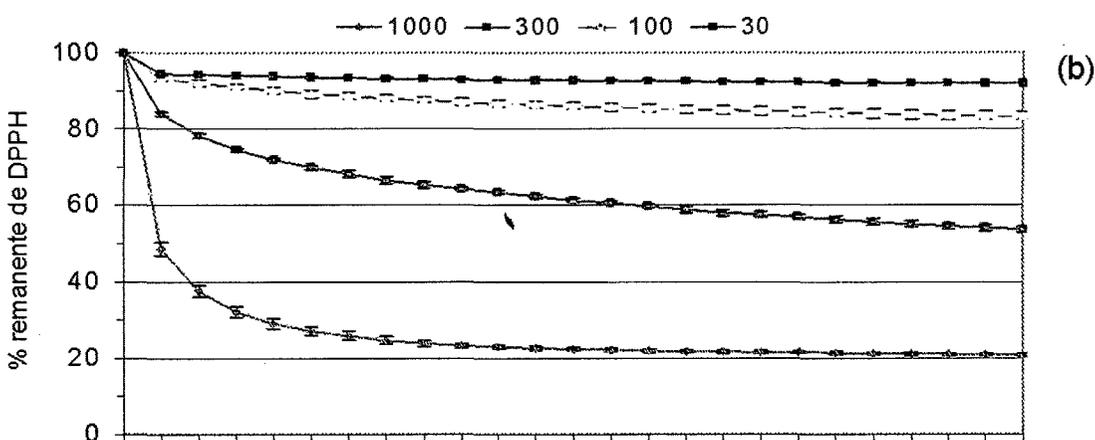
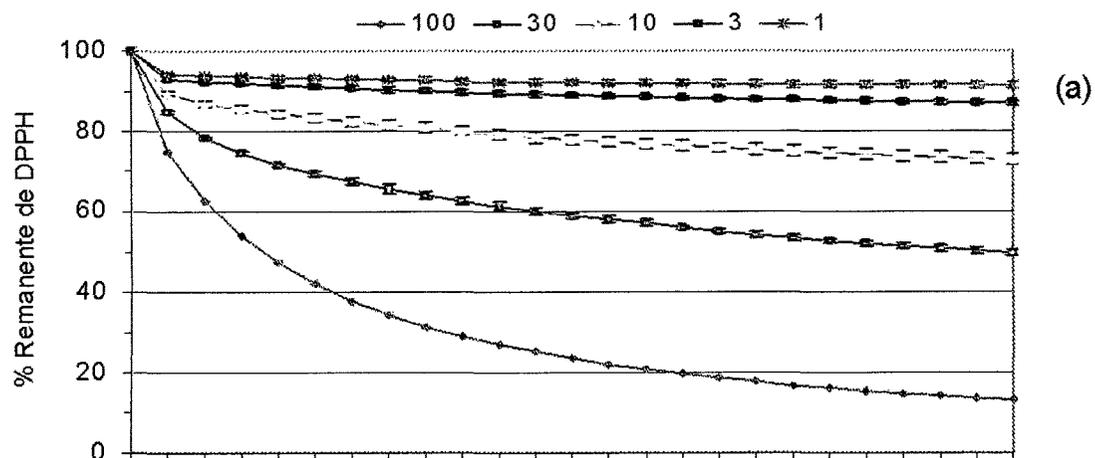
- RICE-EVANS, C. 1999. Implications of the mechanism of active of tea polyphenols as antioxidants *in vitro* for chemoprevention in humans. Society for Experimental Biology and Medicine. p. 262 – 266.
- SANCHEZ-MORENO, C.; LARRAURI, J. A.; SAURA-CALIXTO, F. A. 1998. Procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. Journal of Food Science. Vol. 76. p. 270 – 276.
- SCALBERT, A.; WILLIAMSON, G. 2000. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. Journal American Society for Nutrition Sciences. p. 2073S – 2085S.
- SEERAM, P.N.; NAIR, G.M. 2002. Inhibition of lipid peroxidation and structure-activity-related studies of the dietary constituents anthocyanins, anthocyanidins and catechins. Journal of Agricultural and Food Chemistry.
- SHIEH, C. J.; AKOH, C.; KOEHLER, P. 1996. Optimizing low fat peanut spread containing sucrose polyester. Journal of Food Science. Vol 61. No 6. p. 1227 - 1229.
- SHIROSE, I.; MORI, E. 1966. Estatística aplicada a análise sensorial. p. 74 – 89.
- SIDEL, J.; STONE, H.; OLIVER, S.; WOOLSEY, A.; SINGLETON, R. C. 1974. Sensory evaluation by quantitative descriptive analysis. Food Technology.

- SILVA, D. H. 1995. Plantas medicinales de la amazonía peruana. Primera edición. Iquitos. Perú.
- SINGH, R. P.; HELDMAN, D. R. 1997. Introducción a la ingeniería de los alimentos. Editorial Acribia S.A. Zaragoza. España. p. 455 – 483.
- SIMONETTI, P.; PIETTA, P.; TESTOLIN, G. 1997. Polyphenol content and total antioxidant potential of selected Italian wines. Journal of Agricultural of Food Chemistry. Vol 45. p. 1152 – 1155.
- STATISTICA. 1995. Statistica para windows. Versión 5,0. Copyright©StatSoft Inc. U.S.A.
- STEEL, R.; TORRIE, G. D. 1988. Bioestadística: Principios y procedimientos. Segunda edición. Editorial Mc Graw Hill. México. 622 p.
- THOMAS, M. J. 2000. The role of free radicals and antioxidants. Nutrition. Vol 16. No 7/8. p. 716 – 718.
- UREÑA, M.; D'ARRIGO, M. 1999. Evaluación sensorial de los alimentos. Primera Edición. Editorial Agraria. Lima. Perú. 197 p.
- VARNAM, A. H.; SUTHERLAND, J. P. 1997. Bebidas: tecnología, química y microbiología. Editorial Acribia S.A. Zaragoza. España. 487 p.
- VASCONCELLOS, A. 2000. Alimentos funcionales. Conceptos y beneficios para la salud. Institute Food Technology (IFT). California. U.S.A.

