



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
LABORATORIO DE ANÁLISIS
BIOTECNOLÓGICO Y MOLECULAR(ANBIOMOL)
“Prof. Guillermo López Corcuera”



ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE *in vitro* DE EXTRACTOS METANÓLICOS DE TÉ
COMERCIALES

(Trabajo de Grado presentado como requisito para optar al título de Licenciado en
Bioanálisis)

Tesista:

Manuel Enrique Carrillo Lacruz

C.I.: 23.716.589

Tutor (a):

Dra. Elizabeth Pérez

Mérida, mayo de 2023

DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado a mis padres Manuel y Margot, por apoyarme incondicionalmente en cualquier momento y circunstancia, por brindarme la oportunidad de enfocarme en mis estudios y cumplir mi sueño de ser Licenciado en Bioanálisis.

A mi hermana Diana por su constante e incondicional apoyo en este camino, por estar siempre presente ante cualquier circunstancia y ser mi motivo de inspiración.

www.bdigital.ula.ve

Manuel Carrillo

AGRADECIMIENTOS

A mi padre Manuel y a mi madre Margot, por siempre apoyarme en la realización de este sueño de ser Licenciado en Bioanálisis, por acompañarme y ser mi estímulo para seguir adelante, por guiarme y nunca abandonarme en este difícil camino, sin ellos este sueño no se estaría cumpliendo, gracias infinitas, los amo, este sueño también es de ustedes.

A mi hermana Diana, un pilar fundamental en mi vida, por ser mi apoyo incondicional para seguir adelante, eres mi ejemplo de lucha, trabajo, disciplina y perseverancia, sin ti este logro jamás podría materializarse, infinitas gracias, te amo.

Agradezco a mi tutora Dra. Elizabeth Pérez por aceptarme como su tesista, por guiarme en la realización de este trabajo y por permitirme entrar a su vida conociendo la gran persona que es, por su apoyo, dedicación, conocimientos y su valioso tiempo permitiéndome finalizar este trabajo.

Agradezco a la MSc. María José Peña por su ayuda, apoyo y paciencia para la realización de la parte experimental del trabajo.

A la ilustre Universidad de los Andes, por brindarme la oportunidad de ocupar sus aulas y ser formado por grandiosos y valiosos profesionales.

A mis amigos, por siempre estar presente cuando más lo necesitaba.

Manuel Carrillo

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Pág.
ÍNDICE DE TABLAS	viii
ÍNDICE DE ESQUEMAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	x
RESUMEN	xi
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I: EL PROBLEMA	3
Planteamiento del problema	3
Justificación de la Investigación	8
Objetivos de la Investigación	9
<i>Objetivo General</i>	9
<i>Objetivos Específicos</i>	9
Alcances y Limitaciones de la Investigación	10
<i>Alcances de la Investigación</i>	10
<i>Limitaciones de la Investigación</i>	10
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO	11
Trabajos Previos	11
Antecedentes Históricos	16
Bases Teóricas	18
<i>Bioactividad fitoquímica presente en las plantas</i>	18
<i>Metabolitos secundarios de las plantas</i>	18
<i>Polifenoles presentes en las plantas</i>	19
<i>Efectos nocivos de los radicales libres en la salud</i>	20
<i>Descripción botánica de la Camellia sinensis</i>	20
<i>Propiedades benéficas de la Camellia sinensis</i>	21
<i>Composición química de la Camellia sinensis</i>	22
<i>Sistema antioxidante del té</i>	23

<i>Sistema de acción de los radicales libres</i>	24
<i>Sistema de acción de los antioxidantes</i>	24
<i>Método de la actividad antioxidante (AOA)</i>	25
<i>Método del catión radical ABTS+•</i>	25
<i>Método de la desoxirribosa para el radical hidroxilo</i>	26
<i>Determinación de la concentración de polifenoles</i>	26
<i>Determinación de la concentración de proteínas</i>	27
<i>Determinación de la concentración de flavonoides con el método del cloruro de aluminio</i>	28
Definición Operacional de Términos	29
<i>Fitoquímicos</i>	29
<i>Metabolitos secundarios</i>	29
<i>Actividad antioxidante</i>	29
<i>Extracto metanólico</i>	30
<i>Polifenoles</i>	30
<i>Flavonoides</i>	30
<i>Proteínas</i>	31
Definición operacional de las variables	33
Hipótesis	33
<i>Hipótesis Alternativa (Hi)</i>	33
<i>Hipótesis Nula (Ho)</i>	33
CAPÍTULO III	34
MARCO METODOLÓGICO	34
Tipo de investigación	34
Diseño de Investigación	34
Población y muestra	35
<i>Unidad de investigación</i>	35
<i>Selección del tamaño muestra</i>	35

Variables de investigación	35
Procedimientos de la investigación	36
<i>Preparación de la muestra</i>	36
<i>Estudio de la Capacidad Antioxidante sobre el Radical Hidroxilo</i>	36
<i>Método de la Actividad Antioxidante (AOA)</i>	37
<i>Método del Catión Radical ABTS^{•+}: Ensayo de Decoloración en Solución Etanólica</i>	38
<i>Determinación de la Concentración de Grupos Fenólicos</i>	39
<i>Determinación de la Concentración de Proteínas</i>	40
<i>Determinación del Contenido de Flavonoides: Método colorimétrico del Cloruro de Aluminio</i>	41
<i>Diseño de Análisis</i>	41
<i>Análisis de Varianza con un factor (ANOVA)</i>	42
<i>Prueba Post-Hoc</i>	42
CAPÍTULO IV	44
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	44
Resultados	44
<i>Descripción de la población y muestra</i>	44
<i>Caracterización química de los extractos metanólicos de Camellia sinensis</i>	45
<i>Actividad antioxidante de los extractos metanólicos de Camellia sinensis</i>	47
Discusión	50
<i>Caracterización química</i>	50
<i>Actividad antioxidante y su correlación con parámetros químicos</i>	54
CAPÍTULO V	59
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	59
Conclusiones	59

Recomendaciones	61
BIBLIOHEMEROGRAFÍA	62

www.bdigital.ula.ve

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
TABLA 1. Operacionalización de la variable dependiente actividad antioxidante <i>in vitro</i>	32
TABLA 2: Operacionalización de la variable independiente extracto metanólico	32
TABLA 3. Volúmenes necesarios para el método AOA	38
TABLA 4. Volúmenes de reactivos necesarios para la curva de calibración en la determinación de proteínas	40
TABLA 5. Concentración media de flavonoides, polifenoles y proteínas de las muestras analizadas	46
TABLA 6. Actividad antioxidante de los extractos metanólicos de hoja seca comercial de <i>Camellia sinensis</i>	47
TABLA 7. Correlación entre la actividad antioxidante <i>in vitro</i> y los parámetros fisicoquímicos	50

ÍNDICE DE ESQUEMAS

	Pág.
ESQUEMA 1. Representación esquemática del método de Halliwell y col. (1987) para la medición del Radical Hidroxilo	27
ESQUEMA 2. Representación esquemática del ensayo de Lowry.	28

www.bdigital.ula.ve

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
FIGURA 1. Representación de las hojas y flores de <i>Camellia sinensis</i>	22

www.bdigital.ula.ve



Universidad de Los Andes
Facultad de Farmacia y Bioanálisis
Escuela de Bioanálisis
Laboratorio de Análisis Biotecnológico y
Molecular (ANBIOMOL)
“Prof. Guillermo López Corcuera”



Actividad antioxidante *in vitro* de extractos metanólicos de té comerciales

Tesista:
Manuel Enrique Carrillo Lacruz
C.I.: 23.716.589
Tutor:
Dra. Elizabeth Pérez

www.bdigital.ula.ve

RESUMEN

La búsqueda de compuestos antioxidantes es un área de creciente relevancia debido al aumento de enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo, haciéndose necesaria la búsqueda de fuentes para contrarrestar los radicales libres, entre ellas el té. El objetivo de esta investigación es confirmar la actividad antioxidante *in vitro* de los extractos metanólicos de té comerciales adquiridos en el Mercado Principal de la ciudad de Mérida (Mérida, Venezuela). El diseño de la investigación es experimental, se someterán los extractos metanólicos de té verde y negro a diferentes métodos capaces de analizar su actividad antioxidante. La actividad antioxidante se estudiará a través del Método de la capacidad antioxidante sobre el radical hidroxilo, método de la actividad antioxidante (AOA) y por último el método del catión radical ABTS^{•+}; y se determinarán las concentraciones de flavonoides, polifenoles y proteínas con la intención de establecer si existe correlación entre los parámetros fisicoquímicos y la actividad antioxidante. El diseño de análisis será a través de un enfoque cuantitativo y los datos se analizarán según técnicas estadísticas, empleándose el análisis de la varianza por medio de la prueba ANOVA *post hoc* Scheffé.

Palabras clave: Radical libre, antioxidante, té, extracto metanólico.

INTRODUCCIÓN

La actividad antioxidante es la capacidad de un conjunto de moléculas de bloquear el efecto dañino de los radicales libres. Esta capacidad tiene como consecuencia generar una serie de reacciones que retrasan el proceso de envejecimiento y la inhibición de los radicales libres capaces de generar la degeneración de moléculas esenciales para la vida. Los antioxidantes se obtienen principalmente de la dieta, encontrándose en su mayoría en los alimentos vegetales y sus derivados, lo cual explica parte de las acciones saludables de frutas, legumbres, hortalizas, cereales integrales, vino, té y miel de abejas (Halliwell y Gutteridge, 1989). La capacidad antioxidante se puede medir en un extracto metanólico, el cual se obtiene por medio de un método de extracción con solvente muy eficiente a partir de una obtención de compuestos directamente de la materia prima seca. El extracto metanólico se produce por medio de una planta al dejar macerar la parte más aprovechable de la misma durante días en metanol, sumergiendo la parte de la planta donde reside mayor cantidad de principio activo (metabolito de interés), obteniendo los compuestos de interés solubles en metanol (Arroyo, Bonilla, Tomás y Huamán, 2011).

Debido a la relación entre los radicales libres y el desarrollo de enfermedades crónicas, la búsqueda de compuestos antioxidantes es un área que cada día adquiere más relevancia, tratando de hallar fuentes de compuestos capaces de generar un equilibrio para contrarrestar estos radicales. Una de estas fuentes naturales son los té, los mismos se han utilizado durante cientos de años de manera empírica, pero no se han estudiado formalmente su composición y bioactividad, resultando de gran interés las múltiples potencialidades de la *Camellia sinensis* (Ramírez, Ortiz y Ospina, 2016). Se ha propuesto que los compuestos presentes en el té son responsables de su capacidad antioxidante bloqueando el efecto causado por los radicales libres, los cuales generan acciones dañinas en el organismo por medio de su habilidad para reaccionar con otros átomos o moléculas presentes en su entorno (Youngson, 2003).

La actividad antioxidante puede ser medida a través de diversas metodologías como; El método de la capacidad antioxidante sobre el radical hidroxilo, método de la actividad antioxidante (AOA) y el método del catión radical ABTS⁺. En estos métodos se permite la generación de diversos radicales libres y se evalúa la inhibición de formación de radical libre y/o la reversión del mismo por parte del supuesto antioxidante en estudio. Para tratar de explicar la posible actividad antioxidante de un extracto es necesario correlacionarla con su composición química, y en el caso de este estudio se medirán las concentraciones de polifenoles, flavonoides y proteínas y se evaluará si existe correlación entre estos parámetros y la actividad antioxidante mostrada por las diferentes muestras de té comerciales analizadas (Quairul y Fadzelly, 2013).

En base a todo lo expuesto anteriormente, el objetivo central de esta investigación es confirmar la actividad antioxidante *in vitro* de los extractos metanólicos de té comerciales disponibles en el Mercado Principal de la ciudad de Mérida (Mérida, Venezuela), en el Laboratorio de Análisis Biotecnológico y Molecular (ANBIOMOL) “Prof. Guillermo López Corcuera” de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, desde Enero de 2019 hasta Mayo de 2023.

Este proyecto de investigación ha sido sistematizado en 3 capítulos. El primero titulado: El Problema, subtítulo de la siguiente manera: Planteamiento del problema, justificación e importancia de la investigación, objetivos, limitaciones y alcances. El segundo capítulo, titulado: Marco teórico, dividido de la siguiente forma: Trabajos previos, antecedentes históricos, bases teóricas, definición operacional de términos y operacionalización de las variables. El tercero, descrito como: Marco metodológico, se representa mediante (5) subtítulos: Tipo de investigación, diseño de la investigación, población y muestra, variables de investigación, procedimientos de la investigación y diseño de análisis.

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA

Planteamiento del problema

El té es una bebida preparada en agua hirviendo con las hojas y brotes de la planta *Camellia sinensis*. Es la segunda bebida más consumida en el mundo, superada solo por el agua, y con múltiples beneficios para la salud. Se ha reportado que el té verde y negro posee polifenoles, vitaminas, sustancias aromáticas, minerales, aminoácidos y antioxidantes, los cuales son los responsables de sus propiedades saludables tales como su actividad antiinflamatoria, antibacteriana, antiartrítica, antioxidante, neuroprotectora, capacidad de prevención de cáncer y enfermedades cardiovasculares, entre otras (Chacko, Thambi, Kuttan y Nishigaki, 2010).

Los radicales libres son sustancias químicamente estructuradas con uno o varios electrones desapareados, lo que les da la propiedad de formar una reacción en cadena formadora de más radicales libres, siempre en la búsqueda de completar la configuración electrónica más estable. Desde un punto de vista químico, un radical libre es cualquier especie (átomo, molécula o ion) que contenga a lo menos un electrón desapareado en su orbital más externo, y que sea a su vez capaz de existir en forma independiente (de ahí el término libre). La presencia de un electrón desapareado en el orbital más externo de un átomo confiere a este último una aumentada habilidad para reaccionar con otros átomos o moléculas presentes en su entorno, normalmente lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. La interacción entre radicales libres y dichos sustratos da lugar a alteraciones en las propiedades estructurales y eventualmente funcionales de estos últimos. El desequilibrio de los radicales libres puede producirse por varios factores como traumatismos, distintas enfermedades, procesos inflamatorios, cambios ambientales, tabaquismo,

radiaciones solares, humedad-calor, estrés físico y mental que producen cambios a nivel hormonal y celular (Márquez, 2016).

Cuando ocurre un desequilibrio entre la producción de especies reactivas del oxígeno y la capacidad de un sistema biológico de decodificar rápidamente los reactivos intermedios o reparar el daño resultante, se produce lo que se conoce como estrés oxidativo, un desequilibrio entre la producción de oxidantes y la capacidad de un sistema biológico de decodificar rápidamente los reactivos intermedios o reparar el daño resultante. Un gran número de investigaciones han demostrado que el daño causado por los radicales libres está implicado en una amplia gama de enfermedades y desordenes incluyendo trombosis coronaria, angina de pecho, fallo cardíaco, apoplejía, daños cerebrales, envejecimiento, enfermedades renales, cáncer, desordenes inflamatorios e intoxicación (Youngson, 2003).

La actividad antioxidante puede definirse como la capacidad de ciertas moléculas de bloquear el efecto dañino de los radicales libres, bien sea inhibiendo la formación del radical, revirtiéndolo o actuando como antioxidantes suicidas. Una consecuencia inherente a ser una molécula antioxidante puede ser la pérdida de un electrón, convirtiéndose en un radical libre que termina oxidándose bajo una forma de baja o nula reactividad hacia su entorno. Las células son capaces de producir antioxidantes naturales endógenos los cuales favorecen al organismo en la defensa ante agresiones externas y envejecimiento. Sin embargo, las células animales obtienen sus antioxidantes principalmente de la dieta encontrándose en su mayoría en los alimentos vegetales y sus derivados, lo cual explica parte de las acciones saludables de frutas, legumbres, hortalizas, cereales integrales, vino, té y miel de abejas (Halliwell y Gutteridge, 1989).

