



---

**Universidad de Valladolid**

Facultad de Ciencias

## **TRABAJO FIN DE GRADO**

Grado en Química

**Determinación de la capacidad antioxidante de infusiones**

*Autora: Sofía López Ayúcar*

*Tutora: Laura Toribio Recio*



Agradezco a mi tutora, la Dra. Laura Toribio Recio, la ayuda, dedicación y paciencia recibidas durante la realización de este trabajo. De igual forma, expreso mi agradecimiento a los profesores del Grupo de Investigación TESEA (I.U. CINQUIMA) del Departamento de Química Analítica por sus enseñanzas.

Hago extensivo mi agradecimiento a mis compañeros de laboratorio y a Mario Martínez Cuéllar por el apoyo incondicional recibido.

Dedico este trabajo a mi familia, por la confianza depositada en mí y el apoyo ilimitado recibido en todo momento, y a mis amigos, por alentarme a seguir adelante en todo momento.

**ÍNDICE**

<b>1. Resumen</b> .....	1
<b>2. Abstract</b> .....	2
<b>3. Introducción y antecedentes bibliográficos</b> .....	3
<b>3.1. Propiedades de los distintos tipos de té</b> .....	3
<b>3.2. Propiedades de la infusión de frutos del bosque</b> .....	6
<b>3.3. Antioxidantes</b> .....	7
<b>3.4. Capacidad antioxidante y su determinación</b> .....	9
<b>3.4.1. Método DPPH</b> .....	10
<b>3.4.2. Método ABTS</b> .....	12
<b>3.5. Polifenoles</b> .....	14
<b>3.6. Determinación del contenido fenólico total</b> .....	15
<b>3.7. Cromatografía de fluidos supercríticos (SFC)</b> .....	16
<b>4. Objetivos y plan de trabajo</b> .....	19
<b>5. Experimental</b> .....	20
<b>5.1. Equipos</b> .....	20
<b>5.2. Material y reactivos</b> .....	22
<b>5.3. Muestras</b> .....	23
<b>5.4. Columna cromatográfica</b> .....	24
<b>6. Resultados y discusión</b> .....	25
<b>6.1. Capacidad antioxidante de infusiones</b> .....	25
<b>6.1.1. Método DPPH</b> .....	25
<b>6.1.2. Método ABTS</b> .....	29
<b>6.2. Contenido fenólico total (TFC) de las infusiones</b> .....	34
<b>6.3. Determinación del contenido individualizado en polifenoles mediante cromatografía de fluidos supercríticos (SFC)</b> .....	37
<b>7. Conclusiones</b> .....	48
<b>8. Bibliografía</b> .....	49
<b>Abreviaturas</b> .....	52
<b>Listado de figuras y tablas</b> .....	54

## 1. Resumen

En este estudio se ha determinado la capacidad antioxidante de varias infusiones utilizando dos métodos diferentes, el ensayo DPPH y el ensayo ABTS. Se observó que se obtenían valores mayores con el método ABTS que con el DPPH, pero con ambos se obtuvo el mismo orden en cuanto a la capacidad antioxidante de las infusiones estudiadas, siendo el té verde el que presentó mayor capacidad antioxidante, luego el té negro con canela, seguido por el té negro, el té rojo y, por último, la infusión fría de frutos del bosque. También se probaron distintos tiempos de infusión y distintas temperaturas obteniéndose los mejores resultados cuando mayores eran ambos factores. Además se determinó el contenido fenólico total de las mismas utilizando el método Folin-Ciocalteu y se observó que existía una correlación entre el contenido fenólico y la capacidad antioxidante cuando se determinó mediante el método ABTS, pero no cuando se determinó con el método DPPH.

Por último, se trató de determinar alguno de los polifenoles presentes en las infusiones utilizando cromatografía de fluidos supercríticos (SFC).

## 2. Abstract

In this work the antioxidant capacity of several infusions was determined using two different methods, the DPPH assay and the ABTS assay. The ABTS assay provided higher values for the antioxidant capacity than the DPPH one, but in both cases the antioxidant capacity decreased in the order green tea>black tea with cinnamon> black tea> red tea >cold infusion of red fruits. Different infusion times and different temperatures were also tested, obtaining the best results for the highest time and temperature. In addition, the total phenolic content was determined using the Folin-Ciocalteu method and the results showed a correlation between the total phenolic content and the antioxidant capacity measured by using the ABTS method, but not by using the DPPH one.

Finally, the infusions were analysed using supercritical fluid chromatography in order to determine the individual polyphenols.

### **3. Introducción y antecedentes bibliográficos**

Las hierbas se han utilizado desde siempre tanto por sus propiedades culinarias como por su efectividad como medicamentos. Frecuentemente, se aconseja el consumo de medicinas basadas en infusiones de hierbas ya que presentan compuestos antioxidantes que previenen o retrasan la aparición de enfermedades crónicas relacionadas con la gran cantidad de especies reactivas de oxígeno (ROS) y otros radicales libres en el cuerpo [1].

Las infusiones son una de las bebidas más consumidas en el mundo. Desde el año 2500 a.C se empezaron a utilizar las hojas del té como bebida medicinal en China, y a partir de entonces se tomó como costumbre la práctica de preparar bebidas con hierbas mediante la acción del calor para extraer sus principios activos. Esto se debió a sus múltiples propiedades, las cuales beneficiaban al organismo. A día de hoy las infusiones siguen siendo una de las bebidas de mayor relevancia a causa de sus propiedades relajantes, antioxidantes y reconstituyentes, además de su agradable sabor y reconfortante aroma. Las propiedades medicinales de las hierbas y otras plantas se han investigado y se ha demostrado que presentan beneficios para la salud por su capacidad antioxidante, por ser anticancerígenas, antimutagénicas, antihipertensivas y por presentar baja toxicidad [2].

Entre las variedades más consumidas de infusiones de hierbas se encuentran la manzanilla, el romero, la menta, la tila, la valeriana y el té.

#### **3.1. Propiedades de los distintos tipos de té**

Como se ha mencionado anteriormente, los inicios del consumo del té datan del año 2500 a.C en China y su posterior llegada a Europa tuvo lugar en el siglo XVII. El té es una fuente de hidratación, ya que está formado por un 75-78% de agua. En el porcentaje restante se incluyen proteínas, aminoácidos, glúcidos, vitaminas, alcaloides, fenoles, pigmentos, lípidos, ácidos orgánicos, saponarias, esteroides y sustancias aromáticas. De estas sustancias depende el color, sabor, gusto y efecto medicinal del té [3].

La composición del té varía en función del tipo de té, la zona de cultivo, el procesado y la manipulación de las hojas. Además, la temperatura del agua a la que se infundona, el tiempo de infusión y el factor de exprimir o no la bolsa en la que se encuentra afecta en una mayor o menor presencia de los componentes activos del té.



El té contiene polifenoles, potentes antioxidantes que ayudan a evitar la oxidación de las células. Contiene varios tipos de polifenoles, pero los más abundantes son los flavonoides. Los principales flavonoides del té pertenecen a las sustancias conocidas como catequinas, cuyo papel antioxidante previene enfermedades cardiovasculares, reduce el riesgo de cáncer y retrasa el envejecimiento.

El té es un arbusto de hoja perenne cuyo nombre científico es *Camellia*. Este tiene dos variedades principales, la *Camellia Sinensis* y la *Camellia Assamica*. De la *Camellia Sinensis* se obtiene el té verde, mientras que la *Camellia Assamica* (de cultivo mayoritario) produce el té negro. Además de diferenciarse en la variedad de la que proceden, los distintos tipos de té se diferencian en el proceso de elaboración al que se somete cada uno, el cual le aporta unas peculiaridades en cuanto a sabor y composición. El té se elabora a partir de las hojas y brotes tiernos de la planta y, una vez recolectados, el proceso que sufren es diferente según el tipo de té que se quiere obtener. A continuación se presentan las principales diferencias entre las variedades de té [3].

- Té verde: es un té no fermentado. Justo después de su cosecha se secan las hojas de la planta, se enrollan y se cuecen al vapor, evitando así el proceso de oxidación. Entre sus características se puede mencionar que tiene gran poder antioxidante (debido en gran parte a catequinas y otros polifenoles). Es de color verde.



**Figura 1: té verde**

- Té blanco: no sufre proceso de oxidación, es un té no fermentado. Se puede mencionar que es el té más caro de producir (lo que no quiere decir que sea el proceso más largo). Está compuesto por hojas jóvenes que se dejan secar durante largos periodos de tiempo. Es de color verde pálido.



**Figura 2: té blanco**

- Té negro: es un té fermentado totalmente. Las hojas de *Camellia Assamica* tras sufrir el secado y macerado de las hojas pasan por un proceso de oxidación, en el que se deja que reaccionen sus componentes entre sí. Esto se conoce como fermentación aunque no participan levaduras ni bacterias en el mismo. Su aroma es mayor que el del resto, y lo mismo ocurre con el contenido en teína. Esto se debe al proceso de oxidación. Es de color marrón-rojizo oscuro.



**Figura 3: té negro**

- Té rojo: es un té semifermentado. Se consigue mediante un proceso de fermentación muy largo, de varios años, cuanto más años dure el proceso más beneficios aporta. Es de color rojizo.



**Figura 4: té rojo**

- Té Oolong: es un té de oxidación media. Su proceso de fermentación dura aproximadamente la mitad de tiempo que el del té negro. Por ello, presenta un sabor y unas características intermedias entre el té verde y el té negro. Es de color azul.



**Figura 5: té Oolong**

### **3.2. Propiedades de la infusión de frutos del bosque**

Entre los frutos del bosque se incluye un gran número de frutas caracterizadas por ser pequeñas, rojas y oscuras. Existe una gran variedad, entre los que destacan las frambuesas, los arándanos, las moras, las endrinas, las fresas y las grosellas. Es un grupo amplio pero muchos de estos frutos no se encuentran disponibles en todas las épocas del año, por eso se buscan alternativas para poder consumirlos. Una forma de hacerlo es mediante la fruta desecada, lo que permite que se puedan utilizar como infusión.

Lo más interesante de los frutos del bosque son sus propiedades beneficiosas para la salud. Entre estas propiedades destaca su alta capacidad antioxidante, debido a la presencia de flavonoides como las antocianinas, las cuáles neutralizan los radicales libres presentes evitando daños celulares y retrasando el envejecimiento. Además, son ricos en vitaminas, hierro y taninos.

Se puede mencionar que actualmente hay una “*discusión*” científica sobre si la capacidad antioxidante existente en la infusión de frutos del bosque es la misma que la presente en el alimento ingerido, pero, de cualquier modo, se sabe que la infusión presenta poder antioxidante aunque no sea en la misma medida.

Además de la capacidad antioxidante, los frutos rojos aportan vitaminas y producen efectos beneficiosos para la salud. Entre los más utilizados se encuentran: fresas, moras, arándanos, grosellas y frambuesas [4].



**Figura 6: frutos del bosque**

### 3.3. Antioxidantes

Los antioxidantes se pueden definir como sustancias que evitan la oxidación por parte de otras moléculas (como los radicales libres), retardándola o impidiéndola, lo que hace que presenten beneficios para la salud humana [5, 6].

Actualmente hay un gran interés por los antioxidantes y su incorporación en la dieta humana por los beneficios que aportan. Los efectos desfavorables causados por el estrés oxidativo en la salud constituyen un gran problema ya que bajo ese estrés el organismo produce más especies reactivas de oxígeno (ROS) (radicales) que antioxidantes enzimáticos (como la superóxido dismutasa (SOD)) y antioxidantes no enzimáticos (como las vitaminas C y E). Ese desequilibrio produce daño celular y ciertas enfermedades. Por ello se necesitan antioxidantes que contrarresten el estrés oxidativo que causa algunas enfermedades como la aterosclerosis, los trastornos neurodegenerativos, algunos tipos de cáncer, la inflamación crónica, la diabetes o las enfermedades cardiovasculares [7, 8].

Los antioxidantes se pueden producir de diversas formas. Habitualmente los antioxidantes son sintetizados por microorganismos, hongos y plantas. Estos se conocen como antioxidantes naturales. Otra forma de producirlos es la síntesis o biosíntesis de los mismos en la industria. Estos se conocen como antioxidantes sintéticos y se han desarrollado para añadirlos a los alimentos y poder incorporarlos con la dieta para aprovechar sus beneficios. Antioxidantes sintéticos como el butil-hidroxitolueno (BHT) o el butil-hidroxianisol (BHA) están en el punto de mira por sus posibles efectos adversos para la salud. Por ello ha aumentado el interés en los antioxidantes naturales, pero estos últimos también necesitan pruebas de seguridad y algunos tienen aplicaciones limitadas. Hay un tercer grupo de antioxidantes, los cuales son idénticos a los antioxidantes naturales que se encuentran en los alimentos, pero han sido sintetizados en la industria, por lo que combinan ventajas de los antioxidantes sintéticos y naturales. Estos son conocidos como antioxidantes idénticos a la naturaleza y son sustancias puras, fáciles de obtener, relativamente baratas y de propiedades reproducibles.

Hay estudios que demuestran que hay una relación inversa entre la aparición de enfermedades humanas y la incorporación de alimentos ricos en antioxidantes en la dieta [5, 7, 8, 9].

Los antioxidantes presentan distintas estructuras químicas y mecanismos de acción variados para prevenir o retardar los mecanismos de oxidación. Algunos ejemplos son las vitaminas C

y E, los carotenoides y los polifenoles [10]. Las principales fuentes de antioxidantes naturales en la dieta humana son los cereales, vegetales, frutas, legumbres, productos de cacao, bebidas (como el té o el café), hierbas y especias. Por otro lado, los antioxidantes naturales más habituales en las plantas son los ácidos fenólicos, antocianinas, taninos, flavonoides, lignanos y estilbenos [9].

En los sistemas biológicos se encuentran al menos cuatro fuentes principales de antioxidantes [11]:

- Enzimas: entre ellas la superóxido dismutada (SOD), glutatión peroxidasa y catalasa.
- Moléculas pequeñas: o antioxidantes de bajo peso molecular: como el ácido ascórbico, ácido úrico, polifenoles, carotenoides o tocoferoles.
- Moléculas grandes o antioxidantes de elevado peso molecular: entre ellas albúmina, ceruplasmina o ferritina.
- Hormonas: como la melatonina, angiotensina o estrógenos.

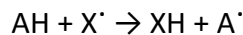
Como se ha mencionado anteriormente, los antioxidantes son inhibidores de la oxidación al actuar como captadores de radicales libres. El antioxidante actúa chocando con el radical libre y cediéndole un electrón, de modo que se oxida y se convierte en un radical libre no tóxico. Estos radicales están presentes en el organismo de forma endógena (como en la respiración mitocondrial o en mecanismos de defensa) o de forma exógena (por ejemplo a través de la dieta o del humo del tabaco). Un radical libre es una especie química de existencia independiente que presenta uno o más electrones desapareados en su estructura, por lo que es altamente reactivo y tiene una vida media muy corta. Son los responsables del daño oxidativo de macromoléculas como el ADN, proteínas, carbohidratos y lípidos, lo que hace que participen en los mecanismos de algunas enfermedades como las mencionadas anteriormente (cáncer, enfermedades neurodegenerativas, cardiovasculares, etc.). Estos radicales se conocen normalmente como especies reactivas del oxígeno (ROS) y hay muchos tipos distintos como los radicales superóxido ( $O_2^-$ ), hidróxilo ( $OH\cdot$ ), el óxido nítrico ( $NO\cdot$ ). También hay otros que no son propiamente radicales, como el oxígeno molecular ( $O_2$ ) [12].

### 3.4. Capacidad antioxidante y su determinación

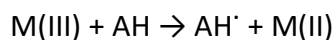
La función antioxidante es la habilidad que tiene un compuesto para inhibir la degradación oxidativa y se suele expresar como eficiencia, acción, potencial, poder, actividad o capacidad antioxidante (AC). Los mecanismos de actuación de los antioxidantes son muy diversos ya que dependen de factores como el tipo de antioxidante, la matriz y las condiciones de reacción. Además, la respuesta de los antioxidantes depende del tipo de radical con el que reaccionen. Ningún método refleja con precisión la forma de actuar de las distintas fuentes de radicales y los distintos antioxidantes. Debido a estas dificultades, un buen estudio de la capacidad antioxidante de una muestra debería incluir varios ensayos para determinarla [7].

Los métodos para evaluar la capacidad antioxidante se clasifican según su mecanismo de reacción [7, 11]:

- **Métodos basados en mecanismos de transferencia de átomos de hidrógeno (HAT):** miden la capacidad que presenta un antioxidante para captar radicales libres por donación de átomos de hidrógeno para formar compuestos estables. En este grupo se incluye el método ORAC (Oxygen radical absorbance capacity), TRAP (Total radical-trapping antioxidant parameter), TOSC (Total oxidant scavenging capacity) y métodos quimioluminiscentes entre otros.



- **Métodos basados en mecanismos de transferencia de un único electrón (SET):** miden la capacidad de un antioxidante para transferir un electrón y reducir cualquier compuesto (incluidos metales, carbonilos y radicales). En este grupo se incluye el método FRAP (Ferric reducing antioxidant power) y el método CUPRAC (Cupric ion reducing antioxidant capacity).