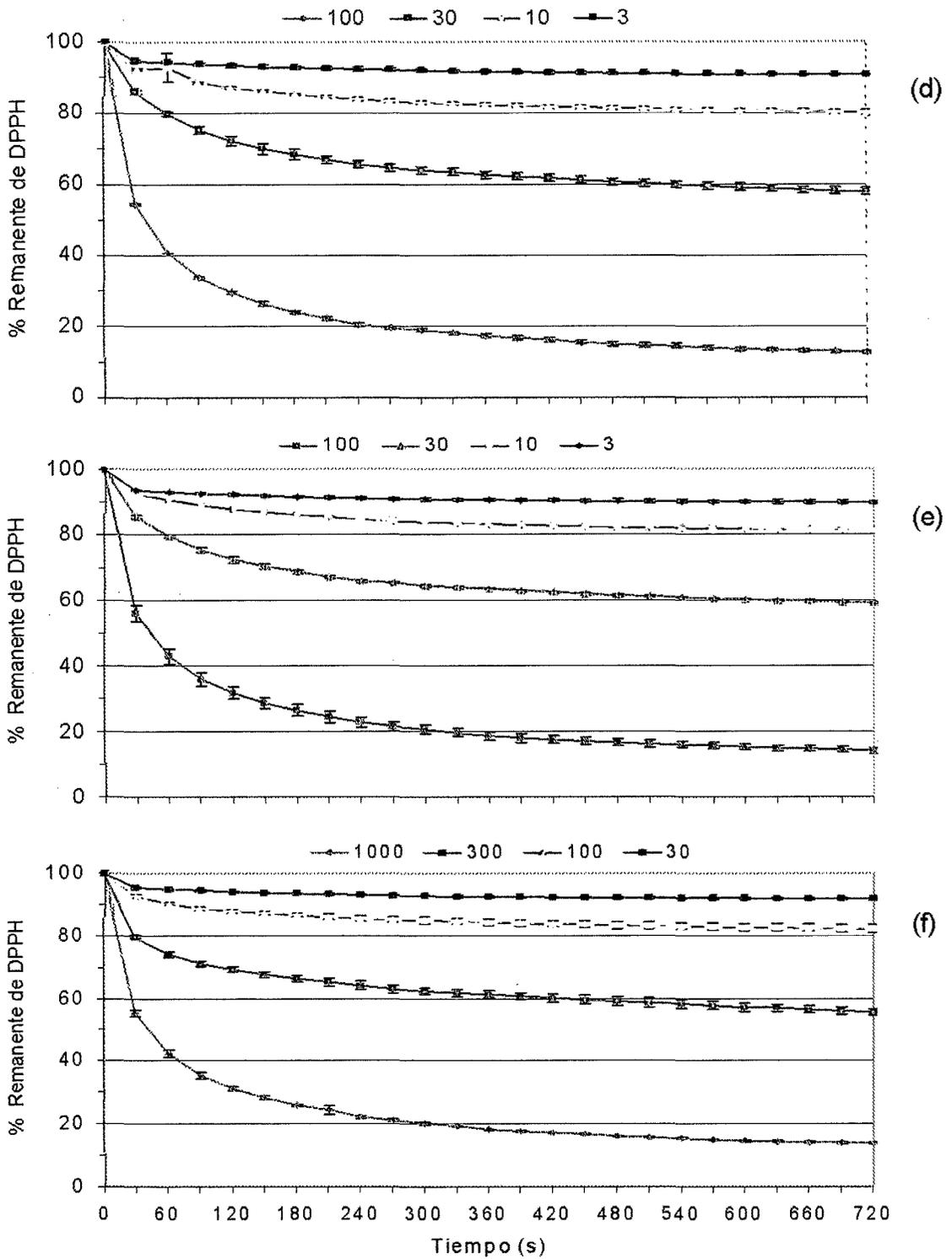
- VÁSQUEZ, M. 1987. Deshidratación de la hierba luisa (*Cymbopogon citratus*) para ser usado en infusiones. Tesis Ing. Industrias Alimentarias. Universidad Nacional Agraria la Molina. Lima. Perú.
- VICENTE, E. 1994. Evaluación del secador solar modelo invernadero con ensayos en plátano verde var. Inguiri (*Musa sp.*). Tesis Ing. Industrias Alimentarias. Universidad Nacional Agraria de la Selva. Tingo María. Perú. 110 p.
- WITTING DE PENNA, E. Evaluación sensorial. Una metodología actual para tecnología de alimentos. 134 p.
- YEN, G. C.; CHEN, H. Y. 1995. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol 43. p. 27 – 32.
- YILDIRIM, A.; MAVI, A.; KARA, A. A. 2001. Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol 49. p. 4083 – 4089.
- YOKOZAWA, T.; DONG, E.; NAKAGAWA, T.; KASHIWAGI, H.; NAKAGAWA, H.; TAKEUCHI, S.; CHUNG, Y. 1998. In vitro and in vivo on the radical-scavenging activity of tea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol 46. p. 2143 – 2150.
- ZHENG, W.; WANG, S. 2001. Antioxidant activity and phenolic Compounds in selected herbs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol 49, p. 5165 – 5170.