Las plantas medicinales ricas en fitoquímicos se han utilizado durante siglos en el tratamiento y prevención de enfermedades. Los metabolitos secundarios derivados de las plantas siguen siendo la base de una gran proporción de los medicamentos comerciales que se usan en la actualidad para el tratamiento de una gran variedad de enfermedades. Fitoquímico es simplemente una palabra que

significa químicos vegetales, son productos químicos producidos por las plantas que poseen compuestos bioactivos naturales y que pueden pertenecer a diferentes categorías como: terpenoides, compuestos fenólicos, alcaloides, glucósidos, carbohidratos, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, entre otros. Pueden afectar la salud pero no son nutrientes esenciales ya que la dieta no los requiere de la misma manera de vitaminas y minerales (Singh, 2011). Cientos de fitoquímicos se están estudiando actualmente debido a su posible efecto positivo en la salud humana. Existen metabolitos secundarios de plantas muy importantes que han sido aislados de las fuentes naturales, son moléculas pequeñas producidas por un organismo o familia en particular, pero no son estrictamente necesarios para la supervivencia del organismo y por lo tanto su ausencia no suele ser fatal; mientras que los metabolitos primarios son vitales para la vida del organismo y se encuentran en todos ellos, dentro de este grupo están los carbohidratos, aminoácidos, proteínas, lípidos y vitaminas. Los metabolitos secundarios tienen una distribución restringida en la naturaleza, las funciones de los metabolitos secundarios pueden ser de defensa contra predadores y/o patógenos, agentes alelopáticos, o para atraer a los polinizadores o a los dispersores de semillas (Guarnizo y Martínez, 2009).

La mejor manera de estudiar los compuesto bioactivos presentes en las plantas es elaborar extractos que permitan acceder a los mencionados metabolitos, de manera pura o formando parte de un extracto. Un extracto metanólico se obtiene a partir de un método de extracción de solvente muy eficiente, por medio de una extracción de compuestos directamente de la materia prima seca. La extracción con metanol de sustancias secas se obtiene por medio de una planta después de dejar macerar su parte más aprovechable durante días en metanol, sumergiendo la parte de la planta donde reside mayor cantidad de principio activo. Después de varios días de maceración, se cuela la mezcla y se obtienen los compuestos solubles en este alcohol, cuyo producto contiene el principio activo de la planta en estado puro y alta concentración (Arroyo y cols., 2011).

Uno de los compuesto a los que se les atribuye actividad antioxidante son los polifenoles, los cuales son sustancias complejas derivadas del fenol, formados

normalmente por condensación de varios anillos fenólicos, que pueden llevar incorporados en alguno de sus carbonos otras sustancias, y se producen en el metabolismo secundario de las plantas. Los polifenoles se generan en pequeñas concentraciones en los tejidos y se acumulan en los mismos protegiendo a las plantas de la luz ultravioleta y de los ataques de ciertos hongos pudiendo sintetizarse en mayor cantidad en situaciones de estrés (Pereda, 2011).

Indarti, Fitria, Wibowo y Simanjuntak (2019) publicaron un trabajo titulado: *Antioxidant Activity of ethanolic extract and various fractions from green tea (Camellia sinensis L.) leaves* el cual utilizó hojas de té verde secas y hechas polvo para una posterior extracción de sus componentes en estudio usando etanol como solvente para ser sometidas a la determinación de actividad antioxidante mediante el método DPPH, contenido total de flavonoides, fenoles y catequinas. Logrando demostrarse la capacidad antioxidante muy potente total de las hojas de té verde de 9,017 µg/mL el cual es un resultado que evidencia la relación directa con el contenido total de flavonoides de 0.27% y compuestos fenólicos 31.16% presentes en la parte más aprovechable de la planta *Camellia sinensis*, sus hojas.

Por otra parte, Vinci, D'Ascenzo, Maddaloni, Prencipe y Tiradritti en el 2022 publicaron un artículo científico titulado: *The influence of green and black tea infusion parameters on total polyphenol content and antioxidant activity by ABTS and DPPH assays* en Italia, Roma usando 20 bolsas comerciales de té negro y verde de mercados locales italianos las cuales fueron procesadas mediante diferentes temperaturas de infusión, tiempos y tipos de agua para la determinación del contenido total de polifenoles y actividad antioxidante mediante los métodos DPPH y ABTS obteniendo resultados significativos evidenciando la presencia de un contenido total de polifenoles en té verde mayor en las muestras procesadas a 100°C por 10 minutos utilizando agua natural mineral con un valor de 916,12 - 1169,81 mg GAE/g, mientras que la actividad antioxidante mediante el método ABTS es de 99.73%I y por DPPH a 100°C por 3 minutos fue de 95,1 I% en té verde, mientras que los té negro a 80°C por 3 minutos arrojó resultados de 77,29% I.

Pacheco, Peraza, Orosco, Ramírez y Pinto en el 2020 publicaron un trabajo titulado: Determinación de compuestos fenólicos totales y evaluación de la actividad antioxidante de té verde comercial y artesanal, comercializados en Maracay, Venezuela en la Universidad de Carabobo utilizando té verde Lipton, té verde McCormick comercializadas en un supermercado de la ciudad y un té verde originario de China los cuales fueron procesados mediante ebullición con agua destilada y filtrados para la determinación de los fenoles totales mediante Folin-Ciocalteu, flavonoides totales utilizando una mezcla de reacciones químicas y su posterior lectura al espectrómetro y por último la actividad antioxidante por medio del método DPPH. Los resultados fueron significativos en relación al contenido total de fenoles, flavonoides y actividad antioxidante. El té verde artesanal originario de China mostró mayor concentración de compuestos químicos de interés y a su vez una mayor actividad antioxidante. En relación al contenido fenólico total el té Lipton arrojó resultados de 178,32 mg GAE/g, el té McCormick 201,32 mg GAE/g y 220,10 GAE/g para la marca China. Los flavonoides totales proporcionó resultados de 118,32 mg CE/g para té verde Lipton, 101,43 mg CE/g para té verde McCormick y 140 mg CE/g para la marca china. La actividad antioxidante medida mediante el método DPPH generó resultados positivos de 180,30 µg/mL para la marca Lipton, 220,30 µg/mL para la marca McCormick y 160,30 µg/mL para la marca artesanal China.

Una vez descrita la situación actual del problema de estudio se formula el siguiente enunciado holoprático: ¿Cuál es la relación causa-efecto entre la actividad antioxidante *in vitro* y los extractos metanólicos de hojas de *Camellia sinensis* comerciales del Mercado Principal de la ciudad de Mérida (Mérida, Venezuela), en el Laboratorio de Análisis Biotecnológico y Molecular (ANBIOMOL) “Prof. Guillermo López Corcuera” de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, desde Enero de 2019 hasta Mayo de 2023?.

Justificación de la investigación

La justificación de la investigación debe resolver las dudas generadas y responder a los por qué o razones de la investigación. Específicamente, estas razones son clasificadas como necesidades, curiosidades y preocupaciones, motivaciones, interés, valores, potencialidades, oportunidades, tendencias y contradicciones (Hurtado, 2012). Se sabe que la presencia de radicales libres en el organismo con habilidad para reaccionar con otras moléculas presentes en su entorno es de gran importancia para diversos mecanismos de funcionamiento y control de moléculas vitales como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. La interacción entre radicales libres y dichos sustratos da lugar a alteraciones en las propiedades estructurales y eventualmente funcionales de las mismas, es por ello que es necesario conocer, aplicar y realizar estudios que permitan desarrollar mecanismos para la eliminación total de estos radicales libres, los cuales son generados de manera natural por el cuerpo y en cantidades enormes (Márquez, 2016). El té posee una gran capacidad antioxidante generando diversos beneficios para aquellas personas que realizan una ingesta de té diaria, posee características ejemplares de actividad antioxidante (Youngson, 2003).

Se ha demostrado que el té es rico en polifenoles, los cuales otorgan numerosas capacidades distintivas de otras infusiones como lo son la capacidad antioxidante, protección de las paredes de los vasos sanguíneos en personas con enfermedades del corazón o diabetes, función antialérgica, función antiinflamatoria, protección de la salud del cerebro contra la demencia y prevención de algunos tipos de cáncer (Pereda, 2011). La capacidad antioxidante es un fenómeno de vital importancia para los organismos, ya que genera estabilidad en contra de cualquier molécula capaz de reaccionar y alterar funcional y estructuralmente a una sustancia química necesaria para el funcionamiento óptimo del organismo como lo son proteínas, carbohidratos, ácidos nucleicos y lípidos (Halliwell y Gutteridge, 1989).

Debido a la correlación encontrada entre la producción de radicales libres y el desarrollo de varias enfermedades crónicas, se ha incrementado la búsqueda de

nuevos y más eficientes antioxidantes naturales que puedan contrarrestar el efecto dañino de los radicales libres. Muchos metabolitos secundarios tienen la capacidad de actuar como fuertes antioxidantes, dándole a la planta de origen no solo un valor calórico sino un valor agregado conocido en la actualidad como valor nutracéutico, siendo considerados este tipo de alimentos como alimentos funcionales, es decir, aquellos alimentos que son elaborados no solo por sus características nutricionales sino también para cumplir una función específica como puede ser el mejorar la salud y reducir el riesgo de sufrir enfermedades (Arroyo y cols., 2011; Márquez, 2016).

Objetivos de la Investigación

Objetivo General

Confirmar la actividad antioxidante *in vitro* de extractos metanólicos de té comerciales del Mercado Principal de la ciudad de Mérida (Mérida, Venezuela), en el Laboratorio de Análisis Biotecnológico y Molecular (ANBIOMOL) “Prof. Guillermo López Corcuera” de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis desde Enero de 2019 hasta Mayo de 2023.

Objetivos Específicos

- Cuantificar las concentraciones de polifenoles, flavonoides y proteínas de los extractos metanólicos de las muestras de té comerciales en estudio.
- Determinar la actividad antioxidante *in vitro* de los extractos metanólicos de té comerciales mediante tres métodos (capacidad antioxidante sobre el radical hidroxilo, método de la actividad antioxidante (AOA) y método del catión radical ABTS).
- Correlacionar la composición química y la actividad antioxidante *in vitro* de las muestras de té comercial en estudio.

Alcances y Limitaciones de la Investigación

Alcances de la Investigación

La profundidad de una investigación representa un continuum de conocimientos, además visualizar qué alcance tendrá una investigación es importante para lograr establecer sus límites conceptuales y metodológicos (Hernández, Fernández y Baptista, 2010). La siguiente investigación presenta como alcance atribuir nuevos conocimientos relacionados con la determinación de la actividad antioxidante y composición química de los extractos metanólicos de té comerciales del Mercado Principal de la ciudad de Mérida (Mérida, Venezuela), para confirmar que dicha actividad antioxidante está relacionada con su composición química.

Limitaciones de la Investigación

Las limitaciones de una investigación están relacionadas con los recursos teóricos, técnicos y de presupuesto económico (Sampieri, Fernandez y Baptista, 2010). Una de las grandes limitaciones a las cuales se enfrentó esta investigación es la falta de recursos económicos, lo cual dificultó poder realizar una investigación más completa, con distintas pruebas, logrando una mayor especificidad y sensibilidad. Igualmente, el escaso recurso bibliográfico sobre la determinación de la actividad antioxidante y composición química de muestras de té comercial de Venezuela representa un reto a superar.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

Trabajos Previos

El té en su forma pura se considera una de las bebidas naturales más benéficas para mejorar la salud en general y para la prevención de enfermedades. La búsqueda de compuestos antioxidantes es un área que ha adquirido una fuerte relevancia gracias al aumento de enfermedades y factores ambientales capaces de aumentar la generación de radicales libres, por lo que se hace necesaria la búsqueda de fuentes de compuestos capaces de generar un equilibrio para contrarrestar estos radicales, siendo una de estas fuentes naturales el té (Ramírez y col., 2016).

Debido a la búsqueda de compuestos con la capacidad de bloquear el efecto dañino de los radicales libres y mejorar la salud en general, surge la necesidad de confirmar la actividad antioxidante *in vitro* en extractos metanólicos de té comercial. A continuación se muestran diferentes investigaciones realizadas sobre el tema.

Indarti, Fitria, Wibowo y Simanjuntak (2019) publicaron un artículo titulado: “*Antioxidant Activity of ethanolic extract and various fractions from green tea (Camellia sinensis L.) leaves*” cuyo objetivo fue determinar la actividad antioxidante del extracto etanólico de hojas de té verde y medir el contenido total de flavonoides, fenoles y catequinas. Utilizaron hojas de té verde (*Camellia sinensis*) obtenidas de Gunung Mas Plantation en Indonesia, las hojas de té verde las recolectaron, clasificaron y luego las secaron en un horno a temperatura de 40°C durante 7 días y fueron trituradas hasta polvo mediante un molinillo el cual fue conservado en una botella marrón cerrada, protegida de la luz solar y el aire húmedo. El extracto etanólico fue preparado con 1000 gramos de polvo de las hojas de té verde en etanol al 96% con un tiempo de maceración de 3 días los cuales fueron recogidos y concentrados con un evaporador al vacío hasta la evaporación total del solvente. El

contenido de flavonoides lo determinaron por el método colorimétrico del tricloruro de aluminio utilizando la quercetina como compuesto de referencia. Usaron quercetina para hacer la curva de calibración, disolvieron 10 mg de quercetina en etanol al 96% y luego la diluyeron a 2,0; 4,0; 6,0, 8,0 y 10,0 $\mu\text{g/mL}$. Las soluciones estándar diluidas fueron mezcladas por separado con 3,0 mL de etanol al 96 %, 0,2 mL de tricloruro de aluminio, 0,2 mL de acetato de potasio 1 M y 5,6 mL de agua destilada. Después de la incubación a temperatura ambiente durante 30 min, la absorbancia de la mezcla de reacción fue medida a 440 nm con un espectrómetro de UV-Vis. El contenido fenólico total lo determinaron por un método colorimétrico utilizando ácido gálico como compuesto de referencia y a su vez para la realización de la curva de calibración. 10 mg de ácido gálico fueron disueltos en solución metanólica para ser diluidos a 0,5; 1,0; 5,0; 10,0 y 25,0 $\mu\text{g/mL}$. Las soluciones estándar diluidas las introdujeron en los tubos de ensayo, agregaron 0,4 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu y 4,0 mL de carbonato de sodio al 7%. Los tubos fueron mezclados con agua destilada y los dejaron reposar durante 2 horas. La absorbancia de la mezcla de reacción la midieron a 744,8 nm con un espectrofotómetro UV-Vis. La actividad antioxidante fue medida mediante el método DPPH en la cual prepararon una solución de DPPH con concentración de 0,4 mM. La actividad antioxidante de las hojas de té verde la evaluaron en comparación el ácido ascórbico el cual es un antioxidante estándar. El ácido ascórbico como comparación lo realizaron bajo una concentración de 1,0; 3,0; 5,0; 7,0 y 9,0 $\mu\text{g/mL}$ usando solución metanólica como solvente. El extracto etanólico fue preparado a una concentración de 1,0; 5,0; 10,0; 15,0 y 20 $\mu\text{g/mL}$ usando solución metanólica como solvente. Cada solución de prueba y de referencia las mezclaron con 600 μL de 0,4 mM de DPPH y solución de metanol hasta 3,0 mL para luego ser homogeneizadas. La solución de prueba con varias concentraciones las incubaron a 37°C en baño maría durante 30 minutos. Luego midieron la mezcla a 517 nm con un espectrofotómetro UV-VIS. A partir de la absorbancia obtenida realizaron curvas de porcentaje de inhibición y regresión, aplicando la ecuación lineal para calcular la IC50 (concentración de inhibición 50). Los resultados que obtuvieron indican la

presencia de flavonoides en el extracto etanólico a base de polvo con hojas de *Camellia sinensis* mediante una prueba cualitativa (+), mediante la prueba cuantitativa se determinaron la presencia de flavonoides en un 0,27%, los fenoles totales fue de 31,16% lo que compruebo efectivamente la presencia de un contenido rico en flavonoides y compuestos fenólicos que actúan como compuestos antioxidantes. La actividad antioxidante mediante el método DPPH utilizando ácido ascórbico como estándar arrojó resultados de 9,017 µg/mL La actividad antioxidante se clasifica como muy poderosa cuando IC₅₀ <50 µg/mL, fuerte si los valores de IC₅₀ son de 50-100 µg/mL, moderada de 101-250 µg/mL y débil cuando IC₅₀ es de 250-500 µg/mL, y se clasifica como inactivo cuando el IC₅₀ >500 µg/mL, evidenciando la poderosa actividad antioxidante presente en el extracto etanólico de polvo a base de hojas de *Camellia sinensis*.

