



---

**Universidad de Valladolid**

**Facultad de Medicina**

**Departamento de Biología Celular, Histología y  
Farmacología**

TESIS DOCTORAL

**“Estudio de la calidad antioxidante de diferentes  
tés de Asia y África”**

Presentada por Sara Gayoso del Villar para optar al grado de  
Doctor por la Universidad de Valladolid

Dirigida por: Dña. Pilar Jiménez López, D. Jesús Tejero del Río y  
D. Tomás Girbés Juan.

---

D. Tomás Girbés Juan, Catedrático de Nutrición y Bromatología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valladolid, Dña. Pilar Jiménez López, Profesora Titular de Nutrición y Bromatología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valladolid y D. Jesús Tejero del Río, Profesor Asociado de Nutrición y Bromatología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valladolid, directores de esta Tesis Doctoral certifican que el trabajo realizado por Dña. Sara Gayoso del Villar puede ser presentado para optar al grado de Doctor por la Universidad de Valladolid.

Valladolid, a 15 de octubre de 2014

Fdo.: Tomás Girbés Juan.

Fdo.: Pilar Jiménez López.

Fdo.: Jesús Tejero del Río.

---

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a los directores de la tesis Profa. Pilar Jiménez López, Prof. Jesús Tejero del Río y Prof. Tomás Girbés Juan, todo lo que me han enseñado, su apoyo y su ayuda constante.

Muchas gracias a todos.

---

## **PUBLICACIONES CIENTÍFICAS EN REVISTAS.**

Los resultados de esta Tesis Doctoral han dado lugar a los trabajos siguientes:

Jesús Tejero, Sara Gayoso, Irma Caro, Damián Córdoba-Díaz, Javier Mateo, José E. Basterrechea, Tomás Girbés and Pilar Jiménez.

Comparative analysis of the antioxidant and free-radical scavenging activities of different water-soluble extracts of green, black and oolong tea samples.

**Food and Nutrition Sciences, aceptado (en prensa) (2014).**

Pilar Jiménez, Jesús Tejero, Sara Gayoso, Emiliano Quinto, José E. Basterrechea, Irma Caro, Manolo Córdoba, Tomás Girbés and Damián Córdoba-Díaz.

Phenolic content spectrophotometric assay of different types of tea with FeCl<sub>3</sub>.

**Journal of Spectroscopy, enviado (2014).**

## **COMUNICACIONES A CONGRESOS.**

Estudio comparado de las capacidades antioxidantes y anti-radicalarias y contenido total de polifenoles en distintos tipos de té.

Jesús Tejero, Sara Gayoso, José E. Basterrechea, Damián Córdoba-Díaz, Cristina Aldavero, Victoria García, Tomás Girbés y Pilar Jiménez.

34 Symposium de la Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (AEFI).

4 y 5 de junio 2014, Madrid.

Determinación de polifenoles totales de muestras de té con tricloruro de hierro.

Sara Gayoso, Jesús Tejero, Pilar Jiménez, Damián Córdoba-Díaz, José E. Basterrechea, Emiliano Quinto, Victoria García y Tomás Girbés.

34 Symposium de la Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (AEFI).

4 y 5 de junio 2014, Madrid.

---

## **FINANCIACIÓN.**

La investigación ha sido financiada en parte por el Grupo de Investigación reconocido GIR “Inmunotoxinas antitumorales”. Organismo financiador: Universidad de Valladolid. Coordinador: Tomas Girbés.

---

## **ABREVIATURAS.**

**A.** Absorbancia.

**A<sub>450</sub>.** Absorbancia a 450 nanómetros.

**A<sub>760</sub>.** Absorbancia a 760 nanómetros.

**A<sub>531</sub>.** Absorbancia a 531 nanómetros.

**A<sub>515</sub>.** Absorbancia a 515 nanómetros.

**a.C.** Antes de Cristo.

**AOM.** Carcinogénesis de colon inducida por azoximetano.

**°C.** Grado centígrado.

**CA.** Capacidad antioxidante.

**Cols.** Colaboradores.

**CUPRAC.** Reducción del ión Cobre actividad antioxidante.

**DE.** Desviación estándar.

**DPPH.** 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl.

**DSS.** Sulfato sódico de dextrano.

**EC.** Epicatequina.

**ECG.** Epicatequingalato.

**EGC.** Epigallocatequina.

**EGCG.** Epigallocatequingalato.

**EGFR.** Factor de crecimiento epidémico receptor.

**equiv.** Equivalentes.

**Et al.** Y Colaboradores

**FAO.** Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura.

**g.** Gramo.

**HPLC.** Cromatografía Líquida de Alta Resolución.

**Kg.** Kilogramo.

**M.** Molar.

**m<sup>2</sup>.** Metro cuadrado.

**ml.** Mililitros.

**mg/Kg.** miligramos por Kilo.

**mg/l.** miligramos por litro.

**ml/min.** Mililitro por minuto.

**mM.** Milimolar.

---

**Nc.** Neocuproína.  
**nm.** Nanómetros.  
**pH.** Medida de la acidez o la alcalinidad de una disolución.  
**PH.** Peso húmedo.  
**Pm.** Peso molecular.  
**POD.** Polifenol peroxidasa.  
**ppm.** Partes por millón.  
**PPO.** Polifenol Oxidasa.  
**p/v.** Peso por volumen.  
**P60.** Polyphenon 60.  
**RLs.** Radicales libres.  
**ROS.** Especies reactivas de oxígeno.  
**r.p.m.** Revoluciones por minuto.  
**RTK.** Receptores de tirosinas quinasas.  
**UA.** Unidades de absorbancia.  
**UK.** Reino Unido.  
**UV/Vis.** Ultravioleta visible.  
**v/v.** Volumen por volumen.  
**µg.** Microgramos.  
**µl.** Microlitros.  
**µm.** Micrómetros.  
**µmoles.** Micromoles.  
**%.** Tanto por ciento.

---

<b>INDICE</b>	<b>Página</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN.</b>	<b>11</b>
1.1. Introducción	12
1.2. Breve reseña histórica.	14
1.3. Tipos de té.	16
1.3.1. Tés de China.	18
1.3.1.1. Té negro.	19
1.3.1.2. Té verde.	20
1.3.1.3. Té oolong.	21
1.3.1.4. Té blanco.	22
1.3.1.5. Té puerh.	22
1.3.1.6. Tés comprimidos y aromatizados.	23
1.3.2. Tés de India y Sri Lanka.	23
1.3.2.1. Tés de la India.	23
1.3.2.2. Tés de Sri Lanka (Ceilán).	25
1.3.3. Tés de África.	26
1.3.3.1. Tés de Kenya.	26
1.3.3.2. Tés de Malawi.	26
1.3.3.3. Tés de Zimbabwe.	27
1.3.3.4. Tés de Tanzania.	27
1.3.3.5. Tés de Sudáfrica.	27
1.3.4. Otros países productores de té.	27
1.3.4.1. Tés de Indonesia.	27
1.3.4.2. Tés de Japón.	28
1.4. Compuestos fenólicos.	29
1.4.1. Fenoles simples.	30
1.4.1.1. Fenilpropanoides simples.	30
1.4.1.2. Lactonas fenilpropanoides o ésteres cíclicos.	30
1.4.1.3. Derivados del ácido benzoico.	30
1.4.2. Fenoles complejos.	31
1.4.3. Antocianos.	31
1.5. Composición del té.	32

---

<b>1.6. Propiedades medicinales del té.</b>	<b>35</b>
1.6.1. Los polifenoles del té y la actividad antioxidante.	35
1.6.2. Los polifenoles del té y el cáncer.	36
1.6.3. Los polifenoles del té y el riesgo de enfermedad coronaria.	38
1.6.4. Efectos antibacterianos y antivirales del té.	38
1.6.5. Efectos antiinflamatorios del té.	39
1.6.6. Efectos del té en la diabetes y la insuficiencia renal.	40
1.6.7. Efectos del té en otras enfermedades.	40
<b>2. OBJETIVOS.</b>	<b>42</b>
2.1. Objetivos.	43
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS.</b>	<b>44</b>
<b>3.1. Material de laboratorio.</b>	<b>45</b>
3.1.1. Equipos.	45
3.1.2. Material fungible.	45
3.1.3. Reactivos químicos.	46
3.1.4. Materiales biológicos.	48
<b>3.2. Métodos.</b>	<b>52</b>
3.2.1. Obtención de extractos de tés.	52
3.2.2. Método de Folin-Ciocalteu.	52
3.2.3. Método de CUPRAC.	54
3.2.4. Método del radical DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl).	57
3.2.5. Medida de los fenoles y de la capacidad antirradicalaria de diferentes tés a distintos tiempos de extracción	58
3.2.6. Método del Tricloruro de Hierro. Longitud de onda óptima y concentración de Polyphenon 60 a utilizar.	58
3.2.7. Validación del método del Tricloruro de Hierro.	59
3.2.7.1. Proporcionalidad y exactitud.	59
3.2.7.2. Precisión. Repetibilidad, reproducibilidad y robustez.	60
3.2.7.3. Límites de detección y cuantificación.	61
3.2.7.4. Selectividad y especificidad.	61
3.2.8. Método del Tricloruro de Hierro utilizando ácido gálico como patrón.	62
3.2.9. Cromatografía Líquida de Alta Resolución para el análisis de los diferentes tés.	62

---

<b>3.3</b>	<b>Análisis estadístico</b>	<b>68</b>
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS.</b>	<b>69</b>
<b>4.1.</b>	<b>Método de Folin-Ciocalteu.</b>	<b>70</b>
<b>4.2.</b>	<b>Método de CUPRAC.</b>	<b>73</b>
<b>4.3.</b>	<b>Método del Radical DPPH.</b>	<b>75</b>
<b>4.4.</b>	<b>Correlación de los métodos de Folin-Ciocalteu, CUPRAC y del radical DPPH.</b>	<b>79</b>
<b>4.5.</b>	<b>Medida de los fenoles totales y de la capacidad antirradicalaria de diferentes tés a diferentes tiempos de extracción.</b>	<b>81</b>
<b>4.6.</b>	<b>Método del Tricloruro de Hierro. Longitud de onda óptima y concentración de Polyphenon 60 a utilizar.</b>	<b>83</b>
<b>4.7.</b>	<b>Validación del Tricloruro de Hierro.</b>	<b>84</b>
<b>4.7.1.</b>	<b>Proporcionalidad y exactitud.</b>	<b>84</b>
<b>4.7.2.</b>	<b>Precisión. Repetibilidad, reproducibilidad y robustez.</b>	<b>88</b>
<b>4.7.2.1.</b>	<b>Repetibilidad.</b>	<b>88</b>
<b>4.7.2.2.</b>	<b>Reproducibilidad.</b>	<b>91</b>
<b>4.7.2.3.</b>	<b>Robustez.</b>	<b>93</b>
<b>4.7.3.</b>	<b>Límite de detección y cuantificación.</b>	<b>99</b>
<b>4.7.4.</b>	<b>Selectividad y especificidad.</b>	<b>100</b>
<b>4.8.</b>	<b>Método del Tricloruro de Hierro utilizando el ácido gálico como patrón.</b>	<b>103</b>
<b>4.8.1.</b>	<b>Método del Tricloruro de Hierro. Correlación de los patrones de ácido gálico y Polyphenon 60.</b>	<b>105</b>
<b>4.9.</b>	<b>Análisis por HPLC de diferentes tés verdes, negros, oolong y puerh.</b>	<b>106</b>
<b>5.</b>	<b>DISCUSIÓN.</b>	<b>109</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSIONES.</b>	<b>115</b>
<b>7.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA.</b>	<b>118</b>

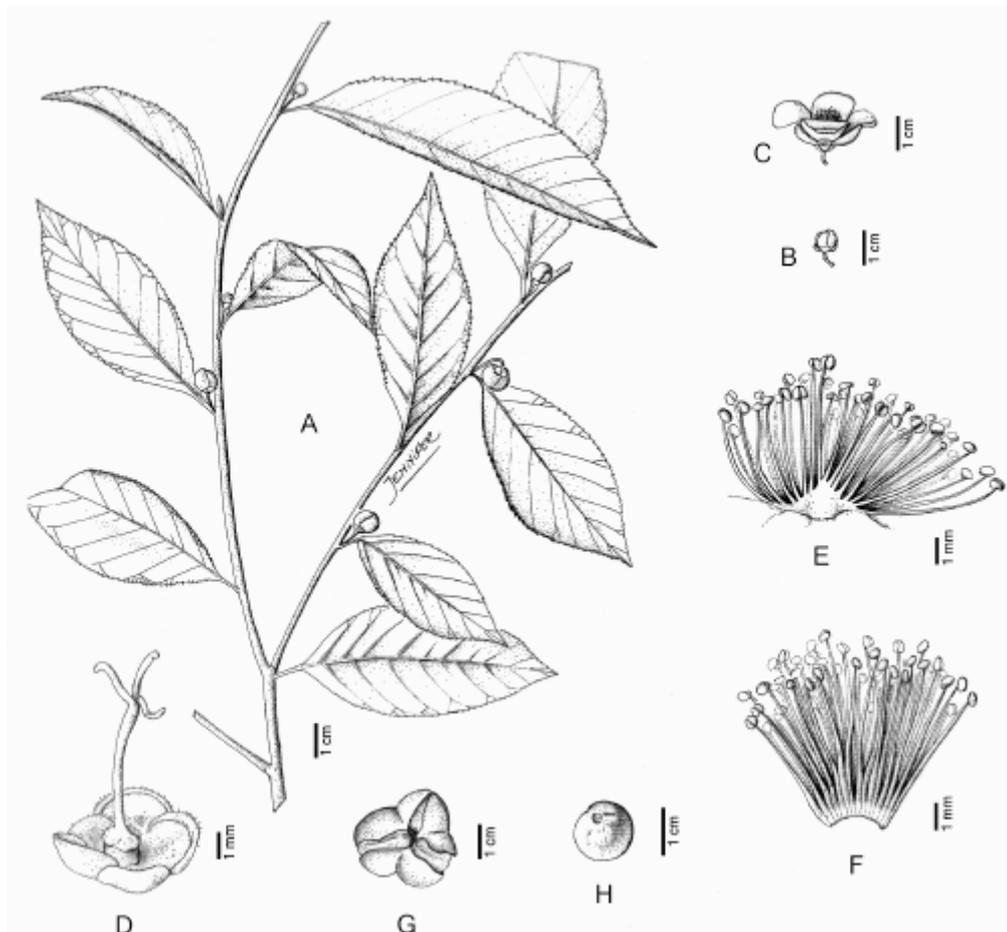
---

# **1. INTRODUCCIÓN.**

## 1.1. INTRODUCCIÓN.

El té se obtiene a partir de la infusión de la planta del té (*Camellia sinensis*). Dicha planta pertenece a la División de las *Magnoliophytas*, a la Clase de las *Magnoliopsidas*, al orden de *Ericales*, a la familia de las *Theaceae* y al género *Camellia*.

El té es un arbusto de hoja perenne que puede llegar a alcanzar cuatro metros de altura, para su cultivo se poda regularmente a un altura aproximada de dos metros. Tiene una gran raíz principal, las hojas son aserradas, de 4-15 cm de longitud y 2-5 cm de ancho. Las flores (Keller H. A. y cols., 2011) son solitarias o en grupos de 3, tienen 5 sépalos, 6-8 pétalos y numerosos estambres, son de color blanco-amarillento y miden 2-4 cm de diámetro (Figura I1).



**Figura I1. Planta de *Camellia sinensis*. A: aspecto general. B: botón floral. C: flor. D: gineceo. E: estambres (visión externa). F: estambres (visión interna). G: fruto con semillas. H: semilla. (Keller H. A. y cols., 2011).**

---

La especie *Camellia sinensis* se desarrolla mejor en suelos con pH ácido o neutro. Su parte subterránea crecerá con vigor en soportes con textura arenosa que se mantiene generalmente húmeda aunque no tolera bien los encharcamientos, por lo que la zona de plantación debe estar muy bien drenada, sólo, puede situarse en un lugar con semisombra para no repercutir negativamente en su crecimiento de forma normal.

La planta del té se cultiva principalmente en Asia (China, Japón, India, Indonesia, Vietnam, Sri Lanka, Taiwán), África (Etiopía, Kenia), América del Sur (Argentina), Australia, etc.

El té es una de las bebidas más utilizado en el mundo. Contiene diferentes compuestos fenólicos en particular las catequinas que promueven la salud desde un punto de vista científico. Entre los tipos de té, el té verde es el tipo más rico en contenido de compuestos fenólicos.

El presente estudio se realizó para comparar la capacidad antioxidante y las actividades de captación de radicales libres de diferentes tipos de tés comerciales obtenidos de Asia y África.

Los polifenoles del té son una fuente muy valiosa de compuestos cuyo consumo puede mejorar la salud y ser beneficioso en diversas patologías, como los trastornos cardiovasculares y el cáncer (Kanwar y cols., 2012; Yang y cols., 2009).

Los tés pueden clasificarse fundamentalmente en tres categorías en función del grado de fermentación: no fermentado (verde), semifermentado (oolong) y fermentado (negro); además pueden ser enriquecidos con aroma de las plantas que conducen a una amplia variedad de tés destacados por su sabor. Desde el punto de vista de la salud el té verde ha sido el más estudiado, debido a su riqueza en compuestos fenólicos.

Los principales polifenoles flavánicos en el té verde son la epigalocatequingalato (EGCG), epicatequingalato (ECG), epicatequina (EC) y epigalocatequina (EGC) (Jhonson y cols; 2010).

---

## 1.2. BREVE RESEÑA HISTÓRICA.

Según los datos recogidos en el libro “Historia del té” (Ariansen, J; 2009). La referencia más antigua del té la encontramos en el año 2737 a C. es la fecha que señala al Emperador Shen Nung, como el impulsor de la agricultura china en general y el té en particular. Su origen hay que buscarlo en el viejo valle de Assam, entre China e India, a orillas del río Bhramaputra.

Weidenger, moderno historiador y misionero en Taiwán referencia el té de Kombucha procedente de la dinastía Tsin 221 (a.C) como "El té divino" o "La medicina de la inmortalidad". Diferentes escritos chinos llaman al té, el elixir de la inmortalidad y lo asocian a Lao-Tse padre del taoísmo 100 (a.C).

En tiempos de la dinastía Ming (200 d.C.) el té era una decocción y pasa a ser una infusión. Las tres etapas principales de desarrollo son: té hervido, té machacado y té en infusión que corresponden a las dinastías Tang, Song y Ming (375).

Las primeras semillas de té llegan a Japón procedentes de China (800). El té es mencionado en muchas de las tablillas de la famosa biblioteca coreana de Tripitaka (1236). La llegada del té a la India desde China se data (1280) en tiempos de Marco Polo.

Hasta mediados del siglo XVI, solo se producía té verde de China que se prensaba en pastillas, a medidas que la demanda crecía se hizo necesario poder conservar el té fermentándolo y deshidratándolo deteniendo el proceso natural de descomposición, así nació el té oolong y el té negro (1550).

La Compañía Holandesa de las Indias Orientales transporta rumbo a Europa el primer cargamento importante de té (1606). El gobierno japonés autoriza comercializar té con los holandeses (1611). Oficialmente el té llega a Rusia en el año 1618, cuando el embajador chino le regaló al zar Alexis varias cajas de té.

El francés Guy Patin, escribe en Paris una carta fechada el 22 de Marzo de 1648 y se refiere a una tesis de medicina: "El doctor Moriste, queriendo favorecer la novedad y queriéndose con ello darse prestigio, ha hecho difundir aquí una tesis del té. Todo el mundo la ha desaprobado. La veréis y os reiréis de ella". Se refería a la gran cantidad de posibilidades terapéuticas de la infusión de té que señalaba Moriste.

---

El gobernador Peter Stuyvesant ordenó que se enviara el primer cargamento de té a los colonos de Nueva Ámsterdam, ciudad que más tarde se convertiría en Nueva York (1650). Así, aunque caro, debido a los altos aranceles, el té fue una bebida muy popular entre los ingleses que poblaban las recientes ciudades americanas y especialmente la sofisticada Boston. El Boston Tea Party, fue uno de los sucesos que iniciaron la cruenta guerra de independencia Americana (1773).

Los ingleses desarrollan el cultivo de té en India (1836). En estas fechas un pequeño cargamento de té de Assam fue embarcado a bordo del navío “Calcuta” rumbo a Londres. A su llegada fue vendido en la casa de India provocando los elogios más entusiastas por parte de los expertos. El primer negocio del té hindú había comenzado.

El explorador y naturalista escocés Robert Fortune defiende la tesis del origen del té, afirmando que cualquiera que fuera su sabor, aroma y color provenía de un solo y único árbol, la *Camelia Sinensis*. También demuestra que el té verde y el té negro podían obtenerse a partir de la misma planta y que el resultado sólo dependía del tratamiento de las hojas después de la cosecha.

Los ingleses siembran con gran productividad té en la isla de Ceilán (1867). Al principio utilizaron semillas procedentes de China pero más tarde se emplearon las semillas de la planta de Assam (India). En la actualidad es uno de los países de mayor producción de té en el mundo. A partir del año 1869 proliferan las plantaciones en la India en las zonas de Assam y Darjeeling en el norte y en las montañas de Nilgiri en el sur.

A partir del año 1880 con la inauguración del ferrocarril transiberiano se generó una drástica reducción de los costes de transporte y en sólo unos pocos años el pueblo ruso se convirtió en gran consumidor de té, tal y como sigue siendo en la actualidad. El té llega a Marruecos a partir del año 1900 y se convierte en la bebida nacional.

El comerciante neoyorquino Thomas Sullivan, comerciante de té y café, envía a sus clientes muestras de sus diferentes mezclas de té en pequeñas bolsitas de muselina (1904). La sorprendente comodidad con que se preparaba el té utilizando aquellas bolsitas hizo que Sullivan recibiera en poco tiempo muchos pedidos. Se había descubierto unos de los más populares envases, las bolsitas filtrantes.

---

Según la FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura) en la última sesión del Grupo Intergubernamental sobre el té. (29 de febrero de 2012, Roma) se espera que el consumo de té crezca un 1,8 por ciento anual y alcance los 3,36 millones de toneladas en 2021 con un importante crecimiento previsto en China, en donde se espera que la producción llegue a 2,3 millones de toneladas. En la actualidad los mayores productores son China, India, Kenia, Sri Lanka y Turquía. Los países que tienen un mayor consumo de té por habitante son Reino Unido, Turquía, Irlanda, Irán, Rusia y Marruecos.