## **ANEXOS**

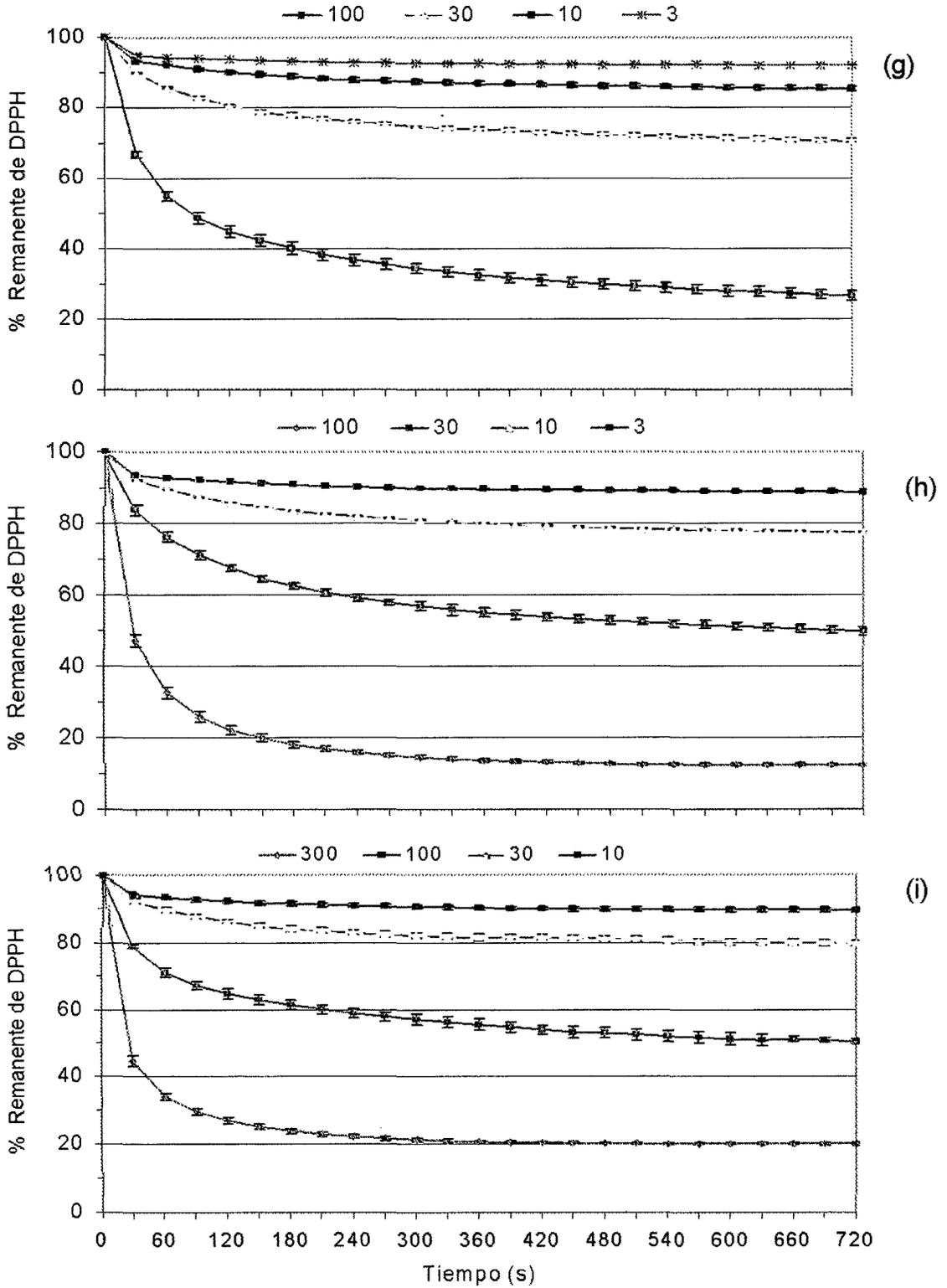
## Anexo I



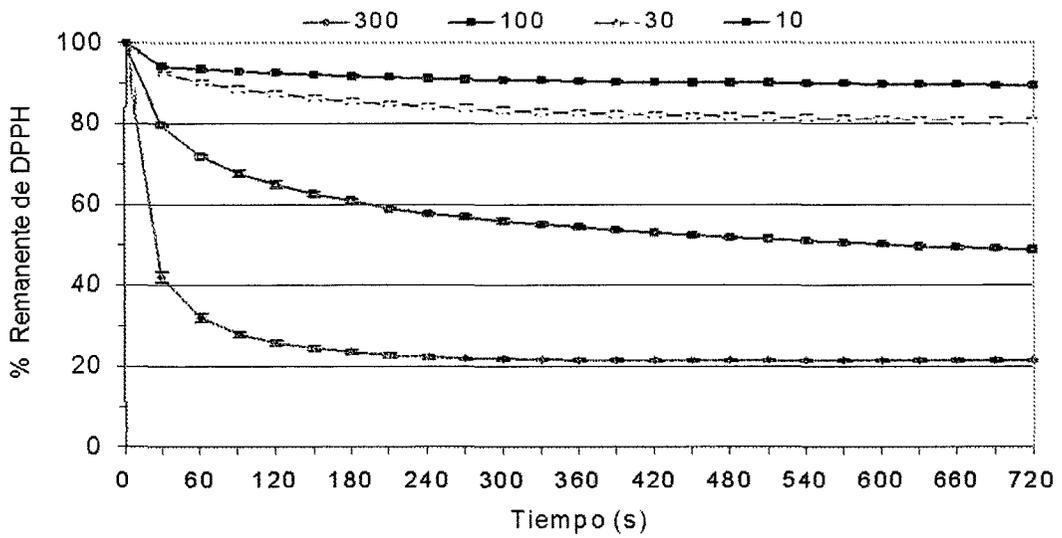
Cinética de inhibición del DPPH\* para (a) té verde (100%), (b) hierba luisa (100%) y (c) pampa orégano (100%). Los datos están expresados como la media  $\pm$  SD,  $n = 3$ . Las unidades de las concentraciones de los filtrantes están en  $\mu\text{g/mL}$ .



Cinética de inhibición del DPPH\* para (d) té verde-hierba luisa (50 - 50%), (e) té verde-pampa orégano (50 - 50%) y (f) hierba luisa-pampa orégano (50 - 50%). Los datos están expresados como la media  $\pm$  SD, n = 3. Las unidades de las concentraciones de los filtrantes están en  $\mu\text{g/mL}$ .



Cinética de inhibición del DPPH\* para (g) té verde-hierba luisa-pampa orégano (33,3 - 33,3 - 33,3%), (h) té verde-hierba luisa-pampa orégano (66,7 - 16,6 - 16,6%) y (i) té verde-hierba luisa-pampa orégano (16,6 - 66,7 - 16,6%). Los datos están expresados como la media  $\pm$  SD, n = 3.



**Cinética de inhibición del DPPH<sup>•</sup> para el té verde-hierba luisa-pampa orégano**

(16,6 - 16,6 - 66,7%). Los datos están expresados como la media  $\pm$  SD, n = 3. Las unidades de las concentraciones del filtrante están en  $\mu\text{g/mL}$ .

## Anexo II

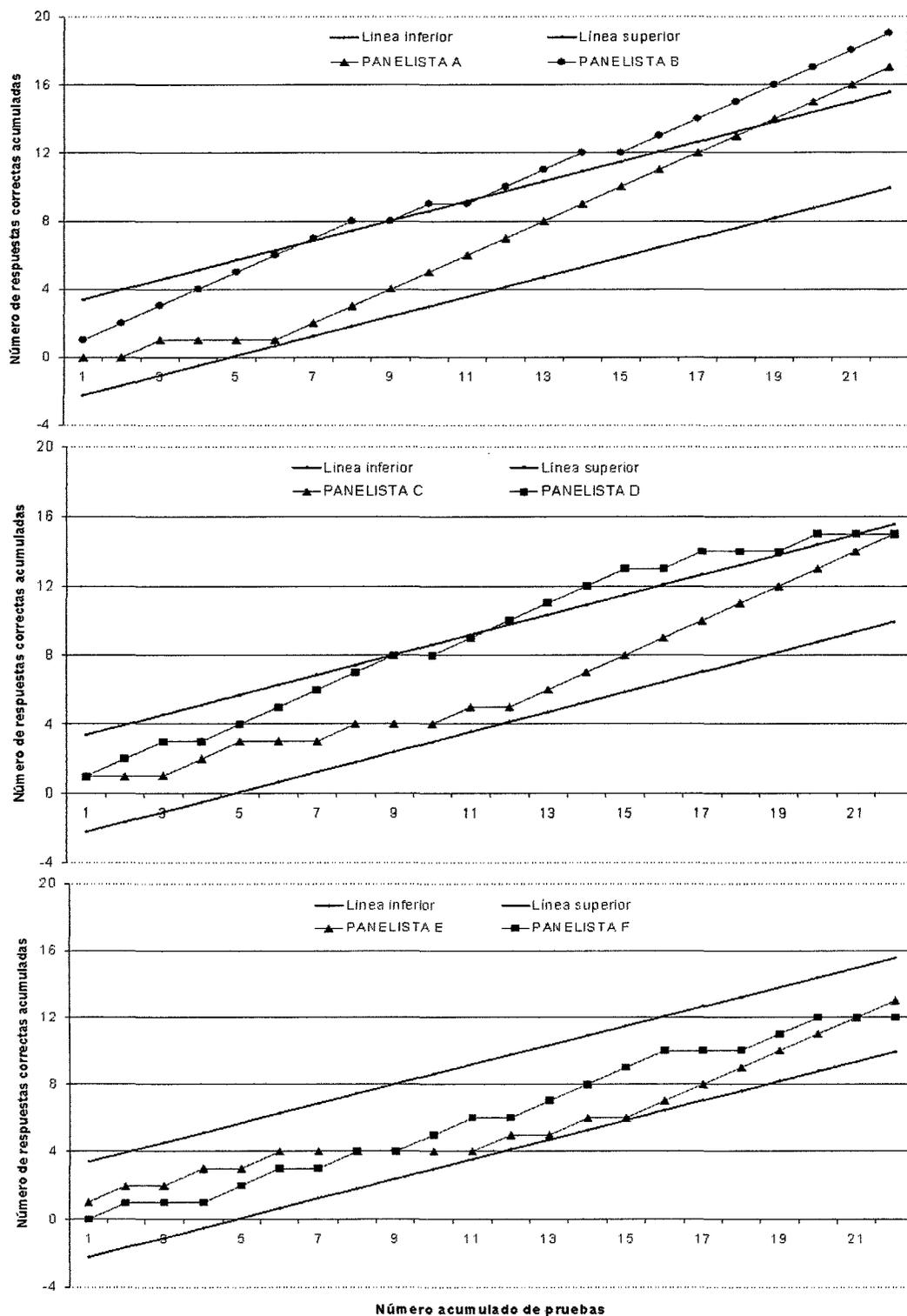


Gráfico de selectividad del análisis secuencial para los panelistas A, B, C, D, E, F.