Vinci, D'Ascenzo, Maddaloni, Prencipe y Tiradritti (2022) en la Universidad Sapienza de Roma, Italia publicaron un artículo científico titulado: "*The influence of green and black tea infusion parameters on total polyphenol content and antioxidant activity by ABTS and DPPH assays*", con el objetivo de evaluar el contenido de polifenoles totales y la actividad antioxidante mediante el Folin-Ciocalteu y los ensayos de sal de diamonio (ABTS) y 2,2-difenil-1-picrihidrazilo (DPPH) en muestras de té negro y verde considerando parámetros de infusión de tiempo, temperatura, pH y tipo de agua utilizada para la realización de la infusión (grifo, mineral natural y destilada). Los autores recolectaron 20 bolsas comerciales de té de dos variedades negro y verde de mercados locales y tiendas de té las cuales almacenaron en oscuridad a una temperatura de 15-20°C hasta el día del análisis. La extracción de polifenoles totales de las diferentes muestras de té la realizaron de la siguiente manera: abrieron las bolsas de té comerciales, que pesaban entre 1,5 y 2 g, y pesaron 2 g de muestra por cada alícuota, luego la muestra fue colocada en el interior de un frasco de vidrio con 200 mL de agua para infusión: agua del grifo (TW) de alta dureza (33.5°F) agua destilada (DW), y agua mineral natural (NMW) de baja dureza (13.3°F). La extracción de polifenoles totales de las diferentes

muestras de té las realizaron en diferentes tiempos de infusión (3, 5, 10 min) y a diferentes temperaturas ($T = 80^{\circ}\text{C}$ y 100°C), respectivamente, estas condiciones de tiempo y temperatura fueron elegidas para replicar las condiciones habituales de preparación casera en el laboratorio. Para cada muestra, los análisis los realizaron por triplicado. El contenido total de polifenoles lo midieron mediante un análisis espectrofotométrico utilizando Folin-Ciocalteu, agregaron 1 mL de la muestra de infusión de té a 0,25 mL de Folin-Ciocalteu reactivo (2,0 N). Después de 3 min, 0,5 mL de Na_2CO_3 (7,5%, w/v) para luego llevarlo a un volumen final de 10 mL con agua destilada. Las muestras de té las dejaron reposar durante 45 min en la oscuridad a temperatura ambiente. La absorbancia fue medida a 750 nm expresando sus resultados en mg equivalentes de ácido gálico (GAE) por gramo de muestras de té en bolsas obtenido a partir de una curva de calibración de ácido gálico. La actividad antioxidante la evaluaron midiendo la disminución de la absorbancia a 515 nm para DPPH y a 734 nm para ABTS catión radical utilizando un espectrómetro UV-Vis expresando los resultados como porcentaje de inhibición (I%). Los resultados que obtuvieron indica que el contenido total de polifenoles en té verde es mayor en las muestras procesadas a 100°C durante 10 minutos y los 3 tipos de agua utilizadas en el procedimiento indicaron que el agua natural mineral en los tres tiempos de infusión sometidos (3, 5 y 10 min) alcanzaron valores de TPC más altos de 916.12-1169.81 mg GAE/g, para las muestras de té negro indicaron un contenido total de polifenoles menor en comparación al té verde, sin embargo la infusión de té negro mostró la misma tendencia con un contenido total de polifenoles más alto en infusiones extraídas a 100°C en agua mineral natural. En relación a la actividad antioxidante la infusión de té verde su mayor actividad ABTS en muestras que prepararon con agua natural mineral durante 10 min fue de 99.73 I%. Por otro lado el ensayo DPPH indica que la actividad aumentó con la temperatura de remojo y disminuyó con el aumento del tiempo de infusión. La mayor actividad de DPPH en infusiones de té verde las obtuvieron a 100°C por 3 min (95.1 I%), mientras que en los té negro la mayor actividad antioxidante resultaron a 80°C durante 3 min (77,29, I%).

Pacheco, Peraza, Orosco, Ramírez y Pinto (2020) en la Universidad de Carabobo realizaron el siguiente trabajo de investigación titulado: “Determinación de compuestos fenólicos totales y evaluación de la actividad antioxidante de té verde comercial y artesanal, comercializados en Maracay, Venezuela”. El objetivo de los investigadores fue determinar y comparar la concentración de fenoles totales, flavonoides y capacidad antioxidante de las infusiones de té verde para ello utilizaron dos marcas de té verde (Lipton, McCormick) comercializadas en un supermercado de la ciudad de Maracay, Venezuela y una marca artesanal original de té verde originaria de China, pesaron 2gr de material vegetal el cual se añadieron en un beaker de 400 mL al cual se adicionaron 200 mL de agua destilada previamente calentada hasta ebullición, agitando la mezcla ligeramente por 4 minutos y filtrada con papel Whatman número 4. Los fenoles totales fueron determinados mediante una mezcla de 50 μ L con 250 μ L del reactivo de Folin-Ciocalteu 1 N, dejaron reposar 8 minutos y luego añadieron 750 μ L de Na al 20% para la posterior adición de 950 μ L de agua destilada. Incubaron por 30 minutos a temperatura ambiente y se procedieron a leer la absorbancia en un espectrómetro UV/VIS utilizando una curva de calibración de ácido gálico con concentraciones de 50, 100, 200, 300, 400, 500 y 1000 ppm. Los flavonoides totales fueron determinados mediante la mezcla de un volumen de 100 μ L de muestra con 30 μ L de NaNO al 5% p/v², 30 μ L de AlCl al 10 % p/v³, 200 μ L de NaOH 1 M y ajustado con agua destilada a un volumen final de 1 mL. La lectura la realizaron a 510 nm en un espectrofotómetro y compararon con una curva estándar de catequina estándar y por último la actividad antioxidante la realizaron colocando juntos 100 μ L de muestra y 2,9 mL de DPPH (solución 100 mM de DPPH en metanol al 80 %) en una celda de cuarzo. Controlaron la absorbancia cada 5 min durante 30 minutos a una longitud de onda de 515 nm. Los resultados mostraron que las hojas de té verde artesanal originario de China es mayor su concentración de fenoles y flavonoides totales en comparación con las marcas Lipton y McCormick de té verde, con valores de 201,34 mg GAE/g para la marca Lipton, 178,32 mg GAE/g para la marca

McCormick y 220,10 mg GAE/g para la marca originaria de China, en comparación con los flavonoides totales de 118,32 mg CE/g para Lipton, 101,43 mg CE/g para McCormick y 140 mg CE/g para la marca china. Por otro lado la actividad antioxidante mediante el método DPPH arrojó 180,30 $\mu\text{g/mL}$ para la marca Lipton, 220,30 $\mu\text{g/mL}$ para la marca McCormick y 160,30 $\mu\text{g/mL}$ para la marca artesanal de China, de esta manera los investigadores evidenciaron diferencias en el contenido de compuestos bioactivos y actividad antioxidante entre el té artesanal chino y las marcas Lipton y McCormick comercializadas en Maracay, Venezuela.

Antecedentes Históricos

El té es una bebida consumida mundialmente desde la antigüedad con el propósito de mejorar la salud. Entre sus componentes principales están los polifenoles (antraquinonas, antronas, flavonoides, taninos, entre otros). Varios estudios epidemiológicos sugieren que el consumo de té podría prevenir el cáncer en humanos. De manera similar, estudios con animales demuestran que los cánceres de próstata y de mama pueden reducirse por la ingesta de té verde. Por medio de diversos mecanismos de acción, los polifenoles constituyentes del té presentan actividad antioxidante y anticarcinogénica, proporcionando así múltiples beneficios a la salud (González, 2003). La capacidad de los polifenoles para modular la actividad de diferentes enzimas y para interferir consecuentemente en mecanismos de señalización y en distintos procesos celulares puede deberse al menos en parte a las características fisicoquímicas de estos compuestos que les permiten participar en distintas reacciones metabólicas celulares de óxido-reducción (Quiñones, Miguel y Aleixandre, 2012).

Los compuestos fenólicos son el grupo más extenso de sustancias no energéticas presentes en los alimentos de origen vegetal. En los últimos años se ha demostrado que una dieta rica en polifenoles vegetales puede mejorar la salud y disminuir la incidencia de algunos tipos de enfermedades (Quiñones, Miguel y Aleixandre, 2012). Se ha evidenciado que el té verde y en particular la

epigallocatequina (EGCG), inhiben de manera efectiva el crecimiento de células cancerosas sin afectar el crecimiento de las células normales. Por ejemplo, el extracto de té verde puede contribuir a la prevención del cáncer de pulmón ya que la epigallocatequina inhiben el desarrollo de células pulmonares cancerosas a través de la inducción de células apoptóticas (Fujimoto y cols. 2002). Al igual, descubrieron que la capacidad del té verde de inhibir el crecimiento de tumores y prevenir la metástasis, está fuertemente correlacionada con una reducción significativa en la peroxidación en el suero de ratones (Das, Sur, Gomes, Vedasiromoni y Ganguly, 2002). Se cree que la inhibición en la proliferación celular y la inducción de apoptosis en el tracto digestivo son los mecanismos responsables de producir los efectos quimioprotectores los cuales actúan sobre el cáncer de colon inducido químicamente (Luceri, Caderni, Sanna y Dolara, 2002). También se descubrió que los té verde, negro y oolong son capaces de inhibir la proliferación de líneas celulares hepáticas en ratas (Zhang, Miura y Tagasaki, 2000). Ciertos antioxidantes como los polifenoles tipo quercetina inhiben la producción de radicales libres en la mitocondria (Feng y col., 2001).

La composición del té puede variar según la especie, el medio de cultivo, la estación del año y edad de la planta. Por ejemplo, en el té verde las catequinas representan un 80-90% de los flavonoides, mientras que en el té negro esta proporción es de 20-30%. En general, las hojas más jóvenes tienen menos catequinas. La forma de preparar la infusión también influye, por medio de temperaturas elevadas producen una disminución de la concentración de catequinas, por lo cual es preferible dejar enfriar el agua antes de introducir las hojas del té. Las catequinas del té verde son solubles en agua, por lo cual el grado de extracción de éstas depende del tiempo de contacto de las hojas con el agua (De Luis y Aller, 2008).

Bases Teóricas

Bioactividad fitoquímica presente en las plantas

Las plantas tienen la capacidad de sintetizar mezclas de compuestos bioactivos estructuralmente diversos con efectos terapéuticos múltiples y mutuamente potenciales, como lo son los metabolitos secundarios. Un metabolito secundario es simplemente una palabra con significado de químico vegetal, son compuestos químicos producidos por las plantas, los cuales poseen compuestos bioactivos naturales encontrados en alimentos vegetales que trabajan con ciertos nutrientes y fibra dietética para proteger contra enfermedades. Son derivados de las plantas siendo la base de una gran proporción de los medicamentos comerciales usados en la actualidad para el tratamiento de una gran variedad de enfermedades pudiendo afectar la salud previniendo enfermedades a través de sus actividades antiinflamatoria, antioxidante, antiartrítica, anticancerígena, entre otras (Singh, 2011).

Metabolitos secundarios de las plantas

Los metabolitos secundarios son compuestos químicos sintetizados a partir de excedentes del metabolismo primario. Los productos provenientes del metabolismo primario (aminoácidos, carbohidratos, lípidos, ácidos nucleicos) participan directamente en el crecimiento y supervivencia de las plantas, pero los metabolitos secundarios (como fenoles, terpenos, alcaloides, entre otros) actúan como mediadores (aleloquímicos). Los metabolitos secundarios intervienen en las funciones de la planta o de los organismos con los que interacciona; en otras palabras, participan en las respuestas a innumerables variables (Guarnizo y Martinez, 2009).

El término producto natural se ha referido más a los metabolitos secundarios que poseen una reconocida actividad biológica, el cual comprende su uso desde

medicinas hasta venenos, su ausencia no es fatal y no son necesarios para la supervivencia del organismo. Por mucho tiempo se pensó a los metabolitos secundarios como productos finales de procesos metabólicos, sin función específica o directamente como productos de desecho. Sus funciones son desconocidas pero los estudios más recientes han determinado que la mayoría de los metabolitos secundarios son capaces de generar defensa contra predadores patógenos, actúan como agentes alelopáticos (sustancias liberadas por las plantas para provocar efectos sobre otras plantas en su alrededor) o para atraer a los polinizadores o a los dispersores de semillas (Guarnizo y Martinez, 2009).

Polifenoles presentes en las plantas

Los polifenoles son fitoquímicos con alta capacidad antioxidante debido al alto contenido de hidroxilos en su estructura, están formados normalmente por condensación de varios anillos fenólicos y pueden llevar incorporados en alguno de sus carbonos otras sustancias. Se producen en el metabolismo secundario de las plantas en pequeñas concentraciones en los tejidos, y se acumulan en ellos protegiendo a las plantas de la luz ultravioleta y de los ataques de ciertos hongos, pudiendo sintetizarse en mayor cantidad y variedad en situaciones de estrés. Se conoce que en el cuerpo humano estos compuestos se fermentan activados por las bacterias que habitan en nuestro sistema digestivo, creando metabolitos con capacidad beneficiosa por ejemplo, por su actividad antioxidante. Las investigaciones indican que los polifenoles pueden tener capacidad antioxidante con potenciales beneficios para la salud. Podrían reducir el riesgo de contraer enfermedades cardiovasculares, protección de las paredes de los vasos sanguíneos en personas que tienen enfermedades del corazón o diabetes, función antialérgica, función antiinflamatoria, protección de la salud del cerebro contra la demencia y prevención de algunos tipos de cáncer (Pereda, 2011).

Efectos nocivos de los Radicales libres en la salud

Los radicales libres se forman en muchos procesos de los organismos, por ejemplo, por el metabolismo o por el sistema inmune para atacar virus y bacterias. Sin embargo, existen factores ambientales como contaminación, cigarrillo, mala alimentación que aumentan la dosis de radicales libres existentes en nuestro cuerpo. El cuerpo maneja los radicales libres producidos de forma natural, pero si la producción de los mismos es excesiva se producen daños en el cuerpo por medio del estrés oxidativo que se define como el desequilibrio entre las concentraciones de oxidantes y antioxidantes en el organismo (Youngson, 2003; Marquez y Vázquez, 2016).

La presencia de un electrón desapareado en el orbital más externo de un átomo le confiere a este último una aumentada habilidad para reaccionar con otros átomos o moléculas presentes en su entorno normalmente, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. La interacción entre radicales libres y dichos sustratos da lugar a alteraciones en las propiedades estructurales, y eventualmente funcionales de estos últimos (Youngson, 2003).

Una consecuencia para el antioxidante es que, como resultado de ceder un electrón éste se convierte en un radical libre y termina oxidándose bajo una forma de baja o nula reactividad hacia su entorno. Un gran número de investigaciones han demostrado que el daño causado por los radicales libres está implicado en una amplia gama de enfermedades y desordenes incluyendo trombosis coronaria, angina de pecho, fallo cardíaco, apoplejía, daños cerebrales, envejecimiento, enfermedades renales, cáncer, desordenes inflamatorios, intoxicación (Márquez y Vázquez, 2016).

Descripción botánica de la Camellia sinensis

Es una planta subtropical de hoja perenne originaria de Asia, pero ahora se cultiva en todo el mundo. Es un arbusto o árbol pequeño (1-9 m) perenne el cual posee una fuerte raíz principal, sus hojas son glabras (no presenta pelos, liso, brillante) y de bordes cerrados miden 4-15 cm de longitud y 2-5 cm de ancho. Poseen flores axilares, solitarias o en grupos de 3, tienen 5 sépalos, 6-8 pétalos y numerosos estambres (formado por el filamento y la punta de polen), son de color blanco-amarillentas y miden 2-4 cm de diámetro (Figura 1) (Baldermann, 2008).

Propiedades benéficas de la Camellia sinensis

A lo largo de la última década, varios estudios epidemiológicos y de casos controlados han encontrado una relación directa entre la ingesta de té, en particular de té verde y un menor riesgo de desarrollar cáncer en humanos. Así también los estudios clínicos sugieren un posible efecto benéfico del consumo de té sobre la incidencia de cáncer de mama, esófago, pulmón, estómago, colon, riñón, próstata, piel y mucosa oral. En base a los resultados de estudios *in vitro* e *in vivo* con animales se sabe que los polifenoles del té muestran ciertos efectos benéficos para la salud durante la mayoría de las etapas del desarrollo de cáncer (González, 2003).

El té verde en polvo también ha demostrado actividad antiproliferativa e hipolipídica sobre células hepáticas. Recientemente se reportó que las células cancerosas del tracto biliar humano mostraron una supresión significativa en su crecimiento y una capacidad de invasión reducida debido al tratamiento con EGCG, dependiente de la dosis (Takada y col., 2002). Además, se demostró que el polifenol epigallocatequina inhibe el proceso de replicación de ADN y por lo tanto, induce la apoptosis de células leucémicas (Smith y Dou, 2001).

