

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades



Cuantificación y análisis de la capacidad antioxidante, los polifenoles y los flavonoides totales de la extracción acuosa en diferentes tiempos de sumersión de té negro Chirrepeco, originario del municipio Cobán, Alta Verapaz

Trabajo de graduación en modalidad de tesis presentado por
Joan Marisol Valdez Estrada
para optar al grado académico de Licenciada Química

Guatemala,

2021

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades



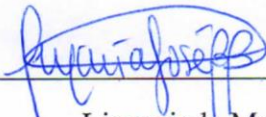
Cuantificación y análisis de la capacidad antioxidante, los polifenoles y los flavonoides totales de la extracción acuosa en diferentes tiempos de sumersión de té negro Chirrepeco, originario del municipio Cobán, Alta Verapaz

Trabajo de graduación en modalidad de tesis presentado por
Joan Marisol Valdez Estrada
para optar al grado académico de Licenciada Química

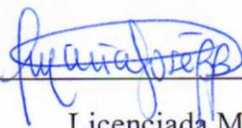
Guatemala,

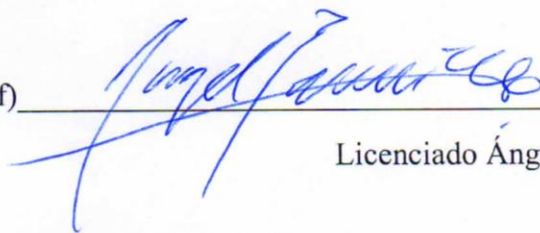
2021

Vo. Bo:

(f) 
Licenciada María José Bran

Tribunal Examinador:

(f) 
Licenciada María José Bran

(f) 
Licenciado Ángel Ramírez

(f) 
Licenciada Irma Orellana

Fecha de aprobación del examen de graduación:

(Guatemala, 22 de 11 de 2021)

AGRADECIMIENTOS

A Dios por haberme guiado en toda mi carrera y por darme fortaleza y sabiduría para afrontar cada obstáculo y lograr mis metas.

A la Universidad del Valle de Guatemala por darme la oportunidad de crecer académicamente y formarme como una futura profesional.

A la Facultad de Ciencias y Humanidades, especialmente a la Escuela de Química por brindarme todos los conocimientos necesarios para desarrollarme en el ámbito laboral.

A mi director Ángel Ramírez por haberme enseñado tanto estos años, por su apoyo en mi proceso de aprendizaje y evolución como estudiante.

A mi asesora, Licenciada María José Bran por haberme orientado sabiamente en la elaboración del trabajo de investigación.

A la MSc. Ana Silvia Colmenares de Ruiz por haberme permitido trabajar en el laboratorio de ingeniería de alimentos.

A Edwinth Rodríguez por su ayuda y guía en los ensayos realizados en esta investigación.

A la Lic. Ana Luisa Mendizábal por permitirme trabajar en el laboratorio de química instrumental avanzada y brindarme su apoyo.

A mis hermanos Jonatan, Analy y Yasmin por siempre estar conmigo y apoyarme.

A mis padres por ser quienes me cuidan, me apoyan, me enseñan a cumplir lo que me propongo, no esperan nada a cambio y por todo el esfuerzo que han hecho por mí.

A mi familia en general gracias por su cariño.

A mis amigos por los muchos años de amistad, buenos y malos momentos pasados juntos, por todos los consejos, enseñanzas y por haberme acompañado en mi camino como profesional y persona.

A todas aquellas personas que me acompañan a compartir este momento tan importante en mi vida y de alguna forma me han ayudado a llegar a este nuevo logro en mi vida.

Muchas gracias.

CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	i
LISTA DE CUADROS.....	iv
LISTA DE FIGURAS.....	v
RESUMEN	vii
ABSTRACT.....	viii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. JUSTIFICACIÓN	2
III. OBJETIVOS	4
A. General	4
B. Específicos	4
IV. HIPÓTESIS.....	5
V. MARCO TEÓRICO.....	6
A. Descripción especies <i>c.sinesis</i>	6
B. Producción.....	7
C. Usos medicinales.....	7
D. Polifenoles.....	7
E. Extracciones.....	9
F. Método de cloruro de aluminio para cuantificar flavonoides	10
G. Método de Folin-Ciocalteu para cuantificar polifenoles.....	10
H. Evaluación de actividad antioxidante.....	11
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	12
A. Materiales, equipo y reactivos.....	12
B. Procedimiento.....	12
VII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	16
A. Determinación cuantitativa polifenoles.....	16

B.	Determinación cualitativa y cuantitativa de flavonoides	18
C.	Determinación de capacidad antioxidantes DPPH.....	20
D.	Correlación de IC50 con polifenoles y flavonoides totales.....	24
VIII.	CONCLUSIONES	25
IX.	RECOMENDACIONES.....	26
X.	BIBLIOGRAFÍA	27
XI.	ANEXOS	31

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Peso y tiempos de extractos acuosos de té Chirrepeco	13
2. Cantidades para curva de calibración de polifenoles	13
3. Cantidades para curva de calibración de flavonoides	14
4. Cantidades para curva de calibración de análisis DPPH.....	15
5. Media de mg de ácido gálico equivalentes por g de té en diferentes tiempos	17
6. Ensayo cualitativo para determinación de flavonoides (Prueba Shinoda).....	18
7. Media de mg de quercetina equivalentes por g de té en diferentes tiempos.....	20
8. Media de porcentaje de captura de radicales libres, IC50 y equivalente de ácido ascórbico (AA) de té en diferentes tiempos	23

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. <i>Camellia sinensis</i>	6
2. Estructura general de flavonoides	8
3. Estructuras básicas de clasificación de los flavonoides	8
4. Reacción de Shinoda.....	9
5. Formación de complejo de aluminio.....	10
6. Mecanismo de reactivo Folin-Ciocalteu	10
7. Mecanismo de reacción de radical libre DPPH	11
8. Curva de calibración de ácido gálico para la determinación cuantitativa de polifenoles	16
9. Determinación de polifenoles totales en té en diferentes tiempos de sumersión. Mx= muestra. Las barras representan \pm desviación estándar de los experimentos realizados en triplicados.....	17
10. Curva de calibración de quercetina para la determinación cuantitativa de flavonoides totales	19
11. Determinación de flavonoides totales en té en diferentes tiempos de sumersión expresados como mg de quercetina equivalentes por g de té. Mx= muestra. Las barras representan \pm desviación estándar de los experimentos realizados en triplicados.	19
12. Curva de calibración de ácido ascórbico para método DPPH.	21
13. Porcentaje de captura de radicales libres en diferentes tiempos de sumersión. Mx= muestra. Las barras representan \pm desviación estándar de los experimentos realizados en triplicados.....	21
14. IC50 en diferentes tiempos de sumersión. Mx= muestra. Las barras representan \pm desviación estándar de los experimentos realizados en triplicados.	22
15. Equivalente de ácido ascórbico (μ mol/g de té) en diferentes tiempos de sumersión, las barras representan \pm s.d. de los experimentos realizados en triplicados.....	22
16. Correlación entre IC50 con mg ácido gálico (AG) equivalentes por g de té y mg quercetina equivalentes por g de té en diferentes tiempos de sumersión	24

17. Prueba Shinoda antes de verter HCL control negativo, control positivo y extractos de izquierda a derecha.....	31
18. Prueba Shinoda después de verter HCL control negativo, control positivo y extracto 7 al 4 de izquierda a derecha.....	31
19. Prueba Shinoda después de verter HCL control negativo, control positivo y extracto 4 al 1 de izquierda a derecha.....	32
20. Prueba polifenoles antes de 45 minutos de lectura de absorbancia	32
21. Prueba polifenoles después de 45 minutos de lectura de absorbancia.....	33
22. Prueba flavonoides antes de 45 minutos de lectura de absorbancia.	33
23. Prueba flavonoides después de 45 minutos de lectura de absorbancia.	34
24. Prueba DPPH antes de 45 minutos de lectura de absorbancia.....	34
25. Prueba DPPH después de 45 minutos de lectura de absorbancia.	35

RESUMEN

El té negro es conocido por su actividad antioxidante y composición de compuestos polifenólicos, sin embargo, el té negro producido en Guatemala nombrado té Chirrepeco no posee estudios que respalden su propiedad antioxidante y su composición. Es por ello que en este estudio se cuantificó y analizó la capacidad antioxidante del té negro, así como el contenido total de polifenoles y flavonoides en extractos acuosos en tiempos de sumersión de 0.5 a 24 minutos. Los flavonoides totales se identificaron cualitativamente por análisis fitoquímico y cuantitativamente por método con AlCl_3 . Los polifenoles totales por el método cuantitativo de Folin-Ciocalteu, así como la prueba cuantitativa de DPPH para determinar la actividad antioxidante. Las concentraciones de los polifenoles totales variaron de 150.4902 ± 0.1321 a 416.8949 ± 0.0867 mg ácido gálico/g de té. Los siete extractos se clasificaron como flavonoles y flavonas seguido se determinó que las concentraciones de flavonoides totales variaron de 74.0904 ± 0.0006 a 106.1898 ± 0.0034 mg de quercetina/g de té. Se aceptó la primera hipótesis ya que todos los extractos acuosos de té negro poseen un contenido mayor de flavonoides totales, polifenoles totales y porcentaje de captura de radicales libres al estimado. El porcentaje de captura de radicales libres más alto de los extractos fue el de cuatro minutos con $83.9011\% \pm 3.8542\%$. Sin embargo, se observó una disminución en el porcentaje de captura de radicales libres a mayor tiempo de sumersión rechazando así la segunda hipótesis a pesar de que el contenido total de flavonoides y polifenoles aumentara a mayor tiempo de sumersión. Por último, se determinó la correlación de Pearson entre IC_{50} con los polifenoles y flavonoides totales mostrando una relación indirectamente. Se recomienda un tiempo de sumersión de 4 a 8 minutos ya que poseen el mayor porcentaje de captura de radicales libres y posee un buen contenido de polifenoles y flavonoides totales.

ABSTRACT

Black tea is known for its antioxidant activity; however, the black tea produced in Guatemala, Chirrepeco tea, does not have studies that support its antioxidant properties, so this study quantified and analyzed the antioxidant capacity of Chirrepeco black tea, as well as the total content of polyphenols and flavonoids in aqueous extracts at immersion times of 0.5 to 24 minutes. Total flavonoids were identified qualitatively by phytochemical analysis and quantitatively by AlCl_3 method. Total polyphenols by the quantitative method of Folin-Ciocalteu, as well as quantitative test of DPPH to determine antioxidant activity. Concentrations of total polyphenols ranged from $150,4902 \pm 0.1321$ to $416,8949 \pm 0.0867$ mg gallic acid/g tea. The seven extracts were classified as flavonols and flavones, followed by determining that the concentrations of total flavonoids varied from $74,0904 \pm 0.0006$ to $106,1898 \pm 0.0034$ mg quercetin/g of tea. The first hypothesis was accepted since all aqueous extracts of black tea had a higher content of total flavonoids, total polyphenols and free radical capture than estimated. The highest percentage of free radical capture of the extracts was the one of four minutes with $83.9011\% \pm 3.8542\%$. However, a decrease in the percentage of free radical capture was observed with longer immersion time, thus rejecting the second hypothesis despite the fact that in the total content of flavonoids and polyphenols increased with longer immersion time. Finally, the Pearson correlation between IC_{50} and total polyphenols and flavonoids was determined, showing an indirect relationship. A submersion time of 4 to 8 minutes is recommended as they have the highest percentage of free radical capture and have a good content of polyphenols and total flavonoids.