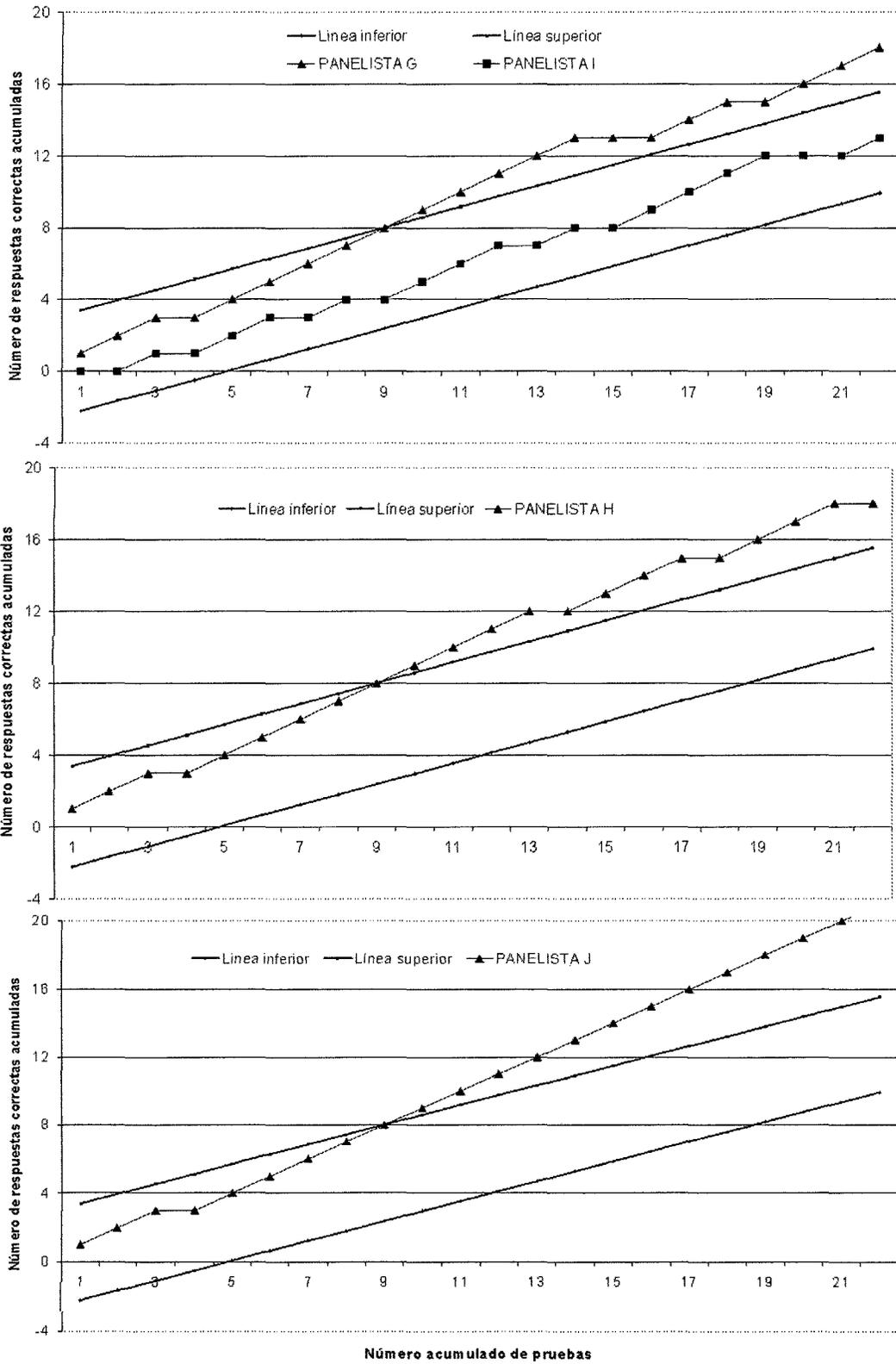


Gráfico de selectividad del análisis secuencial para los panelistas G, H, I, J.

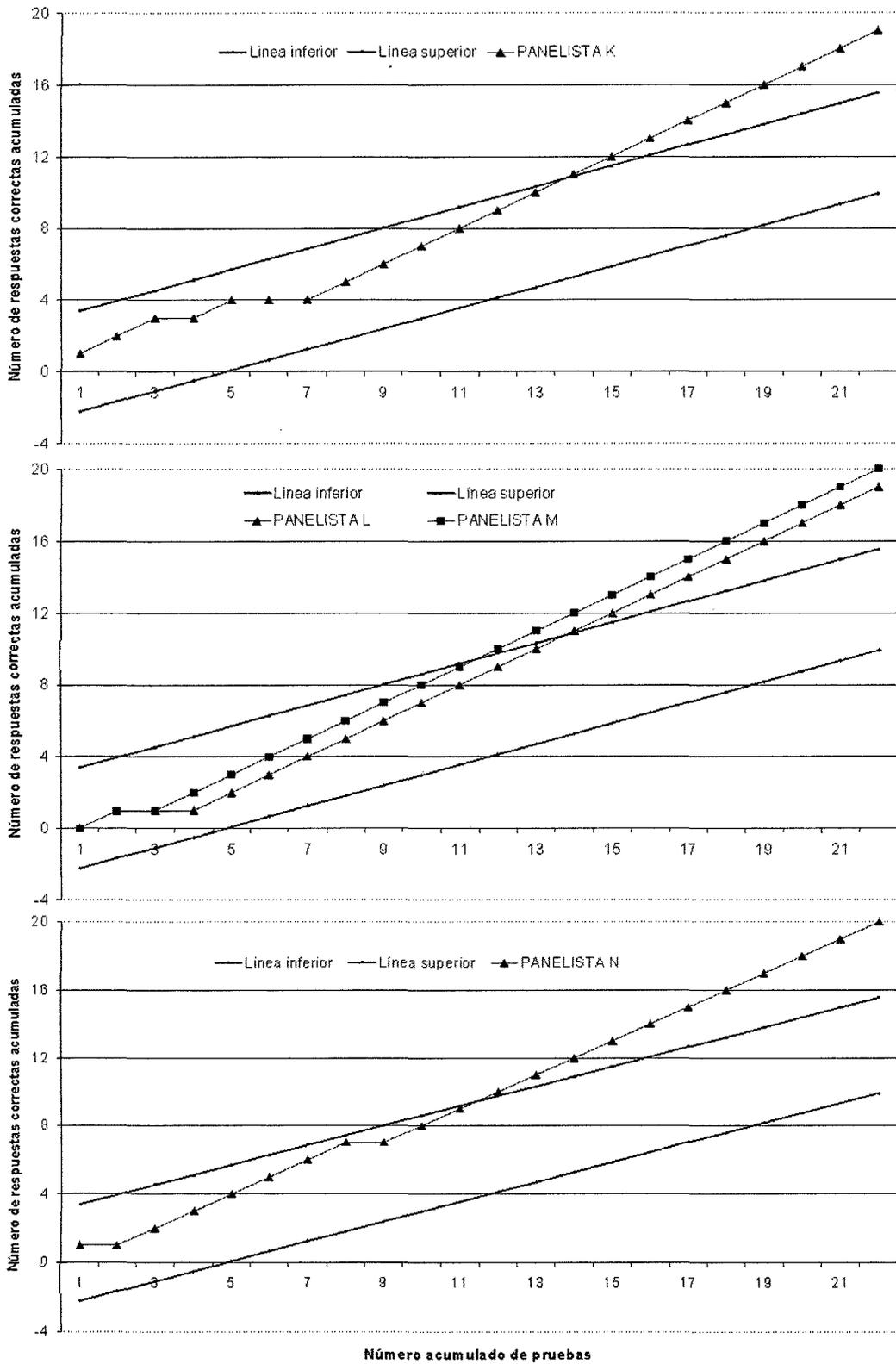
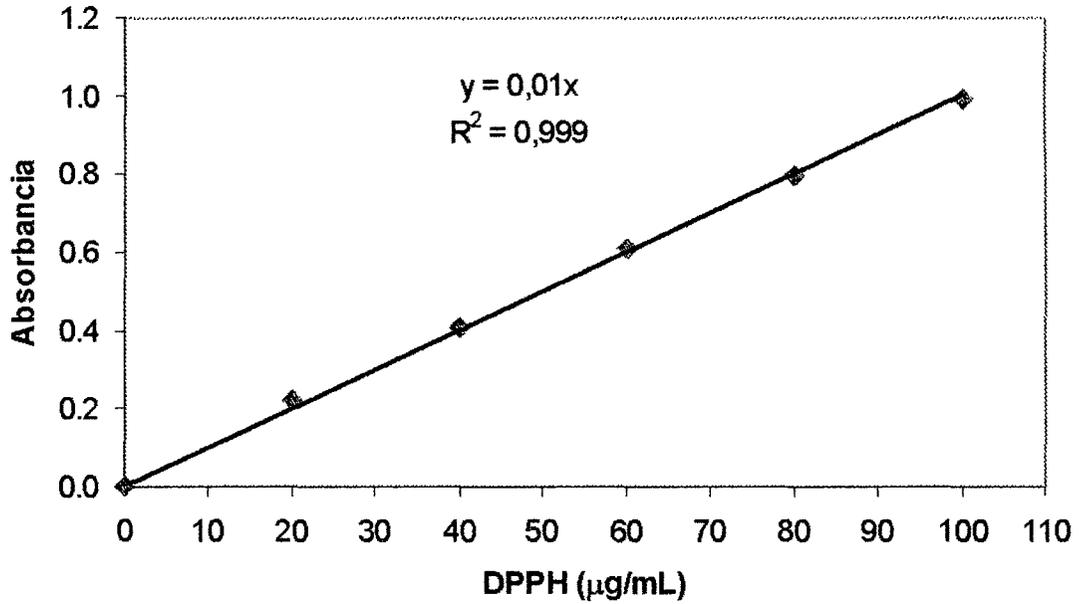
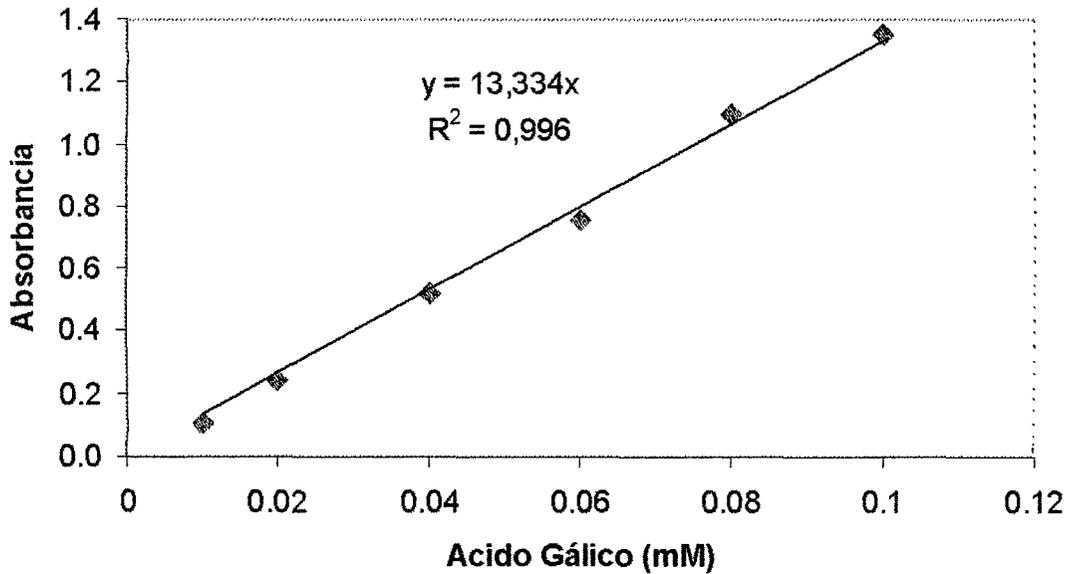