- **Métodos que pueden utilizar ambos mecanismos:** hay algunos métodos que suelen clasificarse dentro del mecanismo SET, pero que realmente pueden actuar por ambos mecanismos. En estos casos los radicales pueden ser captados por transferencia de átomos de hidrógeno o pueden ser neutralizados por transferencia de electrones, pudiendo ocurrir ambos mecanismos en paralelo, dominando uno u otro en función de las propiedades de antioxidantes y radicales, del medio y las condiciones de

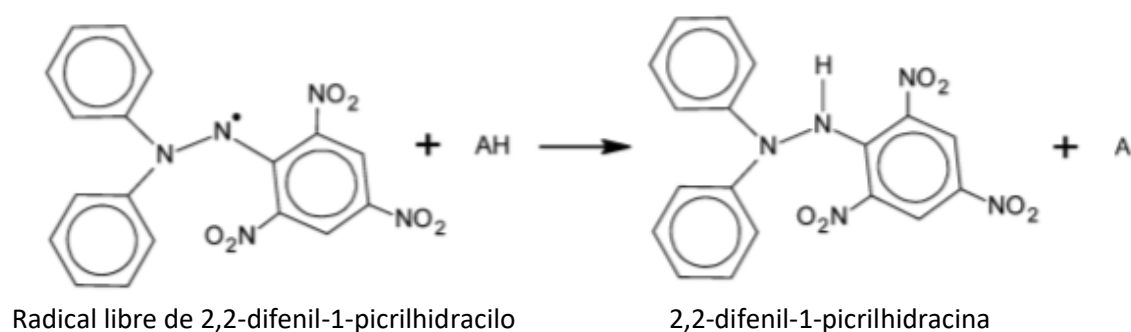
reacción. En este grupo se incluye el método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo) y el método ABTS (Ácido 2,2'azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)).

Se puede mencionar que la eficacia de los antioxidantes y el mecanismo que actúa vienen determinados por la energía de disociación del enlace y el potencial de ionización. Las reacciones SET normalmente son más lentas que las HAT, por lo que requieren tiempos más largos para completarse [11].

Como se ha mencionado anteriormente, ningún método refleja con precisión la forma de actuar de las distintas fuentes de radicales y los distintos antioxidantes, por lo que un buen estudio de la capacidad antioxidante de una muestra debería incluir varios ensayos que la determinen. En la bibliografía se han encontrado estudios en los que se determina la capacidad antioxidante de infusiones por el método FRAP [13], por el método CUPRAC [14], por el método DPPH [1, 2, 15, 16] y por el método ABTS [17, 18], siendo los dos últimos los más utilizados para su determinación, y los que se han empleado en este estudio.

### 3.4.1. Método DPPH

El método DPPH es uno de los más utilizados para determinar la capacidad antioxidante de los alimentos y bebidas. El radical DPPH<sup>•</sup> es un radical de nitrógeno orgánico estable que presenta una banda de absorción entre 515-538 nm y un color púrpura intenso. Se encuentra disponible comercialmente y no tiene que generarse antes del análisis como en otros ensayos (ABTS). Cuando una disolución de radical DPPH púrpura se mezcla con un compuesto antioxidante su color cambia a amarillo pálido ya que se forma la correspondiente hidracina (**Figura 7**). La capacidad reductora de los antioxidantes utilizando el DPPH puede evaluarse registrando la disminución de su absorbancia a 515-538 nm hasta que permanece constante. El ensayo de decoloración fue utilizado por primera vez por Brand-Williams y sus colaboradores en 1995 [7, 11, 19].



**Figura 7: reacción general entre el radical DPPH y los compuestos antioxidantes (AH)**

El DPPH se añade en exceso para evitar reacciones secundarias que interfieran en el color y el tiempo de reacción hasta que el valor de absorbancia es constante suele variar entre 5 y 180 minutos, en función del tipo de antioxidante.

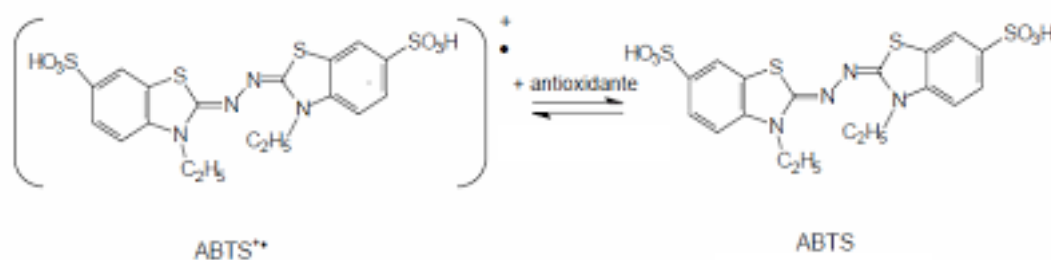
El resultado de la capacidad antioxidante se cuantifica a través de algún estándar como Trolox o vitamina C con unidades TEAC (micromoles o mg equivalentes de Trolox por 100 g) o como  $EC_{50}$ . La  $EC_{50}$  es la concentración eficiente al 50%, es decir, la concentración de antioxidantes necesaria para obtener el 50% de la reactividad (disminución de la absorbancia del radical DPPH al 50%). El tiempo necesario para alcanzar ese  $EC_{50}$  se denomina  $T_{EC_{50}}$  y permite clasificar los antioxidantes en rápidos (<5 min), intermedios (5-30 min) y lentos (>30 min). A partir de esto se determina la eficiencia antioxidante o antirradical (AE) como:  $AE=1/(EC_{50} \times T_{EC_{50}})$ .

Entre las ventajas del método se puede mencionar que es simple, rápido y únicamente necesita un espectrofotómetro UV-Vis para determinar la capacidad antioxidante. Entre las desventajas se puede comentar que el DPPH solo puede disolverse en medios orgánicos; puede dar problemas cuando se analizan compuestos que absorben en la región del visible 500-520 nm, ya que los espectros se superponen a los del DPPH (ocurre particularmente con los carotenoides); el radical DPPH tiene poca similitud con los radicales peroxilo altamente reactivos y transitorios involucrados en la peroxidación de lípidos, por lo que muchos antioxidantes que reaccionan rápidamente con los radicales peroxilo pueden reaccionar lentamente o ser inertes al DPPH debido a la inaccesibilidad estérica; y, por último, el DPPH es a la vez radical y oxidante, por lo que la pérdida de color puede deberse a una reacción radical (SET), a una reducción (HAT) o a alguna reacción secundaria [7, 11].



### 3.4.2. Método ABTS

El ensayo ABTS se basa en la capacidad de eliminación del radical  $ABTS^{\bullet+}$  por parte de los antioxidantes. El radical ABTS presenta un color azul intenso con una banda de absorción en torno a 734 nm. La capacidad antioxidante se mide a través de la disminución de la absorbancia a esa longitud de onda. El esquema de reacción se muestra en la **Figura 8**. Es un método ampliamente utilizado para determinar la capacidad antioxidante en alimentos [20] y bebidas [17, 18].



**Figura 8: reacción general entre el catión radical  $ABTS^{\bullet+}$  y los compuestos antioxidantes**

El radical puede ser formado por reacción enzimática (utilizando peroxidasas o mioglobina por ejemplo) o por reacción química (utilizando dióxido de manganeso ( $MnO_2$ ), persulfato potásico ( $K_2S_2O_8$ ) o radicales peroxil generados en la termólisis aeróbica del 2,2'-azobis(2-amidinopropano (AAPH)). En general, las reacciones químicas para formar el radical requieren mucho más tiempo (por ejemplo con el persulfato de potasio se necesitan hasta 16 horas) o altas temperaturas y las reacciones enzimáticas son mucho más rápidas y emplean condiciones más suaves [7, 11].

En cuanto a las reacciones químicas, los oxidantes más empleados son  $MnO_2$ , AAPH y  $K_2S_2O_8$  debido a que son los que presentan menos interferencias en la formación del radical. Entre estos tres, el persulfato potásico necesita más tiempo de reacción (12-16 horas) que cuando se utiliza dióxido de manganeso (formación instantánea) pero las medidas de la absorbancia son más sencillas con el persulfato, ya que con el dióxido de manganeso la estabilidad del radical formado es baja. Con el AAPH el radical formado presenta estabilidades diferentes en cada ocasión. Por ello, habitualmente se emplea persulfato potásico para la formación del radical. El radical estable se forma mezclando en agua una disolución de ABTS 7 mM con persulfato potásico, obteniéndose una concentración final de 2,45 mM. La mezcla se deja reaccionar en la oscuridad y a temperatura ambiente 12-16 horas y se obtiene el radical

(Figura 9). El radical será más estable cuanto mayor sea la relación ABTS/persulfato (valor entre 2 y 3), pero hay que tener en cuenta que su estabilidad es corta, durando aproximadamente dos días (lo que depende del oxidante y las condiciones de reacción y almacenamiento). Tras formarse el radical la disolución se diluye (en etanol o tampón fosfato) hasta que la absorbancia es de 0,7 ( $\pm 0,02$ ) a 734 nm y entonces se puede utilizar para determinar la capacidad antioxidante de las muestras, expresándola como TEAC (Capacidad Antioxidante Equivalente en Trolox) [21].



**Figura 9: formación del radical ABTS<sup>•+</sup> en presencia de persulfato potásico**

Entre las ventajas del método se puede mencionar que es un método simple utilizado con frecuencia, que el radical ABTS<sup>•+</sup> se puede solubilizar en medios acuosos y orgánicos y reacciona rápidamente con los antioxidantes (normalmente la reacción se completa en 30 minutos). Además se puede utilizar en un amplio rango de pH. Entre las desventajas se puede comentar que el tiempo de reacción varía en función de los antioxidantes y, por lo tanto, utilizar un punto final fijo de corta duración (4-6 minutos) puede dar lugar a valores falsos de la capacidad antioxidante y que el intervalo de concentraciones que se puede utilizar es relativamente pequeño ya que una concentración muy baja de antioxidantes produciría una disminución de la absorbancia muy pequeña que no podría ser medida y, por el otro lado, una elevada concentración de antioxidantes necesitaría demasiado ABTS y esto daría concentraciones muy altas [7, 11].

### 3.5. Polifenoles

Los polifenoles se definen químicamente como sustancias que poseen un anillo aromático que presenta uno o más sustituyentes hidroxilo (-OH). La mayor parte de los polifenoles contienen más de un grupo hidroxilo y son sustancias bioactivas con capacidad antioxidante que se encuentran en altas concentraciones en alimentos, como frutas, vegetales, cereales y chocolate, y en bebidas, como el té o el vino [22].

Los polifenoles son metabolitos secundarios producidos por las plantas en situaciones de estrés con fines de autoprotección y ejercen funciones importantes en la salud de los seres humanos debido a que son fuertes antioxidantes que neutralizan radicales libres por donación de un átomo de hidrógeno o de un electrón. Se ha demostrado científicamente que presentan beneficios para la salud humana debido a que previenen el estrés oxidativo, lo que disminuye las enfermedades cardiovasculares, cerebrovasculares y neurodegenerativas, el cáncer, la diabetes y el envejecimiento celular [23].

Los polifenoles constituyen un amplio grupo de sustancias que incluyen compuestos con estructuras muy diversas y frecuentemente se encuentran unidos a otras biomoléculas (azúcares en su mayoría). Se conocen más de 8000 estructuras fenólicas, de las cuales 4000 son flavonoides. Al ser un grupo tan diverso se puede dividir en varios subgrupos, siendo los ácidos fenólicos y los flavonoides los más abundantes en la naturaleza.

Los ácidos fenólicos son compuestos orgánicos que presentan un ácido carboxílico unido a un anillo fenólico formando esqueletos C1-C6 (derivados del ácido benzoico) o C3-C6 (derivados del ácido cinámico). Los flavonoides son compuestos orgánicos que presentan un esqueleto general C6-C3-C6, cuyas unidades C6 son anillos de naturaleza fenólica. Los flavonoides se dividen a su vez en distintos subgrupos en función a sus características [24].

Debido a la amplia diversidad de polifenoles y a su gran presencia en plantas, su extracción, separación, identificación y análisis puede ser llevada a cabo por distintos procedimientos, no hay ningún método estándar para ello. Las muestras deben prepararse y conservarse adecuadamente y, habitualmente, se secan, congelan o liofilizan antes de la extracción para evitar la degradación de los polifenoles. Los procedimientos más utilizados para los productos de origen vegetal son la extracción líquido-líquido y sólido-líquido debido a su eficiencia, facilidad de empleo y amplia aplicabilidad. Para la extracción se utilizan disolventes orgánicos o mezclas de disolventes orgánicos y acuosos. Otro factor importante es el pH, que debe ser

ácido en la mayoría de los casos ya que los polifenoles son más estables. Cuando los polifenoles se encuentran unidos a azúcares se lleva a cabo una hidrólisis ácida o enzimática, o una saponificación para poder determinar los polifenoles libres.

Hay métodos espectrofotométricos para estimar el contenido fenólico total, como el utilizado en este estudio, el cual es rápido y sencillo. Pero este no es específico para compuestos individuales, lo que hace necesario separar los polifenoles para poder identificarlos y cuantificarlos. Las técnicas más utilizadas para ello son la cromatografía de gases y la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), de las cuales se prefiere esta última debido a que en la primera se debe realizar una derivatización previa de los polifenoles para facilitar su volatilización. En HPLC se suele trabajar en fase inversa, empleando columnas C18 que varían entre 100 y 250 mm de longitud y entre 3 y 10  $\mu\text{m}$  de tamaño de partícula. Además, se suelen utilizar gradientes para la elución y fases móviles formadas por mezclas de disolventes orgánicos (acetonitrilo o metanol) y disoluciones acuosas de ácidos (acético, fórmico, etc.). Como detectores se suelen utilizar ultravioleta/visible (UV/VIS), fotodiodo array (PDA) y fluorescencia, pero últimamente se usa también la espectrometría de masas para muestras complejas. Por último, hay que mencionar que los tiempos de análisis suelen variar entre 30 y 40 minutos [25].

Hay que destacar que la cromatografía de fluidos supercríticos (SFC) es una opción estudiada en los últimos años para el análisis de polifenoles gracias a sus altas resoluciones y eficiencias, cortos tiempos de análisis y bajo consumo de disolventes. En SFC no hay una fase estacionaria de uso general como en HPLC, pero últimamente se están estudiando fases estacionarias polares aquirales para expandir su aplicabilidad [26].

### **3.6. Determinación del contenido fenólico total**

Uno de los métodos más utilizados para la determinación del contenido fenólico total es el ensayo Folin-Ciocalteu. Es un método colorimétrico basado en reacciones de transferencia de electrones entre los compuestos fenólicos y el reactivo de Folin-Ciocalteu (FCR), y el contenido fenólico se expresa respecto a algún patrón concreto (habitualmente ácido gálico). Este ensayo presenta un problema, no es específico para la determinación del contenido fenólico total, ya que hay otros compuestos no fenólicos (como los azúcares reductores o la vitamina C) que pueden formar parte de las muestras y pueden reducir el FCR, dando lugar a resultados incorrectos. Para solucionar este problema lo que se hace es ajustar el pH a  $\sim 10$

(básico), ya que los compuestos fenólicos solo reaccionan con FCR en estas condiciones, debido a que se produce el anión fenolato que reduce el FCR.

El ensayo FC se propuso para mejorar el diseño inicial de Folin y Denis destinado al análisis de proteínas, determinando su concentración total a través del contenido en tirosina (la cual contiene un grupo fenol). Años después, Singleton y Rossi modificaron este ensayo para aplicarlo al análisis de fenoles totales en vino y desde entonces se utiliza en muchas aplicaciones.

La naturaleza química exacta del reactivo Folin-Ciocalteu no se ha determinado, pero se cree que está compuesto por heteropolifosfowolframatos-molibdatos, lo que da lugar a una disolución de color amarillo intenso. La reacción que ocurre tiene lugar entre el reactivo y los polifenoles, de modo que se forma un compuesto de color azul relacionado con la concentración de polifenoles. Esta reacción también es desconocida debido a su complejidad, lo único que se sabe con certeza es que sucede mediante secuencias reversibles de reacciones de reducción. Entre el wolframio y el molibdeno se cree que este último es más fácil de reducir y, por lo tanto, la reacción de transferencia de electrones tiene lugar entre los polifenoles (reductor) y los molibdatos (VI) (oxidante) [6, 27].

A pesar de que la naturaleza química del FCR es desconocida, este método es simple y reproducible, lo que hace que sea utilizado habitualmente en el análisis de diferentes tipos de matrices, incluyendo las infusiones [1, 15, 16, 17].

### 3.7. Cromatografía de fluidos supercríticos (SFC)

La cromatografía de fluidos supercríticos (SFC) es una técnica intermedia entre la cromatografía de líquidos y la cromatografía de gases. En SFC, la fase móvil es un fluido supercrítico, es decir, un fluido con temperatura y presión por encima de los valores críticos (punto crítico). Entre las características de los fluidos supercríticos se puede destacar lo siguiente [28]:

- Su densidad, viscosidad y otras propiedades son intermedias entre las de un gas y un líquido, siendo la densidad más cercana a las del líquido y la viscosidad a la del gas. Esto se puede observar en la **Tabla 1**.
- En algunos casos, en los que los fluidos son gases en condiciones ambientales, se pueden recuperar con facilidad los analitos disueltos en ellos.
- Muchos de ellos son baratos, inocuos y no tóxicos.