I. INTRODUCCIÓN

El té es una bebida que la mayoría de las personas consume diariamente principalmente por sus propiedades medicinales, farmacológicas y terapéuticas. Su uso como agente de la salud es ampliamente conocido en múltiples culturas del mundo y ha sido transmitido a través de generaciones. Estos conocimientos se han ido perfeccionando a lo largo del tiempo, por el conocimiento científico obtenido de ensayos químicos, farmacológicos, toxicológicos y clínicos (Ramos, 2016).

Entre los tés más conocidos está el té negro el cual es popular por ser un energizante natural, reductor de niveles de cortisol, hepatoprotector, reductor de radicales libres (actividad antioxidante) entre muchas otras propiedades. La actividad antioxidante del té negro ha sido estudiada y analizada por diversos grupos científicos como Demain & Fang, 2000 y Pérez & Jiménez, 2011. Se ha encontrado que las propiedades de esta planta están relacionadas con los metabolitos secundarios los cuales son compuestos derivados del metabolismo primario y tienen múltiples funciones en las plantas como defensa contra insectos, bacterias y hongos (Zhang *et al*, 2014).

La actividad antioxidante propia del té negro se correlaciona sobre todo con los polifenoles. A pesar de que se conoce que el té negro tiene las propiedades medicinales mencionadas anteriormente, el té negro producido en Guatemala, específicamente en Cobán, Alta Verapaz conocido como té Chirrepeco, no posee estudios científicos acerca de su composición química (Rengifo, Diana, 2018). Debido a la importancia del consumo de estas infusiones para los guatemaltecos y extranjeros se propone la cuantificación de polifenoles, la clasificación y cuantificación de flavonoides, así como el análisis de capacidad antioxidante de extracciones acuosas en diferentes tiempos de sumersión de té negro Chirrepeco.

II. JUSTIFICACIÓN

El té es la segunda bebida más consumida en el mundo después del agua pura (Pou, Jolvis, 2016). La misma planta *Camellia sinensis* se usa para producir diferentes tipos de té, clasificándose en: blanco, verde, oolong y negro, siendo este el más fermentado (Schillinger, Ban, 2010). Se conoce que la fermentación provoca la descomposición estructural de las paredes celulares de las plantas, liberando y sintetizando así compuestos antioxidantes (Sun, *et al*, 2014). Debido a ello, esta planta posee gran valor medicinal no solo por su capacidad antioxidante sino por sus propiedades farmacológicas y terapéuticas.

La demanda de la medicina tradicional ha aumentado ya que es utilizada como una alternativa para mantener la salud, prevenir y tratar enfermedades, especialmente en las zonas rurales (Gallegos y Gallegos, 2017). El té negro posee actividad antioxidante, inhibe la inflamación, genera efectos protectores contra diabetes y obesidad, entre otros (Zhang, *et al*, 2014) Esas propiedades de la planta están relacionadas con los metabolitos secundarios en las plantas, los cuales son compuestos derivados del metabolismo primario y tienen múltiples funciones en las plantas como defensa contra insectos, bacterias, hongos (Pérez & Jiménez, 2011; Demain & Fang, 2000) y le da cualidades como olores y colores característicos. El té negro puede poseer flavonoides, alcaloides, taninos, saponinas, antocianinas, alcaloides, y demás, en sus hojas, tallos y flores (Ramdani, *et al*. 2013).

Los flavonoides poseen una estructura química de 15 carbonos y son de especial interés en la investigación de productos naturales por tener actividad antioxidante, antiinflamatoria, hepatoprotectora, antibacteriana y antiviral (Rengifo, Diana, 2018). El estudio fitoquímico de estos compuestos en el té negro permite conocer los principios activos y comprobar su rol en los distintos beneficios farmacéuticos.

Como se ha mencionado el té negro posee diversos beneficios medicinales, sin embargo, en la actualidad el té negro orgánico producido en Guatemala no posee información acerca de su composición química. Su historia empieza a finales del siglo XIX cuando una familia de alemanes adquiere una finca en Cobán y empiezan a enseñar el proceso de producción de té negro, el cual nombraron Té Chirrepeco, basado en la palabra Q'eqchí', Chirrepec, que significa a la orilla de la piedra (Cooperativa Chirrepec, 2020). Ya que la plantación original estaba junto a una cueva y a partir del 1998 se forma la cooperativa Chirrepec, R.L ubicada en el departamento de Alta Verapaz.

Dependiendo de la región en donde se cultiva el té, cambia el contenido de polifenoles en el mismo y debido a la importancia del consumo de estas infusiones para la población guatemalteca, quienes están en la búsqueda de beneficios para su salud es importante conocer su composición química. Por ello, el objetivo de este estudio es validar científicamente la presencia de polifenoles y flavonoides totales por medio de un análisis fitoquímico y calcular la actividad antioxidante de infusiones en diferentes tiempos de sumersión del té Chirrepeco. Además, a partir de estos tiempos de sumersión determinar si existe una relación directamente proporcional para los tres parámetros mencionados.

III. OBJETIVOS

A. General

Analizar la capacidad antioxidante, los polifenoles y los flavonoides totales de extracciones acuosas en diferentes tiempos de sumersión de té negro Chirrepeco originario de Cobán, Alta Verapaz.

B. Específicos

- ❖ Determinar cualitativamente la presencia y clasificación de los flavonoides presentes en las extracciones acuosa en diferentes tiempos de sumersión de té negro Chirrepeco originario de Cobán, Alta Verapaz.
- ❖ Cuantificar los polifenoles y flavonoides totales de los extractos acuosos en diferentes tiempos de sumersión del té Chirrepeco, por medio del método Folin-Ciocalteu y cloruro de aluminio, respectivamente.
- ❖ Cuantificar la actividad antioxidante de los extractos acuosos en diferentes tiempos de sumersión del té Chirrepeco por método colorimétrico con radical DPPH y determinar el extracto con mayor porcentaje captura de radicales libres.
- ❖ Determinar la correlación entre la actividad antioxidante con los polifenoles y flavonoides totales de los extractos acuosos en diferentes tiempos de sumersión de té Chirrepeco.
- ❖ Recomendar el tiempo de sumersión óptimo para obtener un té negro Chirrepeco rico en antioxidantes, polifenoles y flavonoides.

IV. HIPÓTESIS

Los extractos acuosos de tiempo de sumersión de 0.5 a 24 minutos de té negro Chirrepeco poseen un contenido total de flavonoides mayor a 50 mg equivalentes de quercetina por g de té y un contenido de polifenoles mayor a 100 mg equivalentes de ácido gálico por g de té, además tienen un porcentaje de captura de radicales libres mayor al 60%.

A mayor tiempo de sumersión del té negro Chirrepeco existe un aumento en el contenido total de flavonoides (mg equivalentes de quercetina por g de té) y polifenoles (mg equivalentes de ácido gálico por g de té), así como el porcentaje de captura de radicales libres.

V. MARCO TEÓRICO

A. Descripción especies *c.sinesis*

El estudio de Huang *et al*, 2014 indica que el pequeño linaje leñoso de *Camellia* en *Theaceae* se originó y diversificó a finales de mioceno. Este género *camellia* es el más grande de la familia *Theaceae*. Es originaria de China, el sur y sudeste de Asia, actualmente se cultiva en al menos 30 países de todo el mundo. Específicamente la especie *c.sinesis* se considera la especie más importante económica y ecológicamente en su familia; es usada para preparar la bebida de té (Yu *et al*, 2017).

Esta planta se describe como arbustos 1-5 m de altura. Ramas jóvenes de color amarillo grisáceo, lámina de la hoja elíptica, oblonga-elíptica u oblonga, 5-14 × 2-7.5 cm, Flores axilares, solitarias o hasta 3 en racimo, 2,5-3,5 cm de diámetro; bractéolas 2, caducas, ovadas, 2 mm. 5 sépalos, persistentes, ampliamente ovados a suborbiculares, 3-5 mm. Pétalos 6-8, blancos; sepaloides de 1-3 pétalos externos; pétalos internos obovados a ampliamente obovados, 1.5-2 × 1.2-2 cm, ápice redondeado. Estambres numerosos, 0,8-1,3 cm, y semillas pardas subglobosas, 1-1,4 cm de diámetro (Tianlu, Bartholomew, 1887).



Figura 1. *Camellia sinensis*

(Curtis, 1807)

B. Producción

Los tipos de té dependen del procedimiento que se les da a las hojas durante la fermentación una vez recolectada y todas las variedades vienen de la misma planta *Camellia sinensis*. Existen cuatro principales tipos de té: blanco, verde, negro y oolong. El té blanco y verde se preparan exponiendo sus hojas recién cortadas a vapor de agua para inactivar las oxidasas, después se desecan para fijar así el color verde para luego enrollar las hojas. Para la producción de té negro (completamente fermentado) y oolong (semifermentado) las hojas se exponen al aire de 12-24 horas, se enrollan, se procede a realizar la fermentación a una temperatura de 25-40°C y, por último, se realiza la deshidratación y el secado (Wittig, 2005).

1. Té negro

El té negro es consumido debido a su sabor suave y de baja astringencia, el té tiene cerca de 4000 compuestos bioactivos, como polifenoles, alcaloides, aminoácidos, proteínas, carbohidratos, oligoelementos y clorofila. El pigmento típico del té se debe a partir de la oxidación de las catequinas durante la fermentación, que incluyen a las teaflavinas y tearubiginas (Sun *et al*, 2013; Yadav *et al*, 2020).

C. Usos medicinales

Las plantas medicinales desde hace siglos han sido de gran importancia, para cubrir las necesidades terapéuticas. Su uso como agentes de la salud es ampliamente conocido en múltiples culturas del mundo y ha sido transmitido a través de generaciones. Estos conocimientos se han ido perfeccionando a lo largo del tiempo, por el conocimiento científico de ensayos químicos, farmacológicos, toxicológicos y clínicos. La identificación del valor curativo de las plantas ha provenido generalmente de la información proporcionada por el uso de la medicina tradicional, que igualmente ha sido la fuente para la investigación fitoquímica. El té es consumido no solo por su sabor sino por sus componentes asociados a los beneficios para la salud, se le atribuye la activación de la circulación y el metabolismo, refuerza las defensas del organismo, favorece la digestión, mejora la excreción de la orina dado a conocer por medicina tradicional y comprobado por métodos fitoquímicos (Reyes *et al*. 2014; Zhang *et al*, 2014).

D. Polifenoles

Estos metabolitos secundarios tienen más de 8,000 compuestos distintos, que poseen diferentes estructuras, propiedades químicas y actividad biológica. Los compuestos fenólicos poseen un anillo aromático con uno o más grupos OH. Como antioxidantes pueden proteger a las células contra el daño oxidativo así disminuir el riesgo de enfermedades asociadas con el estrés oxidativo es decir el desequilibrio entre las especies oxidantes y reductoras a nivel celular del organismo (Avella, García y Mendoza, 2008).