Gráfico de selectividad del análisis secuencial para los panelistas K, L, M, N.

### Anexo III



Curva de calibración de la solución de DPPH.



Curva patrón de ácido gálico equivalente para el cálculo de polifenoles totales.

## Anexo IV

Resultados de la evaluación sensorial del pampa orégano.

Pampa orégano secado a diferentes temperaturas								
JUEZ	Sabor				Olor			
	50°C	60°C	70°C	80°C	50°C	60°C	70°C	80°C
1	2 (1)	3 (2,5)	3 (2,5)	4 (4)	3 (1,5)	3 (1,5)	4 (3,5)	4 (3,5)
2	2 (1)	3 (3)	3 (3)	3 (3)	2 (1)	3 (2)	4 (3,5)	4 (3,5)
3	3 (1,5)	4 (3,5)	3 (1,5)	4 (3,5)	4 (3)	4 (3)	4 (3)	3 (1)
4	3 (1,5)	3 (1,5)	4 (3,5)	4 (3,5)	3 (1,5)	3 (1,5)	4 (3,5)	4 (3,5)
5	3 (1,5)	3 (1,5)	4 (3,5)	4 (3,5)	3 (2)	3 (2)	4 (4)	3 (2)
6	3 (1,5)	4 (3,5)	4 (3,5)	3 (1,5)	3 (1)	4 (2)	5 (3,5)	5 (3,5)
7	4 (3,5)	4 (3,5)	3 (1,5)	3 (1,5)	5 (4)	3 (2)	3 (2)	3 (2)
8	5 (4)	4 (3)	3 (2)	2 (1)	5 (4)	4 (3)	3 (2)	2 (1)
9	5 (4)	2 (2)	2 (2)	2 (2)	5 (4)	2 (2)	2 (2)	2 (2)
10	4 (2,5)	4 (2,5)	4 (2,5)	4 (2,5)	4 (1,5)	4 (1,5)	5 (3,5)	5 (3,5)
11	3 (1,5)	3 (1,5)	4 (3,5)	4 (3,5)	4 (3)	3 (1)	4 (3)	4 (3)
12	3 (2)	3 (2)	3 (2)	4 (4)	4 (3,5)	3 (2)	2 (1)	4 (3,5)
13	4 (4)	3 (2)	3 (2)	3 (2)	5 (4)	4 (2,5)	4 (2,5)	3 (1)
14	2 (2)	2 (2)	3 (4)	2 (2)	4 (3,5)	4 (3,5)	3 (1,5)	3 (1,5)
15	4 (3,5)	3 (1,5)	3 (1,5)	4 (3,5)	5 (4)	3 (1,5)	4 (3)	3 (1,5)
16	5 (4)	4 (2,5)	4 (2,5)	3 (1)	4 (3)	4 (3)	4 (3)	3 (1)
17	3 (2)	3 (2)	3 (2)	4 (4)	3 (1,5)	4 (3,5)	3 (1,5)	4 (3,5)
18	4 (4)	3 (2)	3 (2)	3 (2)	3 (2)	4 (4)	3 (2)	3 (2)
19	2 (1)	4 (2,5)	4 (2,5)	5 (4)	2 (1)	5 (3,5)	3 (2)	5 (3,5)
20	4 (3,5)	3 (1,5)	3 (1,5)	4 (3,5)	3 (2,5)	3 (2,5)	3 (2,5)	3 (2,5)
21	3 (1,5)	3 (1,5)	4 (3,5)	4 (3,5)	3 (2)	3 (2)	3 (2)	4 (4)
22	4 (2,5)	4 (2,5)	5 (4)	3 (1)	4 (2)	4 (2)	5 (4)	4 (2)
23	3 (1)	4 (2,5)	5 (4)	4 (2,5)	3 (1,5)	3 (1,5)	4 (3,5)	4 (3,5)
24	2 (1)	3 (2)	4 (3,5)	4 (3,5)	3 (1)	4 (3)	4 (3)	4 (3)
R <sub>total</sub>	55,5	54,5	64	66	58	56	65	61

## Cálculo del análisis estadístico correspondiente.

**Sabor:**

$$A_2 = \sum_{i=1}^4 \sum_{j=1}^{24} \{(1)^2 + (1)^2 + (1,5)^2 + \dots + (1)^2 + (2,5)^2 + (3,5)^2\} = 689$$

$$B_2 = \frac{1}{24} \sum_{i=1}^{24} \{(55,5)^2 + (54,5)^2 + (64)^2 + (66)^2\} = 604,27$$

$$T_2 = \frac{(24 - 1)\{604,27 - ((24)(4)(4 + 1)^2 / 4)\}}{689 - 604,27} = 1,159$$

Puesto que  $T_2 = 1,159 < F_{(0,99; 3; 69)} = 4,112$  entonces se puede decir que las muestras han sido extraídas de poblaciones idénticas y afirmar que las muestras de pampa orégano no presentan diferencia significativa en cuanto al sabor.

**Olor:**

$$A_2 = \sum_{i=1}^4 \sum_{j=1}^{24} \{(1,5)^2 + (1)^2 + (3)^2 + \dots + (2)^2 + (3,5)^2 + (3)^2\} = 686$$

$$B_2 = \frac{1}{24} \sum_{i=1}^{24} \{(58)^2 + (56)^2 + (65)^2 + (61)^2\} = 601,92$$

$$T_2 = \frac{(24 - 1)\{601,92 - ((24)(4)(4 + 1)^2 / 4)\}}{686 - 601,92} = 0,524$$

Puesto que  $T_2 = 0,524 < F_{(0,99; 3; 69)} = 4,112$  entonces se puede decir que las muestras han sido extraídas de poblaciones idénticas y también afirmar que las muestras de pampa orégano no presentan diferencia significativa en cuanto al olor.

## Anexo V

Coefficiente de inhibición (IC<sub>50</sub>) de los filtrantes.