**Tabla 1: comparación de las propiedades de fluidos supercríticos, gases y líquidos**

PROPIEDAD	GAS (1 atm, 25°C)	FLUIDO SUPERCRTICO	LÍQUIDO (1 atm, 25°C)
DENSIDAD (g/cm <sup>3</sup> )	$(0,6-2) \times 10^{-3}$	0,2-0,5	0,6-2
COEFICIENTE DE DIFUSIÓN (cm <sup>2</sup> /s)	$(1-4) \times 10^{-1}$	$10^{-3}-10^{-4}$	$(0,2-2) \times 10^{-5}$
VISCOSIDAD	$(1-3) \times 10^{-4}$	$(1-3) \times 10^{-4}$	$(0,2-3) \times 10^{-2}$

En comparación con la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), en SFC el mayor coeficiente de difusión y la menor viscosidad de la fase móvil permite utilizar flujos mayores, la transferencia de materia es más rápida (menores tiempos de retención) y la caída de presión a lo largo de la columna es menor. Esto hace que en SFC las separaciones sean más rápidas y eficaces [29, 30]. En comparación con la cromatografía de gases (GC), en SFC se pueden analizar compuestos no volátiles (o difíciles de volatilizar) y permite separar compuestos mucho más polares [31].

Hay muchos compuestos que se han empleado en SFC como fases móviles a lo largo del tiempo, como N<sub>2</sub>O, NH<sub>3</sub> o butano. Sin embargo, actualmente el CO<sub>2</sub> es el más utilizado como fase móvil. Esto es debido a que presenta una temperatura crítica de 31°C y una presión crítica de 72,9 atm (valores fácilmente alcanzables) y a que es un disolvente excelente para moléculas no polares, fácilmente disponible, barato, transparente en el ultravioleta, inoloro y no tóxico (GRAS, Generally Recognized As Safe). Esto se puede observar en la **Tabla 2** [28].

**Tabla 2: propiedades de algunos fluidos supercríticos**

FLUIDO	TEMPERATURA CRÍTICA (T <sub>c</sub> ), °C	PRESIÓN CRÍTICA (P <sub>c</sub> ), atm	DENSIDAD EN EL PUNTO CRÍTICO, g/mL
CO <sub>2</sub>	31,3	72,9	0,47
N <sub>2</sub> O	36,5	71,7	0,45
NH <sub>3</sub>	132,5	112,5	0,24
n-Butano	152,0	37,5	0,23

El CO<sub>2</sub> es un disolvente apolar, por lo que muchas veces se mezcla con algún disolvente orgánico miscible con él, denominado “modificador”, de este modo se pueden separar compuestos polares. Los modificadores más comunes son alcoholes como metanol o etanol. En algunas ocasiones el uso de los modificadores orgánicos no es suficiente para conseguir que eluyan los analitos con buenas formas de pico, por lo que se suele introducir en la fase móvil un componente denominado “aditivo”, el cual se incluye en concentraciones muy bajas. Estos aditivos que mejoran la forma y simetría de los picos cromatográficos pueden ser ácidos (como el ácido trifluoroacético (TFA)), bases (como la trietilamina (TEA)) o sales, aunque en menor frecuencia (formiato amónico normalmente). Hay que mencionar que las columnas utilizadas habitualmente en SFC son empaquetadas y las fases estacionarias suelen ser polares [32].

Son muy pocos los trabajos en los que se utiliza SFC para la separación de polifenoles, y en menor medida en muestras reales [33, 34].

## 4. Objetivos y plan de trabajo

El objetivo principal de este trabajo ha sido estudiar la capacidad antioxidante de diferentes tipos de infusiones (té verde, té negro, té rojo, té negro con canela e infusión fría de frutos del bosque), para ello se han empleado dos métodos distintos (DPPH y ABTS), y también se ha determinado el contenido fenólico total utilizando el método Folin-Ciocalteu.

Finalmente se ha utilizado la cromatografía de fluidos supercríticos con el fin de identificar y cuantificar individualmente los compuestos fenólicos presentes en dichas infusiones.

El plan de trabajo seguido para llevar a cabo el estudio ha sido el siguiente:

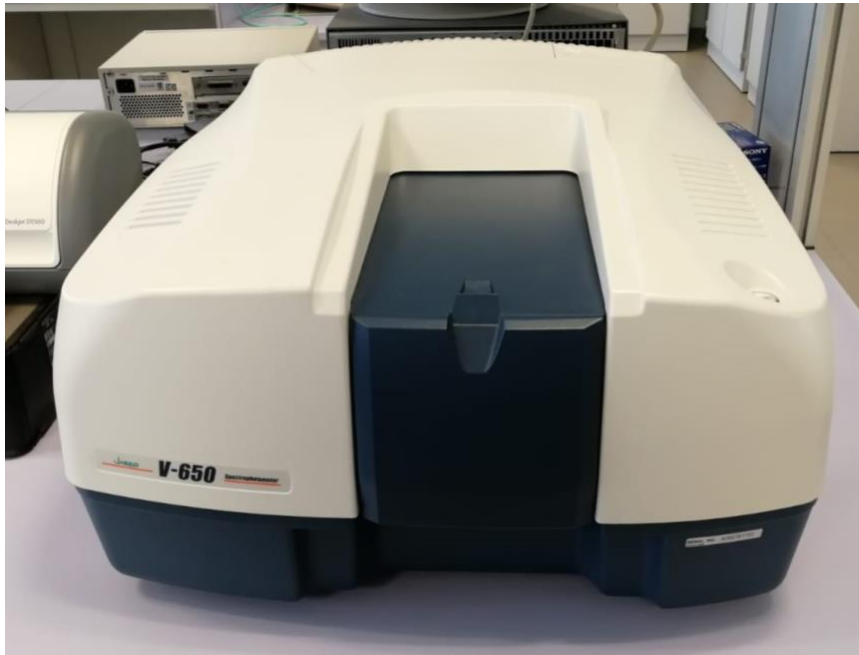
- Revisión de antecedentes bibliográficos relacionados con el tema a tratar para obtener los conocimientos requeridos.
- Aprendizaje de la utilización del espectrofotómetro de absorción molecular UV-Vis.
- Determinación de la capacidad antioxidante de las muestras mediante dos ensayos distintos: DPPH y ABTS.
- Comparación de resultados obtenidos mediante ambos métodos.
- Determinación del contenido fenólico total de las muestras mediante el método Folin-Ciocalteu.
- Observación de la posible correlación entre el contenido fenólico total obtenido para cada muestra, y su capacidad antioxidante.
- Aprendizaje de la utilización del equipo de cromatografía de fluidos supercríticos.
- Separación, identificación y cuantificación de los polifenoles presentes en las muestras mediante SFC.



## 5. Experimental

### 5.1. Equipos

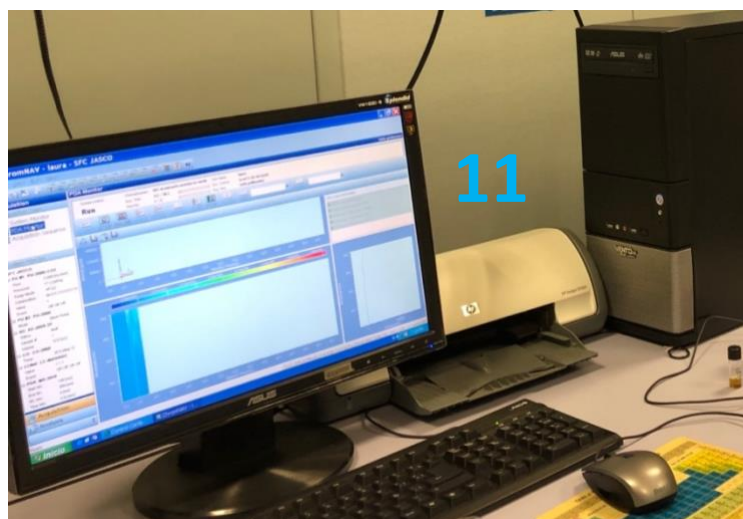
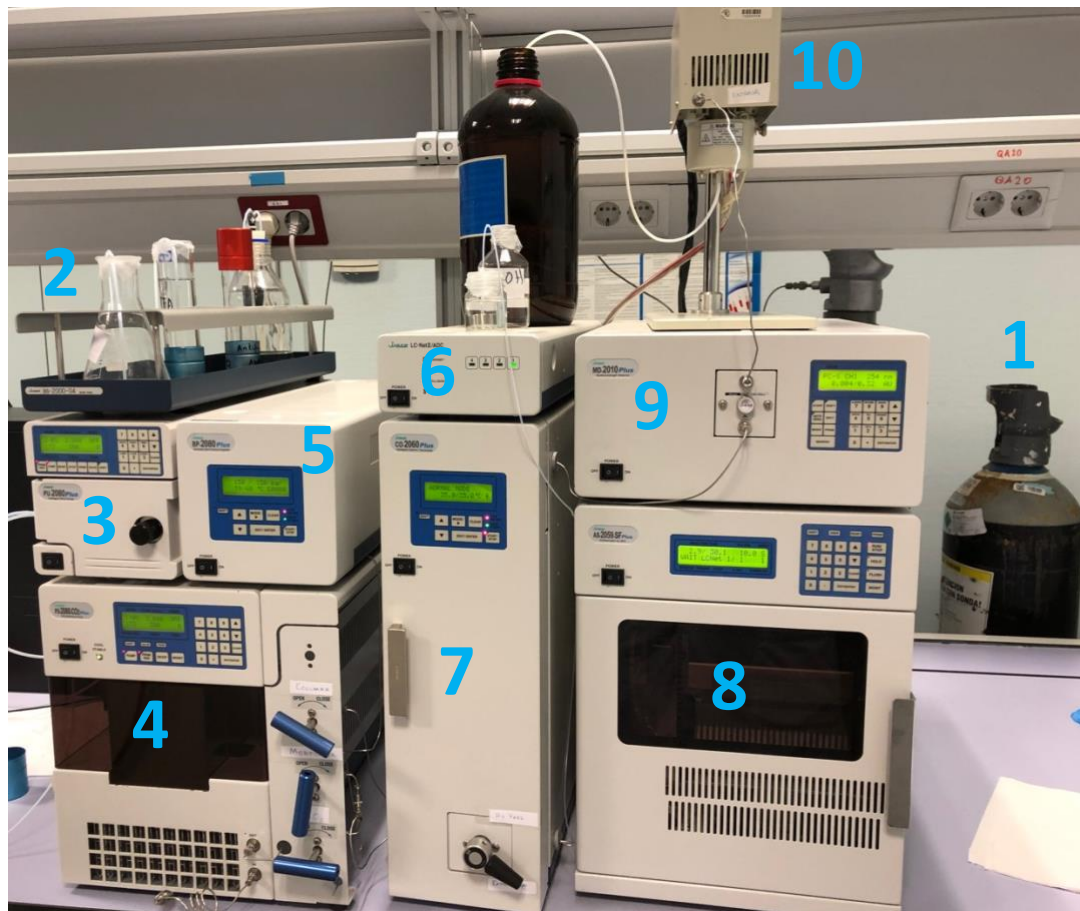
Se ha utilizado el espectrofotómetro V-650 de Jasco Corporation (Tokio, Japón) mostrado en la **Figura 10**.



**Figura 10: espectrofotómetro V-650**

El equipo mide el espectro de absorción molecular de una muestra en un rango de longitud de onda de 190 a 900 nm. Las fuentes de luz utilizadas son una lámpara de deuterio (D2) (187 a 350 nm) para la región UV, y una lámpara halógena (WI) (330 a 900 nm) para la región VIS/NIR.

El equipo de cromatografía de fluidos supercríticos utilizado fue el que se muestra en la **Figura 11** de Jasco (Tokio, Japón).



**Figura 11: equipo SFC**

El equipo está formado por los siguientes elementos:

- 1) Botella de CO<sub>2</sub> líquido ultrapuro (gas licuado), Premier tipo X40S – Carburos metálicos (Barcelona, España).
- 2) Soporte de recipientes para disolventes, Jasco BS – 2000 – 04.
- 3) Bomba de modificador orgánico, modelo Jasco PU – 2080 Plus.
- 4) Bomba CO<sub>2</sub> líquido, modelo Jasco PU – 2080 – CO2 Plus.
- 5) Y 10) Regulador de presión (automatic backpressure regulator), modelo Jasco BP – 2080 Plus.
- 6) Interfase electrónica, modelo Jasco LC – Net II/ADC.
- 7) Horno para columnas cromatográficas, modelo Jasco CO – 2060 Plus.
- 8) Inyector automático, modelo Jasco AS – 2059 – SF Plus.
- 9) Detector UV-Vis PDA, (UV-Vis photo diode array), modelo Jasco MD-2010 plus Multiwavelength detector.
- 11) Sistema de control, adquisición y tratamiento de datos cromatográficos. Software: ChromNAV 1.09.02.

## 5.2. Material y reactivos

El material y equipos adicionales empleados fueron los siguientes:

- Balanza analítica de precisión Mettler AE-240 (L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, España).
- pHmetro de Crison (L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, España).
- Agitador magnético IKA™.
- Centrifugadora de Eppendorf 5810R (Hamburgo, Alemania).
- Rotavapor R-3 de BUCHI.
- Baño de ultrasonidos de J.P Selecta (Barcelona, España).
- Microondas doméstico LG.
- Micropipetas Eppendorf, AG (Hamburgo, Alemania).
- Filtros de Nylon (0,45 µm) de Nalgene (Rochester, NY, USA).
- Material de laboratorio de uso general (vasos de precipitados, matraces aforados, pipetas de vidrio, probetas, pipetas Pasteur, viales cromatográficos, jeringuillas, termómetros, embudos, embudos de decantación, espátulas, vidrios de reloj, pesa-sustancias,...).

Los reactivos empleados en este estudio fueron:

- Metanol (MeOH), Hipersolv Chromanorm de VWR Chemicals (Barcelona, España) – 99% pureza (calidad HPLC).
- Etanol absoluto (EtOH), Panreac (Madrid, España) – 99,9% pureza (UV-IR-HPLC grade).
- Ácido trifluoroacético (TFA), Sigma-Aldrich Química (Madrid, España) – 98% pureza (calidad para análisis).
- Acetato de etilo calidad HPLC, Lab-Scan (Gliwice, Polonia) – 99,8% pureza.
- Ácido cítrico anhidro para análisis de Carlo Erba (Milán, Italia) – 99,5% pureza.
- Cloruro potásico para análisis de Merck (Darmstadt, Alemania).
- Reactivo Folin-Ciocalteu de Panreac Química S.A. (Barcelona, España).
- DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo) de Sigma-Aldrich (Madrid, España).
- ABTS (ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)) de Sigma-Aldrich (Madrid, España).
- Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-carboxílico) de Sigma-Aldrich (Madrid, España).
- Ácido gálico de Sigma-Aldrich (Madrid, España).
- Carbonato sódico de Merck (Darmstadt, Alemania).
- Patrones sólidos de los 9 polifenoles (ácido cinámico, ácido ferúlico, ácido p-cumárico, ácido sinápico, ácido cafeico, ácido gálico, naringenina, catequina y quercetina) de Sigma-Aldrich (Madrid, España).

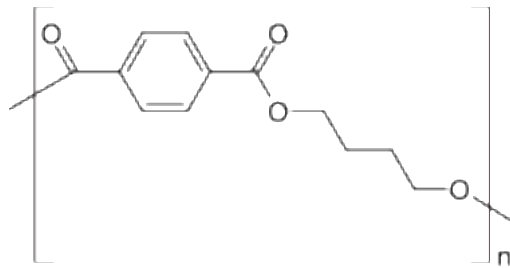
### 5.3. Muestras

Las infusiones se adquirieron de una marca comercial, pertenecientes a cinco variedades distintas: té verde, té negro, té rojo, té negro con canela e infusión fría de frutos del bosque.

Hay que mencionar que las bolsitas de las infusiones eran de 1,5 gramos para té verde, negro y rojo, 1,75 gramos para el té negro-canela y 2 gramos para la infusión fría de frutos del bosque.

#### 5.4. Columna cromatográfica

La columna cromatográfica empleada fue una columna DAICEL DCPak PBT (L 250 mm x  $\varnothing$  4,6 mm), constituida por una fase de polybutileno tereftalato (PBT) y fijada en sílica gel de 5  $\mu$ m, la cual fue adquirida de Chiral Technologies Europe (Daicel Group). Esta columna es polar, lo que permite su interacción con los grupos funcionales polares de los analitos.



**Figura 12: PBT**

La columna puede interaccionar con los analitos a través de puentes de hidrógeno entre los oxígenos de su estructura y los -OH de los polifenoles, interacciones dipolo-dipolo e interacciones  $\pi$ - $\pi$  con los anillos aromáticos accesibles.