1. Flavonoides

Se conocen alrededor de 8000 compuestos fenólicos los cuales se sintetizan por la vía de ácido shikímico o vía de acetato/malonato. Los flavonoides poseen una estructura benzo- γ -pirano, compuesto de dos anillos aromáticos y un pirano, además poseen actividades antioxidantes, así como acción bifásica sobre los vasos sanguíneos actuando como vasoconstrictora a concentraciones activas más bajas y vasodilatadora a concentraciones mayores (López, 2002; Johnson *et al.* 1997).

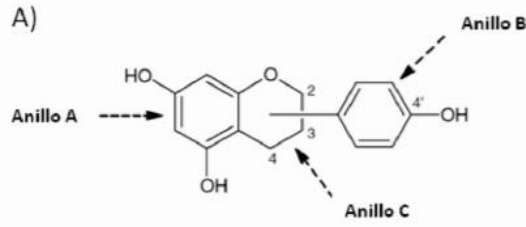


Figura 2. Estructura general de flavonoides

(Limón, 2010)

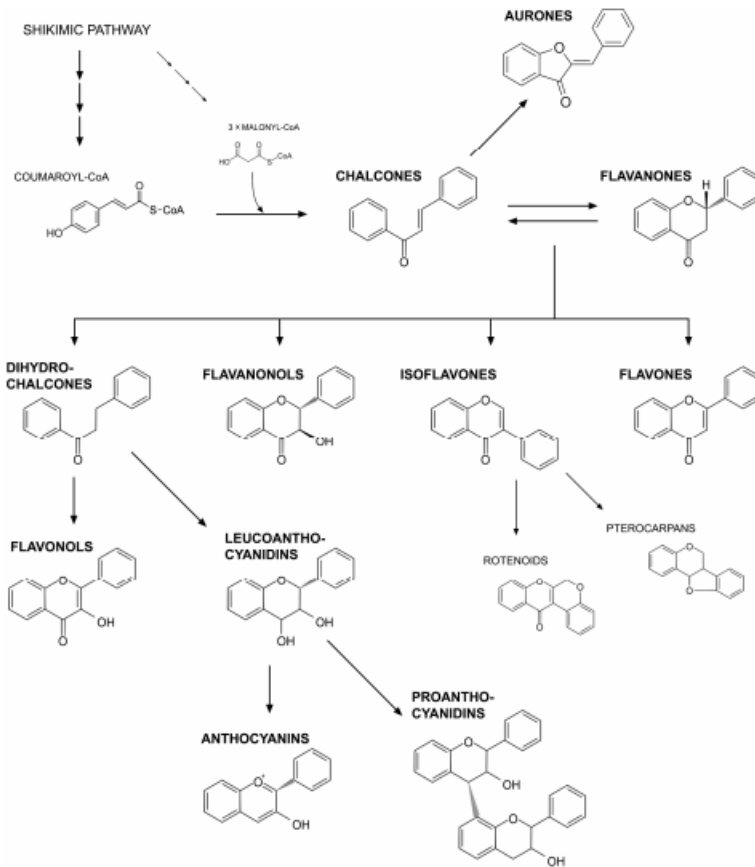


Figura 3. Estructuras básicas de clasificación de los flavonoides

(Mierziak, *et al.* 2014)

E. Extracciones

El término “extracción” se refiere a la separación de porciones medicinales activas provenientes de tejidos vegetales o animales, de todos aquellos componentes inactivos o inertes, mediante el uso de solventes selectivos. Los productos así obtenidos son líquidos relativamente impuros, semisólidos o sólidos, utilizados como elixires, extractos pululares, extractos pulverizados o fluidos, jarabes tinturas, decocciones o infusiones (Cardet, 2011).

1. Análisis fitoquímico

Esta es la etapa principal de la investigación fitoquímica, la cual permite la identificación cualitativa de los metabolitos secundarios presentes en la planta, en donde después se espera realizar el aislamiento de los grupos de interés. El proceso consiste en la extracción de la planta con disolventes apropiados y la aplicación de reacciones de coloración, técnicas de cromatografía o espectrofotometría como: capa fina, cromatografía líquida de alta presión (HPLC), cromatografía de gases, espectroscopía infrarroja y visible, análisis de espectroscopía de masas, técnicas de refracción y cristalografía de rayos X, resonancia magnética nuclear (MNR), entre otros. Los resultados obtenidos permiten continuar la orientación de los próximos estudios a realizar (Cardet, 2011; Domínguez, 2012).

a. Prueba Shinoda

La prueba Shinoda consiste en la reacción entre Mg metálico y ácido clorhídrico, la reacción se observa en la Figura 4. El magnesio metálico es oxidado por el HCl en concentración pura y da como productos al hidrógeno gaseoso y el cloruro de magnesio que al estar en contacto con los flavonoides forma complejos dando así una coloración roja característica de una prueba positiva para flavonoides (Fajardo et al, 2016).

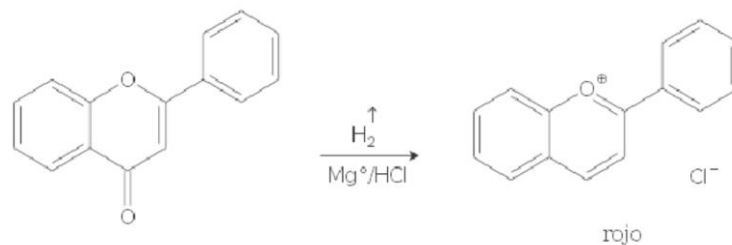


Figura 4. Reacción de Shinoda

(Fajardo et al, 2016)

Observaciones:

Coloración de amarillo a rojo indican presencia de flavonas y flavonoles

Coloración de rojo carmesí indica flavanoles

Coloración de rojo carmesí a púrpura/violeta indica flavanonas

(Cardet, 2011; Ramos, 2016)

F. Método de cloruro de aluminio para cuantificar flavonoides

Este método se basa en el uso de cloruro de aluminio ya que puede determinar los flavonoides totales formando complejos estables con flavonas y flavonoles. El análisis espectrofotométrico se realiza a una longitud de onda de 420 nm. Ese ensayo tiene la ventaja de no poseer interferentes de otras sustancias fenólicas como ácidos fenólicos, haciéndolo reproducible y práctico (Rodríguez y Portillo, 2013).

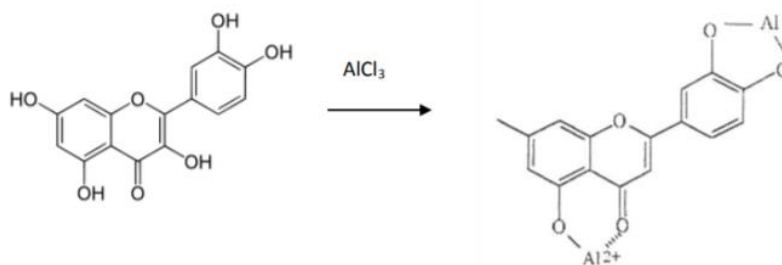


Figura 5. Formación de complejo de aluminio

(Rodríguez y Portillo, 2013)

G. Método de Folin-Ciocalteu para cuantificar polifenoles

Este ensayo es usado para cuantificar el contenido total de polifenoles en productos o extractos vegetales. Se hace uso del reactivo de Folin-Ciocalteu el cual es una mezcla de tungstato sódico y molibdato sódico en ácido fosfórico. Este reactivo posee un color amarillo y al estar en contacto con la muestra forma un complejo de color azul en la presencia de polifenoles, las lecturas de este método se realizan a 750 nm. En la Figura 6 se observa el mecanismo por el cual el ácido fosfomolibdotúngstico se reduce por los grupos fenólicos.

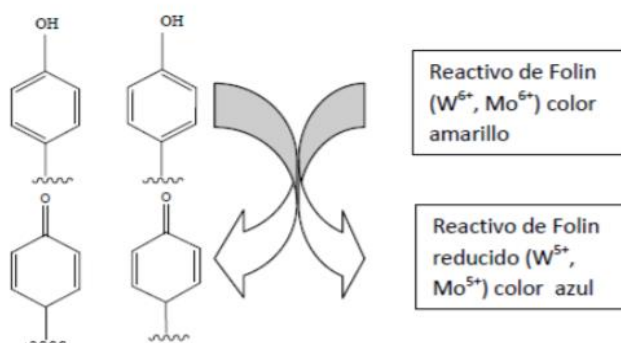


Figura 6. Mecanismo de reactivo Folin-Ciocalteu

(Martínez, Segovia y López, 2015)

H. Evaluación de actividad antioxidante

Los antioxidantes de origen polifenólico tienen la capacidad de capturar radicales libres. Estos son especies químicas muy reactivas que fácilmente conducen a reacciones incontroladas, resultando en daños oxidativos importantes en macromoléculas biológicas como ácidos nucleicos, proteínas y lípidos del cuerpo. Los antioxidantes poseen un papel importante relacionado con el estrés oxidativo, así como enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas, estos pueden disminuir los índices de enfermedades crónicas y fortalece al sistema inmunológico (Ramos, 2016).

1. Métodos de análisis de actividad antioxidante

Para evaluar la actividad antioxidante se puede emplear el estudio de estos por medio de DPPH. El método de DPPH (radical estable 2,2'-di(4-tert-octilfenil)-1-picrilhidrazil) se basa en la estabilidad del radical lo cual se debe a la deslocalización del electrón desapareado, esto mismo le da una coloración violeta y al entrar en contacto con una sustancia dona un átomo de hidrógeno o con otra especie radical (R) produciendo su forma reducida DPPH-H o DPPH-R tornando a un color amarillo por lo tanto disminuyendo su absorbancia, esta última es la que se mide para los análisis. Se realiza una curva de calibración y se compara con un estándar. El parámetro EC50 refleja el 50% del consumo del DPPH se expresa como gramos de muestra equivalentes de estándar por gramo de DPPH en el medio y la actividad antioxidante se expresa como mmol de estándar/g de extracto de muestra (Avella, García y Mendoza, 2008; Domínguez, 2012).

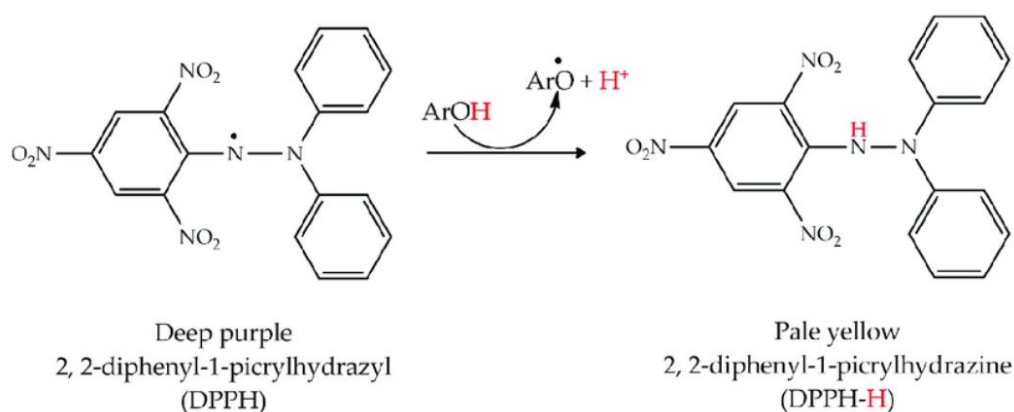


Figura 7. Mecanismo de reacción de radical libre DPPH

(Sadeer, *et al.* 2020)

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Materiales, equipo y reactivos

1. Materiales y reactivos

Reactivos usados, Folin-Ciocalteu's (Merck), Carbonato de Sodio Merck, Ácido Gálico Fisher Scientific Company, estándar L(+) Ácido ascórbico de grado reactivo Merck, DPPH Sigma Aldrich, Cloruro de Aluminio Merck, Quercetina (98%) Aldrich Chemical Company, Etanol absoluto Sigma Aldrich, Ácido clorhídrico, Magnesio metálico Merck y Agua destilada por Nanopure Infinity 18.1 MΩ-cm marca Barnstead. Materiales usados, papel Whatman 0.45 μm, pipetas automáticas de 10 a 100 μL, 100 a 1000 μL y 1000 a 5000 μL todas marca Transferpette, tubos de ensayo (de 10 a 20 mL), gradillas, beakers (de 50 a 400 mL), embudos de vidrio, frascos ámbar, agitadores magnéticos y balones de aforo (de 10 a 100 mL), 1 probeta 250 mL y 1 piseta.