El extracto de té verde suprime la formación de lesiones preneoplásicas inducidas químicamente en el colon de ratas. La epigallocatequina también inhibe el

crecimiento de células cancerosas del colon humano, por lo cual se considera que pudieran ser considerados como agentes terapéuticos. Al igual, se demostró que el té verde inhibe el crecimiento de tumores del colon inducidos químicamente en ratas, debido principalmente a la inhibición en la proliferación celular y la inducción de la apoptosis en las criptas intestinales (Metz y col., 2000).



Figura 1. Representación de las hojas y flores de *Camellia sinensis*.
Recuperado de <https://n9.cl/7ioy>

Composición química de la Camellia sinensis

Los compuestos activos son los flavonoides, un tipo de polifenol que posee propiedades antioxidantes muy potentes, e incluyen polifenoles de los grupos catequina (té verde) y teaflavina (té negro). Los flavonoides se encuentran de manera natural en las plantas. El contenido de flavonoides del té depende directamente del tipo de té y de su método de preparación. Generalmente, una taza de té negro, preparado con 2,5 g de hojas de té, contiene alrededor de 200 mg de flavonoides. La estructura química de los flavonoides polifenólicos tiene un impacto directo sobre sus propiedades biológicas, como su biodisponibilidad, actividad antioxidante, interacción con enzimas y con receptores celulares (González, 2003).

La distribución de flavonoides en el té verde es de 90% de catequinas y 10% de flavonoles. Como resultado del proceso de fermentación, las catequinas del té se polimerizan lo que provoca la formación de teaflavinas y tearubiginas. Por lo tanto, la distribución de flavonoides en el té negro es de 30% de catequinas, 47% de tearubiginas, 13% de teaflavinas, y 10% de flavonoles. De esta manera, una diferencia importante entre el té verde y el té negro es que el primero no contiene teaflavinas. El porcentaje de catequinas en el extracto de té verde es de 46,80% de epigallocatequina galato, 13,54% de epicatequina galato, 7,24% de galocatequina galato, 8,07% de epicatequina, 2,28% de epigallocatequina, 2,46% de galocatequina, 1,28% de catequina galato, 2,22% de catequina, y <0,3% de cafeína. A nivel de minerales nos proporciona: azufre, calcio, cobre, hierro, magnesio, fósforo, potasio y flúor. Y respecto a las vitaminas las hojas del té contienen vitamina C y vitamina B3 o niacina. De todos modos se debe considerar que estas vitaminas son termosensibles, especialmente la vitamina C, por ello no será la mejor bebida para proporcionarnos vitamina C (González, 2003).

www.bdigital.ula.ve

Sistema antioxidante del té

Es abrumadora evidencia acerca de los daños oxidativos causados por los radicales libres, lo que conlleva a numerosas complicaciones biológicas incluyendo carcinogénesis, mutagénesis, envejecimiento, aterosclerosis y enfermedades neurodegenerativas. Estos radicales libres son eliminados por diversos antioxidantes naturales. El término antioxidante se aplica generalmente a cualquier sustancia que en bajas concentraciones comparadas a las de un sustrato oxidable, puede retrasar o prevenir la oxidación de ese sustrato. Los antioxidantes naturales pueden ser compuestos fenólicos (flavonoides, ácidos fenólicos, entre otros), compuestos nitrogenados (alcaloides, derivados de la clorofila, aminoácidos y aminos), así como vitaminas (ácido ascórbico, carotenoides, tocoferol). En el té se ha encontrado un contenido antioxidante significativo, medido como la capacidad del té para eliminar los radicales libres (Halliwell y col., 1989).

Sistema de acción de los radicales libres

Los radicales libres son moléculas altamente inestables y reactivas, puesto que poseen electrones desapareados. Por lo general, las moléculas estables cuentan con electrones emparejados, pero cuando no es el caso, se da la presencia de los radicales libres. Al ser desapareados, estas moléculas tratan de conseguir el electrón que les hace falta. Es entonces cuando el radical libre comienza a desequilibrar el organismo, ya que al robar un electrón de una molécula estable esta se vuelve inestable. Es decir, se convierte en un radical libre. Es así, que la propagación de estas moléculas inestables puede ser caótica y darse de forma rápida. Al convertir en radicales las moléculas estables, estas tratarán a su vez de robar el electrón que el primer radical les robó en un principio, generando una reacción en cadena, las cuales pueden alterar el ácido desoxirribonucleico (ADN) y las proteínas además de ocasionar la oxidación de los lípidos (Halliwell y Gutteridge, 2007).

www.bdigital.ula.ve

Sistema de acción de los antioxidantes

Para que una molécula sea estable, debe contener la cantidad adecuada de electrones. Si la molécula pierde un electrón en un momento inadecuado, se convierte en un radical libre. Aquí es donde aparecen los antioxidantes. La molécula antioxidante tiene la capacidad de brindar al radical libre un electrón neutralizándolo. Una consecuencia inherente a ser una molécula antioxidante puede ser la pérdida de un electrón, convirtiéndose en un radical libre que termina oxidándose bajo una forma de baja o nula reactividad hacia su entorno. Este es el mecanismo detrás de los antioxidantes, donan electrones a los radicales libres, lo cual los anula y previene que causen daño (Halliwell y Gutteridge, 1989).

Método de la Actividad Antioxidante (AOA)

El método del AOA tiene como objetivo analizar la actividad antioxidante de una muestra usando como patrón de comparación el ácido úrico, el cual es un potente antioxidante no enzimático, y el valor obtenido se conoce como Actividad Antioxidante (AOA) y se expresa en mM equivalentes de ácido úrico/100 g de té. En este método el radical hidroxilo se genera por medio de una solución estandarizada de Hierro, el cual reacciona con el peróxido de hidrógeno produciendo la formación del radical hidroxilo. Este radical libre degrada el benzoato, resultando en la liberación de especies reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS). Esta reacción es monitoreada espectrofotométricamente, y la inhibición del desarrollo de color en presencia antioxidante es definida como AOA, en comparación con ácido úrico como estándar (Koracevic, Djordjevic, Andrejevic y Cosic, 2001).

Método del Catión Radical ABTS^{•+}: Ensayo de Decoloración en Solución Etanólica

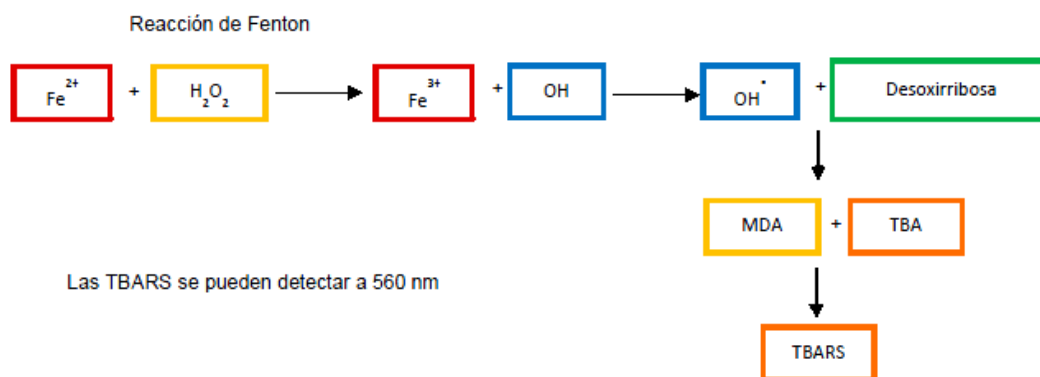
El ABTS es un compuesto químico utilizado para observar la cinética de reacción de enzimas específicas. También es utilizado frecuentemente por la industria alimentaria y los investigadores agrícolas para medir las capacidades antioxidantes de los alimentos. El ABTS se convierte en un catión radical mediante la adición de persulfato de potasio. Este catión radical es de color azul oscuro y absorbe luz a 734 nm. El catión radical ABTS es reactivo frente a la mayoría de los antioxidantes, incluyendo compuestos fenólicos y vitamina C. Durante la reacción el catión radical ABTS azul se convierte de nuevo en su forma neutra incolora, y la reacción puede ser monitoreada espectrofotométricamente. El descenso producido por el Trolox es comparado con el producido por el antioxidante que se está analizando al mismo tiempo. Se basa en que el potencial antioxidante de una sustancia es proporcional al grado de decoloración del radical, reportándose el resultado en μmol equivalente de Trolox/100 g (Robertare y col., 1999).

Método de la Desoxirribosa para el Radical Hidroxilo

En el método de la desoxirribosa descrito por Halliwell y col. (1987) el radical hidroxilo es generado por medio de la reacción de Fenton, en la cual el ion ferroso oxida al peróxido de hidrógeno para formar la especie $\cdot\text{OH}$. En presencia del radical hidroxilo, la desoxirribosa es fragmentada hasta Malondialdehído (MDA) que forma un complejo detectable a 532 nm con el ácido tiobarbitúrico (TBA), conocido como especies reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Esquema 1).

Determinación de la Concentración de Polifenoles

El ensayo Folin-Ciocalteu se utiliza para medir el contenido en compuestos fenólicos totales en productos vegetales. Se basa en que los compuestos fenólicos reaccionan con el reactivo de Folin-Ciocalteu, a pH básico, dando lugar a una coloración azul susceptible de ser determinada espectrofotométricamente a 765 nm. Este reactivo contiene una mezcla de wolframato sódico y molibdato sódico en ácido fosfórico, y reacciona con los compuestos fenólicos presentes en la muestra. El ácido fosfomolibdotúngstico (formado por las dos sales en el medio ácido) de color amarillo, al ser reducido por los grupos fenólicos da lugar a un complejo de color azul intenso, cuya intensidad es la que se mide para evaluar el contenido en polifenoles. El mecanismo de reacción es una reacción redox, por lo que además puede considerarse también como un método de medida de la actividad antioxidante total. La oxidación de los polifenoles presentes en la muestra, causa la aparición de una coloración azulada la cual presenta un máximo de absorción a 765 nm, y se cuantifica por espectrofotometría en base a una recta patrón de ácido gálico, reportándose en mg equivalentes de ácido gálico/100gr de muestra (Singleton, Orthofer y Lamuela-Raventos, 1999).



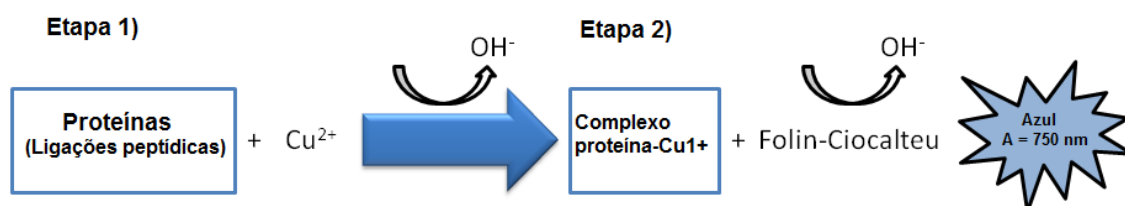
Esquema 1. Representación esquemática método de Halliwell y col. (1987) para la medición del Radical Hidroxilo.

Determinación de la concentración de proteínas

Se han desarrollado varios ensayos para la determinación de la concentración de proteínas, y es importante evaluar la compatibilidad de cada ensayo con los tipos de muestra, el rango del ensayo, el volumen de muestra y la disponibilidad de un espectrofotómetro adecuado, así como el tiempo y el costo.

El ensayo de Lowry, propuesto por Oliver H. Lowry en 1951, se basa en dos reacciones químicas. La primera reacción es la reducción de los iones de Cu^{2+} en condiciones alcalinas, lo que forma un complejo con los enlaces peptídicos (reacción de Biuret). La segunda, es la reducción del reactivo de Folin-Ciocalteu por el complejo cobre-enlace peptídico, la cual causa un cambio de color a azulado en la solución, con una absorción en el rango de 650 a 750 nm (Figura 3) (Olson y Markwell, 2007). La cantidad de proteína en la muestra puede ser estimada utilizando una curva de calibración con una solución de una proteína estándar seleccionada, tal como la albúmina (BSA). Las ventajas de este ensayo son su sensibilidad, y lo más importante, su exactitud. Sin embargo, requiere de más tiempo que otros ensayos, y muchos compuestos comúnmente utilizados en búferes de preparación de proteínas (tales como detergentes, carbohidratos, glicerol, tricina, EDTA, Tris) interfieren con el ensayo de Lowry y forman precipitados. No obstante,

el efecto de estas sustancias puede ser reducido diluyendo la muestra, pero sólo si la concentración de proteínas es lo suficientemente alta. Además, se ha demostrado que el tiempo para realizar este ensayo puede reducirse al aumentar la temperatura o utilizando un horno microondas (Waterborg y Matthews, 1984).



Esquema 2. Representación esquemática del ensayo de Lowry. (Waterborg y Matthews, 1984)

Determinación de la concentración de flavonoides con el método del cloruro de aluminio

Los flavonoides constituyen el grupo más importante de clasificación de los polifenoles, con más de 5000 compuestos; son los polifenoles más distribuidos en las plantas. Los flavonoides son un grupo de compuestos polifenólicos de bajo peso molecular que comparten un esqueleto común de difenilpirano $\text{C}_6\text{C}_3\text{C}_6$, formado por dos anillos de fenilo (A y B) ligados a través de un anillo C de pirano (heterocíclico). Los átomos de carbono en los anillos C y A se numeran del 2 al 8 y los del anillo B desde 2' al 6' (Zhishen y col., 1999)

Los flavonoides totales han sido determinados utilizando el método colorimétrico del cloruro de aluminio (AlCl_3) y nitrito de sodio (NaNO_2) para formar un complejo coloreado cuya absorbancia se mide a 510 nm. El principio básico del método colorimétrico de cloruro aluminio es que éste forma complejos estables de ácidos con el grupo cetona en C-4 o bien el grupo hidroxilo en C-3 o C-5 de flavonas y flavonoles. Además, también forma complejos lábiles ácidos con los grupos dihidroxilo en el anillo A o B de los flavonoides (Zhishen y col., 1999).

Definición operacional de términos

Fitoquímicos

Son compuestos de bajo peso molecular sintetizados por las plantas, tienen diversas funciones en las plantas como la protección ante situaciones adversas tales como el consumo por animales, el ataque por microorganismos como: virus, bacterias y hongos, también por la competencia del espacio del suelo, luz y nutrientes entre las diferentes especies de plantas en el lugar, muchos proporcionan color a flores y frutos generando un papel esencial en la atracción de insectos polinizadores, de la misma manera actúan como repelentes proporcionando a las plantas sabores amargos, haciéndolas indigestas o venenosas (Sepúlveda *et al.*, 2003).

Metabolitos secundarios

Son compuestos químicos sintetizados a partir de excedentes del metabolismo primario. Actúan como mediadores (aleloquímicos) interviniendo en las funciones de la planta o de los organismos con los que interaccionan, la ausencia de los metabolitos secundarios no es fatal para los seres humanos. Los estudios más recientes han determinado que la mayoría de los metabolitos secundarios cumplen funciones en las plantas de defensa contra predadores patógenos y actúan como agentes alelopáticos, o para atraer los polinizadores y dispersores de semillas (Guarnizo y Martinez, 2009).

Actividad Antioxidante

Los antioxidantes son moléculas, iones o átomos que bloquean el efecto dañino de los radicales libres. Se obtienen principalmente de la dieta, encontrándose en su mayoría en los alimentos vegetales y sus derivados, lo cual explica parte de las acciones saludables de frutas, legumbres, hortalizas, cereales integrales, vino, té, miel de abejas, entre otros. Los antioxidantes más ubicuos en la naturaleza son las vitaminas (A, E y C), los minerales (cobre, hierro, manganeso,

selenio, zinc), los pigmentos naturales (flavonoides, carotenoides), coenzimas (Q), las enzimas (catalasas, oxidasas) y otros compuestos (Halliwell y Gutteridge, 1989).

Extracto metanólico

Se obtiene a partir de un método de extracción de solvente muy eficiente en el cual se realiza la extracción de compuestos directamente de materia prima seca, la extracción en metanol de alta calidad utiliza la planta seca, no desecada, sumergiendo la parte de la planta donde reside mayor cantidad de principio activo, es decir dependiendo de la planta en concreto, se utilizarán sus hojas, tallos, raíz o semillas. Después de varios días de maceración en oscuridad, se cuela la mezcla y se obtiene un extracto con todo el principio activo de la planta en estado puro y alta concentración además de todas sus propiedades medicinales listas para consumir (Arroyo y col., 2011).