Filtrante	Composición (Fracción)			IC <sub>50</sub> (µg/mL)
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	
1	1	0	0	29,660 ± 0,386
2	0	1	0	387,493 ± 7,15
3	0	0	1	332,723 ± 12,14
4	½	½	0	35,697 ± 0,486
5	½	0	½	37,283 ± 0,554
6	0	½	½	354,000 ± 4,937
7	1/3	1/3	1/3	54,340 ± 1,439
8	4/6	1/6	1/6	30,563 ± 0,672
9	1/6	4/6	1/6	112,203 ± 0,846
10	1/6	1/6	4/6	111,930 ± 1,574

Los valores representan promedios ± SD, cada uno analizado por triplicado. Medido por el radical DPPH durante 12 minutos.

Velocidad de reacción (K<sub>2</sub>) de los filtrantes.

Filtrante	Composición (Fracción)			K <sub>2</sub> Ln(min <sup>-1</sup> )(mg/mL) <sup>-1</sup>
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	
1	1	0	0	3,886 ± 0,013
2	0	1	0	0,385 ± 0,0067
3	0	0	1	0,507 ± 0,0126
4	½	½	0	4,442 ± 0,0565
5	½	0	½	4,226 ± 0,144
6	0	½	½	0,430 ± 0,0016
7	1/3	1/3	1/3	2,887 ± 0,106
8	4/6	1/6	1/6	5,068 ± 0,0946
9	1/6	4/6	1/6	1,348 ± 0,0101
10	1/6	1/6	4/6	1,325 ± 1,0136

Los valores representan promedios ± SD, cada uno analizado por triplicado. Medido por el radical DPPH durante 12 minutos.

## Anexo VI

Polifenoles totales de los filtrantes.

Filtrante	Composición (Fracción)			Polifenoles totales (g de AG/100 g de muestra)
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	
1	1	0	0	14,22 ± 0,187
2	0	1	0	1,0 ± 0,009
3	0	0	1	1,16 ± 0,013
4	½	½	0	7,87 ± 0,073
5	½	0	½	8,28 ± 0,167
6	0	½	½	1,22 ± 0,013
7	1/3	1/3	1/3	4,96 ± 0,092
8	4/6	1/6	1/6	9,95 ± 0,093
9	1/6	4/6	1/6	3,37 ± 0,028
10	1/6	1/6	4/6	3,60 ± 0,043

Los valores representan promedios ± SD, cada uno analizado por triplicado.

## Anexo VII

### Análisis del atributo sensorial olor.

Filtrante	Composición (Fracción)			Olor
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	
1	1	0	0	5,6 ± 1,3
2	0	1	0	8,3 ± 1,4
3	0	0	1	2,5 ± 0,6
4	½	½	0	6,4 ± 1,4
5	½	0	½	3,3 ± 1,3
6	0	½	½	4,9 ± 1,4
7	1/3	1/3	1/3	5,8 ± 1,4
8	4/6	1/6	1/6	6,6 ± 1,2
9	1/6	4/6	1/6	7,6 ± 1,4
10	1/6	1/6	4/6	2,2 ± 0,8

Los valores representan promedios ± SD, cada uno analizado 18 veces.

### Análisis del atributo sensorial sabor.

Filtrante	Composición (Fracción)			Sabor
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	
1	1	0	0	3,8 ± 1,5
2	0	1	0	6,9 ± 2,5
3	0	0	1	3,0 ± 1,2
4	½	½	0	7,0 ± 1,5
5	½	0	½	3,9 ± 1,1
6	0	½	½	5,2 ± 1,6
7	1/3	1/3	1/3	6,5 ± 1,6
8	4/6	1/6	1/6	5,3 ± 1,6
9	1/6	4/6	1/6	7,2 ± 1,2
10	1/6	1/6	4/6	3,9 ± 1,7

Los valores representan promedios ± SD, cada uno analizado 18 veces.

## Anexo VIII

### Análisis del atributo sensorial amargor.

Filtrante	Composición (Fracción)			Amargor
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	
1	1	0	0	6,4 ± 1,8
2	0	1	0	0,9 ± 0,8
3	0	0	1	1,6 ± 0,9
4	½	½	0	2,8 ± 2,1
5	½	0	½	2,9 ± 1,6
6	0	½	½	1,8 ± 1,7
7	1/3	1/3	1/3	2,0 ± 1,6
8	4/6	1/6	1/6	5,6 ± 2,0
9	1/6	4/6	1/6	1,5 ± 1,8
10	1/6	1/6	4/6	1,7 ± 1,0

Los valores representan promedios ± SD, cada uno analizado 18 veces.

### Análisis del atributo sensorial astringencia.

Filtrante	Composición (Fracción)			Astringencia
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	
1	1	0	0	5,8 ± 1,1
2	0	1	0	1,8 ± 1,2
3	0	0	1	3,0 ± 1,7
4	½	½	0	3,4 ± 1,4
5	½	0	½	4,6 ± 1,6
6	0	½	½	2,7 ± 1,7
7	1/3	1/3	1/3	2,8 ± 1,5
8	4/6	1/6	1/6	5,9 ± 1,3
9	1/6	4/6	1/6	2,0 ± 0,9
10	1/6	1/6	4/6	2,5 ± 1,3

Los valores representan promedios ± SD, cada uno analizado 18 veces.

## Anexo IX

Umbral de percepción del atributo sensorial amargor.

Panelista	Último vaso en el todavía percibe el amargor.		
	Repetición (1)	Repetición (2)	Repetición (3)
Panelista C	5	5	5
Panelista H	4	5	5
Panelista M	6	5	5
Panelista G	5	6	6
Panelista J	5	6	5
Panelista K	5	5	6
Panelista N	5	6	6
Panelista L	6	6	5

Umbral de percepción del atributo sensorial astringencia.

Panelista	Último vaso en el todavía percibe el amargor.		
	Repetición (1)	Repetición (2)	Repetición (3)
Panelista C	5	5	6
Panelista H	6	5	6
Panelista M	6	6	6
Panelista G	6	5	6
Panelista J	5	6	6
Panelista K	4	6	6
Panelista N	6	6	6
Panelista L	5	6	6

## Anexo X

Análisis de varianza del coeficiente de inhibición ( $IC_{50}$ ) del pampa orégano secado a diversas temperaturas.

Fuente de variación	GL	SC	Fc	Sig.
$IC_{50}$	3	45837,5678	222,76	*
Error experimental	8	548,7308		
Total	11	46386,2986		

\* Significancia ( $p < 0,01$ ).

CV = 1,982

R-Square = 0,9882

Mean = 417,858

Root MSE = 68,5914

## Anexo XI

Análisis de varianza del coeficiente de inhibición ( $IC_{50}$ ) de los filtrantes.

Fuente de variación	GL	SC	Fc	Sig.
$IC_{50}$	9	593798,6416	2877,65	*
Error experimental	20	458,5518		
Total	29	594257,1934		

\* Significancia ( $p < 0,01$ ).

CV = 3,2225

R-Square = 0,9992

Mean = 148,589

Root MSE = 22,9256

Análisis de varianza de la velocidad de reacción ( $K_2$ ) de los filtrantes.

Fuente de variación	GL	SC	Fc	Sig.
$K_2$	9	92,4788	2293,91	*
Error experimental	20	0,08959		
Total	29	92,5684		

\* Significancia ( $p < 0,01$ ).

CV = 2,7315

R-Square = 0,9990

Mean = 2,4503

Root MSE = 0,004479

## Anexo XII

Análisis de varianza de la selección de panelistas para el atributo sensorial amargor del té verde.

Fuente de variación	GL	SC	Fc	Sig.
Modelo	9	17,4154	3,69	*
Amargor	2	2,3358	2,23	N.S
Panelistas	7	15,0796	4,11	*
Error experimental	14	7,3442		
Total	23	24,7596		

\* Significancia ( $p < 0,01$ ).

CV = 11,7849

R-Square = 0,7034

Mean = 6,1458

Root MSE = 0,5246

Análisis de varianza de la selección de panelistas para el atributo sensorial amargor de la hierba luisa.