2. Equipo

Espectrofotómetro UV/VIS Agilent 8453, Genesys 20 UV-VIS Thermo Spectronic±0.01nm, balanza analítica OHAUS ±0.0001 g (max:220 g min:0.001 g), Agitador/calentador magnético.

B. Procedimiento

1. Selección de muestra

El té Chirrepeco *Camellia sinensis* originario de Cobán, Alta Verapaz fue obtenido de una tienda Distribuidora en la Ciudad Capital de Guatemala. Se tomaron y mezclaron 100 bolsas de 2.5 g de té para obtener muestras aleatorias y homogéneas.

2. Obtención de extractos acuosos

Para la obtención de los extractos acuosos se pesaron 2.3 g de té en un beaker de 400 mL y se colocó en agitación con 250 mL de agua destilada ya calentada a 90°C según el tiempo de sumersión del Cuadro 1. Finalizado el tiempo se filtró con papel Whatman 0.45μm cada extracto y se guardaron en frascos color ámbar de 250 mL en refrigeración un día previo a los análisis (Chamira, Preethi, 2015).

Cuadro 1. Peso y tiempos de extractos acuosos de té Chirrepeco

Extracto acuoso	Peso ± 0.0001 g	Tiempo minutos
1	2.2180	24
2	2.2230	20
3	2.2410	16
4	2.2841	12
5	2.3311	8
6	2.1860	4
7	2.3200	0.5

(Elaboración propia)

3. Análisis fitoquímico de flavonoides

a. Prueba de Shinoda

En un tubo de ensayo se añadió 1 mL del extracto acuoso según su tiempo de sumersión y 2 ml de agua destilada, después se añadió una granalla de magnesio metálico aproximadamente y 3 gotas de HCl concentrado. Como control positivo se hizo uso de Quercetina en concentración de 500 $\mu\text{g/mL}$ y como control negativo agua destilada. (Cardet, 2011; Ramos, 2016).

4. Determinación cuantitativa de polifenoles totales expresados como equivalente de Ácido Gálico

a. Curva de calibración

Se preparó una solución de 0.100 g/mL de estándar de ácido gálico en un balón de 100 mL con agua destilada. Una solución 5% de carbonato de calcio en 100 mL. En tubos de ensayo se midió con pipetas automáticas los volúmenes mostrados en el Cuadro 2 para llegar a un volumen total de 4750 μL y se esperó 45 minutos para hacer las lecturas de absorbancia a 750 nm. Además, se realizó un blanco con agua destilada y un control negativo con agua destilada en lugar de ácido gálico. Todas las lecturas se realizaron en triplicados en un espectrofotómetro UV/VIS. (Pereira, 2014).

Cuadro 2. Cantidades para curva de calibración de polifenoles

Ácido ascórbico μL	Agua destilada μL	Folin-Ciocalteu's μL	Carbonato de sodio μL
10	3990	250	500
30	3970	250	500
50	3950	250	500
70	3930	250	500
90	3910	250	500
110	3890	250	500
130	3870	250	500

(Elaboración propia)

b. Determinación cuantitativa de polifenoles totales

La determinación de polifenoles totales se realizó según el método de Pereira, 2014 con modificaciones de: 500 μL de una solución 5% de carbonato de sodio, 250 μL de reactivo Folin-Ciocalteu's. Se realizaron siete corridas por extracto acuoso (ver Cuadro 1) en concentraciones de 50 a 350 μL y se completó el volumen de 4750 μL con agua destilada. Todas las lecturas se realizaron en triplicados en un espectrofotómetro UV/VIS pasados 45 minutos. Los resultados se expresaron como mg de ácido gálico equivalente por g de té.

5. Determinación cuantitativa de flavonoides totales expresados como equivalente de Quercetina

a. Curva de calibración

Se preparó una solución de 500 $\mu\text{g/mL}$ de estándar de Quercetina en un balón de 25 mL con etanol al 80% y una solución 10% de cloruro de aluminio en un balón de 10 mL. En tubos de ensayo se midió con pipetas automáticas los volúmenes mostrados en el Cuadro 3 para llegar a un volumen total de 3000 μL y se esperó 45 minutos para hacer las lecturas de absorbancia a 420 nm. Además, se realizó un blanco con agua destilada y un control negativo con agua destilada en lugar de quercetina. Todas las lecturas se realizaron en triplicados en un espectrofotómetro UV/VIS (Pereira, 2014).

Cuadro 3. Cantidades para curva de calibración de flavonoides

Quercetina μL	Agua μL	$\mu\text{L AlCl}_3$ al 10%
10.00	2930.00	60
25.00	2915.00	60
40.00	2900.00	60
55.00	2885.00	60
70.00	2870.00	60
85.00	2855.00	60
100.00	2840.00	60

(Elaboración propia)

b. Determinación cuantitativa de flavonoides totales

La determinación de flavonoides totales se realizó según el método de Pereira, 2014 con modificaciones de: 60 μL de cloruro de aluminio al 10%. Se realizaron siete corridas por extracto acuoso (ver Cuadro 1) en concentraciones de 100 a 700 μL y se completó el volumen de 3000 μL con agua destilada. Todas las lecturas se realizaron en triplicados en un espectrofotómetro UV/VIS pasados 45 minutos. Los resultados se expresaron como mg de quercetina equivalente por g de té.

6. Determinación de capacidad antioxidante por método DPPH (2,2-difenil-1-picrylhydrazyl)

a. Curva de calibración

Se preparó una solución de 0.0100 g/mL (0.1mM) de estándar de L (+) ácido ascórbico en un balón de 100 mL y una solución DPPH de 0.0224 g en 100 mL de etanol. En tubos de ensayo se midió con pipetas automáticas los volúmenes mostrados en el Cuadro 4 y se esperó 45 minutos para hacer las lecturas de absorbancia a 519 nm. Además, se realizó un blanco con etanol y un control negativo con agua destilada en lugar de ácido ascórbico. Todas las lecturas se realizaron en triplicados en un espectrofotómetro UV/VIS pasados 45 minutos (Chamira, Preethi, 2015).

Cuadro 4. Cantidades para curva de calibración de análisis DPPH

Ácido ascórbico μL	Etanol μL	0.1 mM DPPH μL
50	2950	1000
100	2900	1000
150	2850	1000
200	2800	1000
250	2750	1000
300	2700	1000
350	2650	1000

(Elaboración propia)

b. Determinación cuantitativa de actividad antioxidante

La determinación de la actividad antioxidante (poder oxido/reductor) se realizó según el método de (Chamira, Preethi, 2015) con modificaciones. Se realizaron siete corridas por extracto acuoso (ver Cuadro 1) en concentraciones de 75 a 950 μL y se completó el volumen de 4000 μL con etanol. Todas las lecturas se realizaron en triplicados en un espectrofotómetro UV/VIS pasados 45 minutos. Los resultados se expresaron como porcentaje de capturas radicales, IC50 (mg de té/L) y equivalente AA (ácido ascórbico) ($\mu\text{mol/g}$ de té).

7. Análisis estadístico de resultados

El análisis estadístico se realizó a través del programa Minitab Statistical Software y Microsoft Excel. Se realizó un análisis ANOVA de un factor con la prueba Tukey post-hoc para comparar los diferentes tiempos de sumersión en los análisis de los polifenoles y flavonoides totales, así como la actividad antioxidante del té negro. Además de cálculos del coeficiente de determinación para curvas de calibración y correlación de Pearson's. Los resultados se realizaron en triplicados y se muestran como media \pm desviación estándar (s.d.). Los valores de p menores a 0.05 se consideraron como estadísticamente significativos con un 95% de confianza.

VII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

A. Determinación cuantitativa polifenoles

La determinación cuantitativa de los polifenoles totales en los extractos acuosos de té Chirrepeco se realizó a través del método Folin-Ciocalteu con ácido gálico (AG) como estándar. La Figura 8 muestra la curva de calibración realizada con un R^2 de 0.9983 indicando que el 99.83% de la variabilidad de las absorbancias fue explicado por este modelo lineal el cual a su vez fue necesario para determinar los mg de ácido gálico equivalente por g de té como se ve en la Figura 9; en esta se observa una relación ascendente de a mayor tiempo de sumersión mayor concentración de polifenoles, con el dato atípico para el tiempo de 12 minutos.

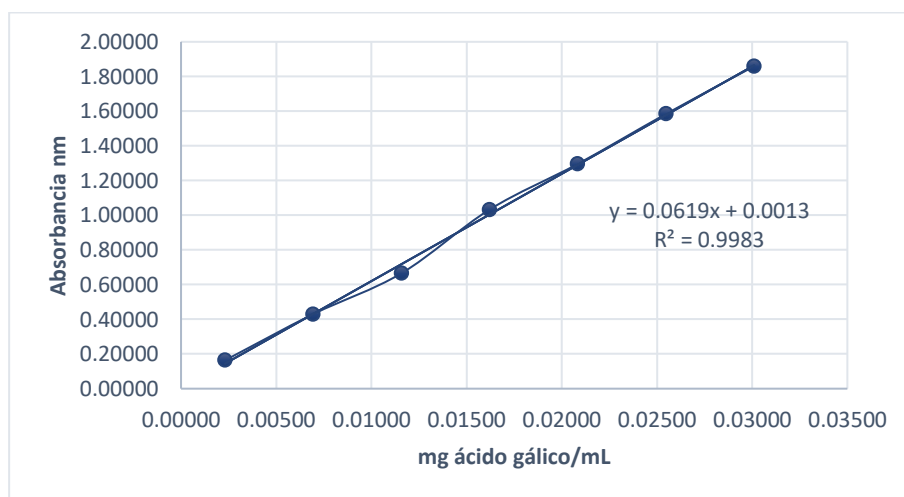


Figura 8. Curva de calibración de ácido gálico para la determinación cuantitativa de polifenoles

En el Cuadro 5 se muestra la concentración máxima de cada extracto siendo todas significativamente diferentes con un 95% de confianza, las concentraciones variaron de 150.49020 ± 0.1321 mg/g de té siendo la mínima y 416.8949 ± 0.0867 mg/g de té siendo la máxima, estos resultados fueron más altos que los reportados en (Anesini, Filip, 2008; Chan 2007 y Chen, 2007) los cuales fueron realizados en el sur de América (Argentina) y Asia.