Polifenoles

Son sustratos de las enzimas polifenol oxidasas, las cuales producen la hidroxilación de monofenoles a difenoles que son convertidos en sus correspondientes químicos. En otras palabras, son un grupo de sustancias químicas encontradas en plantas caracterizadas por la presencia de más de un grupo fenol por molécula. Los polifenoles son generalmente subdivididos en taninos hidrolizables, los cuales son ésteres de ácido gálico de glucosa y otros azúcares; y fenilpropanoides, como la lignina, flavonoides y taninos condensados. Las principales fuentes de polifenoles son bayas, té, cerveza, uvas/vino, aceite de oliva, chocolate/cacao, nueces, maníes, granadas, yerba mate, y otras frutas y vegetales (Hernandez y col., 1999).

Flavonoides

Los flavonoides son pigmentos naturales presentes en los vegetales, los cuales tienen la propiedad de proteger al organismo del daño producido por agentes oxidantes como los rayos ultravioleta, la contaminación ambiental, sustancias

químicas presentes en los alimentos, entre otros. El organismo humano no puede producir estas sustancias químicas protectoras, por lo que deben obtenerse mediante la alimentación o en forma de suplementos. Están ampliamente distribuidos en plantas, frutas, verduras y en diversas bebidas, y representan componentes sustanciales de la parte no energética de la dieta humana (Martínez y col., 2002).

Proteínas

Las proteínas son el principal componente estructural y funcional de las células y tienen numerosas e importantes funciones dentro del organismo que van desde su papel catalítico (enzimas) hasta su función en la motilidad corporal (actina, miosina), pasando por su papel mecánico (elastina, colágeno), de transporte y almacén (hemoglobina, mioglobina, citocromos), protección (anticuerpos), reguladora (hormonas). Son macromoléculas formadas por cadenas de unidades estructurales, los aminoácidos. Estos aminoácidos se unen por medio de enlaces peptídicos entre los grupos carboxilo y el grupo α -amino (imino), con pérdida de agua. Desde el punto de vista nutricional la proteína es un macronutriente presente en los alimentos. La importancia de la proteína presente en la dieta se debe a su capacidad de aportar aminoácidos para atender al mantenimiento de la proteína corporal y al incremento de esta durante el crecimiento. La capacidad antioxidante no es relacionada comúnmente con las proteínas, ya que en sí, una proteína no posee capacidad antioxidante (Hernandez y col., 1999).

Definición operacional de las variables

Según Arias (2006) es el proceso mediante el cual se descomponen deductivamente las variables que constituyen la investigación, partiendo desde lo más general hasta lo más específico. Las variables son operacionalizadas con la finalidad de convertir un concepto abstracto en uno empírico, susceptible de ser medido a través de la aplicación de un instrumento. Esta investigación está

constituida por una variable dependiente la actividad antioxidante. La operacionalización de las variables está reflejada en la Tablas 1 y 2.

Tabla 1. Operacionalización de la variable dependiente Actividad antioxidante

Variable	Actividad antioxidante extractos de té comerciales
Tipo de variable	Dependiente y continua
Definición conceptual	El término antioxidante significa que impide la oxidación de otras sustancias químicas, ocasionada en las reacciones metabólicas o producidas por factores exógenos.
Definición operacional	- Estudio de la capacidad antioxidante sobre el Radical Hidroxilo. - Método de la Actividad Antioxidante (AOA). - Método del Catión Radical ABTS^{•+}: Ensayo de Decoloración en solución metanólica.
Dimensiones	- Actividad antioxidante presente - Actividad antioxidante ausente
Indicador	Cambios de Coloraciones, Lecturas del Espectrofotómetro.

Fuente: M., Carrillo, E., Pérez, J., Hernández

Tabla 2. Operacionalización de la variable independiente extracto metanólico

Variable	Extracto metanólico
Tipo de variable	Independiente y continua
Definición conceptual	Solución muy concentrada que se obtiene de una planta, semilla u otra cosa por diversos procedimientos.
Definición operacional	- Método de la determinación de la Concentración de Grupos Fenólicos - Método para la determinación de la Concentración de Proteínas - Método para la determinación del Contenido de Flavonoides: método colorimétrico del Cloruro de Aluminio.

Continuación de Tabla 2	
Dimensiones	Extracto metanólico: Alta concentración Extracto metanólico: Baja concentración
Indicador	Presencia de azúcares reductores, compuestos fenólicos, actónicos, aminoácidos, aminas en general, y flavonoides

Fuente: M., Carrillo, E., Pérez, J., Hernández

Hipótesis

Hipótesis Nula (H_0):

No existe relación directa entre la actividad antioxidante *in vitro* y las concentraciones de polifenoles, flavonoides y proteínas de los extractos metanólicos de muestras de té comerciales, en el Mercado Principal de Mérida (Mérida, Venezuela), estudiados en el Laboratorio de Análisis Biotecnológico y Molecular (ANBIOMOL) “Prof. Guillermo López Corcuera” de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de los Andes, desde Enero de 2019 hasta Mayo de 2023.

Hipótesis de Investigación (H_i)

Si existe relación directa entre la actividad antioxidante *in vitro* y las concentraciones de polifenoles, flavonoides y proteínas de los extractos metanólicos de muestras de té comerciales del Mercado Principal de Mérida (Mérida, Venezuela), estudiados en el Laboratorio de Análisis Biotecnológico y Molecular (ANBIOMOL) “Prof. Guillermo López Corcuera” de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de los Andes, desde Enero de 2019 hasta Mayo de 2023.

CAPÍTULO III

MARCO METODOLÓGICO

Tipo de Investigación

De acuerdo al nivel de complejidad de la investigación, la cual es determinada por el verbo anunciado en el objetivo general, se determina el tipo de investigación. En tal sentido, los tipos de investigación pueden ser: exploratorio, descriptiva, analítica, comparativa, explicativa, predictiva, proyectiva, interactiva, y confirmativa (Hurtado, 2010). Por lo tanto, esta investigación es confirmatoria, ya que se busca verificar las hipótesis de la investigación y se persigue indagar acerca de las posibles relaciones entre eventos a partir del control de una serie de variables. Para realizar este tipo de investigación se requiere de una explicación previa, bajo una serie de respuestas que el investigador desea confirmar.

Diseño de investigación

El diseño de la investigación es experimental, una investigación experimental consiste en someter a un objeto o grupo de individuos a determinadas condiciones o estímulos (variable independiente), para observar los efectos que se producen (variable dependiente) (Arias, 1999). En el presente trabajo las muestras de té comerciales serán sometidas a diferentes métodos capaces de analizar su actividad antioxidante. Por lo consiguiente el estudio de esta investigación manipula la variable independiente para medir el efecto y hace control estricto a las variables extrañas. En este respecto, el diseño de esta investigación fue transversal, contemporáneo y bivariable.

Población y muestra

Unidad de Investigación

La población es un conjunto finito o infinito de elementos con características comunes, para los cuales serán extensivas las conclusiones de la investigación, ésta queda limitada por el problema y por los objetivos del estudio (Arias, 2006). La unidad de esta investigación estará representada por las muestras metanólicas de hojas secas de té comerciales, que se utilizarán para su estudio en el Laboratorio de Análisis Biotecnológico y Molecular (ANBIOMOL) “Prof. Guillermo López Corcuera” de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de los Andes.

Selección del tamaño de la muestra

Se seleccionarán al azar un total de seis muestras de té a granel en forma de hojas secas comercializadas en el Mercado Principal del Estado Mérida (Mérida, Venezuela), dispuestas entre tres muestras de té verde y tres muestras de té negro.

Variables de investigación

Las variables son elementos que se miden, controlan y estudian dentro del problema formulado (Hernández-Sampieri y cols. 2010). Las variables de esta investigación fueron sistematizadas en dependiente e independiente, la variable independiente está definida por los extractos metanólicos de los té en estudio, y su medición se basa en su alta y baja concentración. La variable dependiente es la actividad antioxidante y su medición se basa en la presencia o ausencia de la misma.

Procedimientos de la Investigación

Preparación de la Muestra

Para la preparación de los extractos metanólicos de té se utilizará una metodología llamada maceración, la cual consiste tomar la materia prima seca (hojas) y triturarla en un mortero, posteriormente se realiza la extracción de la hoja del mortero y se pesa en gramos (5 gr), depositándoseles en un envase al que se le adiciona el solvente metanol (20 mL) hasta cubrir completamente el material en estudio, se agitará y tapará. Posteriormente se deja reposar por un periodo de 10 días agitando esporádicamente el contenido cada 6 horas, obteniéndose de esta manera el extracto metanólico con altas concentraciones de principio activo de la hoja del té.

Estudio de la Capacidad Antioxidante sobre el Radical Hidroxilo

Se utilizará el método de la desoxirribosa descrito por Halliwell y col. (1987). Para una mezcla de 0,1 mL de desoxirribosa 28 mM, se agregan 0,5 mL de buffer fosfato salino 40 mM (pH 7.4), 0,1 mL de FeCl_3 1 mM, 0,1 mL de EDTA 1,04 mM, 0,1 mL de H_2O_2 1mM, y 0,1 mL de vitamina C 1 mM, además de 200 μL de cada una de las muestras a ser analizadas. La mezcla se incuba durante 1 h a 37 °C y se agregan 0,5 mL de TBA 1% en 0,05 M de NaOH y 0,5 mL de ácido tricloroacético 2,8%, y se deja reaccionar durante 10 min a 100 °C. Se leerá el cambio de absorbancia a 532 nm.

Método de la Actividad Antioxidante (AOA)

El valor de la AOA (Actividad antioxidante) será determinado por el método de Koracevic y col. (2001). En este método una solución estandarizada de Fe-EDTA reacciona con el peróxido de hidrógeno, produciendo la formación del radical hidroxilo. Este radical libre degrada el benzoato, resultando en la liberación de especies reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS). Esta reacción es monitoreada espectrofotométricamente y la inhibición del desarrollo de color en presencia antioxidante es definida como AOA, en comparación con ácido úrico como estándar. Los reactivos a preparar serán los siguientes: (1) Buffer fosfato de sodio 100 mM pH 7.4, (2) Benzoato de sodio 10 mM, (3) NaOH 50 mM, (4) EDTA 2 mM en buffer fosfato (Solución 1), (5) Fe (NH₄)₂SO₄ 2 mM, (6) solución Fe-EDTA (preparado fresco mezclando iguales volúmenes de las soluciones 4 y 5, y dejando reposar 60 minutos a temperatura ambiente), (7) Peróxido de hidrógeno, 10 mM, (8) ácido acético 20% (v/v), (9) ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,8% (p/v) en 50mM de NaOH, (10) ácido úrico 1 mM en 5 mM de NaOH.

Cada muestra (A1) debe tener su propio control (A0, muestra blanco) en la cual la mezcla Fe-EDTA y el H₂O₂ será agregada después del ácido acético 20%. Para cada serie de análisis se prepara un control negativo por triplicado (K1 y K0), conteniendo los mismos reactivos que A1 o A0 excepto que la muestra antioxidante es reemplazada con buffer fosfato. Los estándares conteniendo 1 mM de ácido úrico (UA1 y UA0) serán usados para la calibración. Para el análisis se pipetea en los tubos los volúmenes (en microlitros) especificados en la Tabla 3.

Tabla 3. Volúmenes necesarios para el Método AOA (µL)

	A1	A0	K1	K0	UA1	UA0
Muestra	20	20	-	-	-	-
Ácido úrico	-	-	-	-	20	20
Buffer	980	980	1000	1000	980	980
Benzoato de sodio	1000	1000	1000	1000	1000	1000
Ácido acético	-	1000	-	1000	-	1000
Fe-EDTA	300	300	300	300	300	300
H ₂ O ₂	300	300	300	300	300	300
Incubar por 60 min a 37°C						
Ácido Acético	1000	-	1000	-	1000	-
TBA	1000	1000	1000	1000	1000	1000

Los tubos se incuban por 10 minutos a 100 °C en baño de agua, y se enfrían en baño de hielo. Se mide la absorbancia a 532 nm usando agua destilada como blanco. La actividad antioxidante será calculada usando la siguiente ecuación:

$$\text{AOA (mM)} = (\text{CUA}) * (\text{K}-\text{A}) / (\text{K}-\text{UA}), \text{ donde}$$

K= absorbancia del control (K1-K0), A= absorbancia de la muestra (A1-A0), UA= absorbancia de la solución de ácido úrico (UA1-UA0), y CUA es la concentración de ácido úrico (en mM).

Método del Catión Radical ABTS^{•+}: Ensayo de Decoloración en Solución Etanólica

El método desarrollado por Robertare y col. (1999). En este método el ABTS se diluye en agua a una concentración de 7 mM. El catión radical ABTS (ABTS^{•+}) se produce por la reacción de la solución stock de ABTS 7 mM con persulfato de

potasio a una concentración final de 2,45 mM (en agua), en oscuridad durante 12-16 h antes de su uso. Para el estudio de compuestos fenólicos, la solución de ABTS^{•+} se diluye con etanol hasta una absorbancia de 0,70 a 734 nm y 30°C, lo cual se logra mezclando aproximadamente 40 µL de la solución del catión radical ABTS y 960 µL de etanol al 20% (v/v). Se toman 10 µL de las soluciones stock de antioxidantes fenólicos preparadas en metanol y se colocarán en la cubeta del espectrofotómetro con 1,0 mL de la solución de ABTS^{•+} diluida. Entonces se medirán los valores de densidad óptica a 734 nm de inmediato y 6 min después de la mezcla. Se usa como estándar una solución de 8 mM de Trolox, la cual es diluida para obtener concentraciones finales de 1, 2, 4 y 8 µM, en buffer PBS 5 mM (pH 7,4). Se calcula el porcentaje de disminución de color (o de secuestro del catión radical ABTS) a 734 nm después de 6 min de reacción, y se realiza una gráfica del porcentaje de disminución de color en función de las diferentes concentraciones del estándar (Trolox), para luego reportar el valor de actividad antioxidante total (AAT) de las muestras problema en comparación con la ecuación de la recta obtenida con este gráfico. El valor de AAT para una muestra dada sería el equivalente en concentración de Trolox el cual produce el mismo porcentaje de disminución de color. Todas las determinaciones se llevarán a cabo por lo menos tres veces, para cada una de las muestras y soluciones estándar.

Determinación de la Concentración de Grupos Fenólicos

El contenido total de polifenoles se determina por espectrometría a 765 nm usando el reactivo de Folin-Ciocalteu (Singlenton y col., 1999). Se mezclan 100 µL de muestra con 500 µL del reactivo de Folin-Ciocalteu diluido en 1/10 con agua para luego adicionar 400 µL de carbonato de sodio 7,5% (p/v). Registrar la absorbancia después de 10 minutos de reacción a 37 °C, usando como blanco una muestra preparada con agua destilada. La concentración total de polifenoles es determinada usando una curva de calibración mediante una solución de 0,1 g/L de ácido gálico como estándar (diluciones de 0,025, 0,05 y 0,1 g/L).

Determinación de la Concentración de Proteínas

La determinación de proteínas consistirá en una técnica colorimétrica basada en el método de Lowry y col. (1961). Primero, se realizará una curva de calibración usando Albumina Bovina (BSA) como estándar [8 mg de BSA en 10 mL de H₂O MQ]. A la solución de BSA se le medirá la densidad óptica a 279 nm y se le determinará la concentración por medio de la fórmula:

$$[BSA] \text{ (mg/mL)} = D.O._{279 \text{ nm}} \times 13/9$$

Una vez determinada la concentración de la solución estándar, se realizarán las diluciones seriadas necesarias para la construcción de la curva de calibración, de acuerdo a la Tabla 4.