## 6. Resultados y discusión

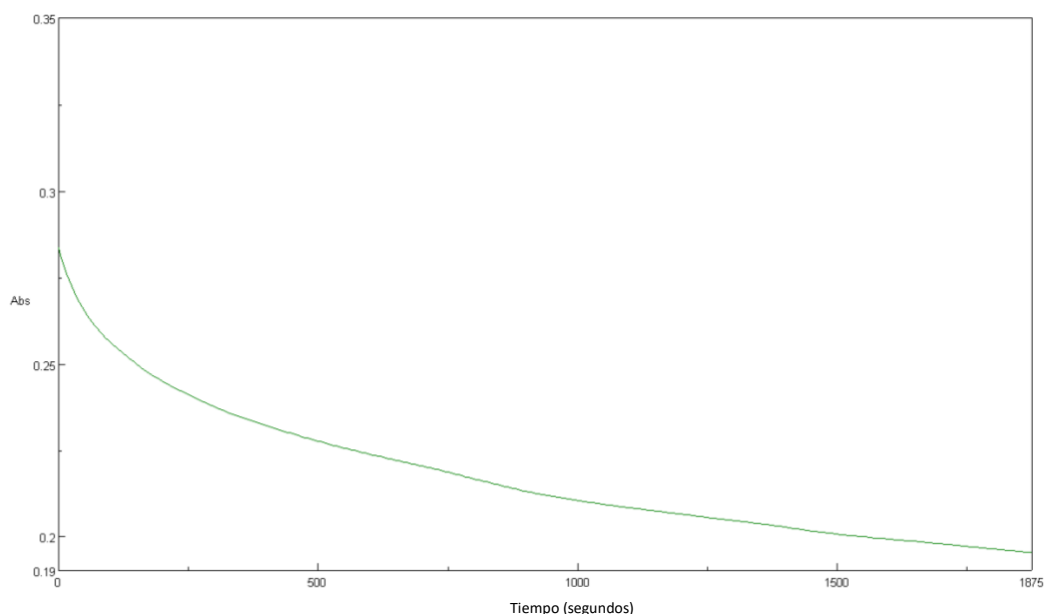
### 6.1. Capacidad antioxidante de infusiones

Para la determinación de la capacidad antioxidante de las diferentes infusiones se utilizaron dos métodos: el ensayo DPPH y el ensayo ABTS. Las variedades elegidas fueron té verde, té negro-canela, té negro, té rojo e infusión fría de frutos del bosque. Las determinaciones se llevaron a cabo a diferentes tiempos de infusión (2, 5 y 10 minutos) y diferentes temperaturas (65°C, 85°C y temperatura de ebullición) con el fin de observar cuales son las mejores condiciones para obtener la mayor capacidad antioxidante posible.

Todas las infusiones (salvo la infusión fría de frutos del bosque que no requiere calentar el agua) se prepararon introduciendo las bolsitas en 75,0 mL de agua caliente a distintas temperaturas (65°C, 85°C y temperatura de ebullición) y dejándolas infusionar 2, 5 y 10 minutos. Después se dejaban enfriar a temperatura ambiente. Hay que mencionar que en primer lugar se determinó el tiempo óptimo de infusión a la temperatura de ebullición y luego se probaron las distintas temperaturas para ese tiempo óptimo.

#### 6.1.1. Método DPPH

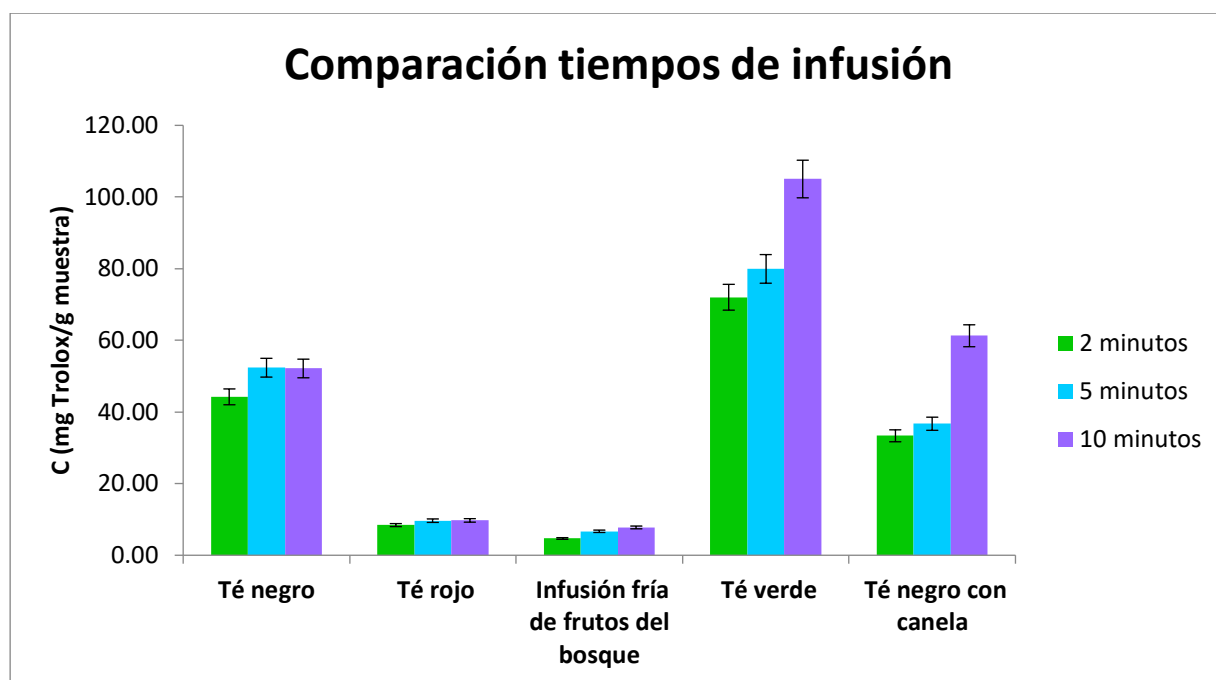
Para determinar la capacidad antioxidante mediante el método DPPH se debe conocer previamente el tiempo de reacción entre el radical y los antioxidantes. Para ello se realizó una cinética con las infusiones, de modo que se mezclaron 0,3 mL de cada infusión con 0,5 mL de DPPH, se enrasó a 5,0 mL con etanol y se midió la disminución de la absorbancia a lo largo del tiempo a 539,6 nm. En la **Figura 13** se puede observar que a partir de los 30 minutos (1800 segundos) la variación de la absorbancia con el tiempo era muy pequeña, inferior al 5%. El caso que se presenta es el del té negro, pero para el resto de infusiones ocurría lo mismo, por lo que se fijó el tiempo de incubación de la mezcla en media hora.



**Figura 13: cinética del té negro con DPPH a 539,6 nm**

Para el método DPPH se preparó una línea de calibrado utilizando Trolox en un rango de concentraciones de 30 a 250 ppm. Para realizar la línea de calibrado, teniendo en cuenta la experiencia previa del grupo de investigación y las diversas pruebas llevadas a cabo previamente al experimento, se mezcló 0,3 mL de cada disolución patrón de Trolox con 0,5 mL de una disolución de DPPH 1 mM (en etanol) y se enrasó a 5,0 mL con etanol. Se dejó reaccionar la mezcla en la oscuridad y a temperatura ambiente (25°C) durante media hora y se midió la disminución de la absorbancia a 539,6 nm (longitud de onda de máxima absorción, determinada previamente para el DPPH). Con las muestras se siguió el mismo procedimiento. A partir de los resultados obtenidos para las infusiones y de la línea de calibrado se determinó la concentración (mg/L) equivalente en Trolox por interpolación y se expresó la capacidad antioxidante de cada muestra como mg Trolox/g muestra seca. Hay que mencionar que las muestras se analizaron por triplicado y los resultados presentados son las medias de las tres réplicas.

En primer lugar, se llevó a cabo la determinación de la capacidad antioxidante de todas las variedades mencionadas para 2, 5 y 10 minutos de infusión a la temperatura de ebullición del agua, con el fin de determinar cual era el mejor tiempo de infusión para probar más tarde diferentes temperaturas. En la **Figura 14** se muestran los resultados obtenidos para la capacidad antioxidante, expresados en mg Trolox/g muestra seca.



**Figura 14:** *variación de la capacidad antioxidante con el tiempo de infusión para DPPH*

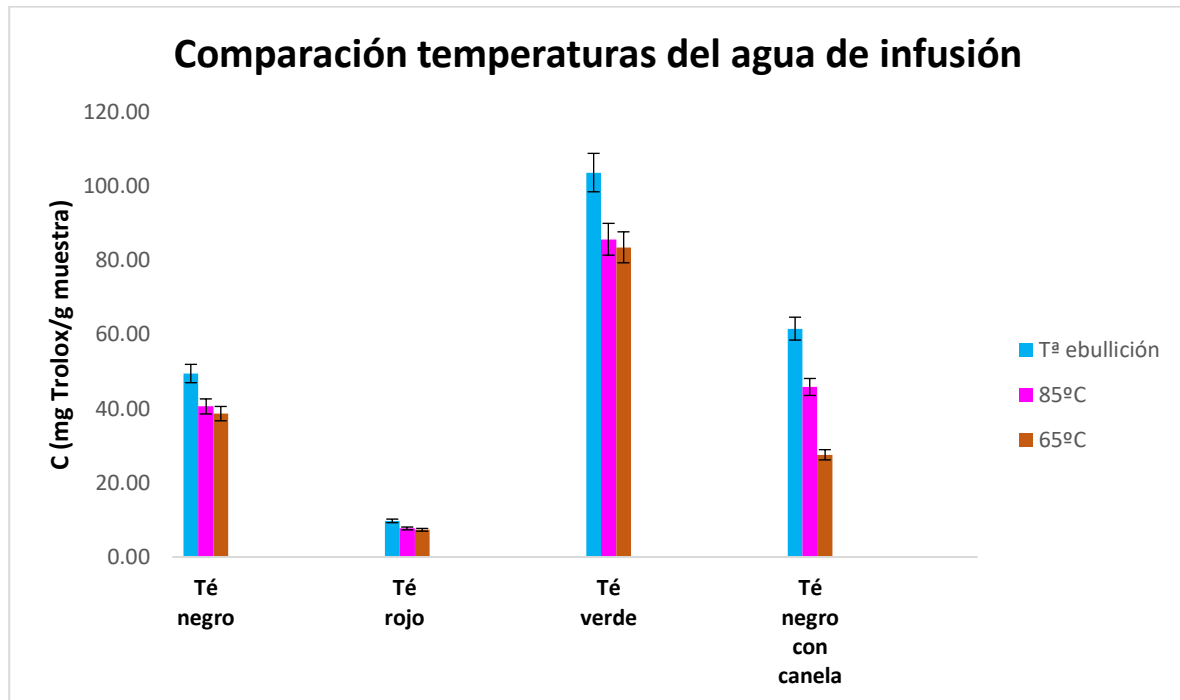
Como se puede observar (**Figura 14**), al aumentar el tiempo de infusión aumentó la capacidad antioxidante de la infusión, de modo que en todas las variedades se observó un aumento claro cuando se pasó de infusionar 2 minutos a infusionar 5. Sólo en el caso del té verde y té negro hay un incremento alto al pasar de infusionar de 5 a 10 minutos, mientras que en el resto de infusiones permanece prácticamente constante. Además, al comparar con los resultados obtenidos por otros autores [16], se observa que ocurre lo mismo, al aumentar el tiempo de infusión aumenta la capacidad antioxidante ya que se extraen más componentes.

Se observa además, que a los 10 minutos de infusión, el té que presentó mayor capacidad antioxidante fue el verde, con una capacidad antioxidante de 105,02 mg trolox/g muestra seca, seguido por el negro con canela, el negro, el rojo y, por último, la infusión fría de frutos del bosque sería la que menos capacidad antioxidante presentó (7,76 mg trolox/g muestra seca).

A continuación se ensayaron diferentes temperaturas (65, 85 y 100 °C) para ver si al aumentar la temperatura del agua en que se hacía la infusión, aumentaba también la capacidad antioxidante o si, por el contrario, aunque era lógico esperar una mayor extracción de compuestos, estos podían sufrir degradaciones dando como resultado final una disminución de la capacidad antioxidante. Esto se hizo seleccionando los mejores tiempos de infusión obtenidos anteriormente; de modo que se infusionó 5 minutos para el té negro y rojo (ya que no se apreciaban grandes aumentos en la AC de 5 a 10 minutos) y 10 minutos para el té verde



y té negro-canela (había un aumento claro al pasar de 5 a 10 minutos). Cabe destacar que este ensayo no se realizó para la infusión de frutos del bosque ya que es una infusión fría. A continuación se muestran los resultados obtenidos para la AC a diferentes temperaturas (Figura 15).



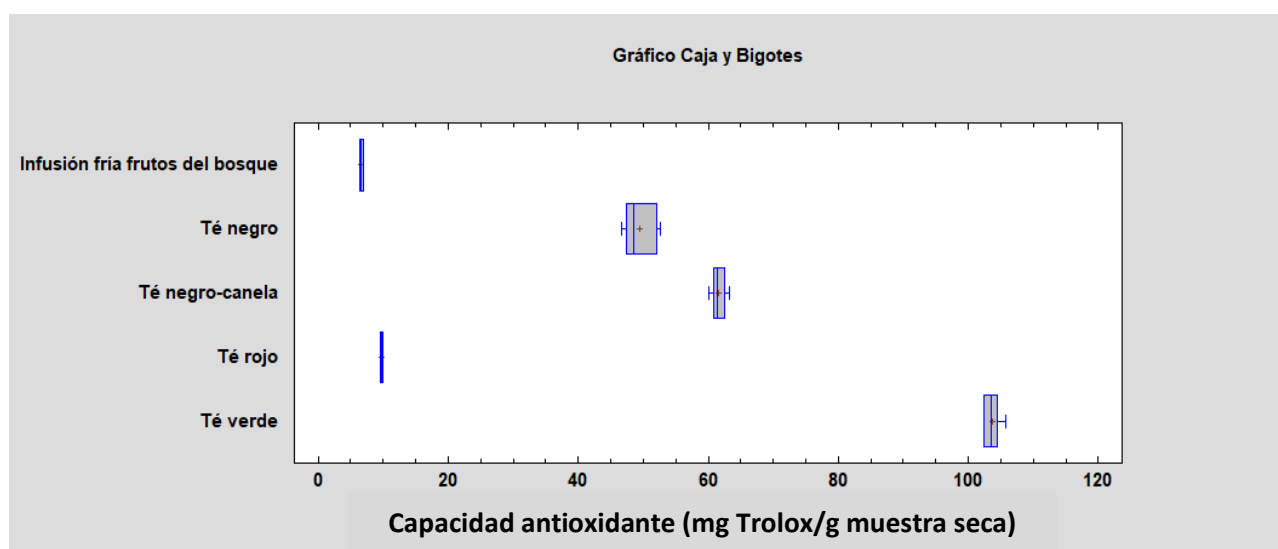
**Figura 15** variación de la capacidad antioxidante con la temperatura del agua de infusión para DPPH

Como se puede observar, al aumentar la temperatura de infusión aumentó la capacidad antioxidante de la infusión, de modo que en todas las variedades había un incremento apreciable al pasar de infusionar a 65°C o 85°C a utilizar agua hirviendo. Además, el té que presentó mayor capacidad antioxidante fue el verde, luego el negro con canela, seguido del negro y, por último, el té rojo.

En la revisión bibliográfica también se encontró un trabajo en el que se comparaba la capacidad antioxidante de infusiones de plantas medicinales preparadas con agua fría (20°C) y con agua caliente (98°C), observándose que se obtenían mejores resultados infusionando con agua caliente [18].

Para comprobar si las aparentes diferencias encontradas entre las distintas variedades de infusiones eran significativas se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA) en función del tipo de infusión. Esto se realizó a partir de los datos obtenidos para la temperatura de ebullición y el tiempo óptimo de infusión mencionado anteriormente (5 minutos para té negro

y rojo y 10 minutos para té verde y negro-canela), ya que de esta forma se obtenía la mayor capacidad antioxidante. Al observar los resultados se comprobó que se obtuvo un valor para la significación a posteriori de aproximadamente 0,00 (p a posteriori), valor menor a 0,05 ( $\alpha$ , significación a priori para un nivel de confianza del 95%), por lo que la hipótesis nula (la hipótesis nula es que el factor no tiene efecto) se rechaza con fuerza, es decir, se pudo concluir que los valores medios obtenidos eran significativamente diferentes para cada tipo de infusión. En la **Figura 16** se puede observar esta diferencia, donde se representa la capacidad antioxidante en función del tipo de infusión mediante un gráfico de caja y bigotes (*Box-plot*).