### **1.3. TIPOS DE TÉ.**

Según el Real Decreto 1354/1983, de 27 de abril, por el que se aprueba la Reglamentación Técnico - Sanitaria para la elaboración, circulación y comercio de té y derivados la definición de té es la siguiente: “son las hojas jóvenes y las yemas, sanas y limpias, de las distintas especies del género botánico «Thea», en buen estado de conservación, convenientemente preparadas para el consumo humano, y poseyendo el aroma y gusto característicos de su variedad y zona de producción”.

A efectos de esta Reglamentación se distinguen las siguientes clases de té y derivados:

- Té verde: Es el té preparado, sin el proceso de fermentación y que no haya sufrido disminución alguna de sus principios activos.
- Té negro o té: Es el té convenientemente elaborado por fermentación, aunque conservando sus mismos principios activos.
- Té semifermentado o té oolong: Es el té en cuya preparación se ha interrumpido el proceso de fermentación para obtener unas características organolépticas determinadas.
- Té descafeinado: Es el té, verde o negro o semifermentado, desprovisto de la mayor parte de su cafeína.
- Extracto soluble de té: Es el producto soluble en agua obtenido por parcial o total evaporación de la infusión de té.

- 
- Te aromatizado: Son los tés definidos anteriormente, a los que por adición de sustancias aromatizantes autorizadas, plantas aromáticas o especias, se les comunica un aroma o sabor característicos.

Los productos elaborados deberán ajustarse a las siguientes especificaciones:

- Té negro o té:
  - Humedad (como máximo), 10 por 100.
  - Nitrógeno (como mínimo), 2,6 por 100.
  - Cafeína (como mínimo), 1 por 100.
  - Extracto acuoso (como mínimo), 32 por 100.
  - Taninos (como mínimo), 4 por 100.
  - Cenizas (como máximo), 9 por 100.
  - Cenizas insolubles en ácidos (como máximo), 1 por 100.
  - Fibra cruda (como máximo), 17 por 100.
- Té descafeinado:
  - Cafeína (como máximo), 0,12 por 100.

En la elaboración y consumo de té y sus derivados se permite:

- La mezcla entre sí de diversas especies de té.
- La presencia de los peciolos de sus hojas, en mayor o menor cantidad, según el origen del té.
- La mezcla entre sí de tés verdes con tés negros y tés oolong o semifermentados.
- La adición de sustancias aromáticas autorizadas, plantas aromáticas o especias.

En la elaboración y consumo de té y sus derivados no se permite:

- El envasado para la venta de tés que contengan hojas y tallos extraños al té, materias inertes y otras impurezas en proporción superior al 2 por 100.

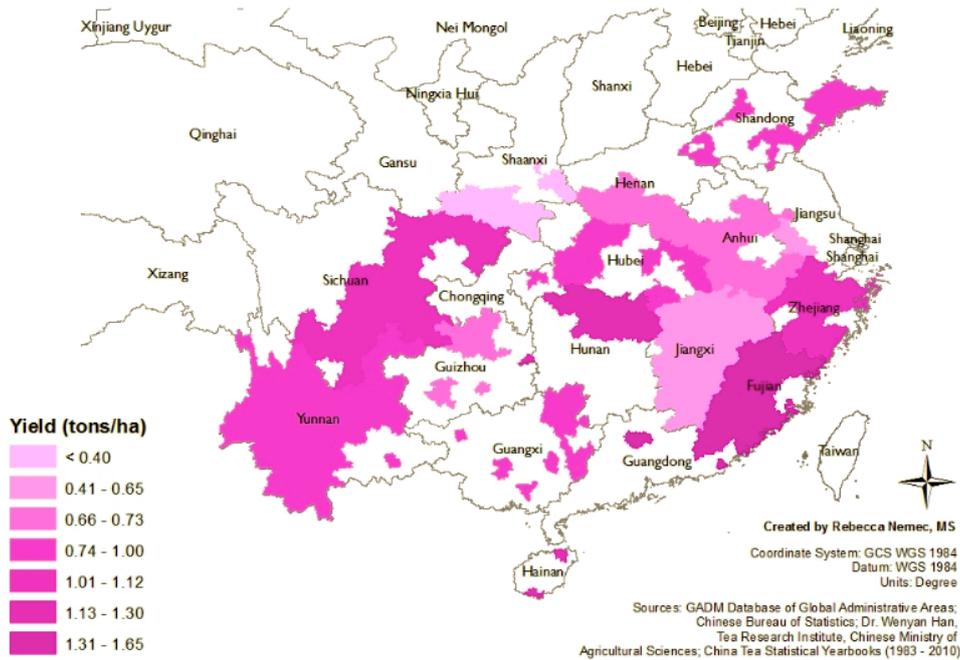
- 
- Los tratamientos destinados a producir aumento en su masa.
  - La venta para el consumo humano de tés «agotados».
  - La adición de agua, agentes conservadores, colorantes y, en general, de cualquier aditivo, así como de materias extrañas al producto, excepto lo establecido en el apartado 10.4.
  - El envasado y venta de tés y derivados, alterados o con caracteres organolépticos anormales.
  - El empleo de la palabra té en cualquier producto que no proceda de las especies del género botánico «Thea».

Según el UK Tea and Infusions Association (Asociación del Té y las infusiones del Reino Unido) los diferentes tipos de té se pueden agrupar según su origen geográfico en:

- Tés de China.
- Tés de India y Sri Lanka (Ceilán).
- Tés de África.
- Tés de otros países productores.

### **1.3.1. Tés de China.**

China sigue representando más del 18% de las exportaciones mundiales. Produce los siguientes tipos de té principalmente té negro, té verde, oolong, blanco, puerh y tés comprimidos y aromatizados. Las regiones de mayor producción (Figura I2) son Fujian, Yunna, Sichuan, Hubei y Zhejiang (Wenyan Han., 2010).



**Figura I2. Regiones de producción de té en China. (Instituto de Investigación del Té. Ministerio de Ciencias Agrícolas de China). China National Bureau of Statistics. 2011. “China Statistical Yearbook (1979-2011)”. <http://chinadatacenter.org/>. (Wenyan Han., 2010).**

### 1.3.1.1. Té negro.

Elaborado por fermentación. Este proceso llamado “fermentación” responde a la oxidación enzimática de las catequinas. La enzima polifenol oxidasa juega un rol clave; la misma está presente en los cloroplastos. En la hoja intacta, la enzima polifenol oxidasa no está en contacto con su sustrato, las catequinas. El fundamento de la fermentación consiste en poner en contacto la enzima con su sustrato (luego del enrollado o enrollado) en presencia de oxígeno mediante la ruptura de las membranas, de manera que los polifenoles y la enzima polifenol oxidasa puedan difundir en el citoplasma. El resultado de esta reacción química genera teaflavinas, tearubiginas y otras sustancias altamente polimerizadas, de colores entre amarillos, rojos y cobrizos, constituyentes del aroma y sabor del té negro.

- Lapsang Souchong. Es el más famoso té de China, proviene de las montañas del norte de Fujian. Es un gran té de hoja única que se distingue por su aroma y

---

sabor ahumado. El sabor alquitranado se adquiere a través de secado con fuego de leña de pino.

- Keemun. Té negro de la provincia de Anhui. Se presenta en finas tiras estrechas sin romper las hojas.
- Yunnan. Té negro de la provincia de Yunnan, en el suroeste de China. Tiene sabor a malta y suele tomarse con leche.

Otros téns negros de China recomendados son Keemun Mao Feng (punto de pelo) y Sichuan Imperial.

### 1.3.1.2. Té verde.

Muchos téns verdes de China todavía están hechos tradicionalmente por métodos manuales usando técnicas que han sido transmitidas de generación en generación. Sin embargo, más y más téns ahora se hacen en fábricas mecanizadas. Las hojas recién arrancadas se cuecen al vapor y luego se enrollan a mano o a máquina. Para eliminar la humedad el té se seca en hornos calientes o en estufas de carbón.



**Figura I3. Té verde de China. Jade Rings (Fujian).**

- 
- Gunpowder o pólvora. La mayoría del té de la pólvora se produce en Pingshui en la Provincia Zheijian, la hoja se enrolla en pequeñas bolitas de diferentes tamaños y luego se seca.
  - Chun Mee. El procesamiento de tés 'ceja' exige gran habilidad con el rodillo de mano y secar las hojas a la forma correcta. Estas hojas largas y finas dan un color amarillo pálido y un sabor suave.

Otros tés verdes de China son: Jade Rings (Figura I3), Longjing, Taiping Hon Kui y Youngxi Huo Qing.

### **1.3.1.3. Té oolong.**

Son tés semifermentados tradicionalmente de la provincia de Fujian de China y Taiwán, básicamente son de dos tipos: oolongs de hojas laminadas verdosas (30% de oxidación) y oolongs de hojas marrones oscuras (60-70% de oxidación).

- Tie Kuan Yin. "Té de la Diosa de Hierro de la Misericordia". Es hoy uno de los más codiciados tés oolongs de todo el mundo.

Otros tés oolong de China recomendados son Fonghwang Tan-chung, Shui Hsien (Water Sprite), Oolong Sechung y Wuyi Liu Hsiang, Huan Jin Qui (Yellow Golden Flower), Da Hong Pao (Gran Red Robe), Loui Gui (Carne flor) y Wuyi Yan (Bohea rock).

- Pouchong. Producido en la provincia de Fujian de China y Taiwán, los tés Pouchong son ligeramente más oxidados que los oolongs. El nombre significa 'el tipo envuelto' que se refiere al hecho de que el té fue envuelto tradicionalmente en papel después del proceso de fabricación cuando el té estaba listo para la venta, sus hojas son negras y largas.

---

#### 1.3.1.4. Té blanco.

Los té blancos tradicionalmente provienen de la provincia de Fujian de China y se hacen de yemas y hojas secadas bajo el sol. Los té blancos más conocidos son Pai Mu Tan que se obtiene a partir de brotes y hojas muy jóvenes, y Yin Zhen (Silver Needles) que se elabora sólo con los nuevos brotes de las hojas.

- Pai Mu Tan Imperial. Este té blanco está hecho de pequeñas yemas y unas hojas que se recogen en el comienzo de la primavera, y una vez que se han secado, se parecen a un montón de pequeñas flores blancas con unas cuantas hojas más oscuras que rodean el brote blanco, de ahí, la razón de su nombre, 'White Peony'.
- Yin Zhen. Desde la provincia Fujian, este té se hace de brotes tiernos que están cubiertos de pelos de color blanco plateado y su nombre significa “agujas de plata”.

#### 1.3.1.5. Té puerh.

La definición oficial de China para el té Puerh (Figura I4) es "productos fermentados del té de hojas verdes grandes, recogido dentro la provincia de Yunnan".



**Figura I4. Té bloque de puerh de China.**

---

Hay dos tipos de té puerh natural (maduran al sol y es conocido como Raw Tea o Sheng té) y puerh artificial (tratado en un wok y es conocido como té maduro o Shou té).

Los tés puerh naturales se almacenan en condiciones de frío y se dejan fermentar de 15 a 50 años. Los tés puerh fermentados artificialmente se envejecieron durante sólo unas pocas semanas o meses. Cuando está listo, cada torta del té de puerh se envuelve en papel de seda o en hojas de bambú secas. El té puerh lleva el nombre de la ciudad en la provincia de Yunnan Puerh, fue el centro comercial más importante para los tés hechos en la zona.

#### **1.3.1.6. Tés comprimidos y aromatizados.**

- Tuancha. Significa "bolas de té", la más pequeña tiene la mitad del tamaño de una pelota de ping-pong. Estas bolitas están hechas en su mayoría de tés puerh.
- Tuocha. Originario de la provincia de Yunnan, Tuocha es generalmente un té puerh que se ha comprimido en forma de nido de pájaro.
- Aromatizados y tés perfumados. Jasmine (tés secados con flores de jazmín colocados entre las capas de té), Rose Congou (té negro de hojas grandes perfumado con pétalos de rosa). Earl Grey (mezcla de tés negros de China tratado con aceites naturales). Otros tés de esta categoría son Osmanthus, Magnolia, Orquídea, Chloranthus y Lichee.

#### **1.3.2. Tés de India y Sri Lanka (Ceilán).**

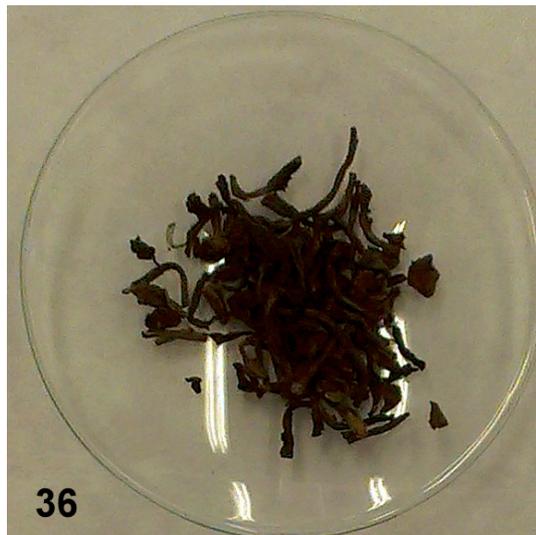
##### **1.3.2.1. Tés de la India.**

India es uno de los principales productores de té, exportando más del 12% del té del mundo. Aunque originario de la región de Assam, los primeros tés producidos comercialmente se plantaron a partir de semillas traídas de China. Hacia 1840, la India fue produciendo envíos regulares para su venta a Londres, y poco a poco la siembra de

---

fincas creció en todo el país (Nilgiri en el sur y Darjeeling en el norte y a mayor altitud). La India produce té en su mayoría negro, una pequeña cantidad de té verde (1% de la producción total) y se produce principalmente para el mercado de Afganistán.

- Assam. Assam es un área de crecimiento importante que cubre el valle del Brahmaputra, que se extiende desde el Himalaya hasta la Bahía de Bengala. Hay 655 fincas que cubren unas 407.000 hectáreas. El té de Assam tiene un distintivo marrón moteado y hojas de color oro, conocido como "naranja" cuando se seca.
- Primero Assam Flush. Se obtiene de los primeros arbustos de té que crecen en marzo, la primera oleada se recoge durante 8 a 10 semanas, raramente se comercializa en Europa.
- Segundo Assam Flush. Estos té se recogen de julio a septiembre. El segundo brote Assam es el mejor de la temporada (Ej. Napuk y Thowra).
- Darjeeling. Considerado como el "Champagne de los té," el té Darjeeling se cultiva en 100 fincas en las estribaciones de la cordillera del Himalaya, en más de 18.000 hectáreas (Figura I5).



**Figura I5. Té Primera Flush negro de la India (Darjeeling).**

- 
- Primero Darjeeling Flush. Los primeros brotes de los arbustos de Darjeeling se recogen en abril. Estos primeros té de la temporada son de alta calidad y tienen mucha demanda y alcanzan precios muy altos. Castleton Primera Flush y Bloomfield Primera Flush son de los más prestigiosos.
  - Segundo Darjeeling Flush. Son recogidos entre mayo y junio y producen té de excelente calidad que son considerados por algunos mejores que la primera oleada, ya que tienen un sabor afrutado, menos astringente que los té anteriores. De los más prestigiosos son Puttabong y Namring.
  - Nilgiri. La región Nilgiri está situada al sur de la India, situada en una meseta montañosa. Más de 20.000 pequeños agricultores cultivan este té en cerca de 90.000 hectáreas de cultivo. Nunsch es un típico té de Nilgiri.
  - India Tea. Una mezcla de té de diferentes zonas de la India.

#### **1.3.2.2. Té de Sri Lanka (Ceilán).**

Sri Lanka representan más del 19% de las exportaciones de té mundiales. En 1972, la isla entonces conocida como Ceilán volvió al nombre tradicional de Sri Lanka, pero conservó el nombre de Ceilán para la comercialización de té. Debido a la ubicación geográfica, el té puede ser arrancado en Sri Lanka durante todo el año.

- Dimbula. Probablemente el más famoso de los té de Ceilán, se cultiva a unos 1.700 metros sobre el nivel del mar. Se produce en la zona alta del centro de Sri Lanka que incluye Dickoya y Nuwarah Eliya.
- Kenilworth. Este té proviene tiene hojas grandes y alargadas.
- Uva. Se cultiva entre 700 y 1.600 metros sobre el nivel del mar en las laderas de las montañas orientales de las Montañas Centrales de Sri Lanka. Tiene un color ámbar brillante.
- Santiago. Se trata de una infusión de color cobre.
- Nuwara Eliya. Té de color brillante, se toma con limón.
- Nuwara Eliya Estate. Destaca por su perfume, se toma con leche.

- 
- Ceilán Blend. Los tés de Ceilán abarcan todo el espectro de la producción de té, mediante la combinación de tés de diferentes zonas de la isla, con una muy amplia variedad de sabores y características.

### **1.3.3. Tés de África.**

África es ahora un productor importante del té en el mundo. Los mayores países productores de té en África son Kenia, Malawi, Zimbabwe, Tanzania, y Sudáfrica que produce aproximadamente el 32% de las exportaciones mundiales.

#### **1.3.3.1. Tés de Kenia.**

Uno de los más antiguos productores africanos, Kenia tiene una historia del té que se remonta a 1903, cuando las semillas de té de la India se plantaron por primera vez. Kenia tiene 69.000 hectáreas cultivadas por pequeños agricultores (shambas). Kenia supone el 22% de las exportaciones mundiales. El clima ecuatorial de Kenia permite el cultivo del té durante todo el año.

#### **1.3.3.2. Tés de Malawi.**

Malawi es el país pionero del cultivo del té en África, empieza su comercialización en 1880 en Mulanje. Malawi representa el 3% de las exportaciones mundiales y es el principal responsable de la propagación del cultivo del té en África. Se utilizan en la mezcla de las principales marcas de té británicas.

#### **1.3.3.3. Tés de Zimbabwe.**

Zimbabwe representa el 1 % de las exportaciones mundiales de té. Hoy en día, el té es una mercancía protegida en Zimbabwe para controlar la calidad y el crecimiento de la industria del té.

---

#### **1.3.3.4. Tés de Tanzania.**

Tanzania ahora exporta entorno al 1% del té mundial. Las diferentes altitudes dan lugar a distintos tipos de té, pero todos los tés de Tanzania se utilizan mucho para mezclar.

#### **1.3.3.5. Tés de Sudáfrica.**

El té de KwaZulu es el único té de Sudáfrica que se utiliza para ser exportado para el consumo internacional. Se utiliza bebido con leche.

### **1.3.4. Otros países productores de té.**

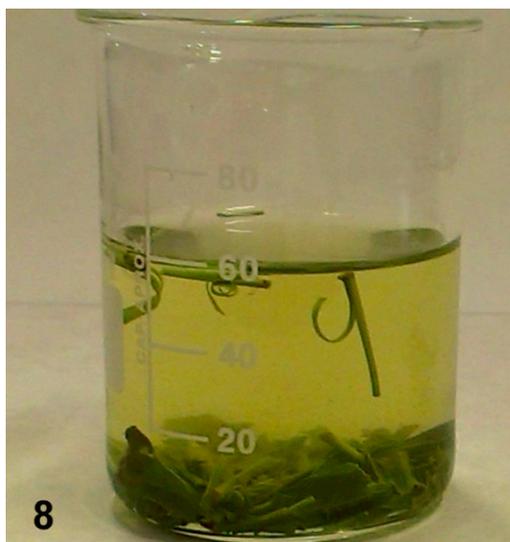
#### **1.3.4.1. Tés de Indonesia.**

El té ha sido parte de la forma de vida en Indonesia durante más de 200 años. Situado en el Mar de China Meridional y el Océano Pacífico, Indonesia forma una cadena de islas que se extiende desde Malasia a Papúa Nueva Guinea, Java y Sumatra.

En 1984, después de una gran inversión, las exportaciones de té de Indonesia comenzaron a dejar su huella en el mercado. En la actualidad, Indonesia representa más del 7% de las exportaciones mundiales. La mayoría de los tés se venden para mezclar.

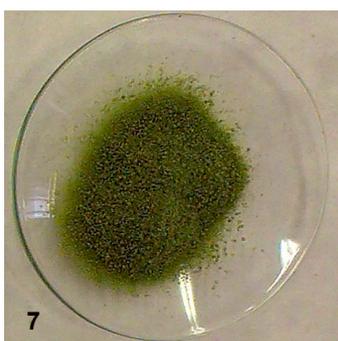
#### **1.3.4.2. Tés de Japón.**

Los japoneses siempre han sido conocidos por producir el té verde de alta calidad. La exportación mundial de té japonés ha disminuido en los últimos decenios, debido al precio. Japón produce el 3% del té en el mundo. El té Gyokuro (Figura. I6) es muy apreciado en Japón. No es molido, y se obtiene de los primeros brotes más tiernos de la planta. Es un té muy refinado.



**Figura I6. Té verde de Japón. Gyokuro (Fukuoka).**

Sencha es el té verde común japonés. Es un té sin moler y se recoge de los brotes de las plantas. Es una infusión de color amarillo pálido. Matcha (Figura I7) es un té cuyos arbustos se cubren de la acción del sol cuando ya han crecido para retrasar el crecimiento y que aumente el color verde de las hojas. Una vez recolectadas las hojas se ponen en superficies planas para que se sequen sin que fermenten. Es un té molido.



**Figura I7. Té verde de Japón. Matcha de segunda (Kyoto)**

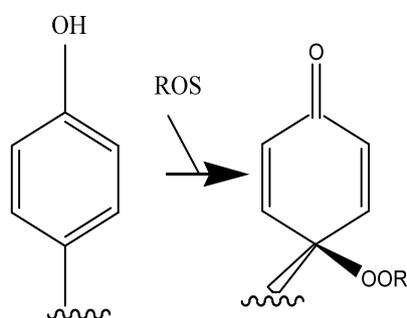
#### **1.4. COMPUESTOS FENÓLICOS.**

Los fenoles o compuestos fenólicos son compuestos orgánicos cuyas estructuras moleculares contienen al menos un grupo fenol, un anillo aromático unido al menos a un grupo funcional. Muchos son clasificados como metabolitos secundarios de las plantas. En general son sintetizados por una de estas dos vías biosintéticas: la ruta del ácido shikímico o la vía del ácido malónico (o por las dos, por ejemplo los flavonoides).