Tabla 4. Volúmenes de reactivos necesarios para la curva de calibración en la determinación de proteínas

Volumen de BSA (μL)	V de agua (μL)	Volumen de Solución C (μL)
0	500	1500
50	450	1500
100	300	1500
200	200	1500

La solución C se preparará mezclando 500 μL de la solución B (sulfato cúprico 4,0%) con 50 mL de la solución A (carbonato de sodio 2%, hidróxido de sodio 2%, tartrato de sodio y potasio 0,16% y SDS 1%). Los tubos de ensayos se colocarán en baño de maría por 10 minutos a 37 °C. Se diluirá un volumen del reactivo de Folin en un mismo volumen de H₂O MQ, y se le adicionarán a cada tubo 150 μl del reactivo de Folin diluido. Los tubos se regresarán al baño de maría por 10 minutos más. Después, se medirá la absorbancia a una longitud de onda de 750 nm. Una vez realizada la curva de calibración se procederá a la medición de las

proteínas presentes en las muestras, para lo cual se utilizarán 10 μ L de cada una de las muestras a estudiar siguiendo el procedimiento explicado anteriormente.

Determinación del Contenido de Flavonoides: Método colorimétrico del Cloruro de Aluminio.

El método colorimétrico del cloruro de aluminio se modificará del procedimiento reportado por Woisky y Salatino (1998). En este método, la quercetina es usada como estándar para construir una curva de calibración, para lo cual diez miligramos de quercetina se disuelven en etanol al 80% (v/v), para luego diluir hasta concentraciones de 25, 50 y 100 μ g/mL. Las soluciones estándar diluidas (0,5 mL) se mezclarán por separado con 1,5 mL de etanol al 95% (v/v), 0,1 mL de cloruro de aluminio al 10% (p/v), 0,1 mL de acetato de potasio 1M y 2,8 mL de agua destilada. Después de la incubación durante 30 min a temperatura ambiente, se mide la absorbancia de la mezcla de reacción a 415 nm. La cantidad de cloruro de aluminio es sustituida por agua destilada en el blanco. De modo similar, 0,5 mL de extractos metanólicos de las muestras en estudio se dejan reaccionar con el cloruro de aluminio para la determinación del contenido de flavonoides como se describió anteriormente.

Diseño de análisis

Todos los experimentos se llevaron a cabo por triplicado, y se les aplicaron los tests o pruebas paramétricas, para analizar si los datos se ajustan a una distribución normal, y si existen diferencias significativas entre los diferentes grupos de muestras. Los datos numéricos fueron analizados bajo un diseño cuantitativo mediante el uso de técnicas estadísticas. Se hizo un análisis de la varianza, empleando la prueba de ANOVA *post hoc* Scheffé.

Análisis de Varianza con un factor (ANOVA)

El análisis de varianza permite contrastar la hipótesis nula de que las medias de K poblaciones ($K > 2$) son iguales, frente a la hipótesis alternativa de que por lo menos una de las poblaciones difiere de las demás en cuanto a su valor esperado (Sote, 2005). El análisis de varianza (ANOVA) de un factor permite comparar varios grupos en una variable cuantitativa, y se aplica para contrastar la igualdad de medias de tres o más poblaciones independientes y con distribución normal. La hipótesis nula ($H_0: p \geq 0,05$ Las medias poblacionales son iguales) traducirá la idea de que en los diferentes grupos se obtienen resultados similares y la hipótesis alternativa ($H_1: p < 0,05$ Al menos dos medias poblacionales son distintas) lo negará. La significación del contraste nos dará una idea de si las diferencias observadas en los diferentes grupos son imputables al azar (significación grande) o hay una diferencia intrínseca entre algunos grupos (significación pequeña) (Sote, 2005).

www.bdigital.ula.ve
Pruebas Post-Hoc.

Una vez que se determinó que existen diferencias entre las medias, las pruebas de rango *post-hoc* y las comparaciones múltiples por parejas permitieron determinar qué medias difieren. Las pruebas de rango son aquellas que buscan identificar grupos homogéneos (medias parecidas). Las comparaciones múltiples buscan establecer diferencias entre grupos basándose en diferencia dos a dos, y generan una matriz donde los asteriscos indican las medias de grupo significativamente diferentes a un nivel alfa de 0,05. En este caso, se llevó cabo la prueba *post-hoc* conocida como Test de Scheffé. Por medio de esta prueba se hacen todas las comparaciones posibles, por ejemplo, el primer grupo con respecto a cada uno de los restantes, pero también el primero con respecto al grupo formado por la unión de dos de los restantes. Posteriormente, es necesario interpretar el nivel de significación, si esta es menor que 0,05, las diferencias entre los grupos

formados por la variable en estudio son significativas, allí mismo se observa entre qué grupos exactamente hay diferencias. Si el nivel de significación es mayor o igual a 0,05, no hay diferencias significativas (Blair y Taylor, 2008).

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Resultados

Descripción de la población y muestra

Para la investigación de este trabajo se prepararon extractos metanólicos de hojas secas de tipo comercial de *Camellia sinensis* en procesos de oxidación con humedad y temperatura controlada (té verde) y un proceso de oxidación más largo (té negro). Las muestras fueron adquiridas en el Mercado Principal de Mérida, ubicado en el sector Gonzalo Picón, municipio Libertador, Estado Mérida-Venezuela en la Av. Las Américas con Viaducto Miranda (N8°35'42.86" O71°8'36.24"). Las muestras fueron analizadas en el Laboratorio de Análisis Biotecnológico y Molecular (ANBIOMOL) "Prof. Guillermo López Corcuera" en la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, de la Universidad de los Andes, lugar en el cual se determinó la concentración total de polifenoles, flavonoides y proteínas, además de la determinación de la actividad antioxidante total a través de 3 métodos diferentes (Método Radical hidroxilo, ABTS^{•+} y del AOA).

Las distintas determinaciones que se realizaron fueron comparadas con una serie de métodos estadísticos en los cuales se pudo observar la relación entre la concentración de los componentes con la actividad antioxidante que se encontraba presente en la muestra analizada.

Caracterización química de los extractos metanólicos de *Camellia sinensis*

En la tabla 5 se encuentran los resultados obtenidos de la concentración total de flavonoides, proteínas y polifenoles de cada una de las muestras representadas por extractos metanólicos de hoja seca comercial de *Camellia sinensis* de tipo té negro y té verde. La concentración total de flavonoides obtenidos mediante el método colorimétrico del cloruro de aluminio, utilizando una solución de quercetina como estándar otorgó concentraciones entre un rango de 331,4 a 391,5 mg equivalentes de quercetina/100 g de extracto metanólico.

La muestra cuyo valor de concentración de flavonoides menor fue la muestra de extracto de té verde comercial número 3 con una concentración de flavonoides de 331,4 mg equivalentes de quercetina/100 g de extracto metanólico. Por otro lado la muestra de extracto metanólico con mayor concentración fue la muestra de té negro comercial número 3 con 391,5 mg equivalentes de quercetina/100 g de extracto metanólico. Los resultados permiten evidenciar que existen diferencias pero no muy significativas en lo que se refiere a la concentración de flavonoides en las muestras de analizadas.

El contenido total de polifenoles de los extractos metanólicos de té fueron determinados realizando una serie de reacciones químicas mediante el reactivo de Folin-Ciocalteu y sometidos a espectrometría, empleando una curva de calibración de ácido gálico como estándar obteniendo valores en mg equivalentes de ácido gálico/g de extracto metanólico representados en la Tabla 5. Los valores de concentración de polifenoles se encuentran en un rango entre 308,6 a 357,9 mg equivalentes de ácido gálico/100 gr de extracto metanólico, siendo el extracto de té verde número 1 la de mayor concentración de polifenoles; y el extracto de té negro número 1 la de menor concentración de polifenoles, evidenciándose una diferencia en el contenido total de polifenoles no significativa entre muestras.

Por ultimo en relación a la composición química de las muestras en estudio se determinó la concentración total de proteínas usando el método de Lowry (1951), utilizando una solución de albumina bovina como estándar para la realización de la curva de calibración. Los resultados de la concentración total de proteínas son representados en la tabla 5, estos resultados se encuentran en un rango entre 37,9 a 110,7 mg de proteínas/100 g de extracto metanólico, siendo el extracto de té negro número 2 la de menor concentración y el extracto de té verde número 3 la de mayor concentración, los resultados obtenidos demuestran una clara diferencia en la concentración total de proteínas entre los extractos metanólicos de té verde y té negro pudiéndose remarcar una mayor concentración proteica en los extractos metanólicos de té verde sobre los extractos de té negro.

Tabla 5. Concentración media de flavonoides, polifenoles y proteínas de las muestras analizadas

EXTRACTO METANÓLICO DE HOJA SECA DE TÉ COMERCIAL	Flavonoides (mg equivalentes de quercetina/100 g de extracto)	Polifenoles (mg equivalentes de ácido gálico/100 g de extracto)	Proteínas (mg de proteínas/100 g de extracto)
Té verde N°1	353,8±6,0a	357,9±3,6a	103,2±32,0d
Té verde N°2	350,7±19,6a	346,9±0,7a	94,5±33,4c
Té verde N°3	331,4±7,7a	333,0±10,9a	110,7±29,5d
Té negro N°1	346,7±4,3a	308,6±7,5a	47,0±20,0b
Té negro N°2	372,5±5,8a	342,9±10,0a	37,9±12,2a
Té negro N°3	391,5±3,3a	326,4±8,9a	45,8±5,6b

Los datos se presentan como media ± Error Estándar (n=3). Las columnas que comparten la misma letra no son significativamente diferentes de acuerdo a la prueba ANOVA post hoc Scheffé (p<0.05).

Actividad antioxidante de los extractos metanólicos de *Camellia sinensis*

Posterior a la caracterización química de las muestras analizadas, se procedió a determinar la actividad antioxidante de las mismas por medio de 3 métodos diferentes; AOA en valores de mM equivalentes de ácido úrico/100 g de extracto, radical hidroxilo en valores de porcentaje de inhibición/100 g de extracto y por ultimo ABTS representados en μ moles equivalentes de Trolox (TEAC/100 g de extracto). Los resultados son presentados en la Tabla 6.

Tabla 6. Actividad antioxidante de los extractos metanólicos de hoja seca comercial de *Camellia sinensis*

EXTRACTO METANÓLICO DE HOJA SECA DE TÉ COMERCIAL	AOA (mM equivalentes de ácido úrico/100 g de extracto)	Radical Hidroxilo (% de inhibición/100 g de extracto)	ABTS ^{••} μ moles equivalentes de Trolox(TEAC/100 g de extracto)
Té verde N°1	41,48 $\pm$ 0,27f	87,5 $\pm$ 1,09c	431,7 $\pm$ 125,5e
Té verde N°2	16,44 $\pm$ 0,94e	84,7 $\pm$ 0,52c	370,9 $\pm$ 79,8d
Té verde N°3	17,04 $\pm$ 1,07e	80,3 $\pm$ 0,32c	610,3 $\pm$ 26,3g
Té negro N°1	9,11 $\pm$ 1,35c	59,8 $\pm$ 21,08b	456,4 $\pm$ 9,9e
Té negro N°2	12,96 $\pm$ 1,30d	80,3 $\pm$ 0,31c	530,5 $\pm$ 17,1f
Té negro N°3	9,22 $\pm$ 2,18c	79,4 $\pm$ 0,18c	445,0 $\pm$ 10,6e
Antioxidantes de origen comercial (preparados a 1 mM)			
Quercetina	0,86 $\pm$ 0,03b	53,0 $\pm$ 1,1b	100,6 $\pm$ 1,7b
Melatonina	0,83 $\pm$ 0,02b	53,9 $\pm$ 1,07b	97,6 $\pm$ 5,1a
Ácido Lipoico	0,31 $\pm$ 0,07a	27,9 $\pm$ 0,98a	124,7 $\pm$ 3,1c

Los datos se presentan como media $\pm$ Error Estándar (n=3). Las columnas que comparten la misma letra no son significativamente diferentes de acuerdo a la prueba ANOVA post hoc Scheffé (P<0.05).

El método AOA tiene como finalidad analizar la actividad antioxidante de una muestra mediante el uso de un patrón de comparación de ácido úrico como estándar, el cual es un excelente antioxidante no enzimático, y el resultado se califica como actividad antioxidante AOA expresada en mM equivalentes de ácido úrico/100 g de extracto. La reacción es controlada espectrofotométricamente en base a la capacidad de inhibición en la formación de un color indicativo de la presencia de un proceso de anti oxidación.

Los valores de AOA para todas las muestras analizadas varían de $41,48 \pm 0,27$ a $9,11 \pm 1,35$ mM equivalentes de ácido úrico/100 g de extracto, siendo el extracto de té verde N°1 el que presenta el valor más alto de AOA de $41,48 \pm 0,27$ mM equivalentes de ácido úrico/100 g de extracto, mientras que los que presentaron menor actividad fueron los extractos de té negro N°1 de $9,11 \pm 1,35$ mM equivalentes de ácido úrico/100 g de extracto y té negro N°3 de $9,22 \pm 2,18$ mM equivalentes de ácido úrico/100 g de extracto. Al correlacionar los valores obtenidos de AOA con los flavonoides y proteínas no se halló ninguna correlación entre estos parámetros ($R^2 < 0,5$), aunque se pudo evidenciar una correlación entre los grupos fenólicos (polifenoles) y la actividad antioxidante ($R^2 > 0,5$). Por último, se puede observar que en todas las muestras analizadas presentan valores de AOA superiores a los antioxidantes de origen comercial (quercetina, melatonina y ácido lipoico) (Tabla 6).

Con respecto a la inhibición del radical hidroxilo, los valores de porcentaje de inhibición se hallaron en un rango entre 59,8 y 87,5 de inhibición/100 g de extracto, siendo el extracto metanólico de té verde N°1 el de mayor % de inhibición con $87,5 \pm 1,09$ de inhibición/100 g de extracto y el extracto metanólico de té negro N°1 el de menor % de inhibición con $59,8 \pm 21,08$. Al correlacionar el porcentaje de inhibición/100 g de extracto metanólico con los flavonoides, fenoles y proteínas se pudo contrastar la misma tendencia evidenciada por el método AOA. Se halló una correlación positiva entre el % de inhibición del radical hidroxilo y el contenido de polifenoles totales ($R^2 > 0,5$), en relación a los flavonoides y proteínas no presentó correlación entre estos parámetros de la composición química y la actividad

antioxidante ($R^2 < 0,5$). Al comparar los antioxidantes comerciales usados y los extractos metanólicos analizados se puede demostrar un porcentaje de inhibición del radical hidroxilo mayor por parte de todos los extractos metanólicos de hojas secas de té verde y té negro (Tabla 6).

Finalmente, el último método utilizado para evidenciar la actividad antioxidante total (AAT) fue por medio del método de la decoloración del catión radical ABTS●+ usando como patrón de comparación el Trolox, método que consiste en un proceso de captación o secuestro del catión radical ABTS●+ provocando una disminución en el desarrollo de color de reacción. Los valores AAT obtenidos en la determinación varían en un rango entre 370,9 y 610,3 μ moles equivalentes de Trolox/g de extracto metanólico, siendo el extracto de té verde N°3 el que presentó el mayor valor de AAT $610,3 \pm 26,3$ μ moles equivalentes de Trolox/g de extracto y la muestra de extracto de té verde N°2 la de menor valor de actividad antioxidante total con $370,9 \pm 79,8$ μ moles equivalentes de Trolox/g de extracto. En este caso al correlacionar la composición química estudiada de la muestra (flavonoides, polifenoles y proteínas) y el método ABTS no existe ninguna correlación entre ellas ($R^2 < 0,5$). En este caso, los valores de AAT de todas las muestras procesadas fueron muy superiores a los antioxidantes comerciales usados como patrón de comparación en esta investigación (quercetina, melatonina y ácido lipoico) (Tabla 6).

Tabla 7. Correlación entre la actividad antioxidante *in vitro* y los parámetros fisicoquímicos

Parámetro	Flavonoides	Polifenoles	Proteínas	AOA	RH	ABTS ^{•+}
Flavonoides	1	X	X	0,0656	0,017	0,1181
Polifenoles		1	X	0,5713	0,8444	0,0966
Proteínas			1	0,4131	0,2932	0,0098
AOA				1	X	X
RH					1	X
ABTS ^{•+}						1

Discusión

Caracterización química

El té es una bebida consumida a nivel mundial con amplia variedad de componentes asociados a capacidades benéficas para la salud. El té, en sus diferentes variaciones de consumo, té verde, azul, rojo, blanco y negro contienen una alta concentración de catequinas y polifenoles. Los efectos del té se asocian primordialmente con su acción antioxidante mediante las moléculas de su composición las cuales actúan como captadores de especies reactivas de oxígeno protegiendo de esta manera las estructuras de ácidos nucleicos, proteínas y lípidos (Valenzuela, 2004).