**Figura 16:** gráfico de caja y bigotes obtenido para la AC por el método DPPH

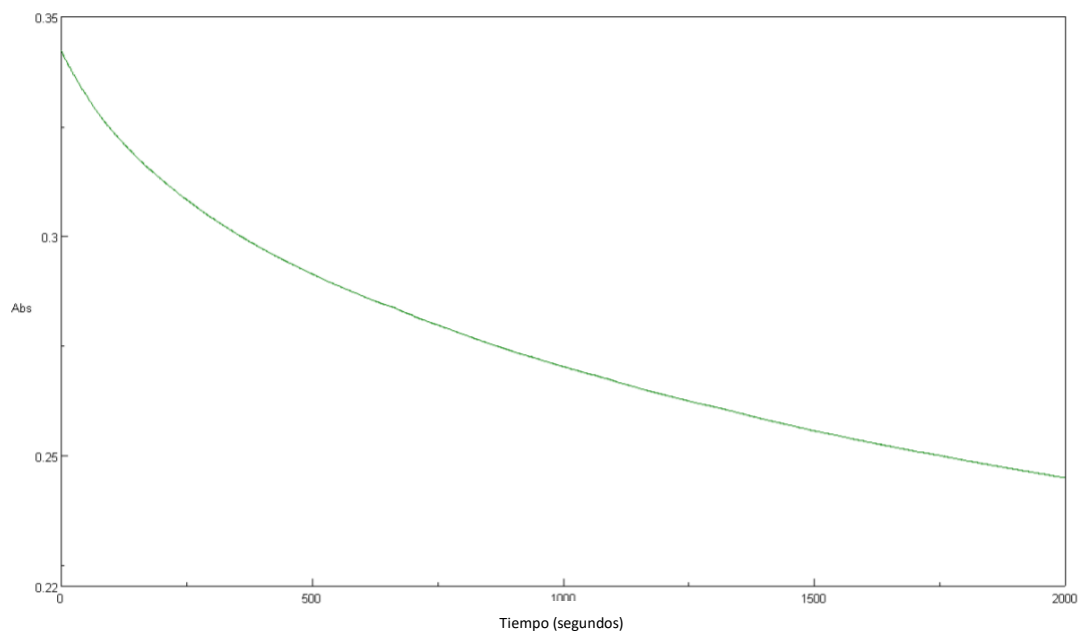
Como se puede observar, el té verde es el que presenta mayor capacidad antioxidante, sobre todo respecto a la infusión fría de frutos del bosque y al té rojo. También se puede apreciar que los valores medios obtenidos para el té negro y para el té negro con canela son muy similares, presentando el té negro con canela valores mayores; lo que puede ser debido al aporte extra de la canela.

### 6.1.2. Método ABTS

Para el método ABTS había que preparar el radical, ya que no estaba formado como ocurría en el caso del DPPH. Para ello se preparó una disolución con 2,45 ml de  $K_2S_2O_8$  24,5 mM, enrasando a 25,0 mL con ABTS 7 mM. La mezcla se dejó incubar en la oscuridad a temperatura ambiente entre 12 y 16 horas, de modo que se obtenía el radical  $ABTS^+$  azul verdoso oscuro. Una vez formado el radical se medía su absorbancia, determinándose su longitud de onda de máxima absorción la cuál fue de 734 nm, y se diluyó hasta obtener una absorbancia de

$0,7 \pm 0,02$  a esa longitud de onda. Este radical diluido ya se podía utilizar para determinar la capacidad antioxidante de las muestras. La formación de este radical se realizó de este modo porque es la forma de producir el radical más estable en agua, no obstante, se debía repetir la preparación del radical cada dos días debido a su alta inestabilidad.

Del mismo modo que para el DPPH, para determinar la capacidad antioxidante mediante el método ABTS se debe conocer previamente el tiempo de reacción entre el radical y los antioxidantes. Para ello se realizó una cinética con las infusiones, de modo que se tomaron 0,3 mL de cada infusión, se enrasó a 5,0 mL con la disolución del radical ABTS y se midió la disminución de la absorbancia a lo largo del tiempo a 734 nm. En la **Figura 17** se puede observar que a partir de los 30 minutos (1800 segundos) la variación de la absorbancia con el tiempo era muy pequeña, inferior al 5%. El caso que se presenta es el del té negro, pero para el resto de infusiones ocurría lo mismo, por lo que se fijó el tiempo de incubación de la mezcla en media hora.

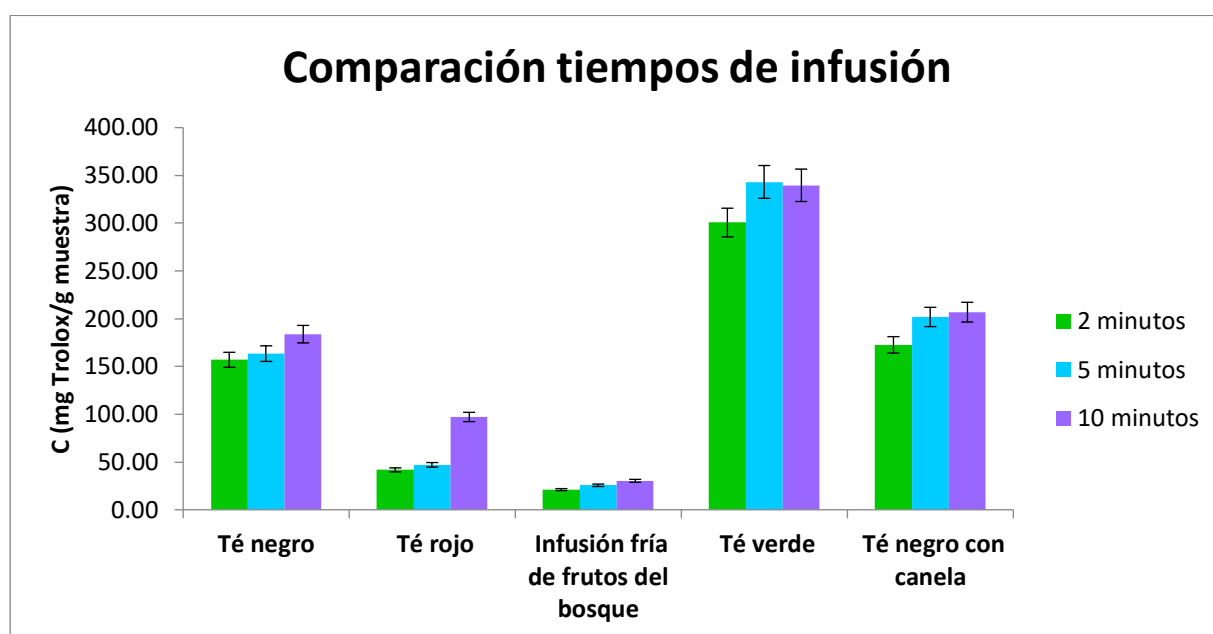


**Figura 17: cinética del té negro con ABTS a 734 nm**

Se preparó una línea de calibrado utilizando Trolox en un rango de concentraciones de 10 a 90 ppm. Para ello se pipeteó 0,3 mL de cada disolución patrón de Trolox, enrasando a 5,0 mL con la disolución del radical ABTS. Se dejó reaccionar la mezcla en la oscuridad y a temperatura ambiente (25°C) durante media hora y se midió la disminución de la absorbancia a 734 nm. Con las muestras se siguió el mismo procedimiento. A partir de los resultados obtenidos para las infusiones y de la línea de calibrado se determinó la concentración (mg/L) equivalente en Trolox por interpolación, y se expresó la capacidad antioxidante de cada muestra como mg

Trolox/g muestra seca. Hay que mencionar que las muestras se analizaron por triplicado y los resultados presentados son las medias de las tres réplicas.

En primer lugar, se llevó a cabo la determinación de la capacidad antioxidante de todas las variedades para 2, 5 y 10 minutos de infusión a la temperatura de ebullición del agua, con el fin de determinar cual era el tiempo óptimo de infusión para probar más tarde diferentes temperaturas. En la **Figura 18** se muestran los resultados obtenidos para cada tipo de infusión y para los diferentes tiempos ensayados expresados en mg Trolox/g muestra seca.

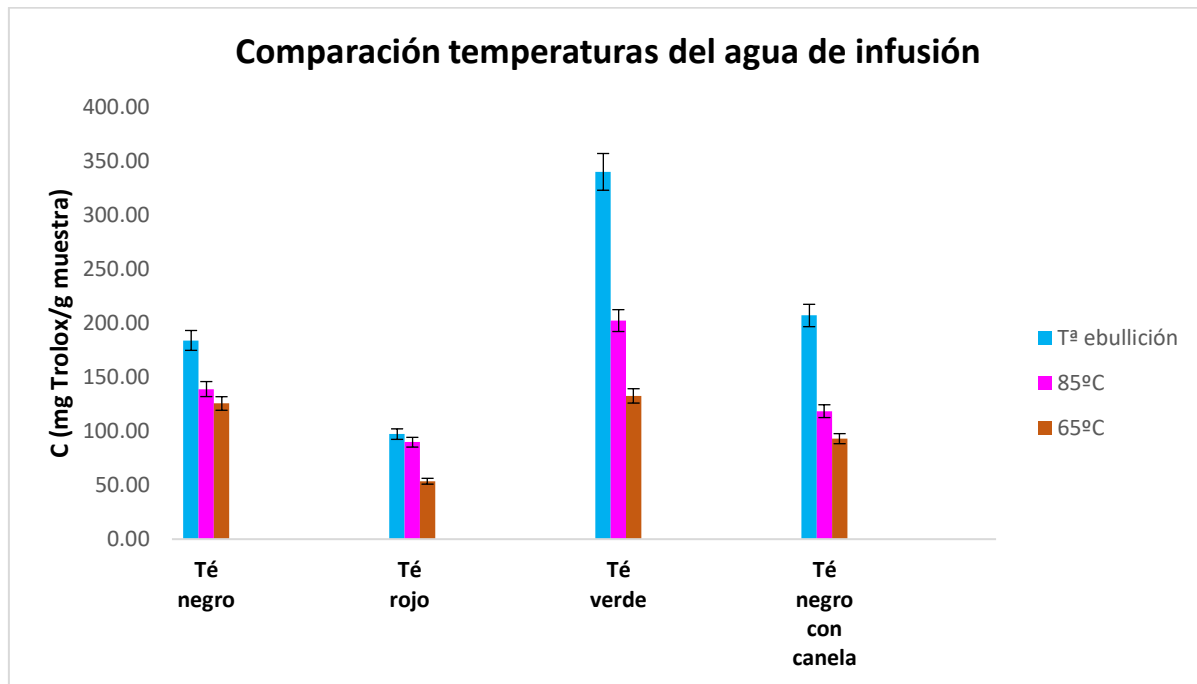


**Figura 18: variación de la capacidad antioxidante con el tiempo de infusión para el método ABTS**

Como puede observarse al igual que en el método DPPH, al aumentar el tiempo de infusión aumentó la capacidad antioxidante. Cuando se pasó de infusionar 2 minutos a infusionar 5, especialmente para el té verde y el té negro con canela, se observó un incremento pronunciado, mientras que al pasar de 5 a 10 minutos en general el aumento fue menor, excepto para la infusión de té rojo. Hay que comentar que en el caso del té rojo al infusionar 10 min se apreció un mayor aumento cuando se utilizó ABTS que cuando se utilizó DPPH; mientras que por el contrario, para el té verde y té negro con canela sólo se observó un ligero aumento utilizando ABTS. Cabe destacar que aunque los dos métodos (DPPH y ABTS) se utilizan indistintamente para determinar la capacidad antioxidante, la contribución de cada compuesto con capacidad antioxidante es diferente en cada uno y esto puede justificar las diferencias observadas.

Se observa además que, para todos los tiempos de infusión, el té que presentó mayor capacidad antioxidante fue el verde, seguido del negro con canela, el negro, el rojo y, por último, la infusión fría de frutos del bosque. Esto coincide con lo obtenido para un tiempo de infusión de 10 minutos con el método DPPH.

A continuación se experimentó con distintas temperaturas (65, 85 y 100 °C) utilizando un tiempo de infusión de 10 minutos. En la **Figura 19** se muestran los resultados obtenidos.

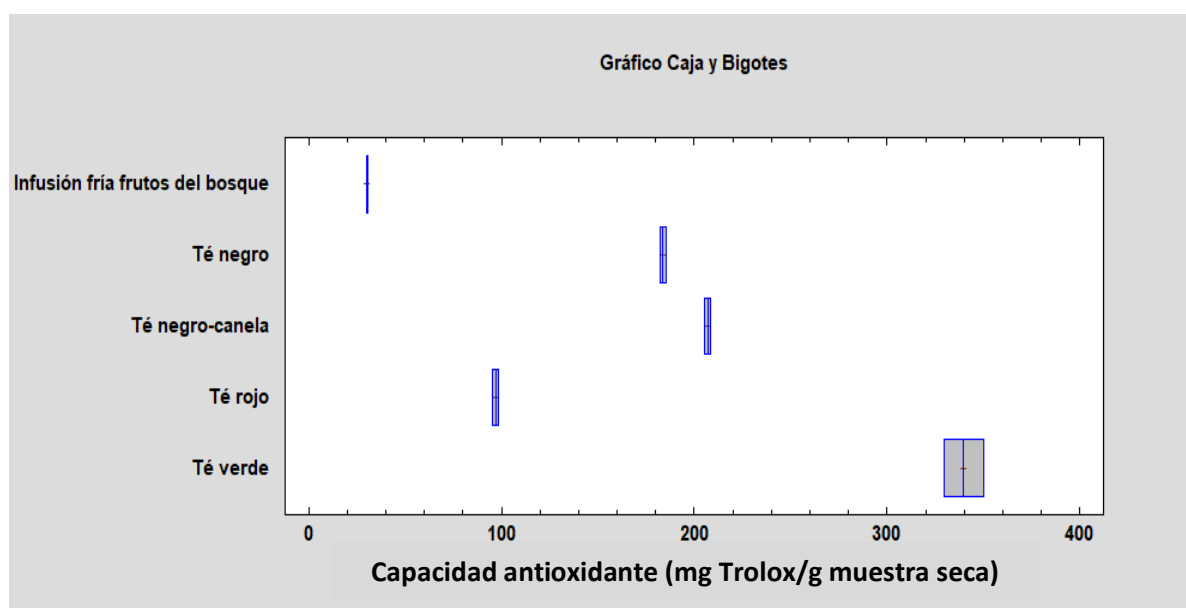


**Figura 19: variación de la capacidad antioxidante con la temperatura del agua de infusión para ABTS**

Como se puede observar, al aumentar la temperatura de infusión aumenta la capacidad antioxidante de la muestra, de modo que en todas las variedades se ve un aumento cuando se pasa de infundir a 65°C a infundir a 85°C, y lo mismo ocurre al pasar de 85°C a la temperatura de ebullición, siendo más marcado este último aumento. Además, se puede observar que el té que presentó mayor capacidad antioxidante para todas las temperaturas fue el verde, pero en función de la temperatura utilizada el siguiente sería el negro con canela (para Tª eb.) o el negro (para 85 y 65°C) y, por último, en todos los casos el que presentó la menor capacidad antioxidante fue el té rojo.

Del mismo modo que para el método DPPH, para comprobar si las aparentes diferencias encontradas entre las distintas variedades de infusiones eran significativas se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA) en función del tipo de infusión. Esto se realizó a partir de los

datos obtenidos para la temperatura de ebullición y el tiempo de infusión óptimo mencionado anteriormente (10 minutos), ya que de esta forma se obtenía la mayor capacidad antioxidante. Al observar los resultados se comprobó que se obtuvo un valor para la significación a posteriori de aproximadamente 0,00, valor menor a 0,05, por lo que la hipótesis nula se rechaza con fuerza, es decir, se pudo concluir que los valores medios obtenidos eran significativamente diferentes para cada tipo de infusión. En la **Figura 20** se puede observar esta diferencia, donde se representa la capacidad antioxidante en función del tipo de infusión mediante un gráfico de caja y bigotes (*Box-plot*).



**Figura 20:** gráfico de caja y bigotes obtenido para la AC por el método ABTS

Como se puede observar, el té verde es el que presenta mayor capacidad antioxidante, sobre todo respecto a la infusión fría de frutos del bosque. Hay que señalar que con el método ABTS las infusiones de frutos del bosque y té rojo se diferencian más que con el método DPPH.

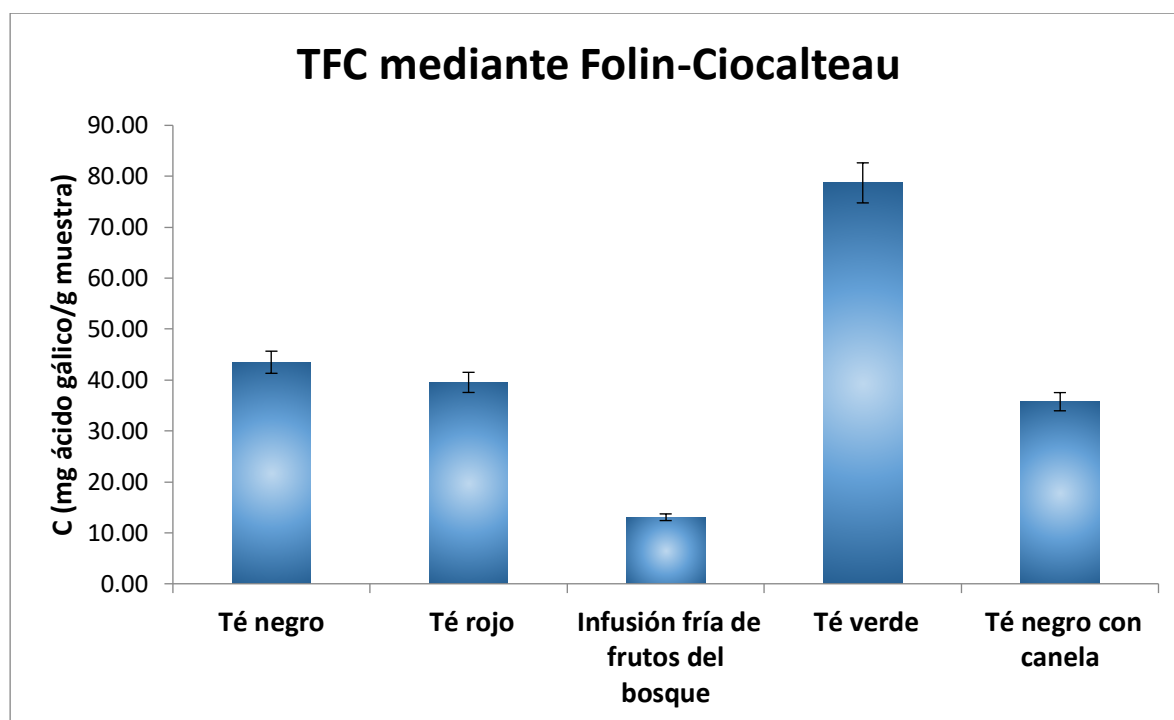
Una vez determinada la capacidad antioxidante por ambos métodos se evaluó el coeficiente de correlación de Pearson para estudiar la asociación entre las dos variables aleatorias (DPPH y ABTS). Este coeficiente varía entre -1 y +1 en función del tipo de asociación, siendo estos dos valores los que indican una perfecta relación lineal entre las dos variables. Se obtuvo un valor de  $r=0,9837$  con un  $p\text{-valor}=0,0025$ . El  $p\text{-valor}$  es menor que 0,05, por lo que la correlación es significativamente diferente de cero con un nivel de confianza del 95%. Por lo tanto, DPPH y ABTS presentan una correlación significativa entre los valores obtenidos por ambos métodos, como era lógico esperar.