---

Los compuestos fenólicos de las plantas son un grupo heterogéneo de productos con más de 10.000 compuestos (Arouma, O.I., 2003). Algunos son solubles en solventes orgánicos, otros son glucósidos o ácidos carboxílicos y por lo tanto solubles en agua, y otros son polímeros muy grandes e insolubles (Girbés T y cols., 2013).

Este grupo también juega una variedad muy heterogénea de funciones biológicas en las plantas, como por ejemplo como defensa ante herbívoros y patógenos; otros proveen de soporte mecánico a la planta; otros atraen insectos polinizadores o dispersores de frutos; algunos de ellos absorben la radiación ultravioleta, o actúan como agentes alelopáticos (agentes que reducen el crecimiento de plantas competidoras que estén cerca). Los compuestos fenólicos son atrapadores de radicales libres. El mecanismo de reacción es el descrito en la Figura I8.



**Figura I8. Mecanismo de reacción de los compuestos fenólicos. Los compuestos fenólicos se oxidan por sustancias fuertemente oxidantes y por radicales libres generando quinonas (Girbés T y cols., 2013).**

En esta reacción el fenol se oxida a quinona y después a peróxido (-OOR). El peróxido más sencillo es el peróxido de hidrógeno (nombre vulgar: agua oxigenada) de fórmula  $H_2O_2$  (HO-OH). Los peróxidos superiores se forman sustituyendo un hidrógeno del HO-OH por un resto R (RO-OH). Cuando el peróxido se forma en una biomolécula, se pierde la función de dicha biomolécula y ello puede provocar daños serios en el funcionamiento de las células y los tejidos.

---

### **1.4.1. Fenoles simples.**

#### **1.4.1.1. Fenilpropanoides simples.**

Tienen un esqueleto básico de fenilpropanoide (un anillo aromático unido a una cadena de 3 carbonos). Ejemplos: ácido trans-cinámico, ácido p-cumárico, y sus derivados como el ácido cafeico. El ácido cafeico es considerado un poderoso antitumoral y entre los alimentos que lo contienen están: crucíferas (coles, coles de Bruselas, rábanos), apio, naranjas, limones, calabazas, higos, lechuga, etc.

#### **1.4.1.2. Lactonas fenilpropanoides o ésteres cíclicos.**

Se les denomina también cumarinas. Poseen un esqueleto fenilpropanoide pero el propano está ciclado. Ejemplos: la umbeliferona (una cumarina simple). Originalmente la cumarina se aisló del haba de Tonka. Su rol en las plantas parece ser de defensa, dándole propiedades de rechazo a la alimentación, antimicrobiana, captadora de radiación UV e inhibidora de la germinación.

La propiedad de rechazo a la alimentación que poseen las cumarinas puede ser correlacionada con el efecto que provoca como alimento en los animales. La ingesta de plantas como el trébol, rico en cumarinas, puede causar hemorragias internas en mamíferos.

#### **1.4.1.3. Derivados del ácido benzoico.**

El esqueleto es un anillo aromático unido a un carbono. Son formados a partir de fenilpropanoides. Ejemplos: la vainillina, el ácido salicílico. El ácido salicílico (o ácido 2-hidroxibenzoico) recibe su nombre de *Salix*, la denominación latina del sauce de cuya corteza fue aislado por primera vez. Se trata de un sólido incoloro que suele cristalizar en forma de agujas. Tiene una buena solubilidad en etanol y éter. Este producto sirve como materia prima para la obtención del ácido acetilsalicílico, comercialmente conocido como Aspirina. El ácido salicílico aparece en el comino y el ácido vainillínico en la salvia.

---

### 1.4.2. Fenoles complejos.

Los fenoles complejos los podemos clasificar en lignanos y Flavonoides (Iwashina, T., 2000). En función de los diversos sustituyentes y su colocación espacial, aparecen diversas familias de flavonoides. Los flavonoides se biosintetizan en todas las "plantas terrestres" o embriofitas, y también en algunas algas como la *Charophyta*, y aunque todas las especies comparten la vía biosintética central, poseen una gran variabilidad en la composición química de sus productos finales y en los mecanismos de regulación de su biosíntesis, por lo que la composición y concentración de flavonoides es muy variable entre especies y en respuesta al ambiente. Las familias más importantes son flavanoles, flavanonas, flavonas, flavonoles, isoflavonas y antocianos.

### 1.4.3. Antocianos.

La calidad y madurez de los frutos rojos o negros procedentes de diversos tipos de plantas de interés alimentario o farmacéutico se determina parcialmente por la intensidad de su color. Estas bayas deben su color a diferentes tipos de compuestos polifenólicos entre los que destacan desde un punto de vista cuantitativo los antocianos. Las antocianidinas son los constituyentes básicos de este tipo de compuestos y están formados por un anillo aromático (C6) unido a un anillo heterocíclico (C3) que contiene un oxígeno protonado y unido a su vez a un tercer anillo aromático (C6). Las diferencias entre las distintas antocianidinas caracterizadas, radican en el número de hidroxilos, la naturaliza, posición y número de restos azucarados unidos a esta estructura básica, así como del número de restos de ácidos alifáticos o aromáticos unidos a estos azúcares.

En los últimos años, diversos estudios han puesto de manifiesto que estos compuestos poseen propiedades farmacológicas muy interesantes relacionadas con diversas patologías cardiovasculares, inmunológicas, antiinflamatorias o anticancerígenas entre otras (Liu, R.A., 2004), por lo que ha surgido un creciente interés en caracterizarlos (Girbés T y cols., 2013).

---

## 1.5. COMPOSICIÓN DEL TÉ.

La composición del té depende de diversos factores como son la variedad de la planta, el clima, las prácticas de cultivo, la estación de recogida, la edad y la posición de la hoja, así como los tratamientos y los tipos de procesamiento que permiten obtener las diversas variedades en las que se comercializa el té.

La composición química de las hojas del té se ha estudiado en profundidad y sus principales compuestos son los polifenoles que representan un alto porcentaje de su peso seco.

El té además contiene otros componentes químicos como las metilxantinas, aminoácidos, clorofila, carotenoides, lípidos, carbohidratos, vitaminas, y más de 600 compuestos volátiles. En la tabla I1 se recogen los diferentes componentes del té (Zhen Y., 2002; Venkata y cols; 2011; Nie, S.P. y cols., 2011).

Los polifenoles del té incluyen hasta seis grupos flavanoles, hidroxilo-4-flavanoles, antocianinas, flavonas, flavonoles y ácidos fenólicos. Los flavanoles más característicos son las catequinas, que aportan un punto de amargura y astringencia a la infusión. Los flavonoles más importantes son la quercetina, kamferol, mircetina, y sus glicósidos.

En la oxidación de los polifenoles durante el procesamiento del té negro se produce la formación de catequinas y complejos de ácido gálico tales como teaflavinas y tetrubiginas (Hara y cols., 1995a; Lee y cols., 2008).

Las metilxantinas como la cafeína, teofilina y teobromina representan del 2 al 4%. El té contiene muchos aminoácidos, como la teanina, específica de la planta del té, que constituye el 50% del total de aminoácidos. La degradación de los aminoácidos favorece la biogénesis del aroma del té (Balentine y cols., 1997).

La clorofila, los carotenoides, los lípidos y los compuestos volátiles son componentes residuales del té, pero tienen importancia en la formación del aroma. Los minerales representan entre el 4 y 9% de las cenizas del té, los más importantes son flúor, potasio, aluminio, yodo, selenio, níquel y manganeso.

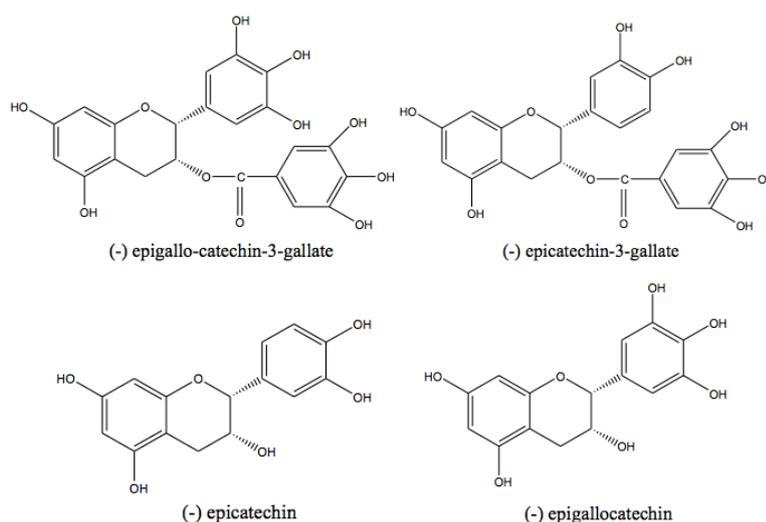
Las estructuras de los cuatro principales catequinas, epigalocatequingalato (EGCG), epigalocatequina (EGC), epicatequingalato (ECG), y epicatequina (EC) se muestran en

---

la figura I9. El epigalocatequingalato (EGCG) es la principal catequina del té (Sang y cols., 2011).

Los flavonoles, como la quercetina, kaemperol, mircetina, y su glucósidos, también están presentes en el té en proporciones menores (0,5-2,5%).

La apigenina es la única flavona identificada en el té que junto con sus glucósidos representan una fracción muy pequeña de los polifenoles del té.



**Figura I9. Catequinas más abundantes en el té.**

Los principales polifenoles del té negro son teaflavinas y terubiginas (Clifford cols., 2013; Da Silva Pinto., 2013) que se forman por la oxidación y polimerización de catequinas durante el proceso de la fermentación. Son dos las enzimas que controlan el proceso la polifenol oxidasa (PPO), que regula la oxidación de los flavanoles para formar los componentes del té negro como teaflavinas y terubiginas y la polifenol peroxidasa (POD) que cataliza la oxidación de los O-difenoles a sus quinonas utilizando peróxidos, como el peróxido de hidrógeno que se forma por la acción de PPO en ciertos flavanoles (Shengmin y cols., 2011).

Los polifenoles del té previenen la formación de especies reactivas del oxígeno (ROS) y son fuertes quelantes de iones metálicos El carácter fuertemente antioxidante de los polifenoles del té se atribuye a su estructura (Kanwar y cols., 2014).

**Tabla II. Composición del té. Porcentaje (%) en peso seco (Zhen Y., 2002; Venkata y cols; 2011).**

<b>Clase de componente</b>	<b>Nombre de cada componente</b>	<b>Porcentaje de cada componente (%)</b>
Ácidos	Aminoácidos	2-4
	Ácidos orgánicos	0,5-2
Minerales	Minerales insolubles	1,5-3
	Minerales solubles	2-4
Sacáridos	Carbohidratos	3-5
	Celulosas	6-8
	Polisacáridos	4-10
Polifenoles/Flavonoides	(-)-EC	1-3
	(-)-ECG	2-4
	(-)-EGC	4-7
	(-)-EGCG	9-14
	(-)-GC	1-2
	(+)-C	0,5-1
	Glucósidos de flavonoles	3-4
	Catequinas menores	0,4-1
	Protoantocianidinas	2-3
Otros compuestos	Caféina	3-4
	Pigmentos, pigmentos insolubles	0,5-0,8, 0,5
	Lignina	4-6

	Lípidos	2-4
	Saponinas	0,04-0,07
	Vitaminas	0,6-1
	Volátiles	0,01-0,02

Algunos de los compuestos bioquímicos responsables del aroma de los diferentes té son el tinalol, nerolidol, etc. (Screeer., 1988; Yamanishi., 1995 y 1996; Takeo., 1996; Kawakami., 1997), entre los compuestos responsables del sabor tenemos las teaflavinas, las tearubiginas, la cafeína, etc. (Yamanishi., 1995).

Los compuestos responsables del color de los diferentes té son las teaflavinas (marrón-amarillento), terubiginas (marrón-rojizo), glucósidos de flavonoles (amarillo claro), feoforbida (pardo), feofitina (negro), carotenos (amarillos) (Nakagawa y cols., 1970, 1975; Liu y cols., 1990).

## **1.6. PROPIEDADES MEDICINALES DEL TÉ.**

### **1.6.1. Los polifenoles del té y la actividad antioxidante.**

Las catequinas del té verde son moléculas muy activas que actúan como antioxidantes (Yang y cols., 2009) y como pro-oxidantes (Hou y cols., 2005). Una importante preparación estandarizada de polifenoles del té verde es el Polyphenon® que se ha utilizado en estudios sobre la inflamación relacionados con la carcinogénesis de colon en ratones (Shirakami et al., 2008) y en los estudios de la farmacocinética de catequinas en seres humanos sanos.

Un desequilibrio entre antioxidantes naturales y la producción de radicales libres puede causar daños a las proteínas y el ADN de las células. El té es rico en flavonoides y evita la producción excesiva de radicales libres (Weisburger y cols., 2000), las catequinas del té verde tienen una alta capacidad antioxidante (Buzzini y cols., 2009).

---

La actividad antioxidante total y el contenido de compuestos fenólicos en preparados de extractos té verde y su contenido dependiendo del tiempo y la temperatura se determinaron utilizando el método de Folin-Ciocalteu (Molan y cols., 2009).

### **1.6.2. Los polifenoles del té y el cáncer.**

Se ha demostrado que los extractos de té inhiben la formación y el desarrollo de tumores en diferentes órganos en modelos animales (Venkata y cols; 2011). El Epigallocatequingalato (EGCG) también actúa como anti-inflamatorio (Shirakami y cols., 2008), suprimiendo la inflamación relacionada con la carcinogénesis de colon inducida por azoximetano (AOM) y sulfato sódico de dextrano (DSS) y contra el cáncer. Entre las distintas catequinas el Epigallocatequingalato (EGCG) es la más ampliamente estudiada (Kanwar y cols., 2012; Hou y cols., 2005).

Estudios recientes indican que los receptores de tirosina quinasas (RTK), que desempeñan papeles importantes en la proliferación celular, son uno de los posibles objetivos de las catequinas del té verde en la inhibición del crecimiento de células de cáncer. El Epigallocatequingalato (EGCG) inhibe la proliferación celular e induce la apoptosis en varios tipos de células cancerosas, incluyendo células de cáncer colorrectal y carcinoma hepatocelular, mediante el bloqueo de la activación del factor de crecimiento epidérmico receptor (EGFR) de la familia de las RTK (Shimizu y cols., 2011).

El Epigallocatequingalato (EGCG) inhibe la proliferación celular y la mejora de la apoptosis, así como la inhibición de la invasión celular, la angiogénesis y la metástasis (Weisburger, J., 1996; Gao y cols; 2013). Los factores dietéticos pueden influir sustancialmente en el riesgo de cáncer humano. El té es una gran fuente de polifenoles de la dieta en muchas poblaciones.

Diferentes estudios asocian los antioxidantes polifenólicos presentes en el té verde y negro a la reducción del riesgo de cáncer en ensayos con animales (Katiyar y cols., 1996; Dreosti y cols., 1997; Kohlmeier y cols., 1997). La mayoría de los estudios que muestran los efectos preventivos del té se llevaron a cabo con té verde; sólo unos pocos estudios evaluaron la utilidad de té negro (Katiyar et al., 1996; Serpen y cols;

---

2012). Estos estudios demostraron que el consumo de té y sus constituyentes polifenólicos proporcionan protección contra cánceres de piel inducidos por la radiación ultravioleta en modelos de ratón.

La mayor actividad preventiva del cáncer por el té se debe al Epigallocatequingalato (EGCG), muchos productos de consumo, se han complementado con extractos té verde y están disponibles en las tiendas de comestibles y farmacias.

La combinación de Epigallocatequingalato (EGCG) y Sulindac mejora de forma significativa la apoptosis en colon de rata y la reducción de los focos de criptas aberrantes. La combinación de EGCG y sulindac muestra efectos sinérgicos para la actividad preventiva de la carcinogénesis de colon de rata inducida por azoximetano (AOM), mediante la mejora de la apoptosis. El Epicatequingalato (EGCG) puede ser candidato adecuado para la terapia y la prevención del cáncer (Ohishi y cols., 2002).

La administración oral de té verde mejora los efectos inhibidores de tumores en carcinomas de ascitis de Ehrlich implantados en ratones (Sadzuka y cols., 1998). Los polifenoles del té verde han mostrado efectos inhibidores contra la formación y el desarrollo de tumores (Yang y cols., 2010; Lamber y cols., 2010) en diferentes órganos animales (piel, pulmón, cavidad oral, esófago, estómago, intestino, colon, hígado, páncreas, vejiga, glándula mamaria y próstata). La importancia de los polifenoles del té en el tratamiento del té ha sido ampliamente estudiada (Zaveri, 2006; Ju y cols., 2007; Lambert y cols., 2010a; Yang y cols., 2007).

Los efectos del té verde y el té negro se han estudiado en modelos animales para conocer con más detalle los procesos celulares in vivo en diferentes tipos de tumores (Matsuo y cols., 1996; Hibasami y cols., 1998; Rodgers y cols., 1998; Miodini y cols., 1999; Kuhlmann y cols., 1998).

A pesar de estos efectos positivos del té, la administración de dosis muy grandes de extractos de té verde concentrado se ha demostrado que desencadenan ciertos efectos adversos que elevan las preocupaciones desde el punto de vista de la seguridad alimentaria (Schönthal., 2011, Lambert y cols., 2010b; Jiménez y cols., 2014b).

---

### 1.6.3. Los polifenoles del té y el riesgo de enfermedad coronaria.

La enfermedad coronaria prevalece más en el mundo occidental, probablemente como resultado de la forma de vida en esta parte del mundo, que incluye una dieta alta en grasas saturadas, baja actividad física y una gran proporción de población fumadora e hipertensa. Una variedad de estudios epidemiológicos mostró el efecto preventivo del consumo de té verde contra la arteriosclerosis y la enfermedad cardíaca coronaria (Weisberger y cols., 1996; Thelle y cols., 1995).

El consumo de té ha demostrado que reduce el riesgo de hipertensión, disminuye la concentración de colesterol y la presión arterial (Stensvold y cols., 1992; Mckay D.L y cols., 2002).

Además, los estudios en animales de experimentación mostraron el efecto preventivo del té verde contra la arteriosclerosis (Tijburg y cols., 1997; Dubick y cols., 2001). Las investigaciones realizadas en los últimos años revelan que tanto el té negro como el té verde tienen efectos beneficiosos similares en la disminución del riesgo de muchas enfermedades coronarias humanas (Gupta y cols., 2008; Danesi y cols., 2009; Frank y cols., 2009; Venkata y cols; 2011).

### 1.6.4. Efectos antibacterianos y antivirales del té.

Las catequinas del té verde han demostrado actividad antibacteriana en bacterias "gram-positivas" y "gram-negativas" tales como *Staphylococcus aureus*, *S. epidermis*, *Plesiomonas shigelloides* (Toda y cols., 1989), *Salmonella typhi*, *S. tiphimurium*, *S. enteritidis*, *Shigella flexneri*, *S. disenteriae* y *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus* (Mitscher y cols, 1997; Toda et cols., 1989; Toda y cols., 1991), *Campylobacter jejuni* y *C. coli* (Diker y cols., 1991), pero no son eficaces contra *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* o *Aeromonas hydrophila* (Toda y cols., 1989).

Los extractos de té verde y negro pueden ser efectivos frente a *Helicobacter pylori* (Diker y cols., 1994). Los polifenoles del té inhiben *Streptococcus mutans* (Sakanaka y cols., 1989), *S. sobrinus* (Sakanaka y cols., 1990) y *Porphyromonas gingivalis*, las bacterias responsables de la caries dental (Kakuda y cols., 1994.; Sakanaka y cols., 1996).

---

El epigallocatequingalato (EGCG) inhibe el virus de la influenza A y B en cultivo de células animales (Mitscher y cols., 1997). Se ha observado capacidad antiviral frente a enzimas del virus VIH en cultivo de células de mono tratadas previamente con epigallocatequingalato (EGCG) (Mitscher y cols., 1997). Los extractos naturales del té han utilizados en la inhibición del virus de la hepatitis B (Wang y cols., 2007).

#### **1.6.5. Efectos antiinflamatorios del té.**

En varios estudios realizados la fracción polifenólica del té verde ha demostrado proteger contra la inflamación causada por ciertos productos químicos (Katiyar y cols., 1993), o por la radiación ultravioleta (Agarwal y cols., 1993).

Además, los polifenoles del té verde han demostrado protección contra las citoquinas inducidas por los tumores (Katiyar y cols., 1995).

Los extractos de té verde han demostrado inhibir las respuestas inflamatorias in vitro en diferentes tipos de células y el desarrollo de artritis en estudios de modelo animal. Existe una considerable evidencia de que la Epigallocatequingalato (EGCG) inhibe la actividad de las enzimas que juegan un papel importante en la inflamación y en la artritis (Singh y cols., 2010).

Los polifenoles del té verde mejoran los niveles de insulina y lípidos, actúan como antioxidantes y disminuyen la neurodegeneración (Cao y cols., 2008).

#### **1.6.6. Efectos del té en la diabetes y la insuficiencia renal.**

La diabetes está asociada con el contenido de glucosa en sangre. Los extractos de té verde y negro pueden disminuir significativamente el nivel de glucosa en sangre en ratas de edad avanzada mediante la reducción de la absorción de glucosa (Zeyuan y cols., 1998; Mousavi y cols., 2013).

Los polifenoles del té inhiben la actividad alfa-amilasa en la saliva, por tanto, se reduce la amilasa intestinal y reduce la asimilación de glucosa (Hara y cols., 1995b). El té reduce la absorción de la glucosa de la mucosa intestinal debido a que los

---

polisacáridos inhiben la absorción de glucosa y la difenilamina de té promueve su metabolismo (Zeyuan y cols., 1998).

Los polifenoles también pueden disminuir la actividad de las enzimas digestivas y reducir la absorción de glucosa (Zeyuan y cols., 1998). Disminuyen los niveles de toxinas urémicas y la metilguanidina de pacientes en hemodiálisis (Sakanak y cols., 1997).