El consumo de té presenta múltiples beneficios debido a su capacidad antioxidante, produce un aumento del nivel de energía, mejor funcionamiento del metabolismo y control de peso corporal. El té se asocia como un potente antioxidante para actuar sobre los radicales libres, los cuales son partículas residuales del metabolismo que se encuentran en el torrente sanguíneo. El estrés, la mala alimentación, el uso de productos químicos, el tabaco, alcohol, agua potable

y algunos medicamentos son fuentes de radicales libres. Para reducir la producción de radicales libres se debe tener una alimentación rica en frutas y hortalizas, de lo contrario es aconsejable recurrir al suplemento alimenticio del té para eliminar problemas causados por los radicales libres (Márquez y Vázquez, 2016).

Los polifenoles del té producen *in vitro* efectos inhibitorios en el inicio, promoción y progresión de procesos cancerígenos al actuar sobre diferentes enzimas involucradas en el proceso maligno, como también ejercen importantes efectos inhibitorios de la aterogénesis, derivada de la oxidación de las LDL. El consumo de té ejerce efectos hipocolesterolémicos y vasodilatadores, actuando sobre enzimas y metabolitos involucrados en estos procesos. Por ello el consumo de té mejora la calidad de vida activando la movilización de grasa en el tejido adiposo estimulando la termogénesis. Aunque muchos efectos bioquímicos y fisiológicos del té se han observado en pruebas químicas *in vitro* existe una evidencia importante derivada a partir de estudios epidemiológicos en poblaciones numerosas y de diferente edad en relación a las numerosas propiedades benéficas *in vivo*. Por todo lo mencionado anteriormente esta investigación tuvo como objetivo determinar la composición química y actividad antioxidante de los extractos metanólicos de las hojas secas comercial de *Camellia sinensis* de tipo té verde y té negro, con el propósito de confirmar las propiedades benéficas mencionadas por diferentes literaturas y aportar a la sociedad mayor información sobre las múltiples propiedades positivas que se pueden obtener a partir del consumo de té (Valenzuela, 2004).

En relación a la composición química, el contenido total de flavonoides de los extractos metanólicos de hojas secas comercial de *Camellia sinensis* de tipo té verde N°1, N°2 y N°3 fue de 353,8, 350,7 y 331,4 mg equivalentes de quercetina/g de extracto, respectivamente, en cuanto a los extractos de tipo té negro N°1, N°2 y N°3 fue de 346,7, 372,5 y 391,5 mg equivalentes de quercetina/g de extracto, respectivamente; a su vez, el contenido de polifenoles resultante para el té verde N°1 fue de 357,9, té verde N°2 346,9, té verde N°3 333,0, té negro N°1 308,6, té negro N°2 342,9 y té negro N°3 326,4 mg equivalentes de ácido gálico/g de extracto;

simultáneamente el resultado obtenido para el contenido total de proteínas para té verde N°1 fue de 103,2, té verde N°2 94,5, té verde N°3 110,7, té negro N°1 47,0, té negro N°2 37,9 y por ultimo té negro N°3 45,8 μ moles equivalentes de Trolox (Tabla 5).

Al equiparar los resultados obtenidos en esta investigación con los reportados por Shahbazi, et al., (2019), en un trabajo titulado: "*Microscopic characterization, TLC fingerprinting and determination of total phenol and flavonoid of different population of Camellia sinensis (L.) Kuntze (green tea) compared to a standard sample*" determinaron el contenido total de polifenoles y flavonoides en extractos metanólicos de té verde en bolsa y a granel, así como la caracterización microscópica de 14 muestras de té verde. El método utilizado para la determinación de polifenoles totales fue Folin-Ciocalteu para extractos metanólicos de té verde obteniendo el contenido de fenoles totales, el contenido fenólico de las 14 plantas varió de $144,74 \pm 4,32$ a $288,4 \pm 12,03$ mg GAE/g de extracto, así pues la bolsita de té chino fue la más alta con $288,4 \pm 12,03$ mg GAE/g de extracto y el contenido de fenol más bajo lo relacionaron con la muestra a granel china de $144,76 \pm 4,32$ mg GAE/g de extracto. Por otro lado, el contenido de flavonoides (método colorimétrico de cloruro de aluminio) de las catorce plantas varió de $4,5 \pm 0,02$ a $19,77 \pm 0,68$ mg QE/g de extracto, de las cuales la más alta y la más baja fue hallada en las muestras a granel de Pakistán ($19,77 \pm 0,68$ mg QE/ g de extracto) y Lahijan ($4,5 \pm 0,02$ mg QE/g de extracto), respectivamente. Los valores conseguidos en la investigación fueron inferiores a los reportados en el presente estudio.

Del mismo modo, en un estudio realizado por Hashish, Zein y El-Bhnsawy (2018), los cuales realizaron un estudio titulado: "*Evaluation of total phenolic compounds, flavonoids and antioxidant activity of black and green tea drink among some available brands in the Egyptian market*" basado en evaluar y comparar los compuestos fenólicos totales determinados mediante el método Folin-Ciocalteu, el contenido de flavonoides utilizando la quercetina como patrón estándar y la actividad antioxidante por medio del método DPPH en el té negro y verde de algunas marcas disponibles en los mercados egipcios. Según el método de extracción, el

contenido fenólico total del té hervido osciló entre 236,88 (para el té negro) y 1076,30 (para el té verde) mg equivalentes de ácido gálico (mg GAE)/100 g. Sin embargo, el método de infusión (Koshary) resultó en cantidades de contenido fenólico total que oscilaron entre 515,63 (para té verde) y 997,9 (para té negro) mg GAE/100 g. El contenido de flavonoides total del té hervido lo hallaron en un rango entre 5,74 (té verde) y 53,29 (té verde) mg QE/100 g y para el método de infusión resultó en un rango entre 16,62 (té verde) y 74,53 (té negro) mg QE/100 g. Los valores conseguidos en la investigación fueron inferiores a los reportados en el presente estudio en relación a los flavonoides ya que el contenido fenólico total obtenido por estos investigadores fue superior a los reportados en el presente estudio.

En cuanto a la concentración de proteínas, un estudio realizado por Nakazawa, et al., (2020), titulado: *"Development of experimental teaching material for high school students: analysis of the protein content in Japanese green tea, black tea, and toasted tea"* basado en determinar la concentración de proteínas en muestras de té verde japonés, té negro y té tostado utilizando albumina de suero bovino como estándar para la realización de una curva de calibración. La concentración de proteína en las soluciones preparadas a partir de 2 g de hojas de té, incubadas en 100 mL de agua durante 5 min a 40 °C, 60 °C, 80 °C y 90 °C, fue de $0,191 \pm 0,023$, $0,264 \pm 0,022$, $0,299 \pm 0,073$ y $0,387 \pm 0,003$ mg/mL, respectivamente. Posterior a ello evaluaron el contenido proteico de las mismas muestras pero procesadas mediante un molino-mezclador durante 1,5 minutos arrojando resultados de $0,337 \pm 0,017$ mg/mL, en comparación con $0,362 \pm 0,021$ mg/mL para la muestra sin procesar (Media $\pm$ SD). Los datos no mostraron diferencias significativas entre los dos métodos. Por lo tanto, se prefirió la alternativa más simple y fácil de usar hojas de té sin procesar a usar hojas de té procesadas en un molino-mezclador. Los valores resultantes de la investigación en Japón fueron mayores en comparación a los resultados del presente estudio.

La presencia de los componentes que hacen del té un producto de calidad dependen de factores culturales y ambientales, ya que es afectado por el clima de

la región, la estación de la cosecha, la altitud de la plantación, la genética de las plantas, la madurez de las hojas, los fertilizantes usados, entre otros factores. Todo factor cultural y ambiental puede afectar la composición de la *Camellia sinensis* como la temperatura, las precipitaciones, la radiación solar. Las condiciones óptimas para un té rico en flavonoides, proteínas y fenoles se hallan en zonas con clima tropical o subtropical, abundantes precipitaciones, suelos húmedos y ligeramente ácidos. Se han reportado diferencias en la composición química de la misma planta de té ubicada en diferentes zonas geográficas, además de ello la composición fisicoquímica del té es afectada en relación a las podas de la planta, el nivel de recolección, la frecuencia de la recolección y el uso de fertilizantes. Cualquier sea la causa que afecte la velocidad de crecimiento de la planta conducirá a variaciones en su composición química y por lo tanto variabilidad en las determinaciones de sus componentes químicos. El análisis químico de la planta del té es de suma importancia, ya que el objetivo es confirmar las evidencias aportadas por la literatura (Thea, 2013).

Actividad antioxidante y su correlación con parámetros químicos

La capacidad antioxidante es llevada a cabo por moléculas antioxidantes las cuales son compuestos químicos que tienen la capacidad de reaccionar con los radicales libres neutralizándolos, lo que les imposibilita causar daño a las moléculas del organismo. El organismo humano tiene la capacidad de producir algunos antioxidantes usados para neutralizar los radicales libres, estos antioxidantes son llamados antioxidantes endógenos. Sin embargo, el cuerpo depende de fuentes exógenas de la dieta principalmente para obtener el resto de antioxidantes necesarios para enfrentar a los radicales libres. Existen diferentes métodos para la determinación de la actividad antioxidante en los alimentos basados en verificar como un elemento oxidante induce daño oxidativo a un sustrato oxidable, el daño que es inhibido o reducido en presencia de un antioxidante. Esta inhibición es proporcional a la actividad antioxidante de la muestra, por otro lado existen ensayos

que se basan en la cuantificación de los productos formados luego del proceso oxidativo. Los métodos se diferencian en el agente oxidante, el sustrato utilizado, la medida del punto final, la técnica instrumental usada y en las probables interacciones de la muestra con el medio de reacción. De igual manera, los objetivos de los diferentes métodos de medida son diversos. Así mismo, la actividad antioxidante de un alimento *in vitro* es diferente de su efecto *in vivo* ya que los procesos de transformación metabólicos que sufren los compuestos antioxidantes en el organismo modifican su actividad. Debido a ello, para obtener resultados confiables de la actividad antioxidante de un alimento lo ideal es realizar diversas metodologías destinadas a la determinación de la actividad antioxidante (Fernández, Villano, Troncoso y García, 2006).

La determinación de la actividad antioxidante de los extractos metanólicos de hojas secas comercial de té tipo verde y negro fue estimada a través de tres métodos diferentes: Método del catión radical ABTS^{•+} (ensayo de decoloración en solución etanólica), método de la actividad antioxidante (AOA), estudio de la capacidad antioxidante sobre el radical hidroxilo. Mediante el método AOA se obtuvo resultados de 41,48; 16,44; 17,04; 9,11; 12,96 y 9,22 mM equivalentes de ácido úrico/g de extractos de té verde N°1, N°2, N°3 y té negro N°1, N°2 y N°3, respectivamente. Por otro lado, el % de inhibición del radical hidroxilo arrojó valores para los extractos metanólicos de té verde N°1 de 87,5; té verde N°2 84,7; té verde N°3 80,3, té negro N°1 59,8, té negro N°2 80,3 y té negro N°3 79,4% de inhibición/g de extracto. Análogamente, la determinación de AAT mediante el método ABTS^{•+} resultó en valores de 431,7; 370,9; 610,3 µg equivalentes de Trolox/mL de extracto de té verde N°1, N°2 y N°3, respectivamente, por otro lado los valores obtenidos para los extractos de té negro N°1, N°2 y N°3 fueron de 456,4; 530,5 y 445,0 µg equivalentes de Trolox/mL de extracto, correspondientemente (Tabla 6).

Es de interés alegar que el presente estudio evidenció correlación positiva solamente entre el contenido de polifenoles con la actividad antioxidante determinada a través del método AOA y el % de inhibición del radical hidroxilo,

mientras que el método ABTS+• no presentó ninguna correlación positiva entre los parámetros de composición química evaluados (Tabla 7).

En el estudio realizado por Cai-Ning et al., (2019), titulado "*Phenolic Profiles and Antioxidant Activities of 30 Tea Infusions from Green, Black, Oolong, White, Yellow and Dark Teas*" reportaron valores de actividad antioxidante en extractos acuosos de diferentes marcas de té mediante ensayos de capacidad antioxidante equivalente de Trolox (TEAC) que van desde $166,29 \pm 24,48$ a $2532,41 \pm 50,18$ μmol Trolox/g PS, respectivamente. Además, sus contenidos de fenoles totales (TPC) fueron cuantificados por el ensayo de Folin-Ciocalteu y estuvieron en el rango de $24,77 \pm 2,02$ a $252,65 \pm 4,74$ mg de ácido gálico equivalente (GAE)/g DW. Los valores reportados en los extractos acuosos de diferentes marcas de té son superiores a los reportados en la presente investigación, ya que obtuvieron un valor máximo de actividad antioxidante mediante el método ABTS•+ de $2353,21 \pm 50,68$ para té verde y para té negro $1034,29 \pm 17,99$ té negro. Es importante resaltar que las capacidades antioxidantes y el contenido fenólico total de los té diferían mucho. El tipo de cultivo, el lugar de producción, las condiciones de plantación, el tiempo de cosecha, el grado de oxidación de la hoja, el método de extracción de sus componentes y el proceso de fabricación podrían afectar las determinaciones de las capacidades antioxidantes y el contenido fenólico total.

Además, Kopjar, Tadic y Pilizota (2015), realizaron un estudio titulado "*Phenol content and antioxidant activity of green, yellow and black tea leaves*", determinaron la capacidad antioxidante de hojas de té verde, amarillo y negro obtenidos comercialmente del mercado local en Croacia, los té adquiridos fueron procesados en un método de extracción con metanol acidificado determinándoseles la actividad antioxidante mediante el método ABTS expresando los resultados en μmol equivalentes de Trolox/100g de extracto. La actividad antioxidante determinada por ABTS•+ para el extracto metanólico de té verde fue de 0,649, para té negro 0,570 y té amarillo 0,871 μmol equivalentes de Trolox/100g de extracto. Los valores reportados en la investigación son levemente superiores a los

expresados en la presente investigación tanto para los extractos de té negro como de té verde (Tabla 6). Es importante resaltar que el pH tuvo una gran influencia en la determinación de los compuestos fenólicos totales, el contenido total de flavonoides y taninos, así como en la actividad antioxidante.

Por otro lado, Rusaczek, Swiderski y Waszkiewicz-Robak (2010), realizaron un trabajo titulado: "*ANTIOXIDANT PROPERTIES OF TEA AND HERBAL INFUSIONS – A SHORT REPORT*" en el cual determinaron la actividad antioxidante y el contenido total de polifenoles en infusiones de bolsitas de té verde, negro, pu-erh y blanco en el comercio minorista local de Polonia. Reportaron resultados que variaron en promedio de 1328 a 1772 μmol de Trolox/g para té, valores superiores a los reportados en la presente investigación (Tabla 6). El mayor contenido de polifenoles en el té verde fue de 120-185 mg de ácido gálico/g, té blanco 99-174 mg de ácido gálico/g, té negro 112-151 mg de ácido gálico/g, mientras que el más bajo fue en el té Pu-erh de 42-69 mg de ácido gálico/g. En la investigación, se demostró que el contenido total de polifenoles en los tés se correlacionó positivamente con sus propiedades antioxidantes.

Las diferencias en la actividad antioxidante presentadas en estudios previos pueden deberse a la implementación de diferentes métodos analíticos y la preparación de la muestra (concentración de infusión, temperatura, tiempo de preparación, solvente utilizado, pH). Las propiedades antioxidantes de las plantas y el contenido de polifenoles dependen de muchos factores, es decir condiciones de suelo y clima en las que se cultivó la planta, temporadas de cosecha, métodos de procesamiento y almacenamiento, partes de la planta de la que se hizo la determinación. Por lo tanto, las propiedades antioxidantes de la planta pueden ser diferentes. Eso indica la necesidad de controlar y monitorear estos parámetros para una materia prima particular. Se observó una gran variación en la actividad antioxidante de té de diferentes productores, lo que enfatiza la necesidad de establecer parámetros tecnológicos adecuados en la producción de té (Rusaczek, Swiderski y Waszkiewicz-Robak, 2010). Adicionalmente, en la

presente investigación se determinó que los compuestos fenólicos son en parte responsables de la actividad antioxidante de los extractos estudiados, ya que se observó correlación positiva entre el contenido total de polifenoles y los valores antioxidantes obtenidos por el método de AOA y radical hidroxilo, debido a ello explica el uso de té como fuente antioxidante para mejorar la salud.