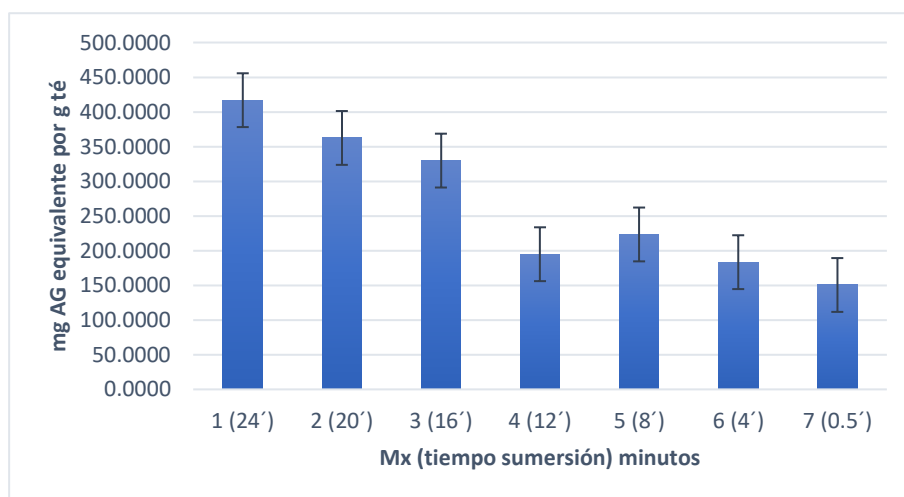


Figura 9. Determinación de polifenoles totales en té en diferentes tiempos de sumersión. Mx= muestra. Las barras representan \pm desviación estándar de los experimentos realizados en triplicados.

Cuadro 5. Media de mg de ácido gálico equivalentes por g de té en diferentes tiempos

Mx (tiempo sumersión) minutos	mg AG equivalentes por g té \pm s.d.	Prueba Tukey post-hoc
1 (24')	416.8949 \pm 0.0867	a
2 (20')	362.4600 \pm 0.1560	b
3 (16')	329.7906 \pm 0.0857	c
4 (12')	194.8275 \pm 0.0920	d
5 (8')	223.3330 \pm 0.1667	e
6 (4')	183.3667 \pm 0.7001	f
7 (0.5')	150.4902 \pm 0.1321	g

(Elaboración propia) Los valores con la misma letra no son significativamente diferentes ($P < 0.05$) (media para muestras por triplicado), s.d.= desviación estándar, Mx=muestra

En el minuto y medio se observó una extracción elevada de polifenoles y a partir de ese tiempo se observa un comportamiento ascendente en la concentración de AG equivalentes por g de té, estos resultados fueron los esperados ya que estudios como el de Nikniaz, *et. al.* (2016) han probado que a mayor tiempo de sumersión mayor es el contenido presente de polifenoles. El valor de la muestra en el tiempo de 12 minutos no siguió esta tendencia, sino se observa como un dato atípico, esto puede haber ocurrido por un error indeterminado como cambio de temperatura, pérdida de muestra o uso de menor cantidad de reactivo de cloruro de aluminio dando así un valor más pequeño a su antecesor.

B. Determinación cualitativa y cuantitativa de flavonoides

En el Cuadro 6 se muestran los resultados de la reacción Shinoda para identificar la presencia de flavonoides y su clasificación. El análisis fitoquímico realizado a los siete extractos acuosos dieron evidencia de intensidad moderada de reacción con un color rojo coral pálido esto se dio dada la oxidación del magnesio con HCl para dar $MgCl_2$ formando complejos con los flavonoides dando a conocer la presencia de flavonoles y flavonas (Fajardo, et al, 2016). De esta forma se comprobó la presencia de flavonoides en los extractos.

Cuadro 6. Ensayo cualitativo para determinación de flavonoides (Prueba Shinoda)

Muestra	Tiempo de sumersión (min.)	Resultados	Color	Tipo de flavonoide
7	0.5	+	Amarillo a rojo coral pálido	Flavonoles/flavonas
6	4	++	Amarillo a rojo coral pálido	Flavonoles/flavonas
5	8	++	rojo coral pálido	Flavonoles/flavonas
4	12	++	rojo coral pálido	Flavonoles/flavonas
3	16	++	rojo coral pálido	Flavonoles/flavonas
2	20	++	rojo coral pálido	Flavonoles/flavonas
1	24	++	rojo coral pálido	Flavonoles/flavonas
Control positivo (Quercetina)	-	+++	rojo coral pálido	Flavonoles/flavonas
Control negativo (agua destilada)	-	-	incoloro	-

(Elaboración propia); Interpretación de resultados: alta evidencia (+++) evidencia (++) baja evidencia (+) ausente (-). (Ver anexos Figura 17 a 19)

Para obtener datos cuantitativos se realizó el estudio a través del método de cloruro de aluminio con quercetina como estándar. La curva de calibración se muestra en la Figura 10 con un R^2 de 0.9957 está permitió explicar con un 99.57% la variabilidad de las absorbancias para el análisis de las siete muestras de extractos acuosos, afirmando así que el ajuste del modelo es bueno. Al observar la Figura 11 se determina una relación directamente proporcional entre el tiempo de sumersión y los mg de quercetina equivalentes por g de té.

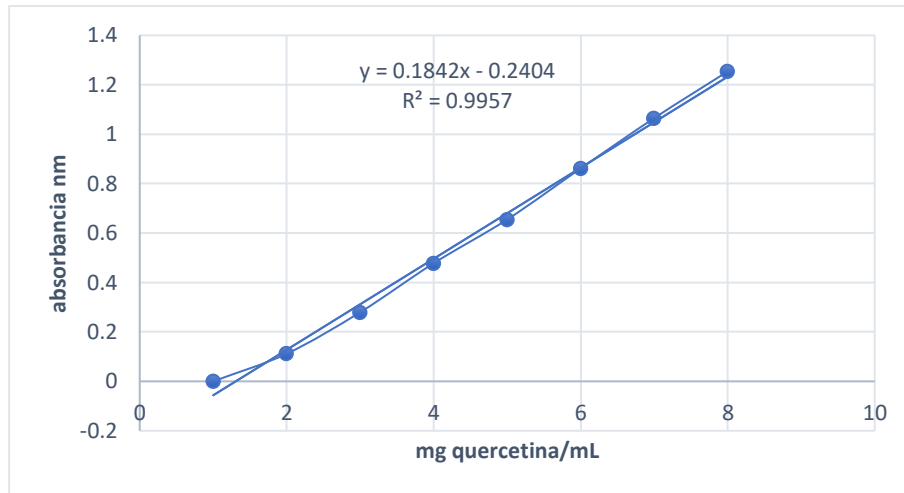


Figura 10. Curva de calibración de quercetina para la determinación cuantitativa de flavonoides totales

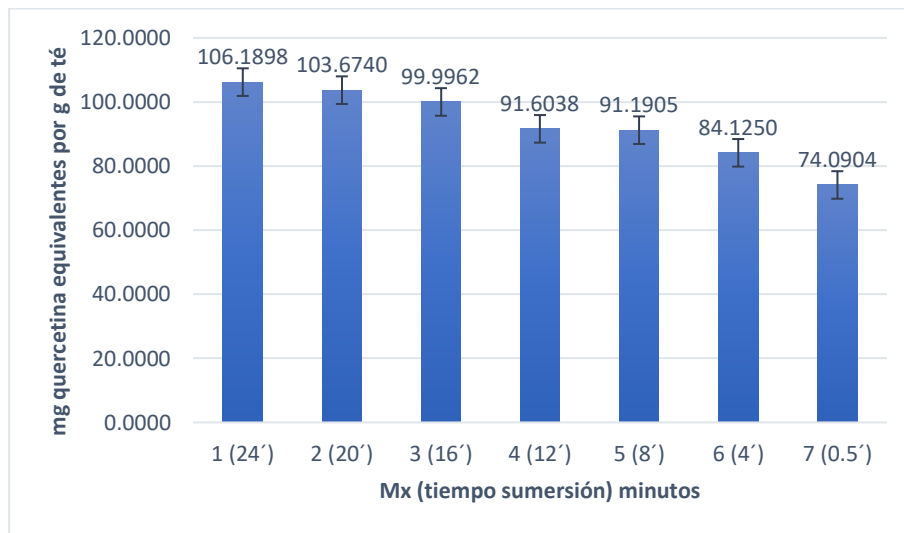


Figura 11. Determinación de flavonoides totales en té en diferentes tiempos de sumersión expresados como mg de quercetina equivalentes por g de té. Mx= muestra. Las barras representan \pm desviación estándar de los experimentos realizados en triplicados.

La cuantificación de flavonoides totales se muestra en el Cuadro 7 con la media de concentración máxima de cada extracto, la muestra 1 y 2; 3,4 y 5; y 2 y 3 no mostraron una diferencia significativa entre ellas, las únicas con diferencia significativa fueron la muestra 6 y 7 con un 95% de confianza. Las concentraciones variaron de 74.0904 ± 0.0006 mg/g té siendo la mínima y 106.1898 ± 0.0034 mg/g té siendo la máxima.

Cuadro 7. Media de mg de quercetina equivalentes por g de té en diferentes tiempos

Mx (tiempo sumersión) minutos	mg quercetina equivalentes por g de té \pm s.d.	Prueba Tukey post-hoc
1 (24')	106.1898 \pm 0.0034	a
2 (20')	103.6740 \pm 0.0010	a, e
3 (16')	99.9962 \pm 0.0008	b, e
4 (12')	91.6038 \pm 0.0010	b
5 (8')	91.1905 \pm 0.0181	b
6 (4')	84.1250 \pm 0.0013	c
7 (0.5')	74.0904 \pm 0.0006	d

(Elaboración propia) Los valores con la misma letra no son significativamente diferentes ($P < 0.05$) (media para muestras por triplicado), s.d.= desviación estándar, Mx=muestra

Como se mencionó la muestra 6 y 7 del Cuadro 7 muestran una diferencia significativa, se podría decir que se da un salto notorio del tiempo 0.5 a 4 minutos. Un comportamiento similar fue observado en donde se dio un salto de los dos a los cinco minutos respecto la concentración de flavonoides y después esta aumenta lentamente sin dar grandes saltos (Pal, *et al.*, 2013). Esto se puede deber a que, al tratarse de té en bolsa, las pequeñas hojas del té al ser extraídas en condiciones dinámicas liberan los compuestos del té en los primeros minutos al tener alto contenido de los mismos (Astill, *et al.*, 2001).

El propósito de realizar la prueba Shinoda era determinar si había evidencia o no de la presencia de flavonoides, aunque cabe mencionar que es meramente cualitativa. Haciendo una comparación entre los resultados cualitativos y cuantitativos se observa que a pesar de que los colores de las muestras de la prueba de Shinoda son pálidos, la intensidad del color cambia ligeramente, por lo que se puede inferir que ambas pruebas cumplen con el hecho de que al aumentar el tiempo de sumersión aumenta el contenido total de flavonoides.

C. Determinación de capacidad antioxidantes DPPH

La cuantificación de la capacidad antioxidante de los extractos acuoso del té Chirrepeco en diferentes tiempos de sumersión se llevó a cabo por el método del radical DPPH, en la Figura 12 se observa la curva de calibración con un $R^2 = 0.9926$ haciendo uso del ácido ascórbico como estándar, este al estar a uno muestra que es un buen modelo para relacionar la absorbancia y los mg de ácido ascórbico/mL. La Figura 13 nos da una representación del porcentaje de captura de radicales libres para cada extracto siendo el más alto el del tiempo 4 minutos con $83.9011\% \pm 3.8542\%$.