## 6.2. Contenido fenólico total (TFC) de las infusiones

Para determinar el contenido fenólico total de las distintas infusiones se utilizó el método Folin-Ciocalteu. En este caso, los ensayos se realizaron utilizando agua a temperatura de ebullición y 10 minutos de infusión, puesto que eran las condiciones en las que se obtenía mayor capacidad antioxidante.

Se utilizó como patrón de referencia ácido gálico, el cual al reaccionar con el reactivo, presenta un máximo de absorbancia a 760,4 nm. La línea de calibrado se preparó en un intervalo de concentraciones de 25 a 300 ppm. Para realizar la línea de calibrado se mezclaron 0,3 mL de cada patrón de ácido gálico con 0,3 mL de reactivo Folin-Ciocalteu y la mezcla se dejó reaccionar 5 minutos. Pasados estos 5 minutos, se enrasó a 5,0 mL con una disolución de carbonato sódico al 5%, se dejó reaccionar la mezcla en la oscuridad a temperatura ambiente (25°C) durante hora y media y se midió la absorbancia a 760,4 nm. Con las muestras se siguió el mismo procedimiento.

A partir de los resultados obtenidos para las infusiones e interpolando en la línea de calibrado se determinó la concentración (mg/L) equivalente en ácido gálico y finalmente se expresó el contenido fenólico total de cada muestra como mg ácido gálico/g muestra seca. Hay que mencionar que las muestras se analizaron por triplicado y los resultados presentados son las medias de las tres réplicas. En la **Figura 21** se presentan los resultados obtenidos.



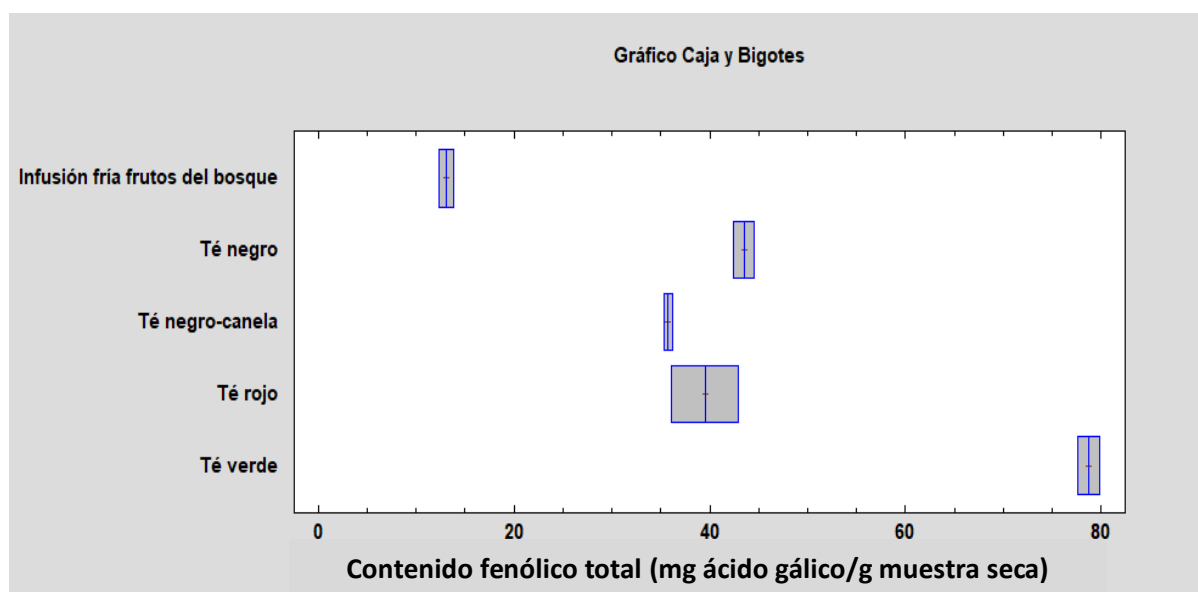
**Figura 21: variación del contenido fenólico total por el método Folin-Ciocalteu**

Como se puede observar, el té verde es el que posee un mayor contenido fenólico total (78,70 mg ácido gálico/g muestra), lo que coincide con los valores obtenidos para la capacidad antioxidante en los que el té verde también es el que presenta los valores más altos. Del mismo modo, la infusión fría de frutos del bosque es la que presenta menor contenido fenólico total (13,06 mg ácido gálico/g muestra seca) y también menor capacidad antioxidante. Esto puede ser razonable si se considera que la capacidad antioxidante y el contenido fenólico total están directamente relacionados, algo que consideran algunos autores. Sin embargo, otros piensan que no existe esa relación, ya que los compuestos fenólicos pueden tener diferentes respuestas en función a su estructura y los extractos vegetales pueden presentar gran cantidad de compuestos antioxidantes además de polifenoles, por lo que no se puede predecir la capacidad antioxidante a partir de su contenido fenólico [20]. Esto explicaría los resultados obtenidos para el té negro con canela, el rojo y el negro, ya que, después del té verde, el té con mayor contenido fenólico total sería el negro, luego el rojo y después el negro con canela, a diferencia de lo que ocurrió con la capacidad antioxidante en la que el orden era té negro con canela, seguido del negro y el rojo.

Al igual que para la capacidad antioxidante, para comprobar si las aparentes diferencias encontradas entre las distintas variedades de infusiones para el contenido fenólico total eran significativas se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA) en función del tipo de infusión.



Al observar los resultados se comprobó que se obtuvo un valor para la significación a posteriori de aproximadamente 0'00, valor inferior a 0'05, por lo que la hipótesis nula se rechaza con fuerza, es decir, se pudo concluir que los valores medios obtenidos eran significativamente diferentes para cada tipo de infusión. En la **Figura 22** se puede observar esta diferencia, donde se representa el contenido fenólico total en función del tipo de infusión mediante un gráfico de caja y bigotes (*Box-plot*).



**Figura 22:** gráfico de caja y bigotes obtenido para el contenido fenólico total por el método FC

Como se puede observar, el té verde es el que presenta mayor contenido fenólico total, sobre todo respecto a la infusión fría de frutos del bosque. Por otro lado se observa que el té negro, el té negro con canela y el té rojo presentan una mayor similitud en lo referente a su contenido fenólico total.

Una vez determinado el contenido fenólico total se evaluó el coeficiente de correlación de Pearson para estudiar la asociación entre cada uno de los métodos para la determinación de la capacidad antioxidante (DPPH y ABTS) y el método Folin-Ciocalteu. Se obtuvo un valor de  $r=0,8575$  con un  $p\text{-valor}=0,0632$  para DPPH y FC y un valor de  $r=0,9229$  con un  $p\text{-valor}=0,0254$  para ABTS y FC. Por lo tanto, los valores de la capacidad antioxidante obtenidos mediante el método DPPH y el contenido fenólico total determinado mediante el método Folin-Ciocalteu no presentan correlación significativa, mientras que sí que la presentan, para un nivel de confianza del 95%, cuando la capacidad antioxidante se determina mediante el método ABTS.

### 6.3. Determinación del contenido individualizado en polifenoles mediante cromatografía de fluidos supercríticos (SFC).

Teniendo en cuenta que en el grupo investigador ya se había desarrollado un método para la determinación de nueve polifenoles empleando cromatografía de fluidos supercríticos; se aplicó éste método con el fin de analizar el contenido individualizado de polifenoles en las infusiones.

Las condiciones cromatográficas fueron las siguientes:

- Columna DAICEL DCPak PBT (250 x 4.6 mm, 5 $\mu$ m).
- Composición de la fase móvil: CO<sub>2</sub> con modificador orgánico MeOH y como aditivo 0,1% TFA (trifluoroacético) utilizando el siguiente gradiente:

**Tabla 3: gradiente de modificador utilizado en el análisis por SFC**

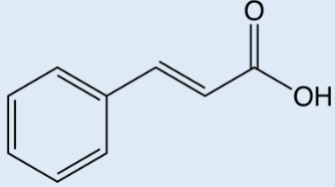
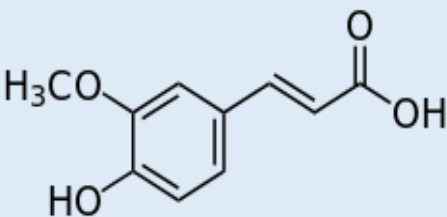
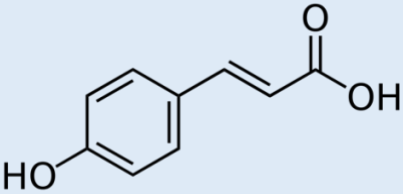
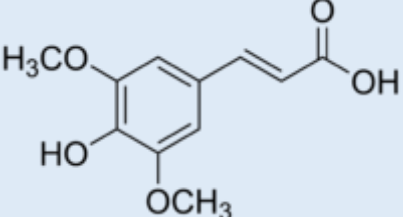
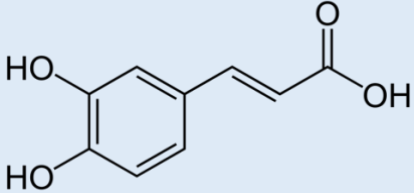
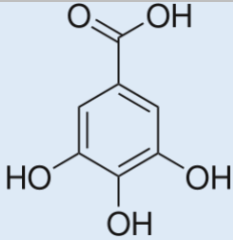
TIEMPO	PORCENTAJE DE MODIFICADOR	INCREMENTO (%/min)
0	5	0
3	5	1,25
15	20	15
17	50	-

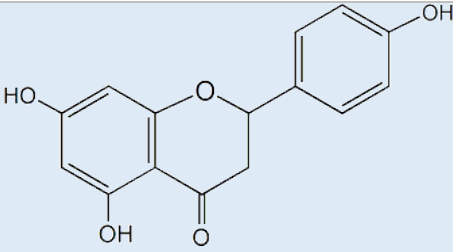
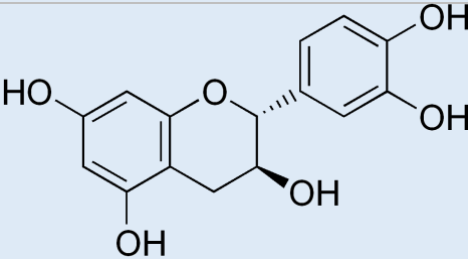
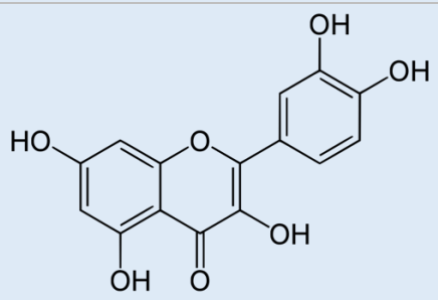
- Flujo de la fase móvil: 2 mL/min.
- Temperatura: 35°C.
- Presión: 150 bares.

El detector empleado permitía monitorizar varias longitudes de onda distintas simultáneamente, por lo que se fijaron las longitudes de onda de 220 nm, 270 nm, 320 nm y 370 nm. También hay que mencionar que las longitudes de onda de máxima absorción no son las mismas para todos los polifenoles, pero en este trabajo se presentan los cromatogramas recogidos a 220 nm, ya que en ella se observan todos los compuestos.

Los polifenoles analizados fueron los que se muestran en la **Tabla 4**.

**Tabla 4: polifenoles analizados por SFC**

NOMBRE	ESTRUCTURA	FAMILIA
ÁCIDO CINÁMICO		Ácido fenólico
ÁCIDO FERÚLICO		Ácido fenólico derivado del ácido cinámico
ÁCIDO p-CUMÁRICO		Ácido fenólico derivado del ácido cinámico
ÁCIDO SINÁPICO		Ácido fenólico derivado del ácido cinámico
ÁCIDO CAFEICO		Ácido fenólico derivado del ácido cinámico
ÁCIDO GÁLICO		Ácido fenólico derivado del ácido benzoico

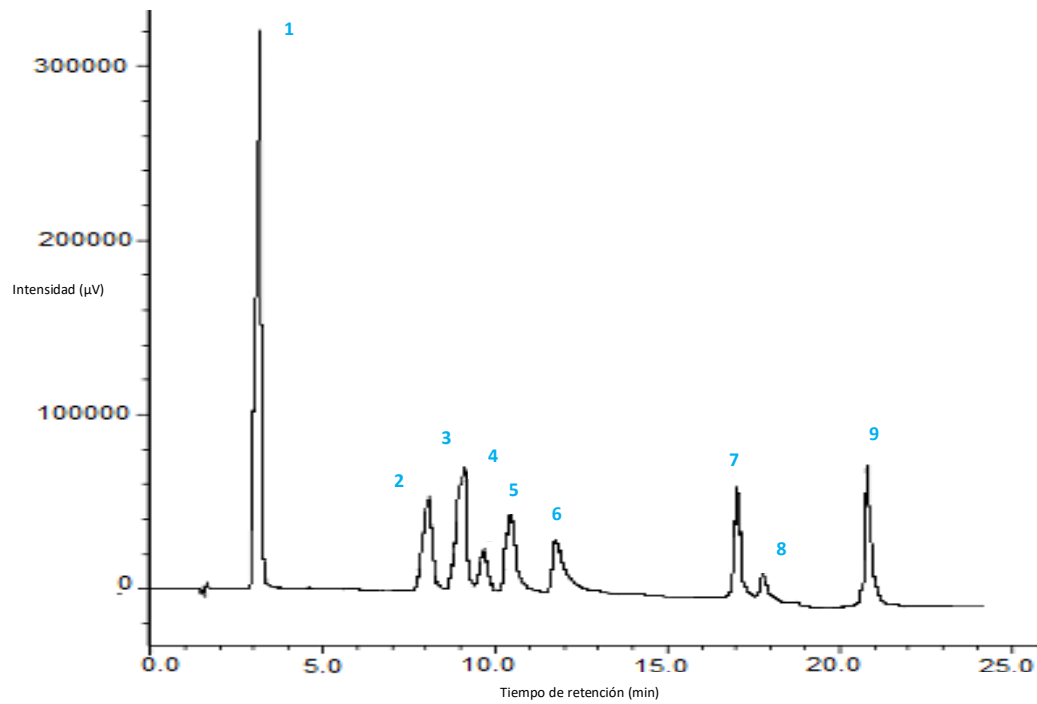
NARINGENINA		Flavonoide, subgrupo de las flavanonas
CATEQUINA		Flavonoide, subgrupo de los flavanoles
QUERCETINA		Flavonoide, subgrupo de los flavonoles

Los límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) son las mínimas concentraciones de analito que se pueden detectar y cuantificar, siendo el LOD la concentración de analito que origina una señal para la cual la relación señal/ruido (S/N) es 3 y el LOQ la concentración a la que esta relación es 10. Los límites de detección y cuantificación de los polifenoles y su longitud de onda de máxima absorción son los que se muestran en la **Tabla 5**.