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

- La concentración de polifenoles reportada como mg equivalentes de ácido gálico/gramos de extracto fue de 357,9 para extracto de té verde N°1, 346,9 para extracto de té verde N°2, 333,0 para extracto de té verde N°3, 308,6 para extracto de té negro N°1, 342,9 para extracto de té negro N°2 y 326,4 para extracto té negro N°3. El mayor contenido de polifenoles para los extractos metanólicos se obtuvo para el extracto de té verde N°1.
- La concentración de flavonoides obtenida en los extractos de té verde N°1, N°2, N°3 y té negro N°1, N°2 y N°3 fue de 353,8; 350,7; 331,4; 346,7; 372,5 y 391,5 mg equivalentes de quercetina/gramo de extracto, respectivamente. El mayor contenido de flavonoides para los extractos metanólicos se obtuvo para el té negro N°3.
- En lo que se refiere a los valores de concentración de proteínas variaron desde 37,9 hasta 110,7 mg de proteínas/100 g de extracto, siendo el extracto de té verde N°3 el que presento el mayor contenido proteico y el extracto de té negro N°2 la de menor valor de concentración de proteínas, además de ello las muestras de té negro tienen menor composición proteica en comparación con las de té verde.
- Los valores de AOA, medidos como mM equivalentes de ácido úrico/g de extracto, fueron de 41,48 para extracto de té verde N°1, 16,44 para extracto de té verde N°2, 17,04 para extracto de té verde N°3 y 9,11 para el extracto té negro N°1, 12,96 para el extracto té negro N°2, 9,22 para el extracto té negro N°3.

- Los valores de % de inhibición de radical hidroxilo/g de extracto fueron de 87,5, 84,7, 80,3, 59,8, 80,3 y 79,4 para los extractos té verde N°1, N°2, N°3 y los extractos té negro N°1, N°2, N°3, respectivamente.
- Por último, los valores de obtenidos mediante el método de la decoloración del catión radical ABTS●+ usando como patrón de comparación el Trolox (TEAC/100 g de extracto) fueron de 431,7, 370,9, 610,3, 456,4, 530,5 y 445,0 para los extractos de té verde N°1, N°2, N°3 y los extractos de té negro N°1, N°2, N°3, respectivamente.
- Se evidenció correlación entre los polifenoles pertenecientes a la composición química de los extractos metanólicos de hojas secas comercial de tipo té verde y té negro con la actividad antioxidante determinada a través del método de la Actividad Antioxidante (AOA) y el % de inhibición del radical hidroxilo, mientras que el método del catión radical ABTS+• no generó resultados de correlación entre ninguno de los parámetros de composición química evaluados.
- El té verde y el té negro se elaboran con las mismas hojas de la planta *Camellia sinensis* pero se procesan de manera diferente, el té negro se oxida casi completamente dejando marchitar sus hojas para reducir el contenido de humedad a diferencia del té verde el cual no tiene un proceso de oxidación. Debido a lo expuesto anteriormente, el té negro y verde varían en sabor, composición y método de elaboración y por medio del trabajo presente podemos evidenciar que ambos presentan un rico contenido de flavonoides y fenoles, aunque el té verde tiene un mayor contenido proteico en comparación con el té negro.
- Los resultados presentados en este trabajo permiten concluir que el té negro y verde a granel pueden ser considerados como un alimento rico en compuestos bioactivos con alta capacidad funcional y benéfica para la salud.

- Este es uno de los primeros estudios donde se realiza un análisis formal de la actividad antioxidante y el contenido de polifenoles, flavonoides y proteínas de extractos metanólicos de hojas secas comercial de tipo té negro y té verde adquirido en Mérida (Venezuela), contribuyendo significativamente con información comprobada de la especie, así como de sus posibles aplicaciones.

Recomendaciones

- Para una mejor evaluación de la composición química y actividad antioxidante, se sugiere incrementar el número de muestras a analizar por tipo de té.
- Realizar la comparación de la actividad antioxidante y análisis químico de muestras de *Camellia sinensis* adquiridas en distintas localizaciones geográficas, y con extractos de diferentes solventes.
- Se sugiere la realización de estudios basados en la determinación de los tipos de compuestos fenólicos y de flavonoides presentes en las muestras de extractos metanólicos de hojas secas comercial de tipo té negro y té verde, pudiendo de esta manera evaluar si las diferencias de concentración se deben a los distintos polifenoles y flavonoides que contienen estas muestras.
- Realizar estudios sobre la actividad terapéutica presente en los extractos metanólicos de hojas secas comercial de tipo té negro y té verde, específicamente sobre la actividad antibacteriana y antifúngica.
- Evaluar el contenido total de flavonoides, fenoles, proteínas y actividad antioxidante de los extractos metanólicos de las de hojas secas comercial de tipo té negro y té verde a diferentes temperaturas y pH.

BIBLIOHEMEROGRAFÍA

- Arias, F. (1999). ***El Proyecto de Investigación: Guía para su Elaboración.*** 1^a ed. Caracas: Episteme; 1999.
- Arias, F. (2006). ***Proyecto de investigación: introducción a la metodología científica.*** 5a ed. Caracas: Espíteme; 2006.
- Arroyo J., Bonilla R., Tomás G. y Huamán, M. (2011). Estudio fitoquímico del extracto etanólico y de las fracciones de las hojas de *Piper Aduncum*. ***Rev per.***, 14 (2), 62-67.
- Baldermann S. (2008). ***Carotenoid Oxygenases from Camellia Sinensis, Osmanthus Fragrans and Prunus Persica Nucipersica: Kinetics and Structure.*** Gottingen: Editorial Cuvillier Verlag.
- Chacko S., Thambi P., Kuttan R. y Nishigaki, I. (2010). *Beneficial effects of green tea.* ***Chin Med.*** 5 (2), 15-19.
- Das M., Sur P., Gomes A., Vedasiromoni J. y Ganguly D. (2002). Inhibition of tumour growth and inflammation by consumption of tea. ***Phytother. Res.***, 16 (1), 40-44.
- De Luis D. y Aller R. (2008). Papel de los flavonoides del té en la protección cardiovascular. ***Rev An Med Int.***, 25 (3), 105-107.
- Dornelles L. y Porto G. (2014). Correlación entre la actividad antioxidante y el contenido fenólico total con parámetros físico-químicos de los extractos mezclados de *Camellia sinensis*. ***Rev Acta Sci***, 36 (1), 97- 103.
- Feng Q., Kumagai T., Torii Y., Nakamura Y., Osawa T. y Uchida K. (2001). Anticarcinogenic antioxidants as inhibitors against intracellular oxidative stress. ***Free Radic. Res.***, 35 (6), 779-788.
- Fernández M., Soledad M., Villaño D., Troncoso A. y García M. (2006). Revisión de los métodos de evaluación de la actividad antioxidante *in vitro* del vino y valoración de sus efectos in vivo. ***Arch Latinoam Nutr***, 56 (2), 110-122
Recuperado de <https://acortar.link/54ys1G>

- Fujimoto N., Sueoka N., Sueoka E., Okabe S., Suganuma M., Harada M. y Fujiki H. (2002). Lung cancer prevention with epigallocatechin gallate using monitoring by heterogeneous nuclear ribonucleoprotein B1. **Int. J. Oncol.**, 20 (6), 1233-1239.
- González, E. (2003). El efecto quimioprotector del té y sus compuestos. **ALAN**, 53 (2), 111-118.
- Guarnizo F. y Martínez Y. (2009). Experimentos de Química Orgánica con enfoque en ciencias de la vida. **ELIZCOM S.A.S.**, 28 (6) Recuperado de <https://bit.ly/2vdw3LL>.
- Halliwell, B. y Gutteridge J. (1989). **Free Radicals in Biology and Medicine 1th Edition**. Reino Unido: Editorial Clarendon Press.
- Halliwell, B. y Gutteridge, C. (2007). **Free Radicals in Biology and Medicine 4th Edition**. Reino Unido: Editorial Clarendon Press.
- Harris, D. (2003). **Análisis Químico Cuantitativo**. Buenos Aires: Editorial Reverté S.A.
- Hashish A., Zein H. y El-Bhnsawy R. (2018). Evaluation of total phenolic compounds, flavonoids and antioxidant activity of black and green tea drink among some available brands in the Egyptian market. **Curr. Sci. Int.**, 7 (4), 721-730.
- Hurtado J. (2010). **El proyecto de investigación, comprensión holística de la metodología y la Investigación**. Bogotá-caracas: Ediciones Quirón.
- Hurtado, J. (2012). **El proyecto de investigación. Comprensión holística de la Comprensión holística de la metodología y la investigación**. Caracas: Fundación Sydal.
- Indarti K., Apriani E., Wibowo A. y Simanjutak P. (2019). Antioxidant Activity of Ethanolic Extract and Various Fractions from Green Tea (*Camellia sinensis* L.) Leaves. **Pharmacogn. J.**, 11 (4), 771-776.
- Kopjar M., Tadic M. y Pilizota V. Phenol content and antioxidant activity of green, yellow and black tea leaves. **Chem. Biol. Technol. Agric.** 2015, 2, 1. <https://doi.org/10.1186/s40538-014-0028-7>.

- Koracevic, D., Koracevic, G., Djordjevic, V., Andrejevic, S. y Cosic, V. (2001). Method for measurement of antioxidant activity in human fluids. **J. of Clin Pat.**, 54(3), 61-63.
- Luceri C., Caderni G., Sanna A. y Dolara P. (2002). Red wine and black tea polyphenols modulate the expression of cyclooxygenase-2, inducible nitric oxide synthase and glutathione-related enzymes in azoxymethane-induced F344 rat colon tumors. **The J. Nutr.**, 132 (6), 1376-1379.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. (1961). Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, 193 (4), 265–275.
- Márquez, M., Vázquez G. (2016). Stop radicales libres: 150 recetas antioxidantes. **EDAF**, 38 (9). Recuperado de <https://bit.ly/2NOYpKL>.
- Martinez O. y Martinez E. (2006). Proteínas y péptidos en nutrición enteral. **Rev Nutr Hosp**, 32 (2), 10-11.
- Metz N., Lobstein A., Schneider Y., Gossé F., Schleiffer R., Anton R. y Raul F. (2000) Suppression of azoxymethane-induced preneoplastic lesions and inhibition of cyclooxygenase-2 activity in the colonic mucosa of rats drinking a crude green tea extract. **Nutr. Cancer**, 38 (1), 60-64.
- Nakazawa Y., Ishii F., Furuya H., Tatsuzawa M., Matsubara Y., Ihara H., Kiuchi S., Goromaru-Shinkai M., Kuroda J. y Nishiguchi Y. (2020). Development of experimental teaching material for high school students: analysis of the protein content in Japanese green tea, black tea, and toasted tea. **Int. J. Anal. Bio-Sci.**, 8 (2), 29-33.
- Ning-Zhao C., Guo-Yi T., Shi-Yu C., Xiao-Yu X., Ren-You G., Qing L., Qian-Qian M., Ao S. y Hua-Bin L. Phenolic Profiles and Antioxidant Activities of 30 Tea Infusions from Green, Black, Oolong, White, Yellow and Dark Teas. **Antioxidants** 2019, 8, 215. <https://doi.org/10.3390/antiox8070215>.
- Olson B., Markwell J. (2007). Assays for determination of protein concentration. **Curr Protoc Protein Sci.** 4 (2), 12-24.

- Pacheco-Coello F., Peraza-Marrero M., Orosco-Vargas C., Ramirez-Azuaje D. y Pinto-Catari I. (2020). *DETERMINATION OF TOTAL PHENOLIC COMPOUNDS AND EVALUATION OF THE ANTIOXIDANT ACTIVITY OF COMMERCIAL AND ARTISANAL GREEN TEA TRADED IN MARACAY, VENEZUELA. Rev. Bol. Quim. Bolivian J. Chem.*, 37 (1), 28-33.
- Pereda M. (2011). *Elaboración de sidra natural ecológica. Ediciones Mundi-Prensa*, 48 (9). Recuperado de <https://bit.ly/2M0auw7>.
- Quiñones M., Miguel M. y Aleixandre A. (2012). Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutr. Hosp*, 27 (1), 9-18.
- Quairul N. y Fadzelly, M. (2013). *Phytochemicals and antioxidant properties of different parts of Camellia sinensis leaves from Sabah Tea Plantation in Sabah, Malaysia. Int Food Res J.*, 20 (1), 307-312.
- Ramírez A., Ortiz A. y Ospina, L. (2016). Determinación de compuestos fenólicos (catequinas, cafeína, ácidos orgánicos) en té verde (*Camellia sinensis*) usando cromatografía líquida de alta resolución. *Rev Vitae*, 23 (8), 245-249.
- Robertare R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M. y Rice- evans C. (1999). Antioxidant Activity Applying an Improved abts Radical Cation de Colorization Assay. *Food Nutr. Sci.*, 26 (9), 1231–1237.
- Rusaczonek A., Swiderski F. y Waszkiewicz-Robak B. (2010). ANTIOXIDANT PROPERTIES OF TEA AND HERBAL INFUSIONS – A SHORT REPORT. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 60 (1), 33-35.
- Sampieri H., Fernandez Collado R. y Baptista C. (2010). *Metodología de la investigación*. 5ª ed. México: McGraw-Hill Interamericana.
- Sepúlveda, G., Porta, H., y Rocha, M. (2003). La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Mex. J. Phy.* 21:355-363.
- Shahbazi Z., Zarshenas M., Moein M., Khademian S. y Etemadfard H. (2019). Microscopic characterization, TLC fingerprinting and determination of total

- phenol and flavonoid of different population of *Camellia sinensis* (L.) Kuntze (green tea) compared to a standard sample. **Trends Sci.**, 5 (2), 111-118.
- Singh A. (junio, 2011). Herbalism, Phytochemistry and Ethnopharmacology. *CRC Press*, 42 (5). Recuperado de <https://bit.ly/2Lwax6O>.
- Singleton L., Orthofer R. y Lamuela-Raventos R. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Els Ser Therm Fluid.** 299(5), 152–178.
- Smith D. y Dou Q. (2001). Green tea polyphenol epigallocatechin inhibits DNA replication and consequently induces leukemia cell apoptosis. **Int. J. Mol. Med.**, 7 (1), 645-652.
- Sote A. (2005). **Principios de Estadística**. Caracas: Editorial Panapo de Venezuela.
- Takada M., Ku Y., Habara K., Ajiki T., Suzuki Y. y Kuroda Y. (2002). Inhibitory effect of epigallocatechin-3-gallate on growth and invasion in human biliary tract carcinoma cells. **World J. Surg.**, 26 (6), 683-686.
- Thea A. (2013). Diferencias en los parámetros fisicoquímicos de calidad entre los distintos tipos de té (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) elaborados en Argentina [Tesis de maestría, Universidad Nacional de Misiones]. Repositorio institucional de la Universidad Nacional de Misiones https://rid.unam.edu.ar/bitstream/handle/20.500.12219/2785/7.%20Thea%20AE_2013_Diferencias_par%C3%A1metros.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Valenzuela A. (2004). *EL CONSUMO DE TÉ Y LA SALUD: CARACTERÍSTICAS Y PROPIEDADES BENEFICAS DE ESTA BEBIDA MILENARIA*. **Rev. chil. nutr.** 31 (2), 72-82.
- Vinci G., D'Ascenzo F., Maddaloni L., Prencipe S. y Tiradritti M. The Influence of Green and Black Tea Infusion Parameters on Total Polyphenol Content and Antioxidant Activity by ABTS and DPPH Assays. **Beverages**. 2022, 8, 18. <https://doi.org/10.3390/beverages8020018>.

- Waterborg J. y Matthews H. (1984). The lowry method for protein quantitation. **Methods Mol Biol.** 1, 1-3.
- Woisky R. y Salatino A. (1998). Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. **J. Apic. Res.** 37: 99-105
- Yang C., Maliakal P. y Meng X. (2002). Inhibition of carcinogenesis by tea. **Rev. Pharmacol. Toxicol.**, 42 (3), 25-54.
- Youngson R. (2003). *Antioxidantes y radicales libres*. España: Editorial EDAF.
- Zhang G., Miura Y. y Yagasaki K. (2000). Induction of apoptosis and cell cycle arrest in cancer cells by in vivo metabolites of teas. **Nutr. Cancer**, 38 (2), 265-273.
- Zhishen J., Mengcheng T. y Jianming W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. **Food Chem.** 64, 555-559.

www.bdigital.ula.ve