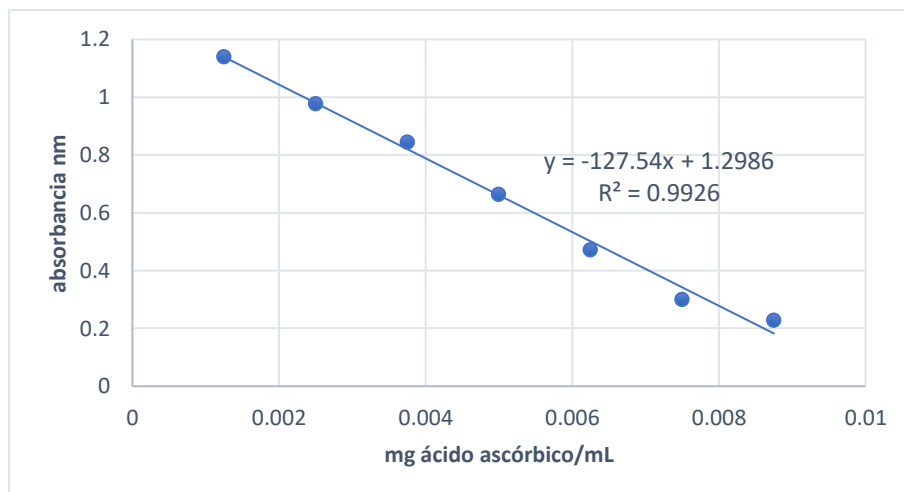


Figura 12. Curva de calibración de ácido ascórbico para método DPPH.

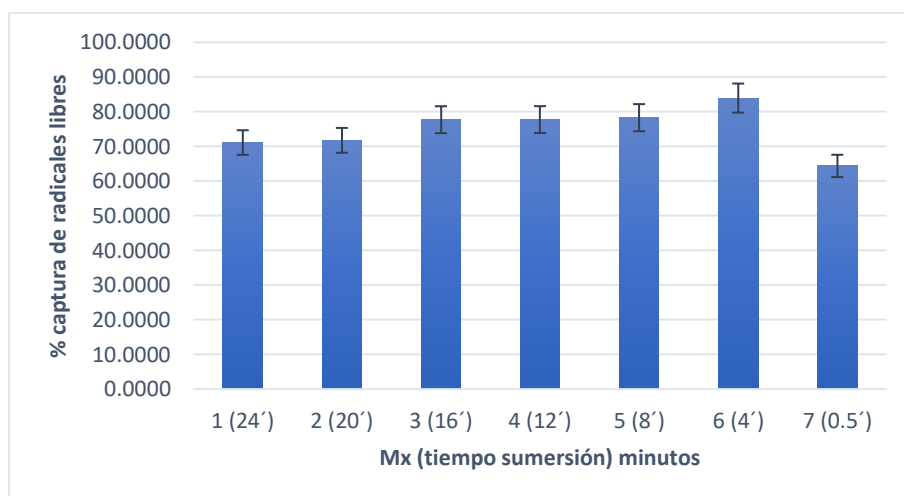


Figura 13. Porcentaje de captura de radicales libres en diferentes tiempos de sumersión. Mx= muestra. Las barras representan \pm desviación estándar de los experimentos realizados en triplicados.

Se determinó que el extracto con el IC50 menor fue el 6 con un tiempo de 4 minutos seguido del extracto 5 con 8 minutos. La Figura 15 muestra el mismo comportamiento ya que son los μ moles de ácido ascórbico equivalente por g de té necesarios para inhibir los radicales, usado para indicar la actividad antioxidante. Se obtuvo un valor de 735.4356 ± 32.5632 μ mol/g de té para el extracto 5 y 735.2877 ± 21.3564 μ mol/g de té para el extracto 6.

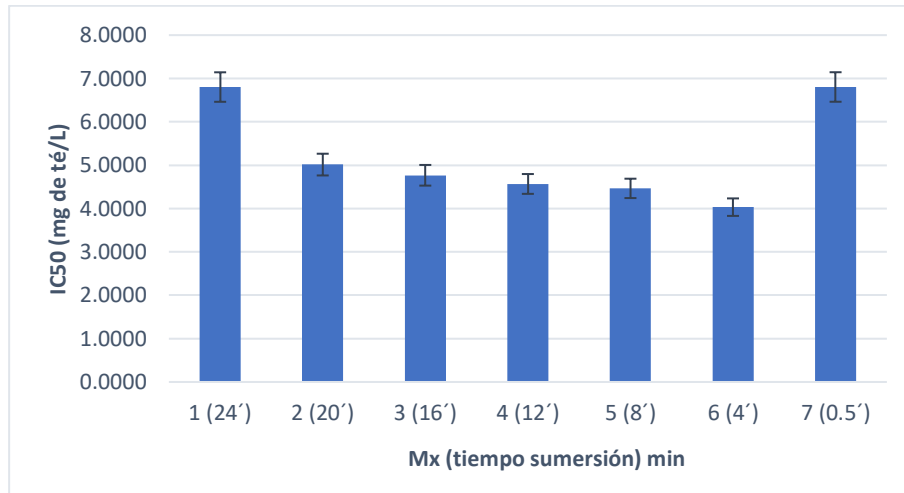


Figura 14. IC50 en diferentes tiempos de sumersión. Mx= muestra. Las barras representan \pm desviación estándar de los experimentos realizados en triplicados.

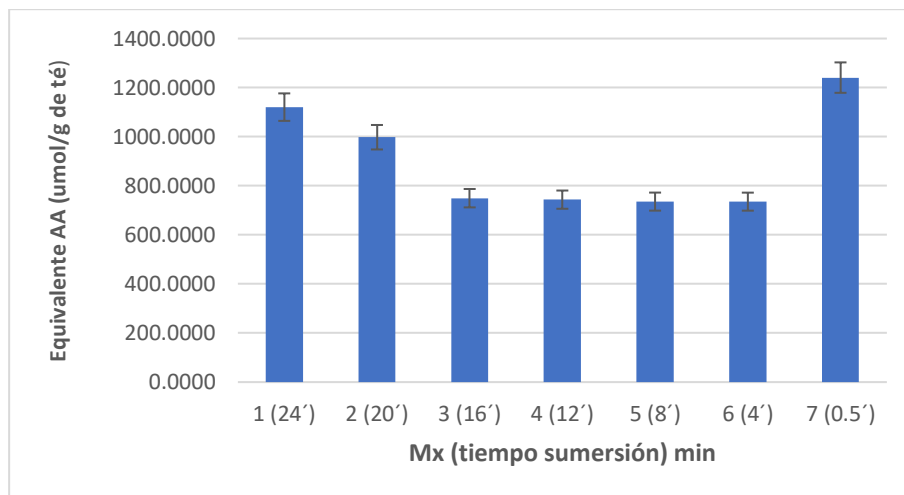


Figura 15. Equivalente de ácido ascórbico ($\mu\text{mol/g}$ de té) en diferentes tiempos de sumersión, las barras representan \pm s.d. de los experimentos realizados en triplicados.

Para el porcentaje de captura de radicales libres las muestras 1 y 2; 3 y 4 no mostraron una diferencia significativa entre ellas, las únicas con diferencia significativa fueron la muestra 5, 6 y 7 con un 95% de confianza, sin embargo, para el IC50 y el equivalente de ácido ascórbico (AA) los extractos 3, 4, 5 y 6; 1 y 7 no mostraron una diferencia significativa entre ellas, la única con diferencia significativa fue la muestra 2.

Cuadro 8. Media de porcentaje de captura de radicales libres, IC50 y equivalente de ácido ascórbico (AA) de té en diferentes tiempos

Mx (tiempo sumersión) minutos	% Captura radicales libres ± s.d.	Prueba Tukey post-hoc	IC50 (mg de té/L) ± s.d.	Prueba Tukey post-hoc	equivalente AA (umol/g de té) ± s.d.	Prueba Tukey post-hoc
1 (24´)	71.0825 ±1.0864	a	6.8025 ±0.0667	a	1120.441 ± 60.5356	a
2 (20´)	71.7184 ±2.8001	a	5.0139 ±0.0560	b	997.7867 ±50.8521	b
3 (16´)	77.6684 ±4.6323	b	4.7676 ±0.0067	c	749.4229 ±27.4215	c
4 (12´)	77.6937 ±1.0298	b	4.5676 ±0.0200	c	743.4229 ±38.6317	c
5 (8´)	78.2488 ±3.4315	c	4.465 ±0.00670	c	735.4356 ±32.5632	c
6 (4´)	83.9011 ±3.8542	d	4.0322 ±0.2000	c	735.2877 ±21.3564	c
7 (0.5´)	64.3452 ±1.0245	e	6.8039 ±0.0200	a	1240.7183 ±57.7514	a

(Elaboración propia) Los valores con la misma letra no son significativamente diferentes (P <0.05) (media para muestras por triplicado), s.d.= desviación estándar, Mx=muestra.

Conociendo que el IC50 indica la concentración a la cual los antioxidantes del té inhiben el 50% de radicales DPPH (Márquez *et al*, 2014) y los $\mu\text{mol/g}$ de té son su equivalente como ácido ascórbico se espera que ambos posean una relación inversamente proporcional con el porcentaje de captura de radicales libre. Es decir, a mayor porcentaje de captura de radicales libres se espera que se necesite menos concentración de té para inhibirlos.

Chamira y Preethi, 2015 determinaron a partir del análisis DPPH que la actividad antioxidante del té negro aumentaba acorde al tiempo de sumersión. En este estudio no fue el caso ya que la muestra 6 con cuatro minutos de extracción fue la que mayor porcentaje de captura de radicales libres obtuvo y a partir de ella este porcentaje en las muestras fue disminuyendo. Esto pudo haber ocurrido porque al estar extrayendo mecánicamente por más tiempo los metabolitos del té, es posible la oxidación de estos al estar en contacto con el oxígeno, observando así el comportamiento inverso. De ser esta la razón puede que, para el extracto de medio minuto, este tiempo no fue suficiente para obtener un buen porcentaje de captura de radicales (Cleverdon, 2018).

D. Correlación de IC50 con polifenoles y flavonoides totales

Como se ha mencionado en los análisis anteriores a mayor tiempo de sumersión se espera un aumento en los tres parámetros analizados, lo cual ocurrió para los flavonoides y polifenoles totales, en cambio el IC50 no sigue este comportamiento. A pesar de ello se obtuvo un coeficiente de correlación de 0.8879 entre IC50 y los mg de ácido gálico equivalente por g de té y un r de 0.8465 entre IC50 y los mg de quercetina equivalente por g de té, ambas correlaciones indicando relación inversamente proporcional, pero hay que tomar en cuenta que una alta correlación no indica causalidad, lo cual es contundente ya que la actividad antioxidante no se debe solamente a este grupo de metabolitos (García, R. *et. al.*, 2019). Cabe mencionar que el análisis de determinación de actividad antioxidante se realizó en dos días por lo que eso pudo provocar la discrepancia en los resultados; por trabajar con dos soluciones de DPPH distintas por día y que la preparación de estas llevo más tiempo para que estuvieran completamente disueltas.