Los polifenoles también protegen contra el estrés oxidativo asociado con la diabetes y son útiles para mantener un equilibrio entre pro y antioxidantes en el organismo (Zeyuan y cols., 1998). El consumo de té se asocia con un aumento en el volumen de orina y la eliminación de electrolitos, especialmente de sodio, junto con una disminución de la presión arterial (sistólica y diastólica) en ratas hipertensas (Yokogoshi y cols., 1995).

Las catequinas del té verde puede suprimir la progresión de la insuficiencia renal inducida en ratas o en cultivo de células renales (Yokozawa y cols., 1996; Yokozawa y cols., 1997; Yokozawa y cols., 1998).

#### **1.6.7. Efectos del té en otras enfermedades.**

Muchos estudios han demostrado que el consumo de té o sus polifenoles pueden proporcionar protección contra las enfermedades distintas del cáncer y las enfermedades coronarias. Se han realizado estudios en lesiones cerebrovasculares (Weisburger y cols., 1996).

El consumo de té reduce el riesgo de la osteoporosis (Fujita., 1994; Kao y cols., 1995), protege de las enfermedades del hígado (Imai y cols., 1995) y de la caries dental (Ishigami y cols., 1993).

Los polifenoles del té tienen un papel importante en el sistema inmunológico. El epigallocatequingalato ha mostrado efectos inmunoestimulantes (Singh y cols., 2006).

El consumo de té promueve cambios saludables en la obesidad, la longevidad y la función neural (Afag y cols., 2004). Los beneficios para la salud asociados con el té verde se han corroborado en estudios en modelos animales asociados a la

---

quimioprevención del cáncer, la hipercolesterolemia, la arterosclerosis, la enfermedad de Parkinson, el Alzheimer y otros trastornos relacionados con el envejecimiento (Zaveri y cols., 2006).

---

## **2. OBJETIVOS.**

---

## 2.1. OBJETIVOS.

En base a los antecedentes presentados se proponen los siguientes objetivos:

1. Determinación de los fenoles totales de diferentes tés por el Método de Folin-Ciocalteu.
2. Determinación de la capacidad antioxidante por el Método de CUPRAC.
3. Determinación de la capacidad antirradicalaria por el Método del radical DPPH.
4. Correlación entre los Métodos de Folin-Ciocalteu, CUPRAC y DPPH.
5. Medida de los fenoles totales y de la capacidad antirradicalaria de diferentes tés a distintos tiempos de extracción por los Métodos de Folin-Ciocalteu y DPPH.
6. Validación del Método del Tricloruro de Hierro para el análisis del té.
7. Análisis de diferentes tés por el Método del Tricloruro de Hierro utilizando el Ácido Gálico y el Polyphenon 60 como patrones.
8. Análisis comparativo de distintos tés por HPLC.

---

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS.**

---

### **3.1. MATERIAL DE LABORATORIO.**

#### **3.1.1. Equipos.**

- Agitador de tubos: Raypa.
- Agitador magnético ACS-160: J.Jimeno S.A.
- Balanza de precisión: KERN ABS.
- Balanza: KERN 572.
- Baño de agua: Velp Scientifica (multistirrer 6).
- Congelador -24°C: Fagor.
- Cronómetro.
- Equipo de agua Hellix. Millipore.
- Equipo de HPLC (Waters).
- Espectrofotómetro: HELIOS  $\alpha$ Thermo.
- Estufa: P.SELECTA 150 litros.
- pHmetro: pH-meter basic 20 + CRISON.
- Pipetas automáticas: Proline Plus de Biohit.
- Termómetro.

#### **3.1.2. Material fungible.**

- Botellas de vidrio de diversos volúmenes.
- Cubetas de poliestireno para espectrofotometría.
- Embudos.
- Espátulas.

- 
- Frascos Erlenmeyers de vidrio de diferentes volúmenes.
  - Gradillas para tubos Falcon y para microtubos.
  - Guantes de látex.
  - Imanes agitadores.
  - Microtubos de plástico de 1,5 y 2 ml.
  - Papel de filtro convencional (Afora).
  - Parafilm M.
  - Pinzas de acero inoxidable.
  - Pipetas de plástico estériles de 5, 10 y 25 ml.
  - Probetas de vidrio y de plástico de diferentes volúmenes.
  - Puntas de pipeta automática.
  - Teteras.
  - Tijeras.
  - Tubos de plástico de 5, 15 y 50 ml.
  - Tubos eppendorf.
  - Vasos de precipitados de vidrio y plástico de diferentes volúmenes.

### **3.1.3. Reactivos químicos.**

Todos los reactivos empleados en la realización de este trabajo quedan incluidos en la siguiente tabla, siendo todos ellos de una alta pureza (Tabla M1).

---

**Tabla M1. Reactivos utilizados.**

---

<b>Reactivos</b>	<b>Marca</b>
• Acetato de Amonio.	Merck.
• Ácido cítrico.	Panreac.
• Ácido clorhídrico.	Merck.
• Ácido fórmico.	Sigma.
• Ácido gálico.	Sigma.
• Cafeína.	Sigma.
• Carbonato sódico.	Merck.
• Cloruro de cobre II.	Sigma.
• Cloruro de sodio.	Merck.
• Di-potasio hidrógeno fosfato.	Merck.
• DPPH	Aldrich.
• Epicatequina (EC).	Sigma.
• Epicatequingalato (ECG).	Sigma.
• Epigallocatequina (EGC).	Sigma.
• Etanol.	Merck
• Hidróxido de sodio.	Carlo Erba.
• Metanol.	Merck.
• Neocuproína.	Sigma.
• Polyphenon 60.	Sigma

- 
- Potasio hidróxido. Panreac.
  - Potasio hidróxido 85 %. Panreac.
  - Reactivo de Folin-Ciocalteau. Sigma.
  - Tricloruro de Hierro. Panreac.
  - Trolox. Aldrich.

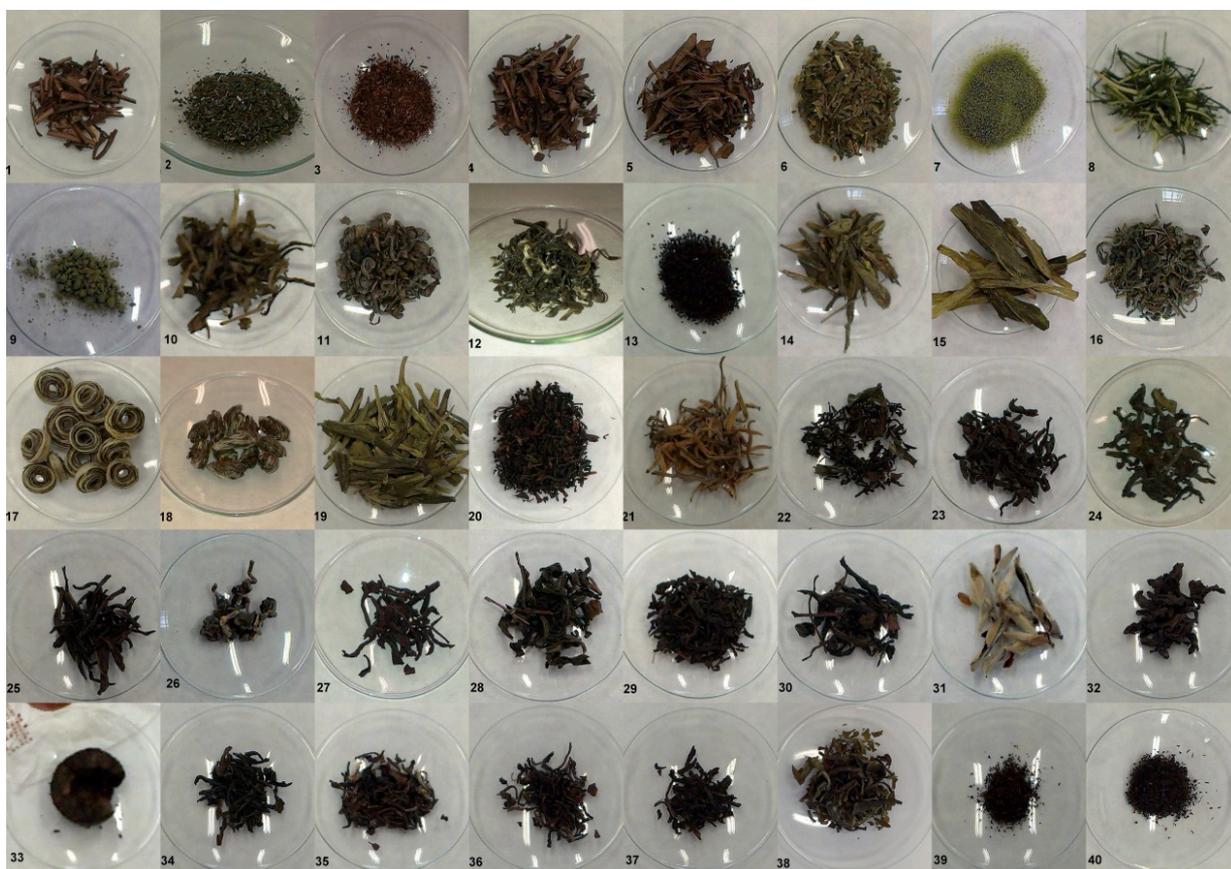
Todas las soluciones se preparan con agua tipo Elix y se esterilizan.

### 3.1.4. Materiales biológicos.

Los cuarenta téis utilizados (Figura M1) tienen diferentes orígenes, son de diferentes clases y tienen sus propias condiciones de tiempo y temperatura de preparación (Tabla M1). Los téis utilizados fueron los siguientes:

1 (3 años Kukicha, Shizuoka, Japón, verde, tostado 3 o 4 veces, rama); 2 (Sencha, Kyoto, Japón, verde, cocer al vapor, secado y tostado, hojas); 3 (Kukicha, Kyoto, Japón, verde, tostado y molido, rama); 4 (3 años Hojicha, Minato-Ku, Japón, verde, tostado carbón, hojas); 5 (Bancha, Shizuoka, Japón, verde, tostado, sucursal); 6 (hoja Bancha, Chuo-Ku, Japón, verde, hoja); 7 (segunda Matcha, Kyoto, Japón, verde, tierra seca y las hojas crecen en la sombra y los nervios se derivaron); 8 (Gyokuro, Fukuoka, Japón, verde, vaporizados, secas y laminadas, primeras hojas cultiva a la sombra); 9 (primera Matcha, kyoto, Japón, verde, seco y molido, hojas cultivadas a la sombra y los nervios de tallo); 10 (Wild Green, isla Sikoku, Japón, verde, hoja); 11 (Pólvora Especial, provincia de Zhe-jiang, China, verde, hoja); 12 (Bi Luo Chung, Donting montaña, China, verde, hoja); 13 (Negro, ETHI-opia, negro); 14 (Long Jing, Zhejiang, China, verde, tostado, hoja enfría y tostado, hojas); 15 (Tai Ping Hou Kui, China, verde, frito, se enfrió, se calienta, se enfría y se calienta, la hoja y yema); 16 (Chun Mee, Jiangxi, China, verde, hoja); 17 (anillos de jade, Fujian, China, verde, pan secado, hoja); 18 (Mo Li Feng Yan, Fujian, China, verde, brote); 19 (Long Jing del pozo del dragón, Fujian, China, verde, secar pan, hoja); 20 (Orange Pekoe, Islas Azores, negro, hojas y yemas); 21 (Yunnan Supremo, Yunnan, China, negro, brote); 22 (Keemun, Fujian, China, negro, hoja); 23 (Lap-sang Souchong, Zheng Shan, China,

negro, ahumado, hoja); 24 (Wen Shan Zhong Bao, Taiwán, China, O'olong, secado de bits mínima y herida, hoja); 25 (Ba Xian (hojas colied), China, O'olong, hoja); 26 (Tung Ting, For-mosa, China, Oolong, hoja y pecíolo); 27 (Da Hong Pao, Wuju, China, Oolong, hoja); 28 (Ro Gui (Cassia), China, Oolong, carbón tostado, hojas); 29 (Bai Hao Oolong, Xinzhu Condado de Taiwán, China, Oolong, 50-60% oxi-dación, la hoja y yema); 30 (Ding Dong, Ding Don montaña de Taiwán, China, la oxidación media, hoja); 31 (Ya bao Silver pu-er crudo yema), China, Puerh, 2 o 3 años, los brotes de primavera plantas de edad); 32 (Antiguo Puerh, China, Puerh); 33 (bloque de Puerh, China, Puehr); 34 (FTGFOP1, Darjeeling, India, negro, brote, hojas y brotes); 35 (SFTGFOP, Dar-Jeeling, India, negro); 36 (Primera Flush, Darjeeling, India, negro); 37 (Segunda Flush, Darjeeling, India, negro); 38 (Primera Flush, Samebeong, India, negro); 39 (Negro, Zanzíbar, África, negro); 40 (Negro, Madagascar, África, negro) .



**Figura M1. Tés utilizados para su análisis.**

**Tabla M1. Térs analizados. Nombre, origen, país, tipo, temperatura de cocción en grados centígrados, temperatura (°C) y tiempo de calentamiento en minutos (min).**

<b>Té</b>	<b>Nombre</b>	<b>Origen</b>	<b>País</b>	<b>Tipo</b>	<b>T(°C)</b>	<b>t (min)</b>
1	Kukicha 3 años	Shizuoka	Japón	Verde	90	5
2	Sencha	Kyoto	Japón	Verde	90	2
3	Kukicha	Kyoto	Japón	Verde	90	5
4	Hojicha 3 años	Minato-Ku	Japón	Verde	100	2
5	Bancha	Shizuoka	Japón	Verde	80	3
6	Bancha leaf	Chuo-Ku	Japón	Verde	80	3
7	Matcha segunda	Kyoto	Japón	Verde	100	0
8	Gyokuro	Fukuoka	Japón	Verde	100	2
9	Matcha primera	kyoto	Japón	Verde	100	0
10	Green salvaje	Sikoku island	Japón	Verde	90	3
11	Special Gunpowder	Zhejiang Province	China	Verde	90	3
12	Bi Luo Chung	Donting Mountain	China	Verde	90	3
13	Negro	Etiopía	Etiopía	Negro	90	3
14	Long Jing	Zhejiang	China	Verde	90	2
15	Tai Ping Hou Kui		China	Verde	88	1
16	Chun Mee	Jiangxi	China	Verde	100	2
17	Jade Rings	Fujian	China	Verde	90	3
18	Mo Li Feng Yan	Fujian	China	Verde	85	3
19	Long Jing Dragon Well	Fujian	China	Verde	90	3

<b>Té</b>	<b>Nombre</b>	<b>Origen</b>	<b>País</b>	<b>Tipo</b>	<b>T(°C)</b>	<b>t (min)</b>
20	Orange Pekoe	Islas Azores. San Miguel	Azores	Negro	98	3
21	Yunnan Supreme	Yunnan	China	Negro	93	3
22	Keemun	Fujian	China	Negro	90	4
23	Lapsang Souchong	Zheng Shan	China	Negro	100	1
24	Wen Shan Bao Zhong	Taiwan	China	Oolong	100	3
25	Ba Xian (Colied leaves)		China	Oolong	100	3
26	Tung Ting	Formosa	China	Oolong	85	1
27	Da Hong Pao	Wuju	China	Oolong	90	3
28	Ro Gui (Cassia)		China	Oolong	85	1
29	Bai Hao Oolong	Xinzhu County Taiwan	China	Oolong	85	1
30	Don Ding	Dong Ding Mountain Taiwan	China	Oolong	100	2
31	Ya bao (Silver puer bud raw)		China	Puer	90	2
32	Old Puer		China	Puer	90	2
33	Puer bloque		China	Puer	100	2
34	FTGFOP1	Darjeeling	India	Negro	98	3
35	SFTGFOP	Darjeeling	India	Negro	98	3
36	First Flush	Darjeeling	India	Negro	98	3
37	Second Flush	Darjeeling	India	Negro	98	3
38	First Flush	Samebeong	India	Negro	98	3

<b>Té</b>	<b>Nombre</b>	<b>Origen</b>	<b>País</b>	<b>Tipo</b>	<b>T(°C)</b>	<b>t (min)</b>
39	Negro	Zanzibar	África	Negro	98	3
40	Negro	Madagascar	África	Negro	98	3

### **3.2. MÉTODOS.**

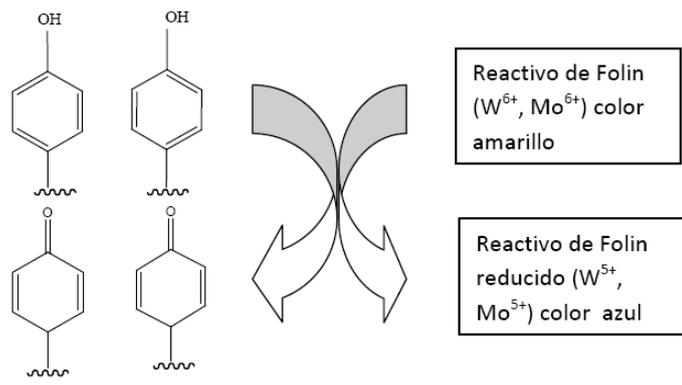
#### **3.2.1. Obtención de extractos de tés.**

Se realizaron las infusiones de cada muestra de té utilizando 1 gramo de té en 50 ml de agua en las condiciones indicadas en la Tabla (Tabla M1).

#### **3.2.2. Método de Folin – Ciocalteau.**

Los fenoles reaccionan con el reactivo de Folin - Ciocalteau dando un color azul propio de la reacción con fenoles. El reactivo de Folin - Ciocalteau se obtiene ya preparado de las casas comerciales (Sigma). Este reactivo contiene una mezcla de wolframato sódico y molibdato sódico en ácido fosfórico y reacciona con restos fenólicos presentes en las proteínas (tirosinas) y en compuestos como ácido gálico y sus derivados, flavonoides, etc.

El ácido fosfomolibdotúngstico (formado por las dos sales en el medio ácido), de color amarillo, que al ser reducido por los grupos fenólicos da lugar a un complejo de color azul intenso (Figura M2), es el que medimos a una longitud de 760 nm (Singleton y Rossi, 1965).

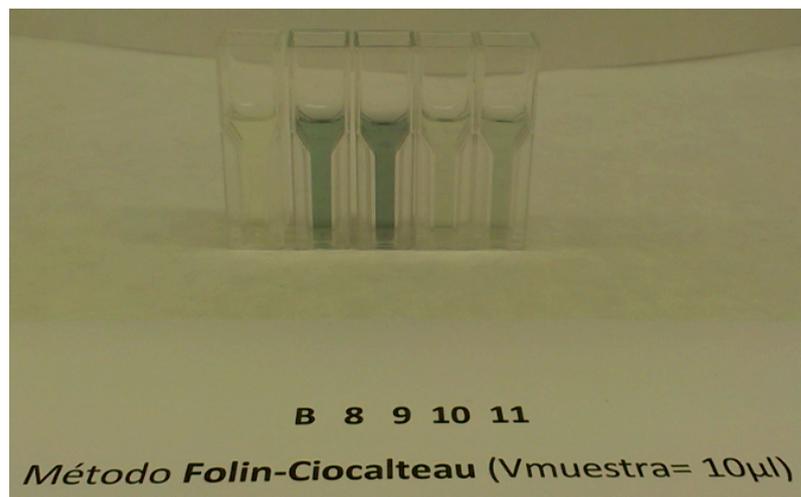


**Figura M2. Reacción de Folin – Ciocalteu. Tomado de Girbés y Jiménez. Cuaderno de Prácticas de Fundamentos de Alimentación y Nutrición (2010).**

Es un método de medida del contenido en fenoles totales y otros compuestos que no siendo fenólicos muestran una cierta capacidad de reacción. Esta reacción es una medida también de la capacidad antioxidante. Por lo que en muchos trabajos se ha asimilado como un método de determinación de la capacidad antioxidante.



**Figura M3. Método de Folin – Ciocalteu. Recta patrón.**



**Figura M4. Método de Folin – Ciocalteu. B (Blanco), té n° 8 Gyokuro, té n° 9 Matcha de primera, té n° 10 Green salvaje, té n° 11 Special Gunpowder.**

Para realizar la recta patrón (Figura M3) añadimos cantidades variables de 2,5mM de ácido gálico (20µl, 40µl, 60µl, 80µl), 600µl de solución de carbonato sódico al 7,5 % y el agua correspondiente para alcanzar un volumen total de 1,5 ml. Posteriormente se añade a cada tubo 200 µl de reactivo de Folin - Ciocalteu, e incubamos los tubos a 50°C durante 10 minutos. A continuación se mide la absorbancia a 760 nm en el espectrofotómetro.

La medida de los diferentes extractos (Figura M4) se realiza sustituyendo en el método, el patrón de ácido gálico, por un volumen de extracto (10µl). Para los cálculos debemos tener en cuenta el volumen de extracto utilizado y el volumen de extracto de partida (extracto crudo). Los resultados se interpolan en la curva de calibrado de 2,5mM de ácido gálico y se expresan en µg equivalentes de ácido gálico por gramo de peso fresco.

### **3.2.3. Método de CUPRAC.**

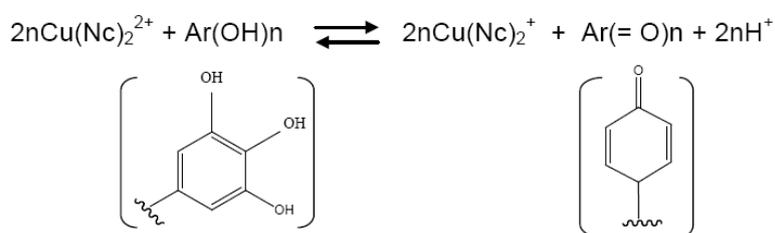
En este ensayo medimos la capacidad antioxidante (CA). Este método está basado en la reducción de Cu (II) a Cu (I) por la acción combinada de todos los antioxidantes (agentes reductores) en una muestra. Para realizar el ensayo de CUPRAC

---

(Apak, R y cols., 2004; Jiménez y cols., 2014<sup>a</sup>, Prior y cols., 2005) se utiliza como reactivo la neocuproína (2,9-dimethyl-1,10-phenanthroline).