Fuente de variación	GL	SC	Fc	Sig.
Modelo	9	18,4704	21,14	*
Amargor	2	0,2608	1,34	N.S
Panelistas	7	18,2096	26,80	*
Error experimental	14	1,3592		
Total	23	19,8296		

\* Significancia ( $p < 0,01$ ).

CV = 20,7146

R-Square = 0,9315

Mean = 1,5042

Root MSE = 0,0971

Análisis de varianza de la selección de panelistas para el atributo sensorial astringencia del té verde.

Fuente de variación	GL	SC	F <sub>c</sub>	Sig.
Modelo	9	5,7529	2,12	N.S
Astringencia	2	0,090	0,15	N.S
Panelistas	7	5,6629	2,68	*
Error experimental	14	4,2233		
Total	23	9,9763		

\* Significancia ( $p < 0,01$ ).

CV = 8,2438

R-Square = 0,5767

Mean = 6,6625

Root MSE = 0,3017

Análisis de varianza de la selección de panelistas para el atributo sensorial astringencia de la hierba luisa.

Fuente de variación	GL	SC	F <sub>c</sub>	Sig.
Modelo	9	17,3375	3,96	*
Astringencia	2	0,1975	0,20	N.S
Panelistas	7	17,1400	5,04	*
Error experimental	14	6,8025		
Total	23	24,1400		

\* Significancia ( $p < 0,01$ ).

CV = 36,6874

R-Square = 0,7182

Mean = 1,900

Root MSE = 0,4859

### Anexo XIII

Análisis de varianza del atributo sensorial amargor de los filtrantes.

Fuente de variación	GL	SC	Fc	Sig.
Tratamientos (no ajustado)	9	183.805	13,58	*
Bloques (ajustado)	14	47.985		
Error intrabloque	36	49.578		
Total	59	281.367		

\* Significancia ( $p < 0,01$ ).

CV = 43,4640

Mean = 2,7

Análisis de varianza del atributo sensorial astringencia de los filtrantes.

Fuente de variación	GL	SC	Fc	Sig.
Tratamientos (no ajustado)	9	113,781	13,67	*
Bloques (ajustado)	14	35,081		
Error intrabloque	36	31,786		
Total	59	180,648		

\* Significancia ( $p < 0,01$ ).

CV = 27,6368

Mean = 3,4

## Anexo XIV

Análisis de varianza de los modelos en orden a la complejidad creciente para el coeficiente de inhibición ( $IC_{50}$ ).

Modelo	Suma de Cuadrados del Efecto	Grados de Libertad del Efecto	Cuadrado Medio del Efecto	Suma de Cuadrados del Error	Grados de Libertad del Error	Cuadrado Medio del Error	$F_0$	$R^2$
Lineal	4,6092	2	2,3046	1,1050	27	0,0409	56,3131*	0,8066
Cuadrático	1,0712	3	0,3571	0,0338	24	0,0014	253,6886*	0,9941
Cúbico especial	0,0066	1	0,0066	0,0271	23	0,0012	5,6362 <sup>N.S</sup>	0,9953
Cúbico reducido	0,0257	2	0,0128	0,0015	21	7,02E-05	182,7096*	0,9997
Total Ajustado	5,7142	29	0,1970					

\* Significancia ( $p < 0,001$ )

Análisis de varianza del modelo cúbico reducido para el coeficiente de inhibición ( $IC_{50}$ ).

Fuente de variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	$F_0$
Modelo	8	5,7127	0,7141	10170,50*
Error Total	21	0,0015	7,02E-05	
Falta de Ajuste	1	1,44E-05	1,44E-05	0,198 <sup>N.S</sup>
Error Puro	20	0,0015	7,30E-05	
Total Ajustado	29	5,7142	0,1970	

\* Significancia ( $p < 0,001$ )

CV = 0,0056

Mean = 148.589

Análisis de varianza de los modelos en orden a la complejidad creciente para la velocidad de reacción ( $K_2$ ).

Modelo	Suma de Cuadrados del Efecto	Grados de Libertad del Efecto	Cuadrado Medio del Efecto	Suma de Cuadrados del Error	Grados de Libertad del Error	Cuadrado Medio del Error	$F_0$	$R^2$
Lineal	4,0268	2	2,0134	1,3947	27	0,0517	38,9765*	0,7427
Cuadrático	1,3797	3	0,4599	0,0150	24	6,25E-04	735,3141*	0,9972
Cúbico especial	0,0034	1	0,0034	0,0116	23	5,03E-04	6,8234 <sup>NS</sup>	0,9979
Cúbico reducido	0,0099	2	0,0049	0,0017	21	8,20E-05	60,1218*	0,9997
Total Ajustado	5,4215	29	0,1869					

\* Significancia ( $p < 0,001$ )

Análisis de varianza del modelo cúbico reducido para la velocidad de reacción ( $K_2$ ).

Fuente de variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	$F_0$
Modelo	8	5,4198	0,6775	8265,77*
Error Total	21	0,0017	8,20E-05	
Falta de Ajuste	1	1,56E-04	1,56E-04	1,998 <sup>NS</sup>
Error Puro	20	0,0016	7,82E-05	
Total Ajustado	29	5,4215	0,1869	

\* Significancia ( $p < 0,001$ )

CV = 0,3696

Mean = 2,4503

Análisis de varianza de los modelos en orden a la complejidad creciente para el atributo sensorial olor.

Modelo	Suma de Cuadrados del Efecto	Grados de Libertad del Efecto	Cuadrado Medio del Efecto	Suma de Cuadrados del Error	Grados de Libertad del Error	Cuadrado Medio del Error	F <sub>0</sub>	R <sup>2</sup>
Lineal	101,8596	2	50,9298	17,9621	27	0,6653	76,5559*	0,8501
Cuadrático	0,5018	3	0,1673	17,4603	24	0,7275	0,2299 <sup>N.S</sup>	0,8543
Cúbico especial	2,9040	1	2,9040	14,5562	23	0,6329	4,5886 <sup>N.S</sup>	0,8785
Cúbico reducido	12,0805	2	6,0403	2,4757	21	0,1179	51,2367*	0,9793
Total Ajustado	119,8217	29	4,1318					

\* Significancia (p<0,001)

Análisis de varianza del modelo cúbico reducido para el atributo sensorial olor.

Fuente de variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	F <sub>0</sub>
Modelo	8	117,3460	14,6683	124,42*
Error Total	21	2,4757	0,11789	
Falta de Ajuste	1	0,01997	0,01997	0,16 <sup>N.S</sup>
Error Puro	20	2,4557	0,12279	
Total Ajustado	29	119,8217	4,1318	

\* Significancia (p<0,001)

CV = 6,4783

Mean = 5,3

Análisis de varianza de los modelos en orden a la complejidad creciente para el atributo sensorial sabor.

Modelo	Suma de Cuadrados del Efecto	Grados de Libertad del Efecto	Cuadrado Medio del Efecto	Suma de Cuadrados del Error	Grados de Libertad del Error	Cuadrado Medio del Error	F <sub>0</sub>	R <sup>2</sup>
Lineal	52,0956	2	26,0478	17,7866	27	0,6588	39,5404*	0,7455
Cuadrático	11,4128	3	3,8043	6,3738	24	0,2656	14,3246*	0,9088
Cúbico especial	1,0131	1	1,0131	5,3607	23	0,2331	4,3468*	0,9233
Total Ajustado	69,8822	29	2,4097					

\* Significancia (p<0,05)

Análisis de varianza del modelo cúbico especial para el atributo sensorial sabor.

Fuente de variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	F <sub>0</sub>
Modelo	6	64,5215	10,7536	46,14*
Error Total	23	5,3607	0,2331	
Falta de Ajuste	3	1,7072	0,5691	3,12 <sup>NS</sup>
Error Puro	20	3,6535	0,1827	
Total Ajustado	29	69,8822	2,4097	

\* Significancia (p<0,001)

CV = 9,1095

Mean = 5,3

## Anexo XV

Nº ..... Fecha: .....  
Nombre: ..... Edad: .....  
Grado de Instrucción: .....  
Dirección: ..... Teléfono: .....