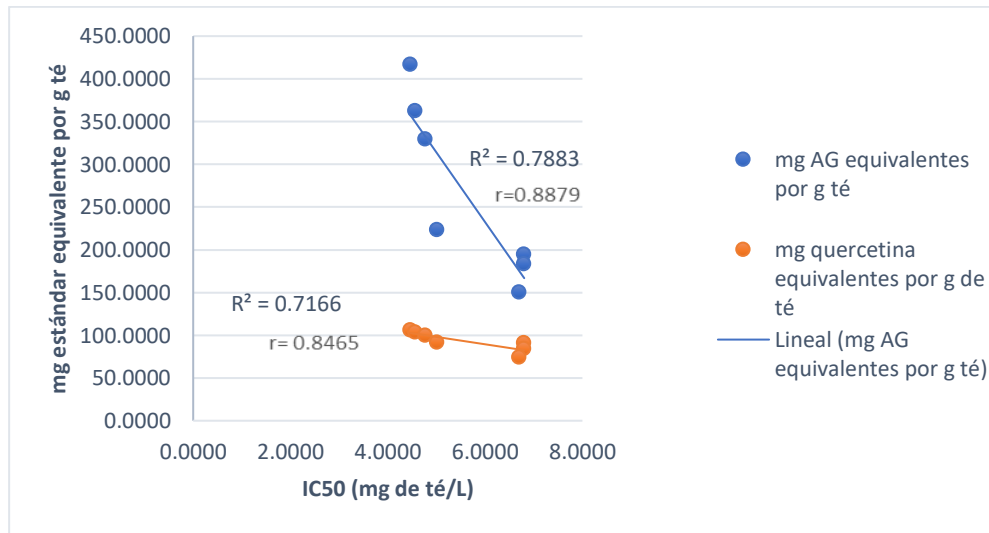


Figura 16. Correlación entre IC50 con mg ácido gálico (AG) equivalentes por g de té y mg quercetina equivalentes por g de té en diferentes tiempos de sumersión

La primera hipótesis planteada se acepta ya que todos los extractos acuosos de tiempo de sumersión de 0.5 a 24 minutos de té negro Chirrepeco poseen un contenido total de flavonoides mayor a 50 mg equivalentes de quercetina por g de té y un contenido mayor de polifenoles mayor a 100 mg equivalentes de ácido gálico por g de té, además tienen un porcentaje de captura de radicales libres mayor al 60%.

La segunda hipótesis no se acepta porque a pesar de que a mayor tiempo de sumersión del té negro se observó un aumento en el contenido total de flavonoides (mg equivalentes de quercetina por g de té) y polifenoles (mg equivalentes de ácido gálico por g de té), el porcentaje de captura de radicales libres tuvo un comportamiento contrario de: a mayor tiempo de sumersión menor capacidad antioxidante.

VIII. CONCLUSIONES

Dado que el té es una de las principales bebidas consumidas en todo el mundo, se valora mucho el estudio de la preparación del té sobre la capacidad de varios fitoconstituyentes beneficiosos para la salud. En este estudio se determinó:

La presencia de flavonoles y flavonas en los siete extractos acuosos a través de la prueba cualitativa de Shinoda. A través del método de cloruro de aluminio se determinó que las concentraciones de flavonoides totales variaron de 74.0904 ± 0.0006 mg/g té a 106.1898 ± 0.0034 mg/g té.

Las concentraciones de los polifenoles totales en los extractos acuosos de té Chirrepeco determinados a través del método Folin-Ciocalteu variaron de 150.49020 ± 0.1321 mg/g de té a 416.8949 ± 0.0867 mg/g de té.

Ambas correlaciones entre IC50 con los polifenoles y flavonoides totales mostraron una relación indirectamente proporcional, siempre tomando en cuenta que una alta correlación no indica causalidad.

El porcentaje de captura de radicales libres más alto en los extractos fue el del tiempo 4 con $83.9011\% \pm 3.8542\%$. Sin embargo, se observó una disminución en el porcentaje de captura de radicales libres a mayor tiempo de sumersión rechazando así la segunda hipótesis a pesar de que el contenido total de flavonoides (mg equivalentes de quercetina por g de té) y polifenoles (mg equivalentes de ácido gálico por g de té) aumentara a mayor tiempo de sumersión del té negro.

Se acepta la primera hipótesis ya que todos los extractos acuosos de tiempo de sumersión de 0.5 a 24 minutos de té negro Chirrepeco poseen un contenido total de flavonoides mayor a 50 mg equivalentes de quercetina por g de té y un contenido mayor de polifenoles mayor a 100 mg equivalentes de ácido gálico por g de té, además tienen un porcentaje de captura de radicales libres mayor al 60%.

IX. RECOMENDACIONES

Actualmente no hay una referencia del consumo dietético (DRI) o dosis diaria de flavonoides y polifenoles. A pesar de que no son esenciales para el crecimiento y desarrollo su presencia en la dieta puede reducir el riesgo de enfermedades crónicas (Birt y Jeffery, 2013). Por ello con los resultados de este estudio se recomienda un tiempo de sumersión de 4 a 8 minutos ya que poseen el mayor de captura de radicales libres y posee un buen contenido de polifenoles y flavonoides totales.

Para el análisis de correlación entre el IC50 con polifenoles y flavonoides totales se puede tomar en cuenta realizar un análisis con otras líneas de tendencia como polinómica o potencial para comprar el mejor ajuste a los resultados obtenidos.

Es necesario hacer más estudios ya que los tres parámetros analizados también se ven influenciados por la intensidad de mezcla para la extracción, tamaño de la hoja, temperatura, proporción agua/hoja de té las cuales son algunas variables para tomar en cuenta. Así se lograría recabar más información y disfrutar el máximo beneficio de esta bebida.

Además, es importante para futuros estudios tomar en cuenta las condiciones a las cuales las muestras son cosechadas y producidas para recabar información más precias y hacer los análisis con más variables.

X. BIBLIOGRAFÍA

- Anesini, C., Ferraro, G. E., & Filip, R. (2008). *Total Polyphenol Content and Antioxidant Capacity of Commercially Available Tea (Camellia sinensis) in Argentina*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(19), 9225–9229. <https://doi.org/10.1021/jf8022782>
- Astill, C., Birch, M. R., Dacombe, C., Humphrey, P. G., & Martin, P. T. (2001). *Factors Affecting the Caffeine and Polyphenol Contents of Black and Green Tea Infusions*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(11), 5340–5347. <https://doi.org/10.1021/jf010759>
- Birt, D. F., & Jeffery, E. (2013). *Flavonoids*. *Advances in nutrition* (Bethesda, Md.), 4(5), 576–577.
- Cardet, F. (2011). *Caracterización de la composición fenólica y capacidad antioxidante del té (camellia sinensis) en productos de diferentes marcas comercializadas en Chile*. Tesis de Universidad de Chile. Santiago, Chile. 32 págs.
- Chamira, D., & Preethi, S. (2015). *Extraction Kinetics of phytochemicals and antioxidant activity during black tea (Camellia sinensis L.) brewing*. *Nutrition Journal*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/s12937-015-0060-x>
- Chan, E., Lim, Y., & Chew, Y. (2007). *Antioxidant activity of Camellia sinensis leaves and tea from a lowland plantation in Malaysia*. *Food Chemistry*, 102(4), 1214–1222. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.07.009>
- Chen, H.; Ho, T. (2007). *Comparative Study on Total Polyphenol Content and Total Antioxidant Activity of Tea (Camellia sinensis)*. In *Antioxidant Measurement and Applications*. ACS Symposium Series 956. American Chemical Society: Washington, DC, pp 195-214.
- Cleverdon, R., Elhalaby, Y., McAlpine, M., Gittings, W., & Ward, W. (2018). *Total Polyphenol Content and Antioxidant Capacity of Tea Bags: Comparison of Black, Green, Red Rooibos, Chamomile and Peppermint over Different Steep Times*. *Beverages*, 4(1), 15. <https://doi.org/10.3390/beverages4010015>
- Cooperativa Chirrepec. (2020). *Té Chirrepeco*. Extraído de <http://www.techirrepeco.com.gt/historia.html>
- Curtis, W. (1807). *Camellia sinensis* (L.) Kuntze. United States of America. Curtis's botanical magazine. Vol.25

- Demain, A., & Fang, A. (2000). *The natural functions of secondary metabolites. Advances in biochemical engineering/biotechnology*, 69, 1–39.
- Domínguez, L. (2012). *Efectos de la aplicación del extracto hidroalcohólico de flores de Calendula (Calendula officinalis) en la estabilización del color y vida útil en pulpa de frutas*. Tesis Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia. 135 págs.
- Dora Avella, Christopher García, Arturo Mendoza Cisneros. (2008). *Medición de Fenoles y Actividad Antioxidante en Malezas Usadas para Alimentación Animal*. Universidad Autónoma de Querétaro 1108-1 a 1108-5.
- Fajardo, Anyuri & Arroyo Rivera, Álvaro & Ramírez-Navas, Juan. (2016). *Extracción de flavonoides totales de la envoltura externa de cebolla roja (Allium cepa)*. *UGCiencia*, 22(1), 119. <https://doi.org/10.18634/ugcj.22v.1i.599>
- Gallegos-Zurita, M., & Gallegos-Z, D. (2017). *Plantas medicinales utilizadas en el tratamiento de enfermedades de la piel en comunidades rurales de la provincia de Los Ríos – Ecuador*. *Anales de la Facultad de Medicina*, 78(3), 315-321. <https://doi.org/10.15381/anales.v78i3.13767>
- García, R. et al. (2019). *Correlación: no toda correlación implica causalidad*. *Revista Alergia México*, 66(3), 354-360. <https://doi.org/10.29262/ram.v66i3.651>
- Hodgson, J, Croft, K. (2010). *Tea flavonoids and cardiovascular health*. *Molecular Aspects of Medicine*, 31(6), 495–502. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2010.09.004>
- Huang, H., Shi, C., Liu, Y., Mao, S. Y., & Gao, L. Z. (2014). *Thirteen Camelliachloroplast genome sequences determined by high-throughput sequencing: genome structure and phylogenetic relationships*. *BMC Evolutionary Biology*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2148-14-151>
- Ibraín Reyes et al. (2014). *Plantas medicinales de interés estomatológico*. Cuba: Tesis de Universidad de Ciencias Médicas de Granma. 53(256): 79-98
- Johnson, E. L., et al. (1997). *Leaf Flavonoids as Chemotaxonomic Markers for Two Erythroxylum Taxa*. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 52(9–10), 577–585. <https://doi.org/10.1515/znc-1997-9-1004>
- Limon, D. et al. (2010). *Los flavonoides: mecanismo de acción, neuroprotección y efectos farmacológicos*. *Mensaje bioquímico*. 34(1) 143-154.
- López, L. (2002). *El té verde*. *Offarm*. Vol. 21 (5). P. 129-132
- Márquez, C. et al. (2014). *Actividad antioxidante y concentración de compuestos fenólicos del tomate de árbol (Cyphomandra betacea s.) en poscosecha*. *Temas Agrarios*, 19(2) 173-184. <https://doi.org/10.21897/rta.v19i2.732>
- Martínez, A. 2005. *Flavonoides*. Universidad de Antioquía; Ed: MEDELLIN; 76 págs.
- Martínez, E., Segovia, F., López, A. (2015). *Determinación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu*. *Departamento de Tecnología de Alimentos*. Universidad Politécnica de Valencia.