Estos complejos tienen una solubilidad muy limitada en agua y por tanto deben ser disueltos en disolventes orgánicos como el etanol. Para ello se utilizará un procedimiento consistente en utilizar el reactivo Cu (II)- neocuproína [Cu (II)-Nc] como agente oxidante cromogénico.

La reacción que tiene lugar es la siguiente: Los protones liberados pueden neutralizarse con la solución de acetato amónico. En esta reacción los polifenoles (-OH) se oxidan a las correspondientes formas quinónicas (= O) y el Cu (II) - Nc es reducido a Cu (I) - Nc que es muy coloreado y muestra un máximo de absorción a 450 nm (Figura M5).



**Figura M5. Reacción del método CUPRAC. Tomado de Girbés y Jiménez. Cuaderno de Prácticas de Fundamentos de Alimentación y Nutrición. (2010).**

Para realizar la recta patrón (Figura M6) utilizamos 1mM de ácido gálico en etanol como patrón. Se añade a cada tubo 1ml de 10 mM de Cloruro de Cobre (II), y la misma cantidad de 7,5 mM de neocuproína en etanol.

Posteriormente se añade a cada tubo 1ml de 1mM de acetato de amonio (pH = 7), añadimos los diferentes volúmenes del patrón de ácido gálico (20µl, 40µl, 6 µl, 80 µl) y la cantidad correspondiente de agua para alcanzar un volumen final de 4 ml. Se espera 1 hora y se mide la absorbancia a 450 nm.

La medida de los diferentes extractos (Figura M7) se realiza sustituyendo en el método, el patrón de ácido gálico, por un volumen de extracto (10µl). Para los cálculos debemos tener en cuenta el volumen de extracto utilizado y el volumen de extracto de partida (extracto crudo). Los resultados se interpolan en la curva de calibrado de 1mM

de ácido gálico y se expresan en  $\mu\text{g}$  equivalentes de ácido gálico por gramo de peso fresco.



Figura M6. Método de CUPRAC. Recta patrón.

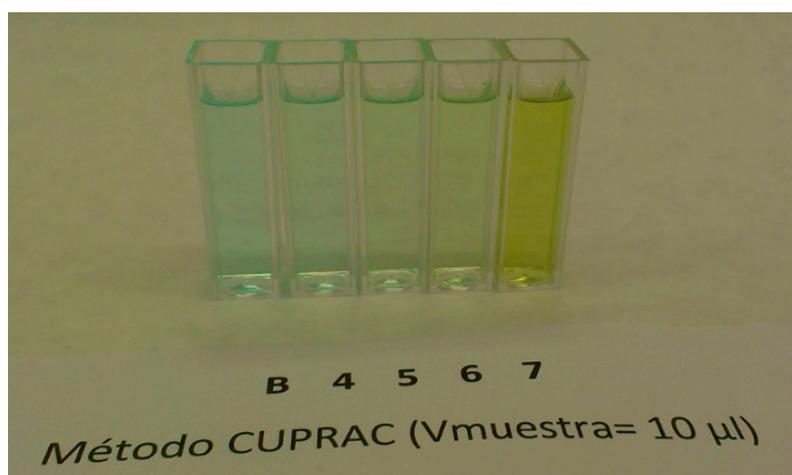
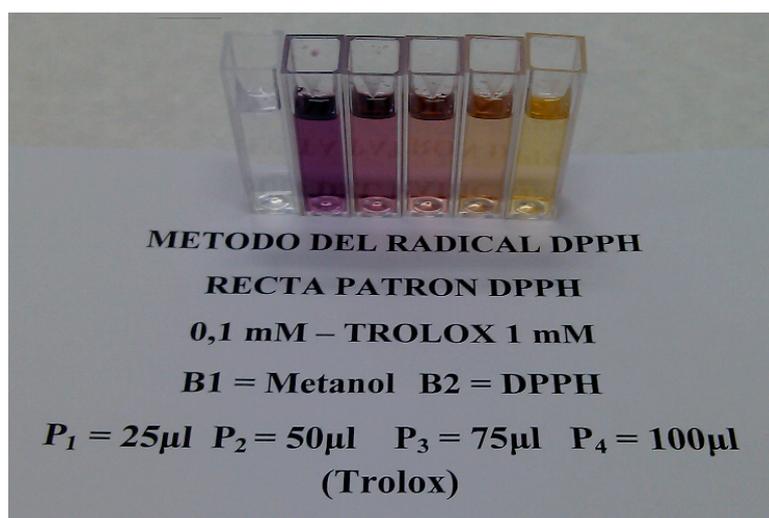


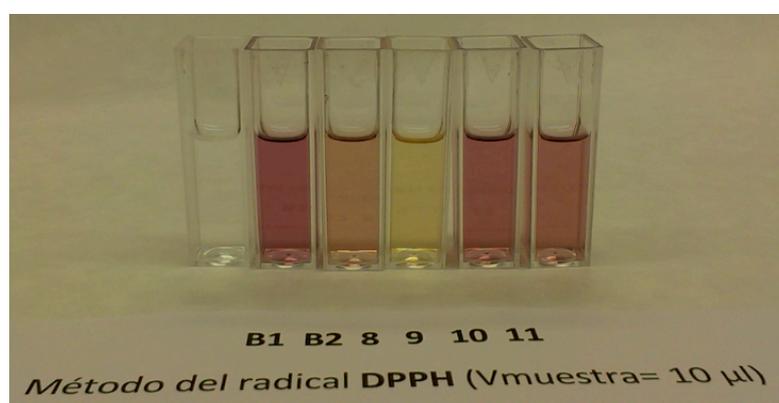
Figura M7. Método de CUPRAC. B (Blanco), té n° 4 Hojicha de tres años, té n° 5 Bancha, té n° 6 Bancha leaf, té n° 7 Matcha segunda.

### 3.2.4. Método del radical DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl).

El DPPH es un radical orgánico nitrogenado y estable que nos sirve para medir la capacidad antioxidante (CA). En presencia de sustancias antioxidantes se produce un descenso de la absorbancia del radical DPPH a 515 nm (Bondet y cols., 1995; Sánchez Moreno y cols., 1998; Heleno y cols., 2012; Jiménez y cols., 2013). El radical tiene una coloración púrpura que se pierde progresivamente.



**Figura M8. Método del radical DPPH. Recta patrón.**



**Figura M9. Método del radical DPPH. B1 Blanco1, B2 Blanco 2, té nº 8 Gyokuro, té nº 9 Matcha de primera, té nº 10 Green salvaje, té nº 11 Special Gunpowder.**

---

La reacción se mide a los 10 minutos del inicio, ya que en este intervalo, la mayoría de sustancias completan la reacción con el DPPH. El ensayo DPPH es un método rápido y sencillo.

El DPPH sólo puede disolverse en un medio orgánico y la concentración que hemos utilizado es 0,1 mM. La cuantificación se realiza empleando una solución patrón de 1mM de Trolox en metanol. Para realizar la recta patrón añadimos la cantidad de metanol al 80 % correspondiente para obtener un volumen final de 3 ml, así como 2.900 µl de DPPH 0,1 mM en metanol. Se añade a cada tubo 25, 50, 75 y 100µl respectivamente de solución de Trolox 1 mM (patrón) en metanol y se agitan los tubos. A continuación y transcurridos 10 minutos se mide la absorbancia a 515 nm. La medida de los diferentes extractos (los ensayos se realizan en tres extractos diferentes y por triplicado cada uno de ellos) se realiza sustituyendo en el método, el patrón de Trolox por un volumen determinado de extracto (10µl).

### **3.2.5. Medida de los fenoles totales y de la capacidad antirradicalaria de diferentes tés a distintos tiempos de extracción.**

Realizamos la extracción de 6 tés diferentes (2 verdes, 2 negros, 1 oolong y 1 puerh) por los métodos de Folin-Ciocalteu y del radical DPPH en las mismas condiciones utilizando volúmenes semejantes, pero, variando el tiempo de extracción (condiciones estándar, 5 minutos y 10 minutos).

### **3.2.6. Método del Tricloruro de Hierro. Longitud de onda óptima y concentración de Polyphenon 60 a utilizar.**

Se realiza un barrido espectrofotométrico a diferentes longitudes de onda (280nm-800nm) y distintas cantidades de P60 (100µg, 200µg, 300µg, 400µg).

### 3.2.7. Validación del método del Tricloruro de Hierro.

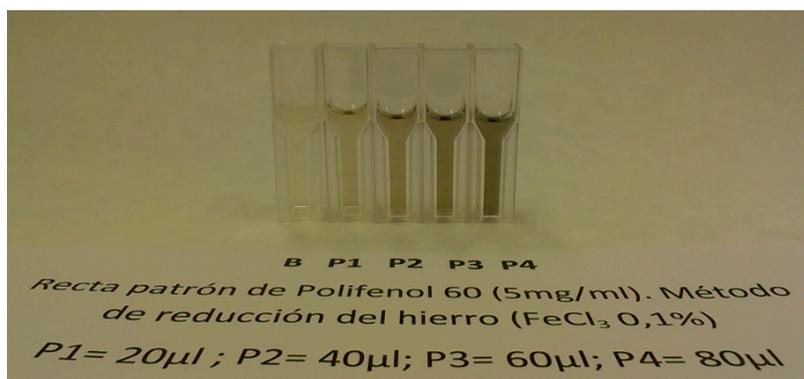


Figura M10. Método del Tricloruro de hierro. Blanco y patrones.

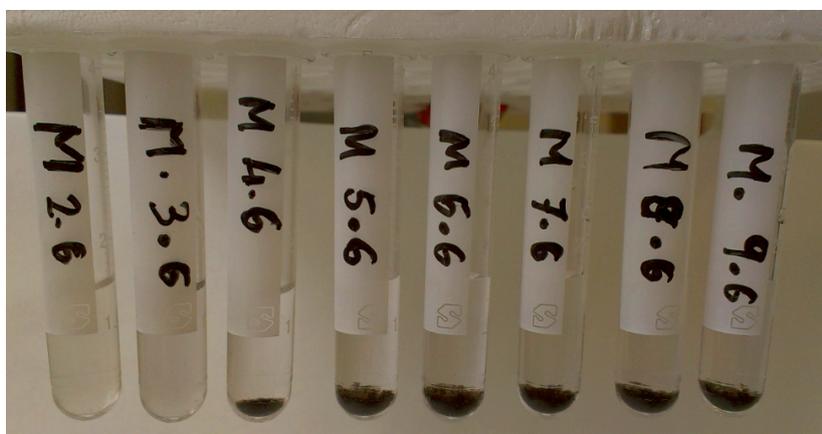


Figura M11. Método del Tricloruro de hierro. Reacción y formación de precipitados a partir de pH 4,6.

#### 3.2.7.1. Proporcionalidad y exactitud.

Realizamos una curva de calibrado con al menos cinco puntos (se recomienda hacer de 7-9 puntos), en nuestro caso se hicieron 8 puntos con absorbancias comprendidas entre 0,050 y 1,100 (UA).

Se realizan tres rectas completamente independientes entre sí, para ello, añadimos 1000µl de FeCl<sub>3</sub> de concentración 0,1% y 100µl de tampón Acetato 30 mM pH = 3,6 en cada uno de los 8 tubos más 10µl, 20µl, 30µl, 40µl, 50µl, 60µl, 70µl, 80µl

---

de Polyphenon 60 5mg/ml en los tubos correspondientes numerados del 1 al 8, la diferencia hasta 1500 $\mu$ l se complementa con agua Elix de Millipore. Utilizamos el vortex (agitación) cada vez que se añade un reactivo y pasados 10 minutos se mide la absorbancia a 400nm en el espectrofotómetro (Yang y cols., 2014). Con los datos obtenidos se obtienen los factores de linealidad y la curva de calibrado.

### **3.2.7.2. Precisión. Repetibilidad, reproducibilidad y robustez.**

- **Repetibilidad.**

Seleccionar una concentración baja otra media y otra alta de la curva de calibrado (no tienen que ser necesariamente las de los extremos) y se realizan tres replicados independientes de cada una de ellas. Se procede como en el apartado anterior pero las cantidades de Polyphenon 60 5mg/ml añadidas en este caso son 10 $\mu$ l, 40 $\mu$ l y 80 $\mu$ l.

- **Reproducibilidad.**

Se trata de determinar si la señal se modifica como consecuencia de variables lógicas, por ejemplo con el tiempo, con distinta analista o con distinto equipo. Se necesitan dos replicados independientes de una concentración baja, otra media y otra alta de la curva de calibrado. En nuestro caso, se utilizan dos analistas diferentes, dos juegos de pipetas automáticas distintas, almacenamos las muestras a temperatura ambiente y medimos las absorbancias en el espectrofotómetro trascurridas 24 horas. Las cantidades de Polyphenon 60 5mg/ml añadidas en este caso son 20 $\mu$ l, 50 $\mu$ l y 70 $\mu$ l.

- **Robustez.**

Se trata de determinar si la señal se modifica como consecuencia de introducir cambios drásticos en el método. Por ejemplo, probar si da lo mismo disolver las muestras en agua o en un tampón. Se necesitan replicados independientes de una concentración baja, otra media, y otra alta de la curva de calibrado en cada una de las condiciones. Se

---

realizan replicados independientes de una concentración baja, otra media, y otra alta de la curva de calibrado utilizando un tampón fosfato (NaCl 0,28 M, Fosfato monosódico 5 mM pH= 3,6). Las cantidades de Polyphenon 60 5mg/ml añadidas en este caso son 10µl, 30µl y 80µl.

### **3.2.7.3. Límites de detección y cuantificación.**

Se necesitan diez blancos independientes. Si el medio elegido es un tampón, pues diez lecturas independientes del tampón preparado ese número de veces. Cuando se lee cualquier solución lo primero es poner la cubeta con el blanco y descontar esa señal en el equipo. Por tanto, cuando se saca la cubeta con el blanco y no pones nada en el lugar donde se colocan las muestras se obtiene una lectura de absorbancia negativa, esa es, la que se registra. Añadimos 1000µl de FeCl<sub>3</sub> de concentración 0,1% y 100µl de tampón Acetato 30 mM pH = 3,6 y 400µl de agua Elix de Millipore en cada tubo.

### **3.2.7.4. Selectividad y especificidad.**

Se determina la capacidad del método analítico para medir exacta y específicamente el principio activo sin interferencias de posibles sustancias que puedan estar presentes en la muestra. El método es selectivo y específico para el té. Se han analizado 40 diferentes tipos de tés (verde, negro, oolong y puehr) por triplicado. Para el análisis de cada té se realiza la medida por triplicado, añadimos 1000µl de FeCl<sub>3</sub> de concentración 0,1% y 100µl de tampón Acetato 30 mM pH = 3,6 en cada uno de los y se añaden 100µl de extracto de té, la diferencia hasta 1500µl (300 µl) se complementa con agua Elix de Millipore. Utilizamos el vortex (agitación) cada vez que se añade un reactivo y pasados 10 minutos se mide la absorbancia a 400nm en el espectrofotómetro. Con los datos obtenidos se obtienen los valores para cada té expresados en mg equivalentes de P60 por gramo de té.

---

### **3.2.8. Método del Tricloruro de Hierro utilizando el ácido gálico como patrón.**

Realizamos una curva de calibrado con cuatro puntos. Se realizan tres rectas completamente independientes entre sí, para ello, añadimos 1000µl de FeCl<sub>3</sub> de concentración 0,1% y 100µl de tampón Acetato 30 mM pH = 3,6 en cada uno de los 4 tubos más 20µl, 40µl, 60µl, 80µl de ácido gálico 10 mM en los tubos correspondientes numerados del 1 al 4, la diferencia hasta 1500µl se complementa con agua Elix de Millipore. Utilizamos el vortex (agitación) cada vez que se añade un reactivo y pasados 10 minutos se mide la absorbancia a 400nm en el espectrofotómetro. Con los datos obtenidos se obtienen los factores de linealidad y la curva de calibrado. Una vez realizada la recta patrón sustituimos el patrón de ácido gálico por 100µl de cada té respectivamente y se obtienen los valores para cada té expresados en mg equivalentes de Ácido gálico por gramo de té y realizamos la gráfica de correlación de ambos métodos.

### **3.2.9. Cromatografía Líquida de Alta Resolución para el análisis de los diferentes té.**

La cromatografía de líquidos de alta resolución es una técnica de separación cromatográfica basada en la diferencia de distribución de las especies entre dos fases no miscibles, en la que la fase móvil es un líquido que atraviesa por percolación una fase estacionaria contenida en una columna.

#### **➤ Aparato.**

El aparato se compone de un sistema de bombeo, un inyector, una columna cromatográfica, un controlador de la temperatura de la columna, un detector y un sistema de adquisición de datos. La fase móvil es suministrada desde uno o varios depósitos y circula a través de la columna, normalmente a un caudal constante, y después a través del detector.

---

➤ **Sistemas de bombeo.**

Los sistemas de bombeo para el HPLC, deben suministrar la fase móvil a un caudal constante. Las fluctuaciones de presión se deben minimizar, por ejemplo, haciendo pasar el disolvente a presión a través de un dispositivo que amortigüe los pulsos. Los tubos y conexiones deben poder resistir las presiones desarrolladas por el sistema de bombeo. Los sistemas controlados por microprocesador son capaces de suministrar exactamente una fase móvil de composición constante (elución isocrática) o variable (elución en gradiente), según un programa definido. En el caso de la elución en gradiente, existen sistemas de bombeo que suministran los disolventes desde diversos depósitos y la mezcla de los disolventes se puede efectuar en el lado de baja presión o en el lado de alta presión de la bomba o bombas.

➤ **Inyectores.**

La disolución de la muestra se introduce en la fase móvil circulante en la cabeza de la columna, o cerca de ella, utilizando un sistema de inyección que puede trabajar a alta presión. Se utilizan dispositivos de bucle fijo y de volumen variable que funcionan manualmente o mediante un inyector de muestras automático. El rellenado parcial de los bucles de forma manual puede llevar a una menor precisión del volumen de inyección.

➤ **Fases estacionarias.**

En HPLC se utilizan muchos tipos de fases estacionarias, principalmente:

- Sílice, alúmina o grafito poroso, utilizados en cromatografía en fase normal, en la que la separación se basa en las diferencias de adsorción y/o de distribución de masas.
- Resinas o polímeros con grupos ácidos o básicos, utilizados en cromatografía de intercambio iónico, en la que la separación se basa en la competición entre los iones a separar y los de la fase móvil.

- 
- Sílice o polímeros porosos, utilizados en cromatografía de exclusión por tamaño, en la que la separación se basa en las diferencias de volumen entre las moléculas, lo que corresponde a una exclusión estérica.
  - Una variedad de soportes modificados químicamente preparados a partir de polímeros, sílice o grafito poroso, utilizados en HPLC en fase inversa, en la que la separación se basa principalmente en el reparto de las moléculas entre la fase móvil y la fase estacionaria.
  - Fases estacionarias modificadas químicamente especiales, por ejemplo derivados de la celulosa o la amilosa, proteínas o péptidos, ciclodextrinas, etc., para la separación de enantiómeros (cromatografía quiral).

La mayor parte de las separaciones se basan en mecanismos de reparto utilizando sílice modificada químicamente como fase estacionaria y disolventes polares como fase móvil. La superficie del soporte, por ejemplo los grupos silanol de la sílice, se hace reaccionar con diferentes reactivos de silano para producir derivados de sililo ligados covalentemente que abarcan un número variable de sitios activos sobre la superficie del soporte. La naturaleza de la fase ligada es un parámetro importante para determinar las propiedades de separación del sistema cromatográfico.

Para las separaciones analíticas, el tamaño de las partículas de las fases estacionarias más comúnmente utilizadas varía entre 3  $\mu\text{m}$  y 10  $\mu\text{m}$ . Las partículas pueden ser esféricas o irregulares, de porosidad y área superficial específicas variables. Estos distintos parámetros contribuyen al comportamiento cromatográfico de una fase estacionaria particular.

En el caso de fases inversas, son factores determinantes adicionales, la naturaleza de la fase estacionaria, el grado de ligamiento, por ejemplo expresado como la carga de carbono, y el hecho de que la fase estacionaria esté recubierta o no en los extremos («end-capping», es decir, sililación de los grupos silanol residuales). Cuando están presentes grupos silanol residuales pueden aparecer colas en los picos, particularmente en las sustancias básicas.

Para cromatografía analítica se utilizan columnas, de acero inoxidable de longitud y diámetro interior variables. La temperatura de la fase móvil y de la columna se debe mantener constante durante el análisis para obtener una mayor eficacia. Se recomienda

---

no calentar las columnas por encima de 60° C a causa de la posible degradación de la fase estacionaria o posibles cambios en la composición de la fase móvil.

➤ **Fases móviles.**

Para la cromatografía en fase normal, se emplean disolventes menos polares. La presencia de agua en la fase móvil debe ser estrictamente controlada para obtener resultados reproducibles. En HPLC en fase inversa, se emplean fases móviles acuosas, con o sin modificadores orgánicos.

Los componentes de la fase móvil generalmente se filtran para eliminar las partículas de tamaño superior a 0,45 µm. Los disolventes normalmente se desgasifican antes del bombeo, mediante el paso de una corriente de helio, tratamiento con ultrasonidos o utilización en línea de módulos de membrana/vacío, para evitar la creación de burbujas de gas en la cubeta del detector.

Los disolventes utilizados para preparar la fase móvil están normalmente exentos de estabilizantes y son transparentes a la longitud de onda de la detección, cuando se emplea un detector ultravioleta. Los disolventes y otros componentes empleados deben ser de calidad apropiada. El ajuste del pH, si fuera necesario, se efectúa exclusivamente sobre el componente acuoso de la fase móvil y no sobre la mezcla. Si se utilizan disoluciones tampón, se realiza un lavado adecuado del sistema con una mezcla de agua y el modificador orgánico de la fase móvil (5 por ciento V/V) para evitar la cristalización de las sales una vez finalizada la cromatografía.

Las fases móviles pueden contener otros componentes, por ejemplo un contra-ión para la cromatografía de par iónico o un selector quiral para la cromatografía que utiliza una fase estacionaria aquiral.

➤ **Detectores.**

Los detectores más utilizados son los espectrofotómetros en el ultravioleta/visible (UV/Vis), incluyendo los detectores de barra de diodos. También se pueden utilizar espectrofotómetros de fluorescencia, refractómetros diferenciales,

---

detectores electroquímicos, espectrómetros de masas, detectores de difusión de la luz, detectores de radiactividad u otros detectores especiales.