**Tabla 5: LOD, LOQ y longitudes de onda de máxima absorción de los polifenoles estudiados**

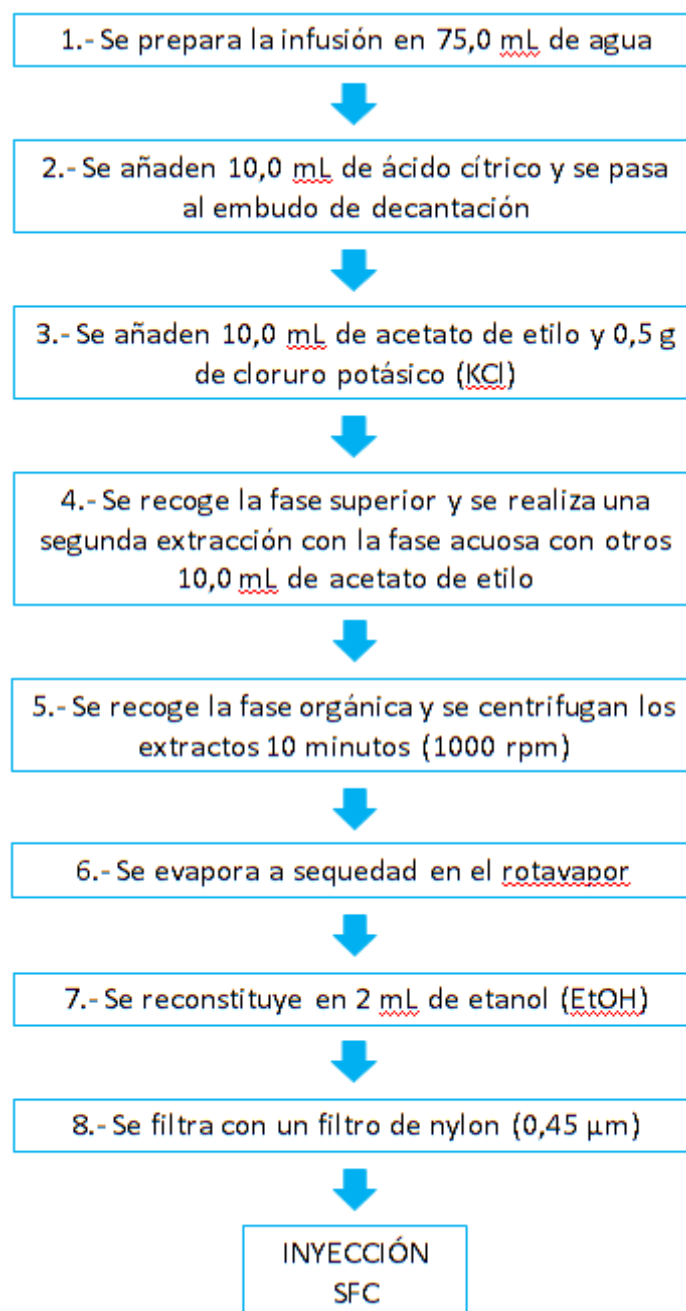
COMPUESTOS	LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)	$\lambda$ (nm)
Cinámico	0,12	0,38	270
Ferúlico	0,38	0,41	320
Cumárico	0,34	1,14	320
Sinápico	0,28	0,92	320
Cafeico	0,86	2,86	320
Gálico	4,35	14,49	220
Naringenina	1,48	4,95	220
Catequina	3,75	12,50	220
Quercetina	3,22	10,75	370

En la **Figura 23** se muestra un cromatograma correspondiente a una disolución patrón que contenía los 9 polifenoles.



**Figura 23: cromatograma de la disolución patrón de los 9 polifenoles. 1. Cinámico 2. Ferúlico 3. Cumárico 4. Sinápico 5. Cafeico 6. Gálico 7. Naringenina 8. Catequina 9. Quercetina. Condiciones cromatográficas: columna DAICEL DCPak PBT, 35°C, 150 bares, 2 mL/min, gradiente Tabla 3**

El procedimiento utilizado para la de extracción de los polifenoles, se basó en uno ya publicado [35], con ligeras modificaciones (**Figura 24**).



**Figura 24: procedimiento de extracción de polifenoles en las infusiones**

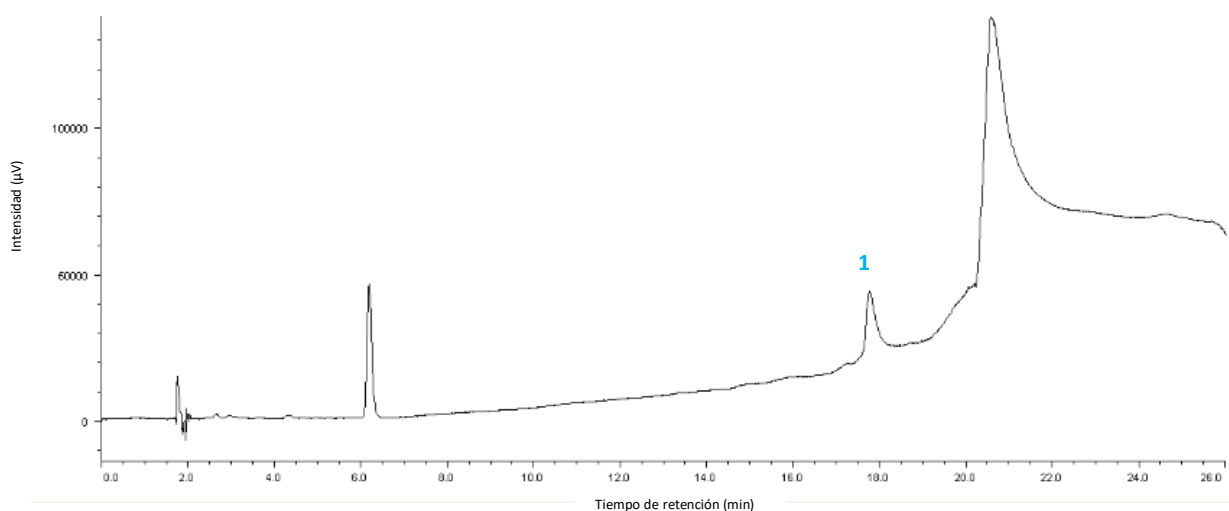
La identificación de los compuestos se llevó a cabo mediante el tiempo de retención, la pureza de pico y los espectros de absorción, y la cuantificación se realizó a la longitud de onda de máxima absorbancia de cada polifenol. A continuación se presentan los resultados obtenidos para las diferentes infusiones.

## Té verde

En el caso del té verde se identificó únicamente catequina en una concentración alta en comparación con la encontrada en el resto de infusiones como se verá a continuación. Hay que mencionar que el compuesto que aparece a un tiempo de retención de 6 minutos no se pudo identificar, pero aparece en todos los té y no en la infusión fría de frutos del bosque, y el pico que aparece a un tiempo de retención de 21-22 minutos se pensó en un primer momento que podía ser la quercetina pero esta teoría se descartó al observar el espectro de absorción molecular.

**Tabla 6: concentración de los polifenoles encontrados en el té verde expresados en mg polifenol/g muestra seca (n = 3)**

POLIFENOLES	CONCENTRACIÓN (mg polifenol/g muestra seca)	% RSD
Catequina	80,3	3.6



**Figura 25: cromatograma del té verde. 1. Catequina. Condiciones cromatográficas: columna DAICEL DCPak PBT, 35°C, 150 bares, 2 mL/min, gradiente Tabla 3**

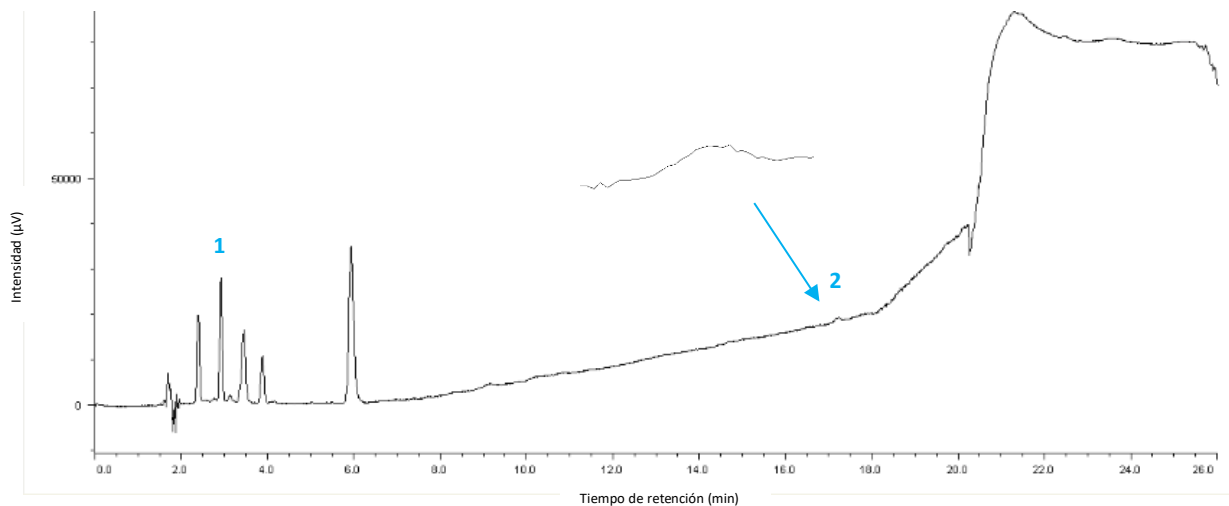


### **Té negro con canela**

En el té negro con canela se identificaron cinámico y catequina, siendo este último el de mayor concentración aunque en menor medida que en el caso del té verde.

**Tabla 7: concentración de los polifenoles encontrados en el té negro con canela expresados en mg polifenol/g muestra seca (n=3)**

POLIFENOLES	CONCENTRACIÓN (mg polifenol/g muestra seca)	% RSD
Cinámico	6,4	2.1
Catequina	30,9	3.5



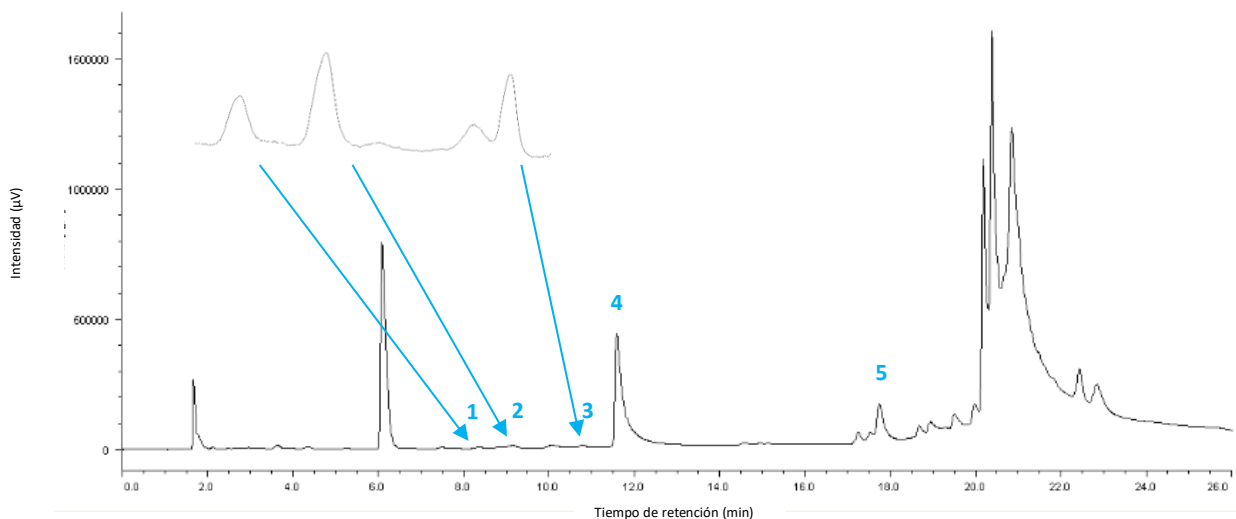
**Figura 26: cromatograma del té negro con canela. 1. Cinámico 2. Catequina. Condiciones cromatográficas: columna DAICEL DCPak PBT, 35°C, 150 bares, 2 mL/min, gradiente Tabla 3**

## Té negro

En el té negro se identificaron ferúlico, cumárico, cafeico, gálico y catequina. La catequina sigue siendo el polifenol mayoritario al igual que en los casos anteriores y su concentración es menor que en el té verde y el negro con canela. También se puede observar el pico del mismo compuesto desconocido a los 6 minutos de retención.

**Tabla 8: concentración de los polifenoles encontrados en el té negro expresados en mg polifenol/g muestra seca (n=3)**

POLIFENOLES	CONCENTRACIÓN (mg polifenol/g muestra seca)	% RSD
Ferúlico	< LOD	
Cumárico	0,54	4.3
Cafeico	0,8	3.8
Gálico	8,5	2.3
Catequina	10,3	3.1



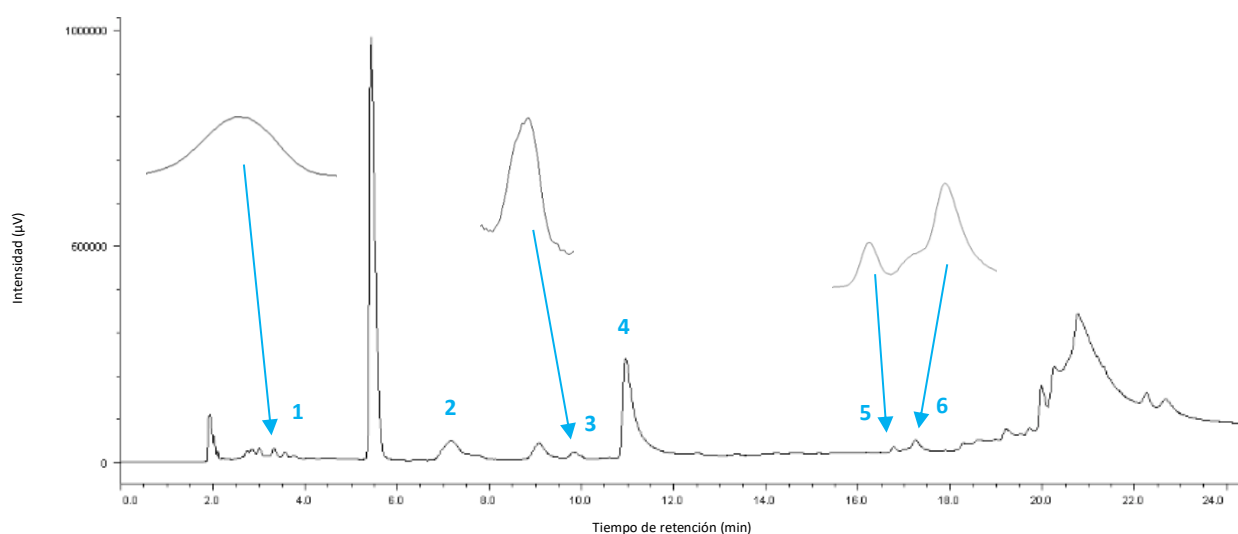
**Figura 27: cromatograma del té negro. 1. Ferúlico 2. Cumárico 3. Cafeico 4. Gálico 5. Catequina. Condiciones cromatográficas: columna DAICEL DCPak PBT, 35°C, 150 bares, 2 mL/min, gradiente Tabla 3**

## Té rojo

En el té rojo se identificaron cinámico, ferúlico, sinápico, gálico, naringenina y catequina. En este caso, la concentración de la catequina es menor que en el té verde, el negro con canela y el negro. Del mismo modo, se puede observar el pico del compuesto desconocido a los 6 minutos de retención, el cual es aún más intenso.

**Tabla 9: concentración de los polifenoles encontrados en el té rojo expresados en mg polifenol/g muestra seca (n=3)**

POLIFENOLES	CONCENTRACIÓN (mg polifenol/g muestra seca)	% RSD
Cinámico	< LOD	--
Ferúlico	0,4	4,1
Sinápico	0,2	3,6
Gálico	3,8	2,5
Naringenina	0,3	4,2
Catequina	2,0	4,3



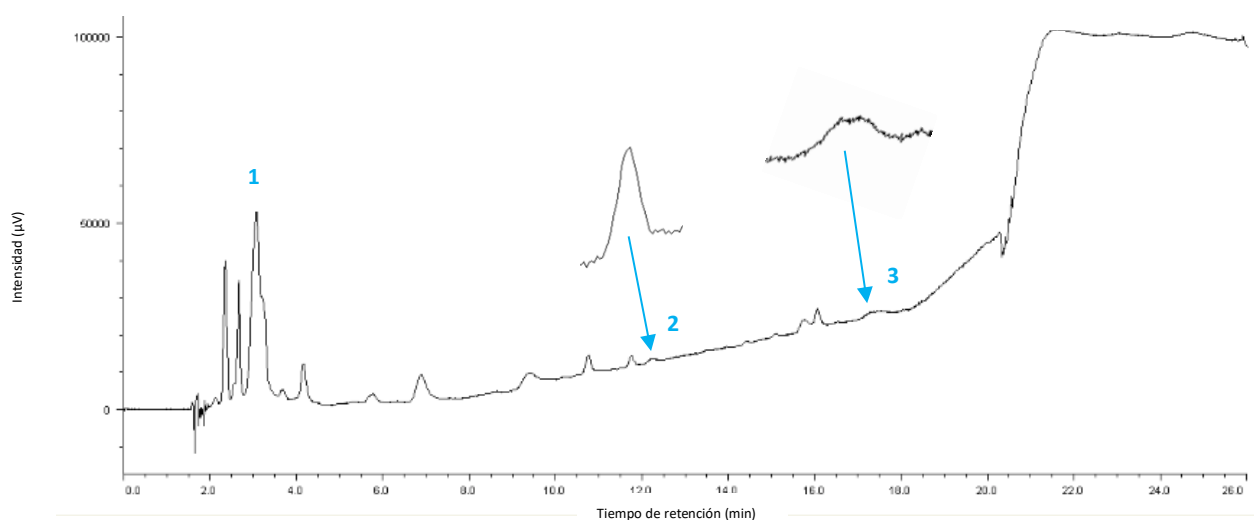
**Figura 28: cromatograma del té rojo. 1. Cinámico 2. Ferúlico 3. Sinápico 4. Gálico 5. Naringenina 6. Catequina. Condiciones cromatográficas: columna DAICEL DCPak PBT, 35°C, 150 bares, 2 mL/min, gradiente Tabla 3**

## Infusión fría de frutos del bosque

En la infusión fría de frutos del bosque se identificaron cinámico, gálico y catequina. Al igual que en los otros casos, la catequina sigue siendo la de mayor concentración, pero en menor medida que en los té. En este caso no se observa el pico a 6 minutos de retención, por lo que puede ser debido a compuestos de la planta del té.