- Mierziak. *et al.* (2014). *Flavonoids as Important Molecules of Plant Interactions with the Environment*. *Molecules*, 19(10), 16240–16265. <https://doi.org/10.3390/molecules191016240>
- Min Tianlu, Bruce Bartholomew. (1887). *Hippocastanaceae through Theaceae, Camellia sinensis*. Extraído de http://www.efloras.org/florataxon.aspx?flora_id=2&taxon_id=200014043
- Nikniaz, Z., *et al.* (2016). *Effect of different brewing times on antioxidant activity and polyphenol content of loosely packed and bagged black teas (Camellia sinensis L.)*. *Avicenna journal of phytomedicine*, 6(3), 313–321.
- Pal, *et al.* (2013). *Effect of infusion time and consecutive brewing on antioxidant status of black tea infusion*. *International Journal of Tea Science*, 9(2–3), 65–68
- Nimal Punyasiri, N. *et al.* (2015). *New Sample Preparation Method for Quantification of Phenolic Compounds of Tea (Camellia sinensis L. Kuntze): A Polyphenol Rich Plant*. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 2015, 1–6. <https://doi.org/10.1155/2015/964341>
- Pereira, V. *et al.* (2014). *Determination of phenolic compounds and antioxidant activity of green, black and white teas of Camellia sinensis (L.) Kuntze, Theaceae*. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 16(3), 490–498.
- Pérez, N., & Jiménez, E. (2011). *Producción de metabolitos secundarios de plantas mediante el cultivo in vitro*. *Biotecnología Vegetal*, 11(4), 195–211
- Pou, Y. Jolvis, K. (2016). *Fermentation: The Key Step in the Processing of Black Tea*. *Journal of Biosystems Engineering*, 41. 85–92. 10.5307/JBE.2016.41.2.085.
- Ramdani D, *et al.* (2013). *Chemical composition, plant secondary metabolites, and minerals of green and black teas and the effect of different tea-to-water ratios during their extraction on the composition of their spent leaves as potential additives for ruminants*. *J Agric Food Chem*, 61(20), 4961–4967.
- Ramos, Ana. (2016). *Análisis fitoquímico, determinación cualitativa y cuantitativa de flavonoides y taninos, actividad antioxidante, antimicrobiana de las hojas de “Muehlenbeckia hastulata (J.E.Sm) I.M. Johnst” de la zona de Yucay (Cusco)*. Tesis de universidad nacional mayor de san marcos. Lima, Perú. 96 págs.
- Rengifo Z., Diana R. (2018). *Estudio fitoquímico cualitativo preliminar y cuantificación de flavonoides y taninos del extracto etanólico de hojas de Desmodium vargasianum Schubert*. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 84(2), 175–182.
- Rodríguez, L., Portillo, C. (2013). *Determinación de fenoles, flavonoides y capacidad antioxidante en melaza, azúcar blanco y moreno en el Ingenio chaparrastique por el método de espectrofotometría ultravioleta-visible*. Tesis de Universidad de El Salvador. 130 págs.
- Sadeer, Nabeelah *et al.* (2020). *The Versatility of Antioxidant Assays in Food Science and Safety-Chemistry, Applications, Strengths, and Limitations*. *Antioxidants*, 9(8), 709. <https://doi.org/10.3390/antiox9080709>

- Schillinger L. Ban-Koffi C. (2010). *Tea, Coffee and Cacao*. In *Fermented Foods and Beverages of the World*, (J. P. Tamang and K. Kailasapathy, eds.). *CRC Press; New York*. p. 353–375
- Sun, H. *et al.* (2014). *Effect of fermentation on the antioxidant activity in plant-based foods*. *Food chemistry*. 160C. 346-356.
- Sun, S. *et al.* (2013). *Active extracts of black tea (Camellia Sinensis) induce apoptosis of PC-3 prostate cancer cells via mitochondrial dysfunction*. *Oncology Reports*, 30, 763-772.
- Wittig de Penna, *et al.* (2005). *Caracterización sensorial y química de la calidad de TÉS (Thea sinensis) consumidos en Chile*. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 55(1), 93-100
- Yadav K. *et al.* (2020). *Phytochemicals and Quality of Green and Black Teas from Different Clones of Tea Plant*. *Journal of Food Quality*, 2020, 1-13. <https://doi.org/10.1155/2020/8874271>
- Yu, X, *et al.* (2017). *Insights into the historical assembly of East Asian subtropical evergreen broadleaved forests revealed by the temporal history of the tea family*. *New Phytologist*, 215(3), 1235–1248. <https://doi.org/10.1111/nph.14683>
- Zhang, W. *et al.* (2014). *Molecular phylogeny of tribe Theeae (Theaceae s.s.) and its implications for generic delimitation*. *PLoS ONE*, 9(5), e98133. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098133>

XI. ANEXOS

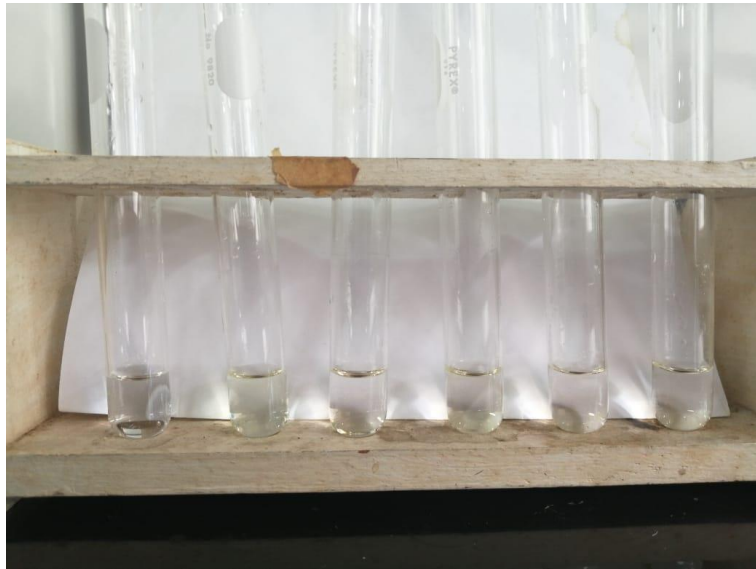


Figura 17. Prueba Shinoda antes de verter HCL control negativo, control positivo y extractos de izquierda a derecha.

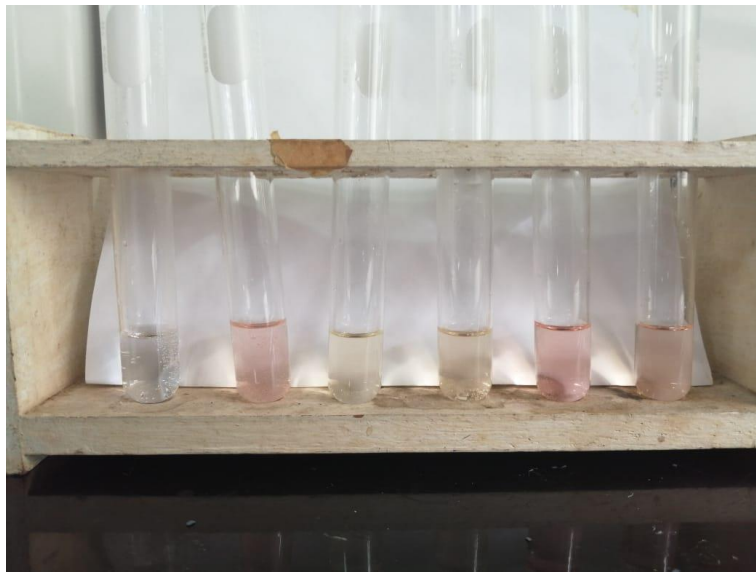


Figura 18. Prueba Shinoda después de verter HCL control negativo, control positivo y extracto 7 al 4 de izquierda a derecha.



Figura 19. Prueba Shinoda después de verter HCL control negativo, control positivo y extracto 4 al 1 de izquierda a derecha.



Figura 20. Prueba polifenoles antes de 45 minutos de lectura de absorbancia



Figura 21. Prueba polifenoles después de 45 minutos de lectura de absorbancia.



Figura 22. Prueba flavonoides antes de 45 minutos de lectura de absorbancia.

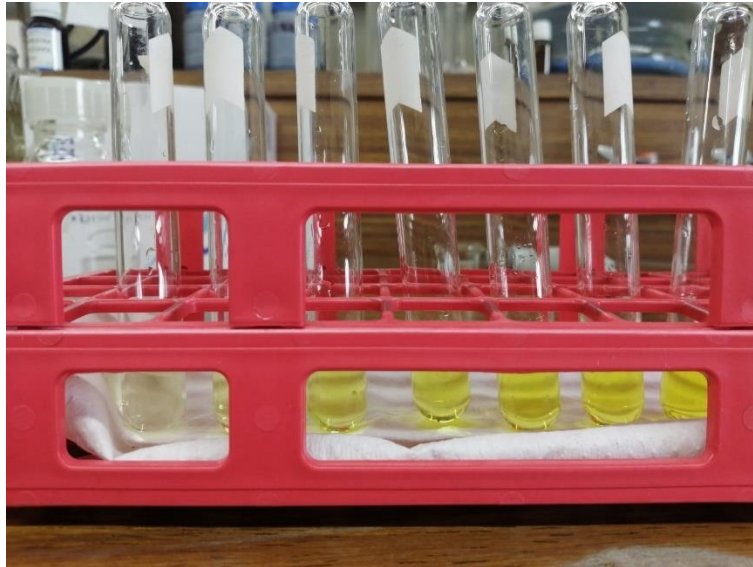


Figura 23. Prueba flavonoides después de 45 minutos de lectura de absorbancia.

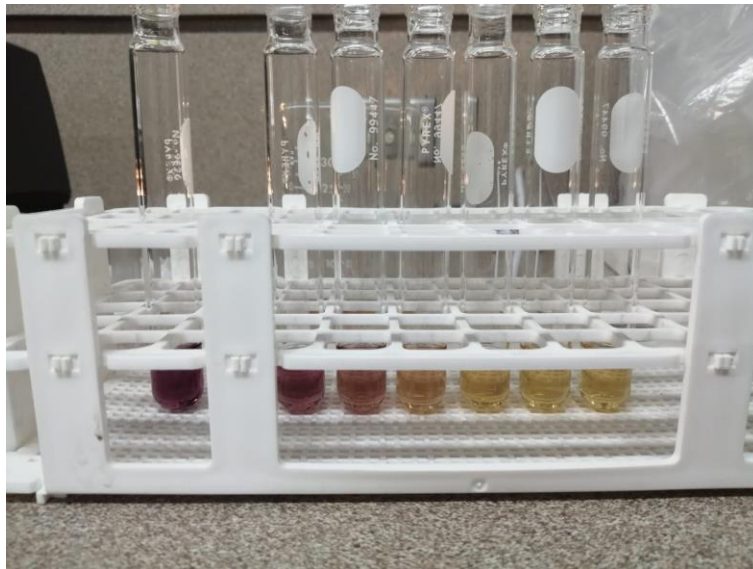


Figura 24. Prueba DPPH antes de 45 minutos de lectura de absorbancia.



Figura 25. Prueba DPPH después de 45 minutos de lectura de absorbancia.