➤ **Proceso de análisis.**

Equilibramos la columna con la fase móvil y el caudal indicado, a temperatura ambiente o a la temperatura especificada en la monografía, hasta que se consiga una línea base estable. Preparamos las disoluciones de la sustancia a examinar y de las sustancias de referencia requeridas. Las disoluciones deben estar exentas de partículas sólidas. Para ello, en el presente trabajo se han filtrado todas las soluciones a través de filtros de jeringa de 13 mm de diámetro con membranas de nylon de 0,45  $\mu\text{m}$ .

En el presente trabajo se ha utilizado un sistema cromatográfico modular Waters formado por los siguientes componentes:

- Módulo “Waters 2690 Alliance”:
  - Bomba cuaternaria apta para gradiente.
  - Inyector automático termostatizable.
  - Horno de columna.
- Módulo “Waters 2695 Alliance”:
  - Bomba cuaternaria apta para gradiente.
  - Inyector automático termostatizable.
  - Horno de columna.
- Dos Bombas “Beckman Programmable Solvent Module 116” (Isocráticas).
- Bomba “Beckman Programmable Solvent Module 126” (Gradiente en alta presión).
- Bomba “Waters 600” (Bomba cuaternaria apta para gradiente).
- Inyector “Waters 717 Plus Autosampler” (Termostatizable).

- Horno de Columna “BioRad Column Heater”.
- Detector “Waters 996 Photodiode Array Detector”.
- Ordenador dotado del programa Empower (Waters).

Los parámetros cromatográficos empleados en esta memoria son los siguientes:

- Fase estacionaria: SUPELCOSIL LC-18 HPLC Column (150 x 4,6 mm, 5µm) acoplado a un guardacolumna (4 x 3 mm).
- Temperatura de análisis: 22 ° C.
- Fase móvil: A: 0,1% ácido fórmico en agua.  
B: 0,1% ácido fórmico en metanol.

En la Tabla (Tabla M2) se recoge la composición de la fase móvil con respecto al cromatograma.

**Tabla M2. Composición de la fase móvil respecto al tiempo de cromatograma.**

Tiempo (min)	Incremento en A (%)	Modalidad
0-15	80-50	Gradiente
15-25	50	Isocrático

- Flujo: 1 ml/min (P 20,3 bar).
- Detección: PDA 280 nm.
- Volumen de inyección: 20 µl.

Los componentes de la fase móvil se filtraron a través de membranas MFS<sup>®</sup> de 47 mm de diámetro y 0,45 µm de diámetro interno empleando una unidad de filtración Millipore<sup>®</sup> acoplada a un sistema de vacío (trompa de agua). La desgasificación de los

---

medios recién filtrados se llevó a cabo en un baño de ultrasonidos Ultrasons BRANSONIC 221 durante 25 minutos.

La preparación de las muestras de té para su análisis cromatográfico consistió en la preparación de una infusión en agua caliente las temperaturas y tiempos idóneos indicados por el fabricante. La infusión se filtró por a través de un filtro OlimPeak (Teknockorma PVDF9 de 0,45  $\mu$ m de tamaño de poro y 25 mm de diámetro y se tomaron 8 ml de infusión que se llevaron a 10 ml enrasando con agua en los correspondientes matraces aforados.

La identificación y cuantificación de los polifenoles se llevó a cabo con los siguientes patrones Polyphenon-60, EC, ECG, EGC, diluidos en una mezcla de agua/metanol 80/20 (v/v), utilizando concentraciones crecientes de forma que se obtuvieron curvas de calibración a partir de 6 puntos. La composición del polyphenon-60 fue de 12% de cafeína, 29,0 % de epigallocatequin galato, 7 % de epicatequina, 8,5% de epicatequin galato y 19,5% de epigallocatequina (Weisburger y col., 1996; Jiménez y cols., 2013).

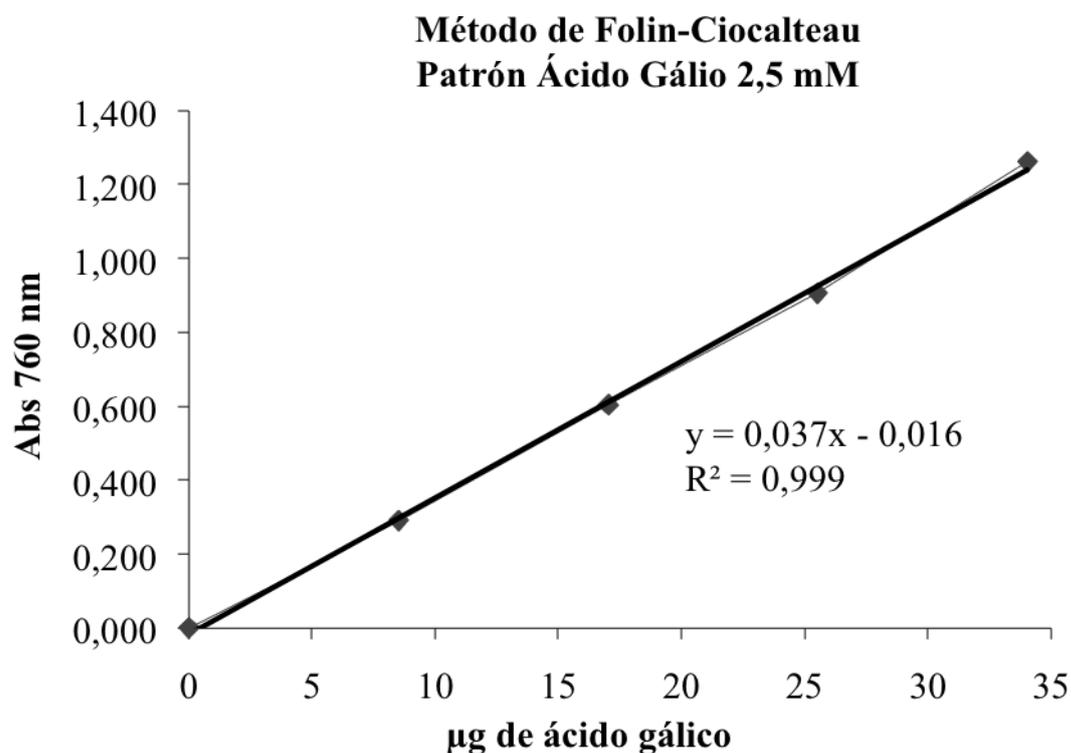
### **3.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.**

Para analizar los resultados obtenidos se realizó un análisis estadístico utilizando los programas de software Microsoft Office Excel 2007. El software Microsoft Office Excel 2007 se utilizó para la realización de las diferentes gráficas, así como para la obtención de la desviación estándar de las diferentes medidas con respecto a la media y el índice de correlación de los diferentes métodos de análisis utilizados.

---

## **4. RESULTADOS.**

#### 4.1. MÉTODO DE FOLIN – CIOCALTEAU.



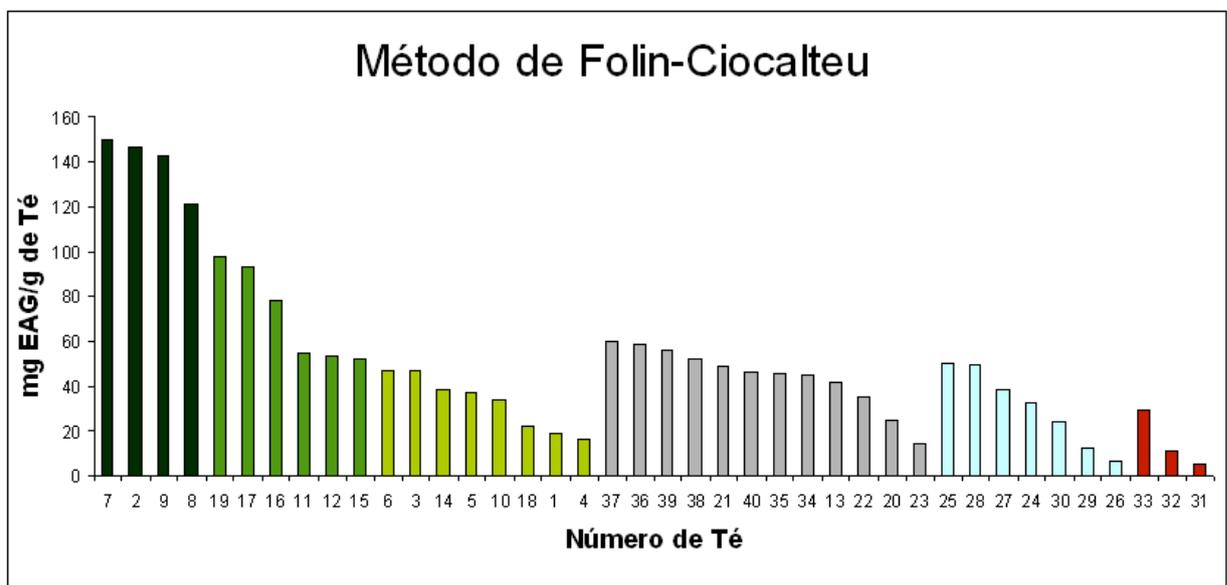
**Figura R1. Método de Folin-Ciocalteu. Recta patrón de ácido gálico 2,5 mM.**

**Tabla R1. Método de Folin – Ciocalteu. Fenoles Totales de los diferentes té.**

Té	Nombre	mg equiv. de ac. gálico/g de té	
		Media	Desviación Estándar
1	Kukicha 3 años	19,0	1,4
2	Sencha	146,5	2,9
3	Kukicha	46,8	0,3
4	Hojicha 3 años	16,6	0,8
5	Bancha	36,8	1,2
6	Bancha leaf	46,9	0,7
7	Matcha segunda	149,5	1,5

<b>Té</b>	<b>Nombre</b>	<b>mg equiv. de ac. gálico/g de té Media</b>	<b>mg equiv. de ac. gálico/g de té Desviación Estándar</b>
8	Gyokuro	121,1	3,5
9	Matcha primera	142,7	2,8
10	Green salvaje	33,8	1,6
11	Special Gunpowder	54,6	2,3
12	Bi Luo Chung	53,8	2,3
13	Negro	41,4	1,1
14	Long Jing	38,8	0,8
15	Tai Ping Hou Kui	52,2	1,0
16	Chun Mee	78,2	0,7
17	Jade Rings	93,3	0,4
18	Mo Li Feng Yan	22,1	2,5
19	Long Jing Dragon Well	97,7	3,1
20	Orange Pekoe	24,9	2,7
21	Yunnan Supreme	48,4	1,5
22	Keemun	35,1	1,8
23	Lapsang Souchong	14,2	1,1
24	Wen Shan Bao Zhong	32,7	0,8
25	Ba Xian (Colied leaves)	50,5	0,9
26	Tung Ting	6,7	0,6
27	Da Hong Pao	38,4	1,2
28	Ro Gui (Cassia)	49,5	1,9
29	Bai Hao Oolong	12,2	0,8
30	Don Ding	24,5	0,9
31	Ya bao (Silver puer bud raw)	5,6	0,4
32	Old Puer	10,9	0,7

Té	Nombre	mg equiv. de ac. gálico/g de té Media	mg equiv. de ac. gálico/g de té Desviación Estándar
33	Puer bloque	29,2	1,0
34	FTGFOP1	45,0	0,6
35	SFTGFOP	45,9	1,0
36	First Flush	58,5	0,9
37	Second Flush	59,6	0,9
38	First Flush	51,6	0,5
39	Negro	55,8	1,1
40	Negro	46,3	0,7



**Figura R2. Método de Folin-Ciocalteu. Fenoles totales de los diferentes tipos de tés. Té verde (color verde), té negro (negro), té oolong (azul), té puerh (rojo).**

## 4.2. MÉTODO DE CUPRAC.

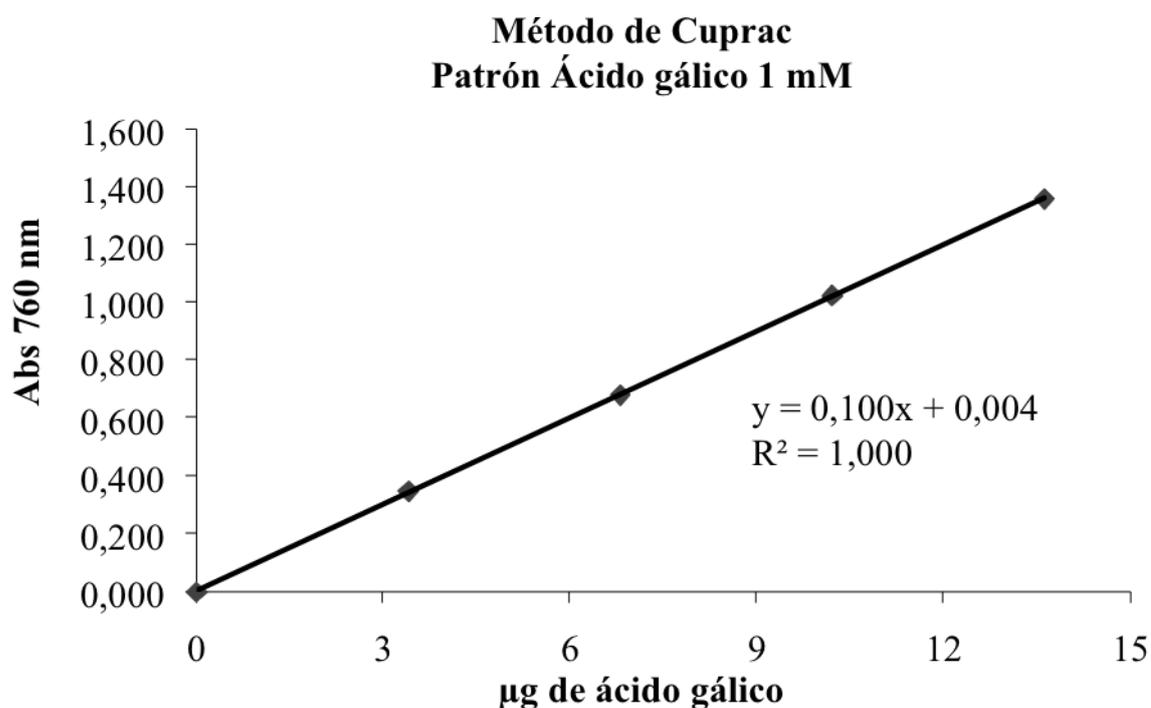


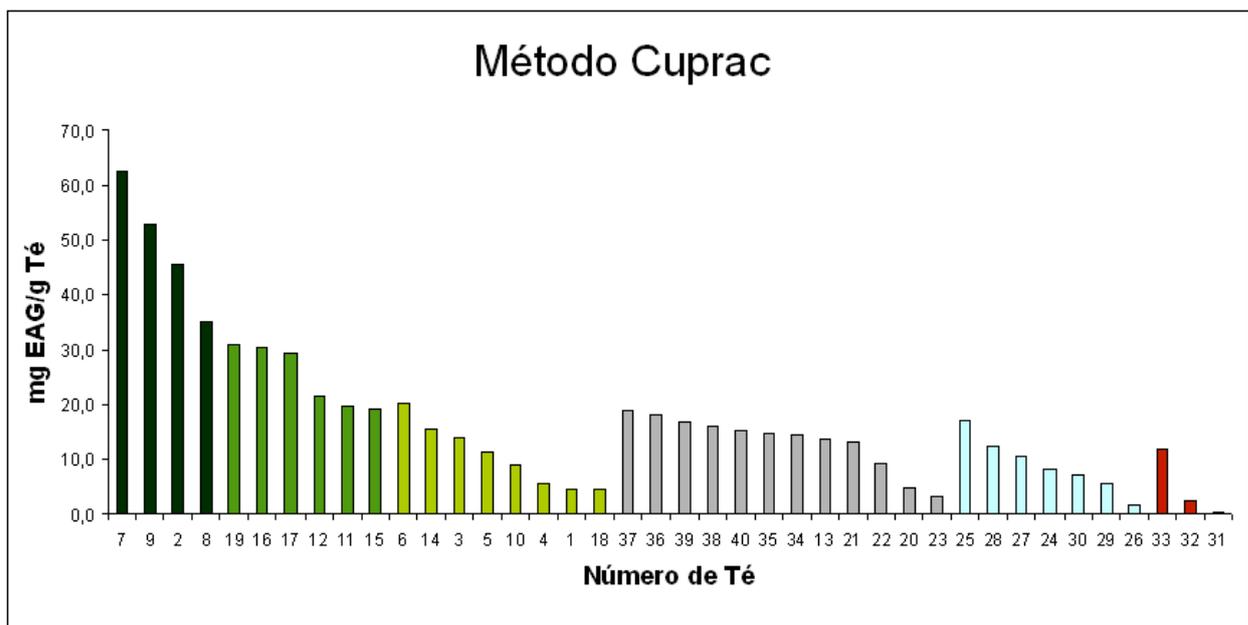
Figura R3. Método de CUPRAC. Recta patrón de ácido gálico 1mM.

Tabla R2. Método de CUPRAC. Capacidad antioxidante de los diferentes té.

Té	Nombre	mg equiv. de ac. gálico/g de té	mg equiv. de ac. gálico/g de té
		Media	Desviación Estándar
1	Kukicha 3 años	4,7	0,3
2	Sencha	45,7	0,8
3	Kukicha	13,9	0,2
4	Hojicha 3 años	5,6	1,0
5	Bancha	11,3	1,0
6	Bancha leaf	20,2	1,5
7	Matcha segunda	62,4	4,1

<b>Té</b>	<b>Nombre</b>	<b>mg equiv. de ac. gálico/g de té Media</b>	<b>mg equiv. de ac. gálico/g de té Desviación Estándar</b>
	Gyokuro	35,2	1,0
9	Matcha primera	53,0	2,5
10	Green salvaje	8,9	0,7
11	Special Gunpowder	19,7	0,4
12	Bi Luo Chung	21,6	2,8
13	Negro	13,6	0,2
14	Long Jing	15,6	1,1
15	Tai Ping Hou Kui	19,0	3,1
16	Chun Mee	30,3	2,9
17	Jade Rings	29,5	0,2
18	Mo Li Feng Yan	4,5	0,9
19	Long Jing Dragon Well	30,9	0,6
20	Orange Pekoe	4,8	1,1
21	Yunnan Supreme	13,1	0,3
22	Keemun	9,4	0,4
23	Lapsang Souchong	3,3	0,4
24	Wen Shan Bao Zhong	8,1	0,3
25	Ba Xian (Colied leaves)	17,0	0,6
26	Tung Ting	1,6	0,3
27	Da Hong Pao	10,6	0,5
28	Ro Gui (Cassia)	12,5	0,2
29	Bai Hao Oolong	5,4	0,3
30	Don Ding	7,1	0,4
31	Ya bao (Silver puer bud raw)	0,5	0,2

Té	Nombre	mg equiv. de ac. gálico/g de té Media	mg equiv. de ac. gálico/g de té Desviación Estándar
32	Old Puer	2,5	0,5
33	Puer bloque	11,8	0,3
34	FTGFOP1	14,3	0,2
35	SFTGFOP	14,9	0,2
36	First Flush	18,1	0,3
37	Second Flush	18,8	0,4
38	First Flush	16,0	0,2
39	Negro	16,9	0,2
40	Negro	15,3	0,2



**Figura R4. Método de CUPRAC. Capacidad antioxidante de los diferentes tipos de té. Té verde (color verde), té negro (negro), té oolong (azul), té puehr (rojo).**

### 4.3. MÉTODO DEL RADICAL DPPH.

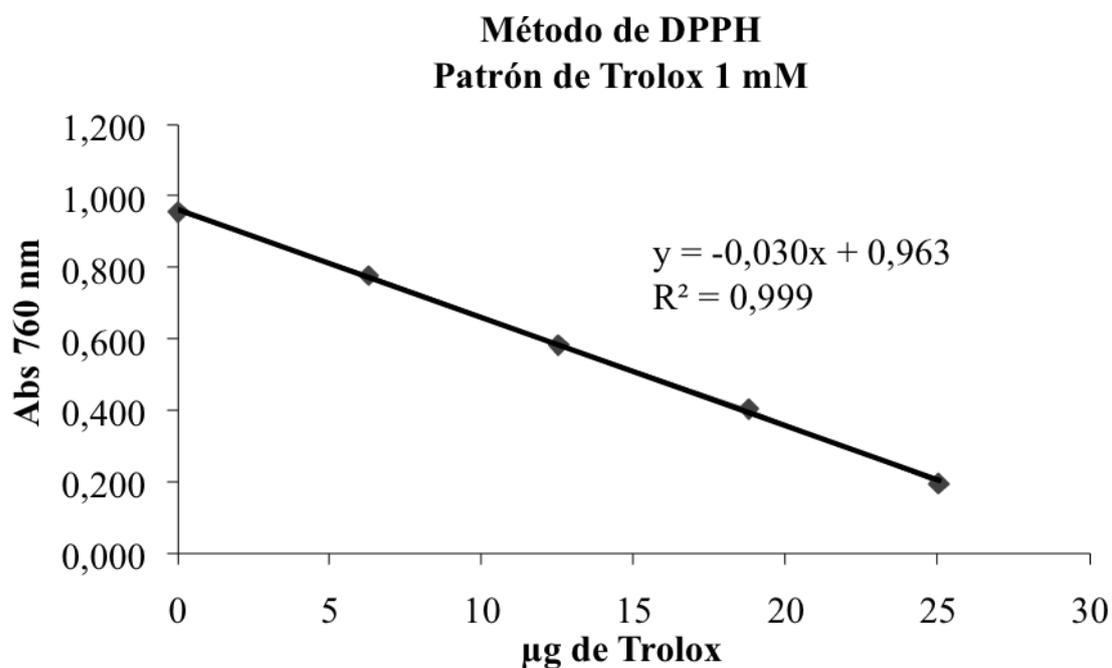


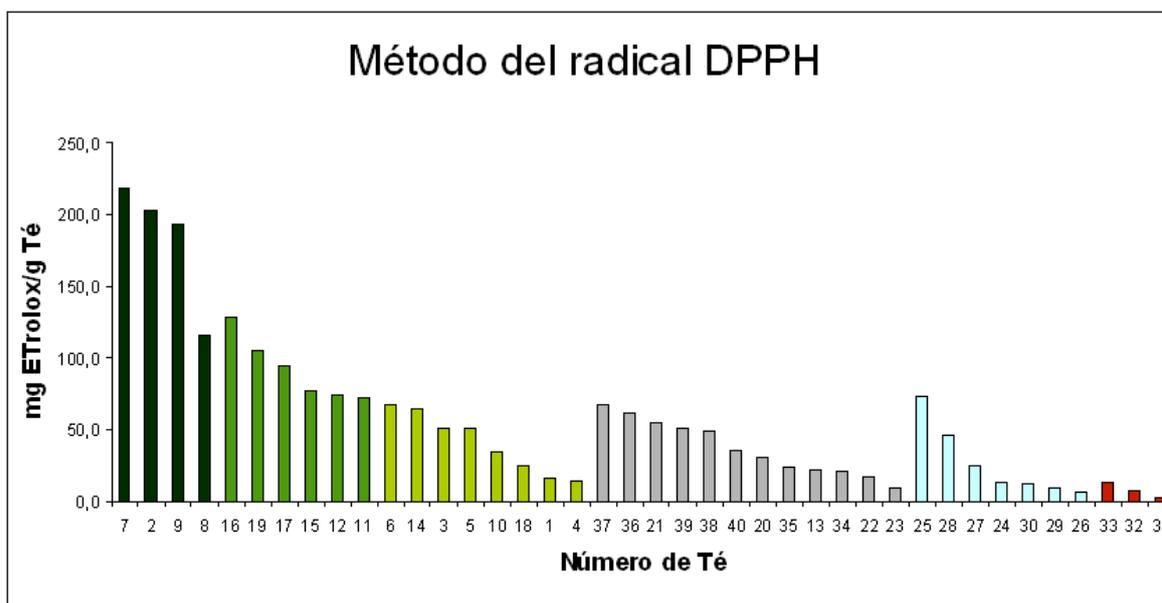
Figura R5. Método de DPPH. Recta patrón de Trolox 1mM.