**Tabla 10: concentración de los polifenoles encontrados en la infusión fría de frutos del bosque expresados en mg polifenol/g muestra seca (n=3)**

POLIFENOLES	CONCENTRACIÓN (mg polifenol/g muestra seca)	% RSD
Cinámico	1,1	3,7
Gálico	<LOD	---
Catequina	1,5	3,9



**Figura 29: cromatograma de la infusión fría de frutos del bosque. 1. Cinámico 2. Gálico 3. Catequina. Condiciones cromatográficas: columna DAICEL DCPak PBT, 35°C, 150 bares, 2 mL/min, gradiente Tabla 3**

## 7. Conclusiones

- Se ha determinado la capacidad antioxidante de distintas variedades de infusiones por el método DPPH y por el método ABTS, obteniéndose mayores valores de la misma por el último método y presentando siempre el té verde la mayor capacidad antioxidante y la menor la infusión de frutos del bosque. Además, se observó que había cierta correlación entre los resultados obtenidos por ambos métodos.
- Se ha determinado el contenido fenólico total de las infusiones mediante el método Folin-Ciocalteu, observándose que al igual que en el caso de la capacidad antioxidante, el que presentó mayor contenido fenólico total fue el té verde y el menor la infusión de frutos del bosque. Además, se apreció una correlación entre el contenido fenólico total y la capacidad antioxidante obtenida por el método ABTS, pero no ocurría lo mismo con los resultados del DPPH.
- Los mejores resultados tanto en términos de capacidad antioxidante como en contenido fenólico total, se obtuvieron realizando las infusiones con agua calentada hasta ebullición y dejando infusionar durante 10 minutos.
- Los resultados obtenidos tanto para la capacidad antioxidante como para el contenido fenólico total mostraron diferencias significativas para los distintos tipos de infusiones. Hay que señalar que en lo referente a la capacidad antioxidante, los valores obtenidos para la infusión de frutos del bosque fueron más similares a los obtenidos para el té rojo, pero siempre mayores para éste último. Lo mismo puede decirse para el té negro y para el té negro con canela, en este caso los mayores valores observados para el té negro con canela pueden ser debidos precisamente al aporte de la canela. Con respecto al contenido fenólico total se observó una mayor similitud entre los valores obtenidos para el té negro, té negro con canela y té rojo.
- Se llevó a cabo la determinación individual de 9 polifenoles mediante cromatografía de fluidos supercríticos (SFC). Los resultados mostraron que el polifenol más abundante en todos los casos fue la catequina y que el perfil cromatográfico obtenido era diferente para cada tipo de infusión.

## 8. Bibliografía

- [1] S. Gonçalves, D. Gomes, P. Costa y A. Romano, «The phenolic content and antioxidant activity of infusions from Mediterranean medicinal plants,» *Industrial Crops and Products*, 2013.
- [2] M. Rodríguez Vaquero, L. Tomassini Serravalle, M. Manca de Nadra y A. Strasser de Saad, «Antioxidant capacity and antibacterial activity of phenolic compounds from argentinean herbs infusions,» *Food Control*, 2010.
- [3] S. Valle Aznar, «Determinación analítica de la cafeína en diferentes productos comerciales,» vol. III, 2011.
- [4] Desconocido, «UMAICHA,» [En línea]. Available: <https://blog.umaicha.com/beneficios-del-te-frutas-del-bosque/>. [Último acceso: 07 abril 2019].
- [5] A. Moure, J. M. Cruz, D. Franco, J. M. Domínguez, J. Sineiro, H. Domínguez, M. J. Núñez y J. C. Parajó, «Natural antioxidants from residual sources,» *Food Chemistry*, vol. 72, pp. 145-171, 2001.
- [6] D. Huang, B. Ou y R. L. Prior, «The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays,» *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 53, pp. 1841-1856, 2005.
- [7] A. Karadag, B. Ozcelik y S. Saner, «Review of Methods to Determine Antioxidant Capacities,» *Food Analytical Methods*, vol. 2, pp. 41-60, 2009.
- [8] D. Krishnaiah, R. Sarbatly y R. Nithyanandam, «A review of the antioxidant potential of medicinal plant species,» *Food and Bioproducts Processing*, vol. 89, pp. 217-233, 2011.
- [9] J. Pokorny, «Are natural antioxidants better - and safer- than synthetic antioxidants?,» *European Journal of Lipid Science and Technology*, vol. 109, pp. 629-642, 2007.
- [10] M. Oroian y I. Escriche, «Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction and analysis,» *Food Research International*, vol. 74, pp. 10-36, 2015.
- [11] R. L. Prior, X. Wu y K. Schaich, «Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements,» *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 53, pp. 4290-4302, 2005.
- [12] B. Halliwell, «Reactive Oxygen Species and the Central Nervous System,» *Journal of Neurochemistry*, vol. 59, pp. 1609-1623, 1992.
- [13] I. F. Benzie y Y. Szeto, «Total Antioxidant Capacity of Teas by the Ferric Reducing/ Antioxidant Power Assay,» *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 47, pp. 633-636, 1999.

- [14] M. Cittan, E. Altuntas y A. Çelik, «Evaluation of antioxidant capacities and phenolic profiles in *Tilia cordata* fruit extracts: A comparative study to determine the efficiency of traditional hot water infusion method,» *Industrial Crops & Products*, vol. 122, pp. 553-558, 2018.
- [15] N. Turkmen, F. Sari y Y. S. Velioglu, «Effects of extraction solvents on concentration and antioxidant activity of black and black mate tea polyphenols determined by ferrous tartrate and Folin–Ciocalteu methods,» vol. 99, pp. 835-841, 2006.
- [16] W. Koch, W. Kukula-Koch y K. Glowniak, «Catechin Composition and Antioxidant Activity of Black Teas in Relation to Brewing Time,» vol. 100, pp. 1694-1699, 2017.
- [17] S. Li, S.-K. Li, R.-Y. Gan, F.-L. Song, L. Kuang y H.-B. Li, «Antioxidant capacities and total phenolic contents of infusions from 223 medicinal plants,» *Industrial Crops and Products*, vol. 51, pp. 289-298, 2013.
- [18] V. Katalinic, M. Milos, T. Kulisic y M. Jukic, «Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols,» *Food Chemistry*, vol. 94, pp. 550-557, 2006.
- [19] K. Pyrzyńska y A. Pekal, «Application of free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) to estimate the antioxidant capacity of food samples,» *Analytical Methods*, vol. 5, pp. 4288-4295, 2013.
- [20] E. Arnáiz, J. Bernal, M. T. Martín, J. C. Diego, J. L. Bernal y L. Toribio, «Optimisation of the Supercritical Fluid Extraction of Antioxidants from Broccoli Leaves,» *Food Analytical Methods*, vol. 9, pp. 2174-2181, 2016.
- [21] R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang y C. Rice-Evans, «ANTIOXIDANT ACTIVITY APPLYING AN IMPROVED ABTS RADICAL CATION DECOLORIZATION ASSAY,» *Free Radical Biology & Medicine*, vol. 26, pp. 1231-1237, 1999.
- [22] C.-T. Ho, «Phenolic Compounds in Food,» 2016.
- [23] F. Tomás-Barberán, «Los polifenoles de los alimentos y la salud,» *Alimentación, nutrición y salud*, vol. 10, pp. 41-53, 2003.
- [24] R. Tsao, «Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols,» *Nutrients*, pp. 1231-1246, 2010.
- [25] C. D. Stalikas, «Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids,» *J.Sep.Sci.*, pp. 3268-3295, 2007.
- [26] L. Toribio, S. Arranz, A. M. Ares y J. Bernal, «Polymeric stationary phases based on poly(butylene terephthalate) and poly(4-vinylpyridine) in the analysis of polyphenols using supercritical fluid chromatography. Application to bee pollen,» *Journal of Chromatography A*, pp. 128-136, 2018.
- [27] J. C. Sánchez-Rangel, J. Benavides, J. Heredia, L. Cisneros-Zevallos y D. A. Jacobo-Velázquez, «The Folin–Ciocalteu assay revisited: improvement of its specificity for total phenolic content determination,» *Analytical Methods*, vol. 5, pp. 5990-5999, 2013.

- [28] D. Skoog, F. J. James y T. A. Nieman, «Principios de análisis instrumental,» *McGraw Hill*, pp. 831-841.
- [29] C. Galea, D. Mangelings y Y. V. Heyden, «Method development for impurity profiling in SFC: The selection of a dissimilar set of stationary phases»,» *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 111, pp. 333-343, 2015.
- [30] W. Majewski, E. Valery y O. Ludemann-Hombourger, «Principle and Applications of Supercritical Fluid Chromatography,» *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, vol. 28, pp. 1233-1252, 2005.
- [31] T. A. Berger, «The Past, Present, and Future of Analytical Supercritical Fluid Chromatography,» *Chromatography Today*, pp. 26-29, 2014.
- [32] E. Lesellier y C. West, «The many faces of packed column supercritical fluid chromatography - A critical review,» *Journal of Chromatography A*, vol. 1382, pp. 2-46, 2015.
- [33] G. Tang, Y. Huang, T. Zhang, Q. Wang, J. Crommen, M. Fillet y Z. Jiang, «Determination of phenolics acids in extra virgin olive oil using supercritical fluid chromatography coupled with single quadrupole mass spectrometry,» *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 157, pp. 217-225, 2018.
- [34] Y. Huang, Y. Feng, G. Tang, M. Li, T. Zhang, M. Fillet, J. Crommen y Z. Jiang, «Development and validation of a fast SFC method for the analysis of flavonoids in plant extracts,» *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 140, pp. 384-391, 2017.
- [35] J. Serra Bonvehí, M. Soliva Torrentó y E. Centelles Lorente, «Evaluation of Polyphenolic and Flavonoid Compounds in Honeybee-Collected Pollen Produced in Spain,» *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, vol. 49, pp. 1848-1853, 2001.



## Abreviaturas

<b>ABTS</b>	Ácido 2,2'azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)
<b>AC</b>	Capacidad antioxidante
<b>CUPRAC</b>	Cupric ion reducing antioxidant capacity
<b>DPPH</b>	2,2-difenil-1-picrilhidracilo
<b>EtOH</b>	Etanol
<b>FC</b>	Folin-Ciocalteau
<b>FCR</b>	Reactivo de Folin-Ciocalteau
<b>FRAP</b>	Ferric reducing antioxidant power
<b>GAE</b>	Equivalente en ácido gálico
<b>GC</b>	Cromatografía de gases
<b>HAT</b>	Transferencia de átomos de hidrógeno
<b>HPLC</b>	Cromatografía de líquidos de alta resolución
<b>LOD</b>	Límite de detección
<b>LOQ</b>	Límite de cuantificación
<b>MeOH</b>	Metanol
<b>ORAC</b>	Oxygen radical absorbance capacity
<b>PDA</b>	Detector de fotodiodos alineados
<b>ROS</b>	Especies reactivas de oxígeno
<b>SET</b>	Transferencia de un único electrón
<b>SFC</b>	Cromatografía de fluidos supercríticos
<b>SOD</b>	Superóxido dismutasa
<b>TEAC</b>	Capacidad antioxidante equivalente en Trolox

<b>TFA</b>	Ácido trifluoroacético
<b>TFC</b>	Contenido fenólico total
<b>TOSC</b>	Total oxidant scavenging capacity
<b>TRAP</b>	Total radical-trapping antioxidant parameter
<b>Trolox</b>	Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-carboxílico
<b>UV-PDA</b>	Detector ultravioleta-visible de fotodiodos alineados
<b>UV/Vis</b>	Ultravioleta-Visible

## Listado de figuras y tablas

### LISTADO DE FIGURAS

<b>Figura 1: té verde</b> .....	4
<b>Figura 2: té blanco</b> .....	5
<b>Figura 3: té negro</b> .....	5
<b>Figura 4: té rojo</b> .....	5
<b>Figura 5: té Oolong</b> .....	6
<b>Figura 6: frutos del bosque</b> .....	6
<b>Figura 7: reacción general entre el radical DPPH y los compuestos antioxidantes (AH)</b> .....	11
<b>Figura 8: reacción general entre el catión radical ABTS<sup>•+</sup> y los compuestos antioxidantes.</b>	12
<b>Figura 9: formación del radical ABTS<sup>•+</sup> en presencia de persulfato potásico</b> .....	13
<b>Figura 10: espectrofotómetro V-650</b> .....	20
<b>Figura 11: equipo SFC</b> .....	21
<b>Figura 12: PBT</b> .....	24
<b>Figura 13: cinética del té negro con DPPH a 539,6 nm</b> .....	26
<b>Figura 14: variación de la capacidad antioxidante con el tiempo de infusión para DPPH</b> ...	27
<b>Figura 15: variación de la capacidad antioxidante con la temperatura del agua de infusión para DPPH</b> .....	28
<b>Figura 16: gráfico de caja y bigotes obtenido para la AC por el método DPPH</b> .....	29
<b>Figura 17: cinética del té negro con ABTS a 734 nm</b> .....	30
<b>Figura 18: variación de la capacidad antioxidante con el tiempo de infusión para el método ABTS</b> .....	31
<b>Figura 19: variación de la capacidad antioxidante con la temperatura del agua de infusión para ABTS</b> .....	32
<b>Figura 20: gráfico de caja y bigotes obtenido para la AC por el método ABTS</b> .....	33
<b>Figura 21: variación del contenido fenólico total por el método Folin-Ciocalteu</b> .....	35
<b>Figura 22: gráfico de caja y bigotes obtenido para el contenido fenólico total por el método FC</b> .....	36
<b>Figura 23: cromatograma de la disolución patrón de los 9 polifenoles. 1. Cinámico 2. Ferúlico 3. Cumárico 4. Sinápico 5. Cafeico 6. Gálico 7. Naringenina 8. Catequina 9. Quercetina. Condiciones cromatográficas: columna DAICEL DCPak PBT, 35°C, 150 bares, 2 mL/min, gradiente Tabla 3</b> .....	41
<b>Figura 24: procedimiento de extracción de polifenoles en las infusiones</b> .....	42
<b>Figura 25: cromatograma del té verde. 1. Catequina. Condiciones cromatográficas: columna DAICEL DCPak PBT, 35°C, 150 bares, 2 mL/min, gradiente Tabla 3</b> .....	43
<b>Figura 26: cromatograma del té negro con canela. 1. Cinámico 2. Catequina. Condiciones cromatográficas: columna DAICEL DCPak PBT, 35°C, 150 bares, 2 mL/min, gradiente Tabla 3</b> .....	44

**Figura 27: cromatograma del té negro. 1. Ferúlico 2. Cumárico 3. Cafeico 4. Gálico 5. Catequina. Condiciones cromatográficas: columna DAICEL DCPak PBT, 35°C, 150 bares, 2 mL/min, gradiente Tabla 3..... 45**

**Figura 28: cromatograma del té rojo. 1. Cinámico 2. Ferúlico 3. Sinápico 4. Gálico 5. Naringenina 6. Catequina. Condiciones cromatográficas: columna DAICEL DCPak PBT, 35°C, 150 bares, 2 mL/min, gradiente Tabla 3..... 46**

**Figura 29: cromatograma de la infusión fría de frutos del bosque. 1. Cinámico 2. Gálico 3. Catequina. Condiciones cromatográficas: columna DAICEL DCPak PBT, 35°C, 150 bares, 2 mL/min, gradiente Tabla 3..... 47**

### LISTADO DE TABLAS

**Tabla 1: comparación de las propiedades de fluidos supercríticos, gases y líquidos ..... 17**

**Tabla 2: propiedades de algunos fluidos supercríticos ..... 18**

**Tabla 3: gradiente de modificador utilizado en el análisis por SFC ..... 37**

**Tabla 4: polifenoles analizados por SFC..... 38**

**Tabla 5: LOD, LOQ y longitudes de onda de máxima absorción de los polifenoles estudiados ..... 40**

**Tabla 6: concentración de los polifenoles encontrados en el té verde expresados en mg polifenol/g muestra seca (n = 3) ..... 43**

**Tabla 7: concentración de los polifenoles encontrados en el té negro con canela expresados en mg polifenol/g muestra seca (n=3)..... 44**

**Tabla 8: concentración de los polifenoles encontrados en el té negro expresados en mg polifenol/g muestra seca (n=3)..... 45**

**Tabla 9: concentración de los polifenoles encontrados en el té rojo expresados en mg polifenol/g muestra seca (n=3)..... 46**

**Tabla 10: concentración de los polifenoles encontrados en la infusión fría de frutos del bosque expresados en mg polifenol/g muestra seca (n=3) ..... 47**