### **Por favor, conteste las siguientes preguntas:**

1. ¿Padece Ud. De alguna enfermedad que afecte sus sentidos?  
No ( ) Si ( )                      ¿Cuál? .....
2. ¿Fuma?.  
No ( ) Si ( )                      ¿Con que frecuencia?.....
3. ¿Qué días está libre a las 10 a.m ó a las 4 p.m?  
Lunes                      (     )  
Martes                      (     )  
Miércoles                      (     )  
Jueves                      (     )  
Viernes                      (     )
4. ¿A qué hora desayuna? .....
5. ¿A qué hora almuerza? .....
6. ¿A qué hora cena? .....
7. ¿ Es Ud. Alérgico o intolerante a algún tipo de alimento o bebida?  
No ( ) Si ( )                      ¿Cuál (es)? .....
8. ¿Le disgusta algún alimento o bebida tanto como para no ingerirlo?  
No ( ) Si ( )                      ¿Por qué? .....
9. ¿Le gustaría y estaría dispuesto a participar en una degustación y de esta manera colaborar con un trabajo de investigación?  
No ( ) Si ( )                      ¿Por qué? .....
10. ¿Desearía Ud. Introducir alguna sugerencia a este formato?  
.....

**Muchas Gracias.**

## Anexo XVI

Nombre del juez: ..... Fecha: .....

Muestra evaluada: ..... Prueba N°: .....

**Instrucciones** : Coloque el código de las muestras que Ud. observa en los vasitos de izquierda a derecha.

*Dos de las muestras codificadas son idénticas y una diferente. Por favor encierre en un círculo el código de la muestra diferente. Enjuáguese la boca entre muestra y muestra. Muchas gracias.*

.....  
Observaciones:.....

.....

## Anexo XVII

Nombre del juez: ..... Fecha: .....

Muestra evaluada: ..... Prueba N°: .....

El vaso 1 contiene la mayor concentración. Por favor sorba una pequeña cantidad de cada muestra, empezando por el vaso 1, e indique el número del vaso hasta el cual todavía percibe el amargor.

Último vaso en el que todavía percibe el sabor

Observaciones: .....  
.....

Nombre del juez: ..... Fecha: .....

Muestra evaluada: ..... Prueba N°: .....

El vaso 1 contiene la mayor concentración. Por favor sorba una pequeña cantidad de cada muestra, empezando por el vaso 1, e indique el número del vaso hasta el cual todavía percibe la astringencia.

Último vaso en el que todavía percibe la astringencia

Observaciones: .....  
.....

## Anexo XVIII

Nombre del juez: ..... Fecha : .....

Muestra Evaluada: ..... Prueba N° .....

Por favor marcar la muestra semejante a la muestra patrón "P". Coloque a la diferente el signo "-" o "+", según sea "más" o "menos" intenso que "P". Comience probando la muestra patrón "P" y las muestras en el orden que prefiera. Antes de pasar a la otra muestra dejar pasar algunos segundos.

Muestras	Diferente a "P"

Comentario: .....

.....

## Anexo XIX

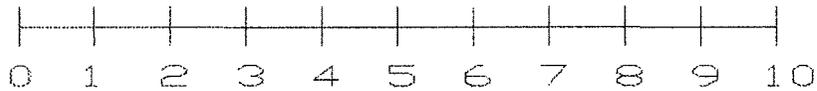
Nombre del juez: ..... Fecha: .....

Muestra Evaluada: ..... Prueba N° .....

Los cuatro vasos contienen soluciones a concentraciones diferentes de cafeína. Ordénelos desde el menos concentrado al más concentrado, colocando el código de cada muestra secuencialmente de izquierda a derecha.

MUESTRAS ORDENADAS DE			
MENOR .....	A .....	MAYOR	
INTENSIDAD			

Luego califique la intensidad en la línea presentada a continuación:



Comentario: .....

Nombre del juez: ..... Fecha: .....

Muestra Evaluada: ..... Prueba N° .....

Los cuatro vasos contienen soluciones de concentraciones diferentes de ácido tánico. Ordénelos desde el menos concentrado al más concentrado, colocando el código de cada muestra secuencialmente de izquierda a derecha.

MUESTRAS ORDENADAS DE			
MENOR .....	A .....	MAYOR	
INTENSIDAD			

Luego califique la intensidad en la línea presentada a continuación:



Comentario: .....

.....

## Anexo XX

Nombre del juez: ..... Fecha: .....

Muestra Evaluada: ..... Prueba N° .....

Los cuatro vasos contienen infusiones de concentraciones diferentes de hierba luisa. Ordénelos desde el menos concentrado al más concentrado, colocando el código de cada muestra secuencialmente de izquierda a derecha.

MUESTRAS ORDENADAS DE			
MENOR	A		MAYOR
INTENSIDAD			

Luego califique la intensidad en la línea presentada a continuación:



Comentario: .....

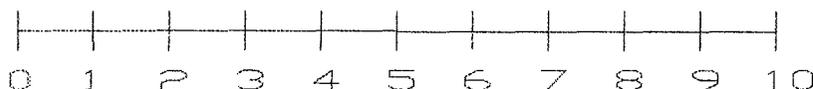
Nombre del juez: ..... Fecha: .....

Muestra Evaluada: ..... Prueba N° .....

Los cuatro vasos contienen infusiones de concentraciones diferentes de pampa orégano. Ordénelos desde el menos concentrado al más concentrado, colocando el código de cada muestra secuencialmente de izquierda a derecha.

MUESTRAS ORDENADAS DE			
MENOR	A		MAYOR
INTENSIDAD			

Luego califique la intensidad en la línea presentada a continuación:



Comentario: .....

### Anexo XXI

Nombre del juez: ..... Fecha : .....

Atributo sensorial: ..... Prueba N° .....

Los vasos contienen infusiones de té y hierba luisa. Por favor califique las muestras en función al amargor en la línea presentada a continuación.

Té	1
Hierba Luisa	2



Comentario:.....

.....

Nombre del juez: ..... Fecha : .....

Atributo sensorial: ..... Prueba N° .....

Los vasos contienen infusiones de té y hierba luisa. Por favor califique las muestras en función a la astringencia en la línea presentada a continuación.

Té	1
Hierba Luisa	2



Comentario:.....

.....

## Anexo XXII

Nombre del juez: .....

Fecha: .....

Evaluar los primeros vapores, dejando intervalos de 10 s, evaluar nuevamente para verificar la presencia del olor, repetir la operación para cada muestra. La escala varía desde extremadamente desagradable hasta extremadamente agradable.

Califique en la línea presentada a continuación:



Comentario:.....

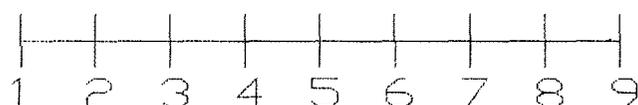
.....

Nombre del juez: .....

Fecha : .....

Sorber directamente de la taza una cantidad de infusión, mantener breves segundos en la boca y hacerlo pasar dejando intervalos de 1 minuto, repetir la operación hasta estar seguro de su respuesta. La escala varía desde extremadamente desagradable hasta extremadamente agradable.

Califique en la línea presentada a continuación:



Comentario:.....

.....

**Anexo XXIII**

Nombre del juez: .....

Fecha: .....

En las infusiones presentadas. Por favor califique las muestras en función al amargor en la línea presentada a continuación.



Comentario: .....

.....

Nombre del juez: .....

Fecha: .....

En las infusiones presentadas. Por favor califique las muestras en función a la astringencia en la línea presentada a continuación.



Comentario: .....

.....

### Anexo XXIV

Nombre del juez: .....

Fecha: .....

Los cuatro vasos contienen muestras de pampa orégano secado a diferentes temperaturas. Califique en el cuadro presentado a continuación:

	Sabor	Olor
Muy agradable		
Agradable		
Me agrada más o menos		
Desagradable		
Muy desagradable		

Comentario:.....

.....