Tabla R3. Método de DPPH. Capacidad antirradicalaria de los diferentes té.

Té	Nombre	mg equiv. de Trolox/g de té Media	mg equiv. de Trolox/g de té Desviación Estándar
1	Kukicha 3 años	16,1	2,8
2	Sencha	203,2	5,0
3	Kukicha	51,2	1,2
4	Hojicha 3 años	14,8	1,5
5	Bancha	50,4	2,2
6	Bancha leaf	68,2	6,2
7	Matcha segunda	218,5	1,1
8	Gyokuro	116,6	11,0

<b>Té</b>	<b>Nombre</b>	<b>mg equiv. de Trolox/g de té Media</b>	<b>mg equiv. de Trolox/g de té Desviación Estándar</b>
9	Matcha primera	193,5	1,3
10	Green salvaje	34,2	4,8
11	Special Gunpowder	72,4	4,7
12	Bi Luo Chung	74,4	1,3
13	Negro	21,9	0,9
14	Long Jing	64,7	17,6
15	Tai Ping Hou Kui	76,7	6,6
16	Chun Mee	128,8	7,1
17	Jade Rings	94,9	1,1
18	Mo Li Feng Yan	25,0	0,9
19	Long Jing Dragon Well	105,8	2,6
20	Orange Pekoe	31,3	2,0
21	Yunnan Supreme	55,1	3,0
22	Keemun	17,6	4,1
23	Lapsang Souchong	9,6	2,4
24	Wen Shan Bao Zhong	13,5	1,7
25	Ba Xian (Colied leaves)	73,2	1,5
26	Tung Ting	6,2	0,9
27	Da Hong Pao	25,5	1,7
28	Ro Gui (Cassia)	45,6	2,2
29	Bai Hao Oolong	9,6	0,7
30	Don Ding	12,2	1,1
31	Ya bao (Silver puer bud raw)	3,1	2,0
32	Old Puer	7,2	0,7

Té	Nombre	mg equiv. de Trolox/g de té Media	mg equiv. de Trolox/g de té Desviación Estándar
33	Puer bloque	14,2	0,9
34	FTGFOP1	21,6	1,5
35	SFTGFOP	24,8	1,5
36	First Flush	62,5	2,4
37	Second Flush	68,3	1,3
38	First Flush	49,0	1,3
39	Negro	52,0	1,1
40	Negro	36,2	1,8



**Figura R6. Método de DPPH. Capacidad antirradicalaria de los diferentes tipos de té. Té verde (color verde), té negro (negro), té oolong (azul), té puerh (rojo).**

#### 4.4. CORRELACIÓN DE LOS MÉTODOS DE FOLIN-CIOCALTEAU, CUPRAC Y DEL RADICAL DPPH.

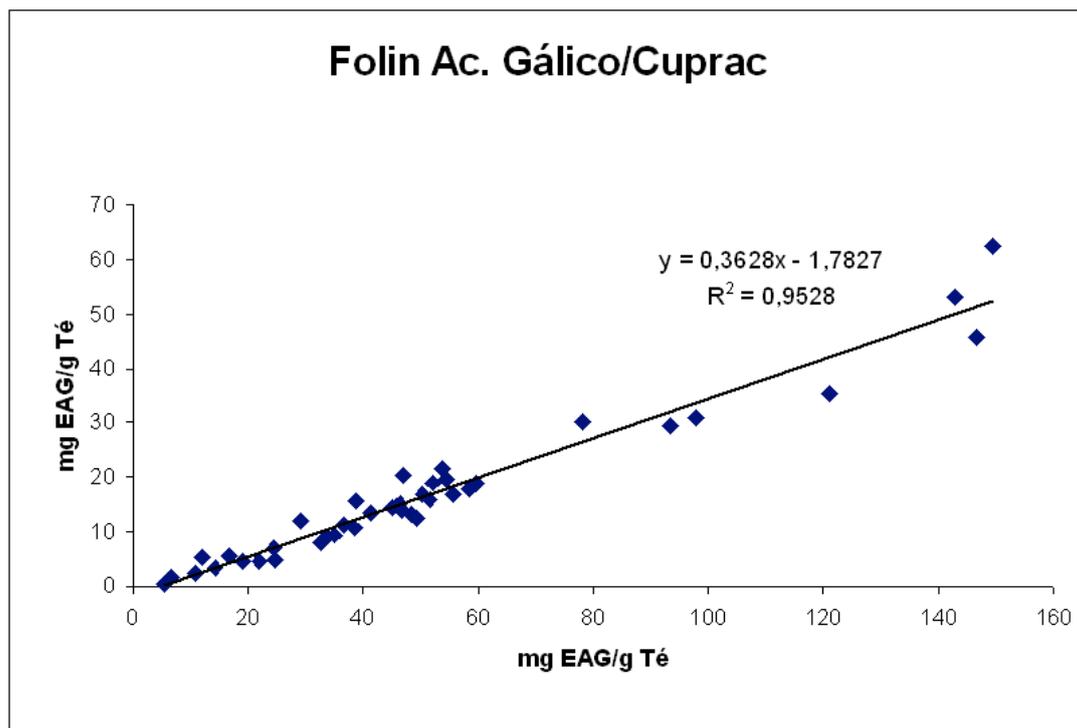


Figura R7. Correlación entre los métodos de Folin-Ciocalteu y CUPRAC de los diferentes té.

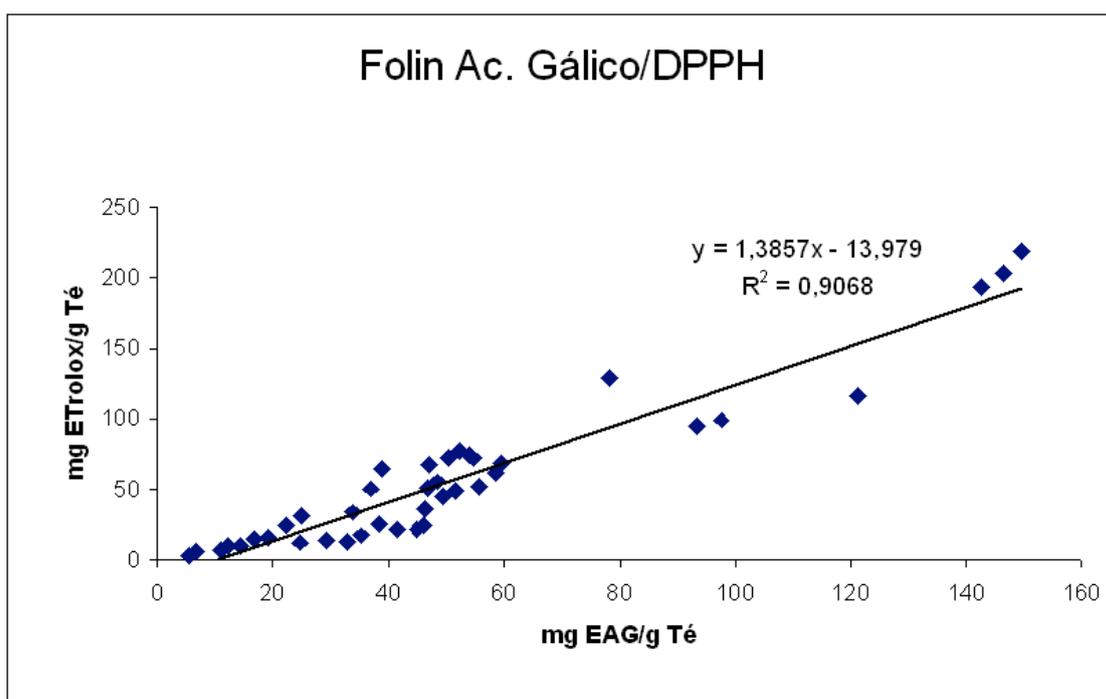
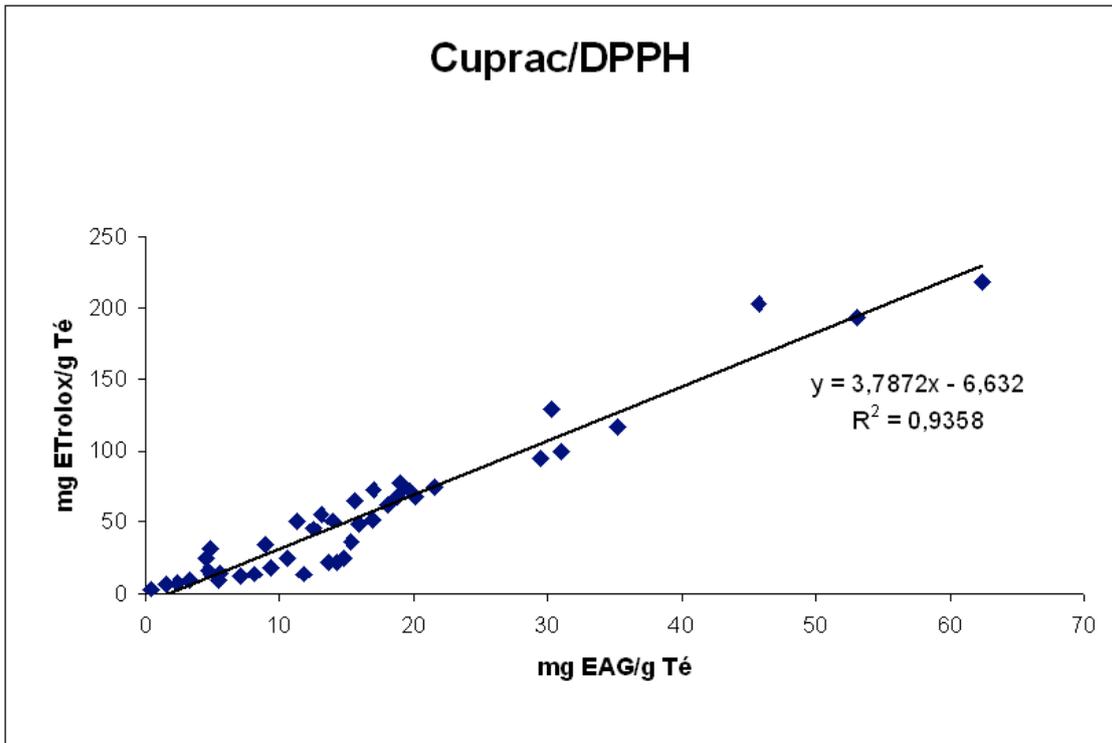


Figura R8. Correlación entre los métodos de Folin-Ciocalteu y DPPH de los diferentes té.



**Figura R9. Correlación entre los métodos de CUPRAC y DPPH de los diferentes té.**

#### 4.5. MEDIDA DE LOS FENOLES TOTALES Y DE LA CAPACIDAD ANTIRRADICALARIA DE DIFERENTES TÉS A DISTINTOS TIEMPOS DE EXTRACCIÓN.

Tabla R4. Método de Folin-Ciocalteu. Determinación de fenoles totales en los distintos té a diferentes tiempos de cocción (Estándar, 5 minutos y 10 minutos).

Nº	Método de Folin-Ciocalteu Té	Tipo	Tiempo Estándar mg EAG/g de Té	D.E	t = 5 min mg EAG/g de Té	D.E	t = 10 min mg EAG/g de Té	D.E
8	Gyokuro	Verde	121,1	3,5	141,4	1,8	147,8	0,8
19	Long Jing Dragon Well	Verde	97,7	3,1	109,8	2,2	114,8	0,9
37	Second Flush	Negro	59,6	0,9	65,9	1,8	69,7	1,5
34	FTGFOP1	Negro	45,0	0,6	51,9	2,2	58,0	0,7
30	Don Ding	Oolong	24,5	0,9	26,8	0,9	30,0	0,5
32	Old Puer	Puerh	10,9	0,7	13,4	0,7	15,3	0,7

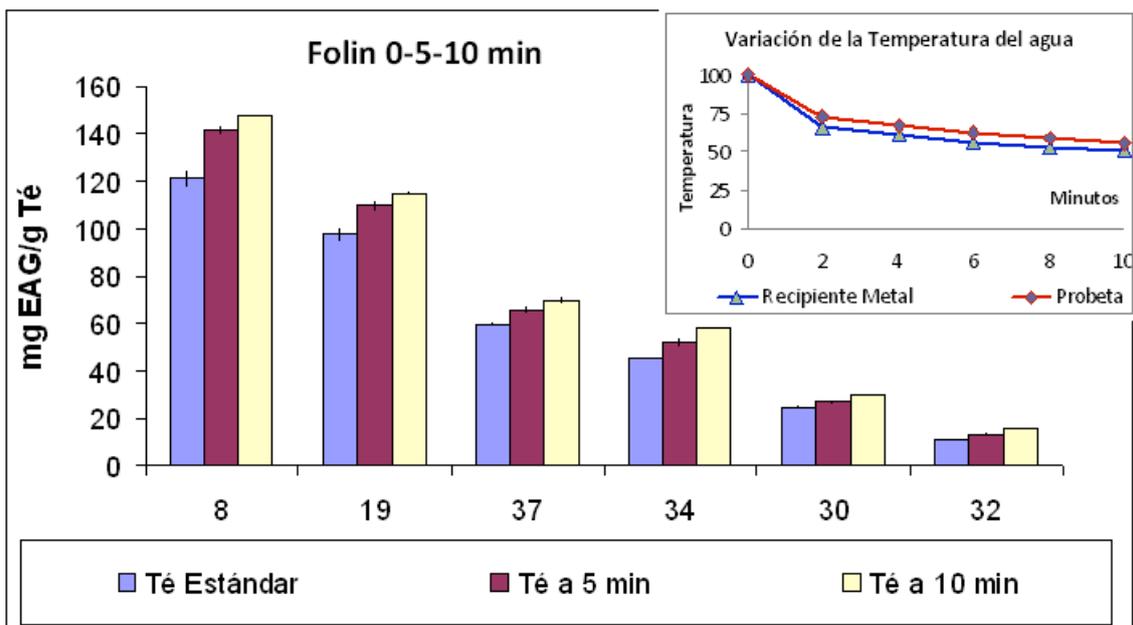
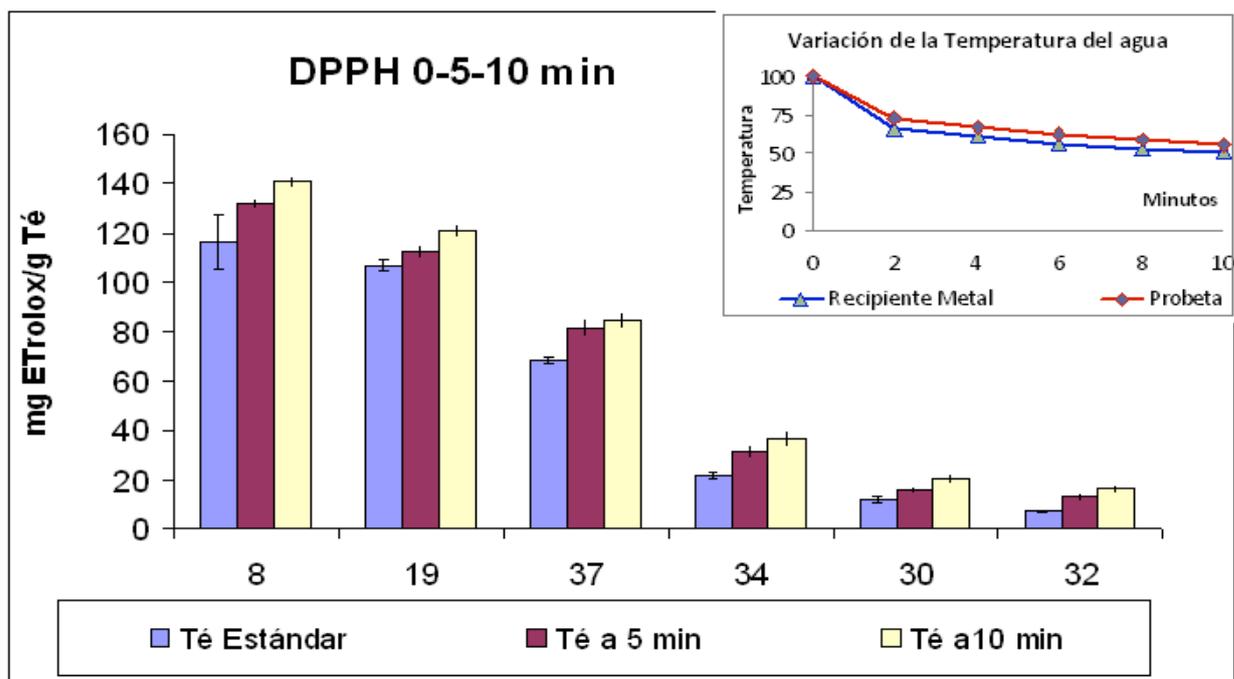


Figura R10. Método de Folin-Ciocalteu. Determinación de los fenoles totales en los distintos té a diferentes tiempos de cocción (Estándar, 5 minutos y 10 minutos).

**Tabla R5. Método de DPPH. Determinación de la capacidad antirradicalaria en los distintos té a diferentes tiempos de cocción (Estándar, 5 minutos y 10 minutos).**

Nº	Método de DPPH Té	Tipo	Tiempo Estándar mg Trolox/g de Té	D.E	t = 5 min mg Trolox/g de Té	D.E	t = 10 min mg Trolox/g de Té	D.E
8	Gyokuro	Verde	116,6	11,0	131,7	2,0	140,7	2,3
19	Long Jing Dragon Well	Verde	106,8	2,6	112,4	2,4	120,9	2,5
37	Second Flush	Negro	68,3	1,3	81,5	3,7	84,6	3,3
34	FTGFOP1	Negro	21,6	1,5	31,3	3,0	36,8	3,2
30	Don Ding	Oolong	12,2	1,1	15,9	0,9	20,3	1,9
32	Old Puer	Puerh	7,2	0,7	13,2	1,5	16,3	1,3



**Figura R11. Método del radical DPPH. Determinación de la capacidad antirradicalaria en los distintos té a diferentes tiempos de cocción (Estándar, 5 minutos y 10 minutos).**

#### 4.6. MÉTODO DEL TRICLORURO DE HIERRO. LONGITUD DE ONDA ÓPTIMA Y CONCENTRACIÓN DE POLYPHENON 60 A UTILIZAR.

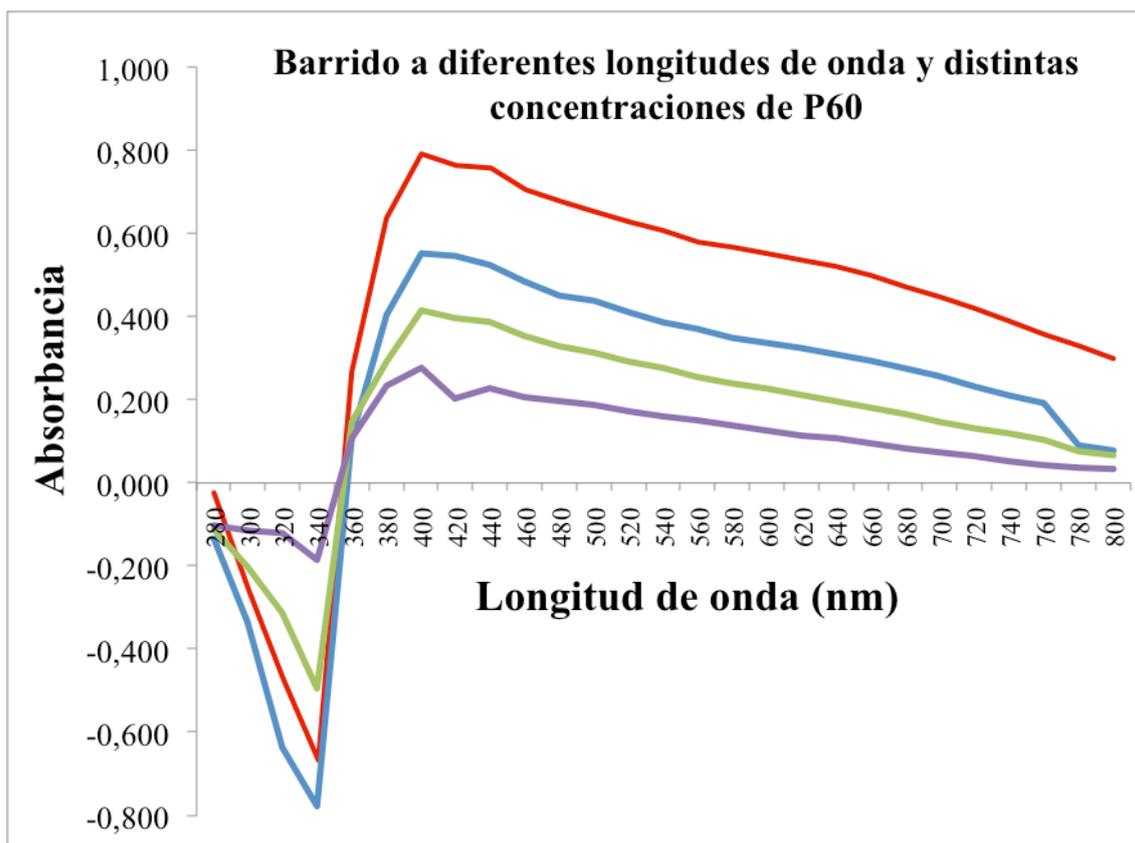


Figura 12. Método del Tricloruro de Hierro. Barrido a diferentes longitudes de onda y distintas concentración de P60 (100 µg, 200 µg, 300 µg, 400 µg).

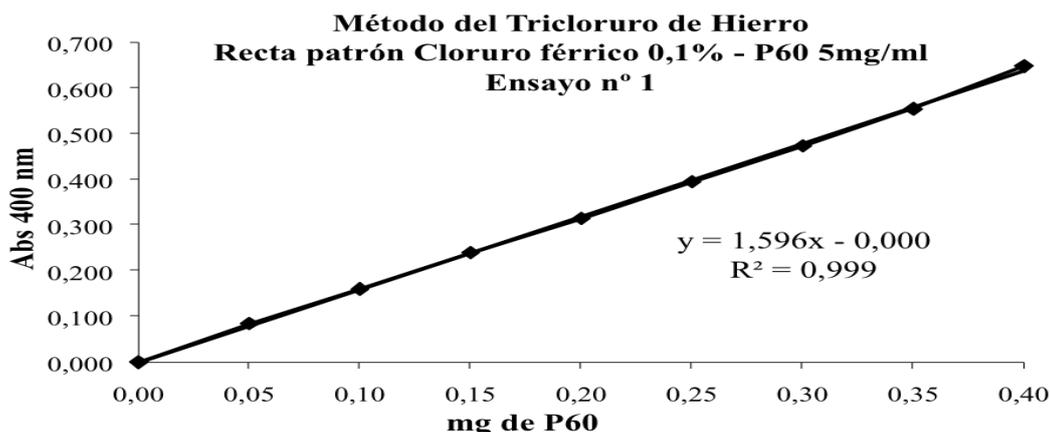
Absorbancia de medida óptima 400 nm.

## 4.7. VALIDACIÓN DEL MÉTODO DEL TRICLORURO DE HIERRO.

### 4.7.1. Proporcionalidad y exactitud.

**Tabla R6. Método del tricloruro de hierro. Proporcionalidad y exactitud. Ensayo n° 1.**

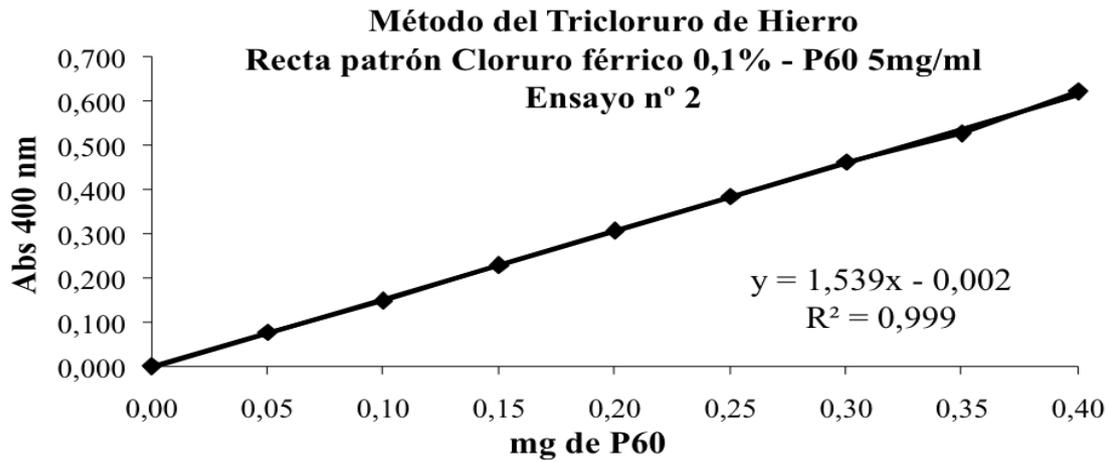
<b>Método Fe-P60</b>	<b>Blanco</b>	<b>P1</b>	<b>P2</b>	<b>P3</b>	<b>P4</b>	<b>P5</b>	<b>P6</b>	<b>P7</b>	<b>P8</b>
<b>FeCl<sub>3</sub> 0,1% (μl)</b>	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
<b>Tampón Acetato Acético 30 mM pH= 3,6</b>	100	100	100	100	100	100	100	100	100
<b>Polyphenon 60 5 mg/ml (μl)</b>	0	10	20	30	40	50	60	70	80
<b>Agua</b>	0	390	380	370	360	350	340	330	320
<b>Tiempo 10 minutos</b>									
<b>Abs. 400 nm</b>	<b>0,000</b>	<b>0,084</b>	<b>0,160</b>	<b>0,240</b>	<b>0,314</b>	<b>0,395</b>	<b>0,474</b>	<b>0,555</b>	<b>0,648</b>
<b>Método Fe-P60</b>	<b>Blanco</b>	<b>P1</b>	<b>P2</b>	<b>P3</b>	<b>P4</b>	<b>P5</b>	<b>P6</b>	<b>P7</b>	<b>P8</b>
<b>mg P60</b>	0	0,05	0,10	0,15	0,20	0,25	0,30	0,35	0,40
<b>Recta 1A</b>	0	0,091	0,159	0,243	0,343	0,399	0,475	0,563	0,664
<b>Recta 1B</b>	0	0,082	0,163	0,229	0,294	0,393	0,474	0,551	0,635
<b>Recta 1C</b>	0	0,079	0,158	0,247	0,306	0,393	0,472	0,550	0,646
<b>Promedio</b>	<b>0</b>	0,084	0,160	0,240	0,314	0,395	0,474	0,555	0,648
<b>D. E.</b>	<b>0</b>	0,006	0,003	0,009	0,026	0,003	0,002	0,007	0,015



**Figura R13. Recta patrón. Método del tricloruro de hierro. Proporcionalidad y exactitud. Ensayo n° 1.**

**Tabla R7. Método del tricloruro de hierro. Proporcionalidad y exactitud. Ensayo n° 2.**

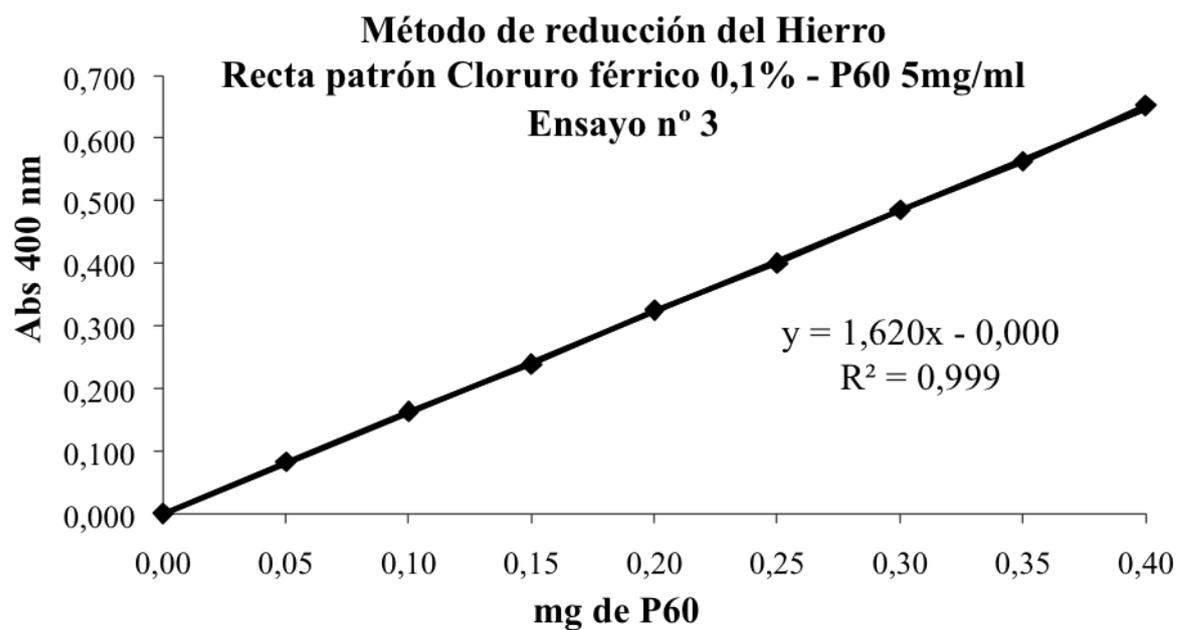
Método Fe-P60	Blanco	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8
FeCl <sub>3</sub> 0,1% (µl)	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
Tampón Acetato Acético 30 mM pH= 3,6	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Polyphenon 60 5 mg/ml (µl)	0	10	20	30	40	50	60	70	80
Agua	0	390	380	370	360	350	340	330	320
<b>Tiempo 10 minutos</b>									
Abs. 400 nm	0,000	0,076	0,148	0,228	0,306	0,384	0,461	0,526	0,622
Método Fe- P60	Blanco	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8
mg P60	0	0,05	0,10	0,15	0,20	0,25	0,30	0,35	0,40
Recta 2A	0	0,078	0,143	0,238	0,300	0,391	0,471	0,544	0,604
Recta 2B	0	0,076	0,155	0,216	0,296	0,364	0,462	0,517	0,616
Recta 2C	0	0,075	0,146	0,230	0,322	0,396	0,451	0,518	0,645
Promedio	0	0,076	0,148	0,228	0,306	0,384	0,461	0,526	0,622
D. E.	0	0,002	0,006	0,011	0,014	0,017	0,010	0,015	0,021



**Figura R14. Recta patrón. Método del tricloruro de hierro. Proporcionalidad y exactitud. Ensayo n° 2.**

**Tabla R8. Método del tricloruro de hierro. Proporcionalidad y exactitud. Ensayo n° 3.**

Método Fe-P60	Blanco	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8
FeCl <sub>3</sub> 0,1% (µl)	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
Tampón Acetato Acético 30 mM pH= 3,6	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Polyphenon 60 5 mg/ml (µl)	0	10	20	30	40	50	60	70	80
Agua	0	390	380	370	360	350	340	330	320
<b>Tiempo 10 minutos</b>									
Abs. 400 nm	0,000	0,082	0,163	0,239	0,325	0,400	0,486	0,563	0,653
Método Fe- P60	Blanco	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8
mg P60	0	0,05	0,10	0,15	0,20	0,25	0,30	0,35	0,40
Recta 3A	0	0,086	0,161	0,244	0,327	0,397	0,475	0,568	0,668
Recta 3B	0	0,080	0,168	0,237	0,318	0,403	0,500	0,571	0,645
Recta 3C	0	0,081	0,160	0,235	0,331	0,401	0,482	0,551	0,646
Promedio	0	0,082	0,163	0,239	0,325	0,400	0,486	0,563	0,653
D. E.	0	0,003	0,004	0,005	0,007	0,003	0,013	0,011	0,013



**Figura R15. Recta patrón. Método del tricloruro de hierro. Proporcionalidad y exactitud. Ensayo n° 3.**

#### 4.7.2. Precisión. Repetibilidad, reproducibilidad y robustez.

##### 4.7.2.1. Repetibilidad.

**Tabla R9. Método del tricloruro de hierro. Repetibilidad. Ensayo n° 1.**

<b>Método Fe-P60 Ensayo n° 1</b>	<b>Blanco</b>	<b>P1</b>	<b>P2</b>	<b>P3</b>
<b>FeCl<sub>3</sub> 0,1% (µl)</b>	1000	1000	1000	1000
<b>Tampón Acetato Acético 30 mM pH= 3,6</b>	100	100	100	100
<b>Polyphenon 60 5 mg/ml (µl)</b>	0	10	40	80
<b>Agua</b>	0	390	360	320
<b>Tiempo 10 minutos</b>				
<b>Abs. 400 nm</b>	<b>0,000</b>	<b>0,083</b>	<b>0,302</b>	<b>0,654</b>
<b>Método Fe-P60</b>	<b>Blanco</b>	<b>P1</b>	<b>P2</b>	<b>P3</b>
<b>mg P60</b>	<b>0</b>	<b>0,05</b>	<b>0,20</b>	<b>0,40</b>
<b>Replicado 1A</b>	0	0,089	0,302	0,661
<b>Replicado 1B</b>	0	0,086	0,305	0,652
<b>Replicado 1C</b>	0	0,075	0,298	0,650
<b>Promedio</b>	0	0,083	0,302	0,654
<b>D. E.</b>	0	0,007	0,004	0,006

**Tabla R10. Método del tricloruro de hierro. Repetibilidad. Ensayo n° 2.**

<b>Método Fe-P60 Ensayo n° 2</b>	<b>Blanco</b>	<b>P1</b>	<b>P2</b>	<b>P3</b>
<b>FeCl3 0,1% (µl)</b>	<b>1000</b>	<b>1000</b>	<b>1000</b>	<b>1000</b>
<b>Tampón Acetato Acético 30 mM pH= 3,6</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>
<b>Polyphenon 60 5 mg/ml (µl)</b>	<b>0</b>	<b>10</b>	<b>40</b>	<b>80</b>
<b>Agua</b>	0	390	360	320
<b>Tiempo 10 minutos</b>				
<b>Abs. 400 nm</b>	<b>0,000</b>	<b>0,079</b>	<b>0,298</b>	<b>0,654</b>
<b>Método Fe-P60</b>	<b>Blanco</b>	<b>P1</b>	<b>P2</b>	<b>P3</b>
<b>mg P60</b>	<b>0</b>	<b>0,05</b>	<b>0,20</b>	<b>0,40</b>
<b>Replicado 1A</b>	0	0,079	0,299	0,650
<b>Replicado 1B</b>	0	0,082	0,304	0,649
<b>Replicado 1C</b>	0	0,076	0,291	0,662
<b>Promedio</b>	0	0,079	0,298	0,654
<b>D. E.</b>	0	0,003	0,007	0,007

**Tabla R11. Método del tricloruro de hierro. Repetibilidad. Ensayo n° 3.**

<b>Método Fe-P60 Ensayo n° 3</b>	<b>Blanco</b>	<b>P1</b>	<b>P2</b>	<b>P3</b>
<b>FeCl<sub>3</sub> 0,1% (µl)</b>	1000	1000	1000	1000
<b>Tampón Acetato Acético 30 mM pH= 3,6</b>	100	100	100	100
<b>Polyphenon 60 5 mg/ml (µl)</b>	0	10	40	80
<b>Agua</b>	0	390	360	320
<b>Tiempo 10 minutos</b>				
<b>Abs. 400 nm</b>	<b>0,000</b>	<b>0,080</b>	<b>0,304</b>	<b>0,657</b>
<b>Método Fe-P60</b>	<b>Blanco</b>	<b>P1</b>	<b>P2</b>	<b>P3</b>
<b>mg P60</b>	<b>0</b>	<b>0,05</b>	<b>0,20</b>	<b>0,40</b>
<b>Replicado 1A</b>	0	0,085	0,308	0,654
<b>Replicado 1B</b>	0	0,081	0,299	0,650
<b>Replicado 1C</b>	0	0,074	0,305	0,667
<b>Promedio</b>	0	0,080	0,304	0,657
<b>D. E.</b>	0	0,006	0,005	0,009

#### 4.7.2.2. Reproducibilidad.

**Tabla R12. Método del tricloruro de hierro. Reproducibilidad a 0 horas. Ensayo n° 1.**

<b>Método Fe-P60 Ensayo n° 1</b>	<b>Blanco</b>	<b>P1</b>	<b>P2</b>	<b>P3</b>
<b>FeCl<sub>3</sub> 0,1% (μl)</b>	1000	1000	1000	1000
<b>Tampón Acetato Acético 30 mM pH= 3,6</b>	100	100	100	100
<b>Polyphenon 60 5 mg/ml (μl)</b>	0	20	50	70
<b>Agua</b>	0	380	350	330
<b>Tiempo 10 minutos</b>				
<b>Abs. 400 nm</b>	<b>0,000</b>	<b>0,155</b>	<b>0,393</b>	<b>0,550</b>
<b>Método Fe-P60</b>	<b>Blanco</b>	<b>P1</b>	<b>P2</b>	<b>P3</b>
<b>mg P60</b>	<b>0</b>	<b>0,10</b>	<b>0,25</b>	<b>0,35</b>
<b>Replicado 1A</b>	0	0,151	0,392	0,560
<b>Replicado 1B</b>	0	0,160	0,396	0,557
<b>Replicado 1C</b>	0	0,153	0,390	0,534
<b>Promedio</b>	0	0,155	0,393	0,550
<b>D. E.</b>	0	0,005	0,003	0,014

**Tabla R13. Método del tricloruro de hierro. Reproducibilidad a 0 horas. Ensayo n° 2.**

<b>Método Fe-P60 Ensayo n° 2</b>	<b>Blanco</b>	<b>P1</b>	<b>P2</b>	<b>P3</b>
<b>FeCl<sub>3</sub> 0,1% (µl)</b>	1000	1000	1000	1000
<b>Tampón Acetato Acético 30 mM pH= 3,6</b>	100	100	100	100
<b>Polyphenon 60 5 mg/ml (µl)</b>	0	20	50	70
<b>Agua</b>	0	380	350	330
<b>Tiempo 10 minutos</b>				
<b>Abs. 400 nm</b>	<b>0,000</b>	<b>0,154</b>	<b>0,394</b>	<b>0,562</b>
<b>Método Fe-P60</b>	<b>Blanco</b>	<b>P1</b>	<b>P2</b>	<b>P3</b>
<b>mg P60</b>	<b>0</b>	<b>0,10</b>	<b>0,25</b>	<b>0,35</b>
<b>Replicado 1A</b>	0	0,159	0,399	0,564
<b>Replicado 1B</b>	0	0,150	0,394	0,553
<b>Replicado 1C</b>	0	0,154	0,388	0,568
<b>Promedio</b>	0	0,154	0,394	0,562
<b>D. E.</b>	0	0,005	0,003	0,008

#### 4.7.2.3. Robustez.

**Tabla R1.4 Método del tricloruro de hierro. Reproducibilidad a 24 horas. Ensayo n° 1.**

<b>Método Fe-P60 Ensayo n° 1</b>	<b>Blanco</b>	<b>P1</b>	<b>P2</b>	<b>P3</b>
<b>FeCl<sub>3</sub> 0,1% (μl)</b>	1000	1000	1000	1000
<b>Tampón Acetato Acético 30 mM pH= 3,6</b>	100	100	100	100
<b>Polyphenon 60 5 mg/ml (μl)</b>	0	20	50	70
<b>Agua</b>	0	380	350	330
<b>Tiempo 10 minutos</b>				
<b>Abs. 400 nm</b>	<b>0,000</b>	<b>0,154</b>	<b>0,392</b>	<b>0,547</b>
<b>Método Fe-P60</b>	<b>Blanco</b>	<b>P1</b>	<b>P2</b>	<b>P3</b>
<b>mg P60</b>	<b>0</b>	<b>0,10</b>	<b>0,25</b>	<b>0,35</b>
<b>Replicado 1A</b>	0	0,150	0,392	0,559
<b>Replicado 1B</b>	0	0,159	0,395	0,553
<b>Replicado 1C</b>	0	0,153	0,388	0,530
<b>Promedio</b>	0	0,154	0,392	0,547
<b>D. E.</b>	0	0,005	0,004	0,015

**Tabla R15. Método del tricloruro de hierro. Reproductibilidad a 24 horas. Ensayo n° 2.**

<b>Método Fe-P60 Ensayo n° 2</b>	<b>Blanco</b>	<b>P1</b>	<b>P2</b>	<b>P3</b>
<b>FeCl<sub>3</sub> 0,1% (µl)</b>	1000	1000	1000	1000
<b>Tampón Acetato Acético 30 mM pH= 3,6</b>	100	100	100	100
<b>Polyphenon 60 5 mg/ml (µl)</b>	0	20	50	70
<b>Agua</b>	0	380	350	330
<b>Tiempo 10 minutos</b>				
<b>Abs. 400 nm</b>	<b>0,000</b>	<b>0,153</b>	<b>0,390</b>	<b>0,558</b>
<b>Método Fe-P60</b>	<b>Blanco</b>	<b>P1</b>	<b>P2</b>	<b>P3</b>
<b>mg P60</b>	<b>0</b>	<b>0,10</b>	<b>0,25</b>	<b>0,35</b>
<b>Replicado 1A</b>	0	0,157	0,392	0,561
<b>Replicado 1B</b>	0	0,147	0,396	0,550
<b>Replicado 1C</b>	0	0,154	0,383	0,564
<b>Promedio</b>	0	0,153	0,390	0,558
<b>D. E.</b>	0	0,005	0,007	0,007

**Tabla R16. Método del tricloruro de hierro. Robustez. Tampón acetato-acético 30 mM pH=3,6. Ensayo n° 1.**

<b>Método Fe-P60 Ensayo n° 1</b>	<b>Blanco</b>	<b>P1</b>	<b>P2</b>	<b>P3</b>
<b>FeCl<sub>3</sub> 0,1% (µl)</b>	1000	1000	1000	1000
<b>Tampón Acetato Acético 30 mM pH= 3,6</b>	100	100	100	100
<b>Polyphenon 60 5 mg/ml (µl)</b>	0	10	30	80
<b>Agua</b>	0	380	350	330
<b>Tiempo 10 minutos</b>				
<b>Abs. 400 nm</b>	<b>0,000</b>	<b>0,086</b>	<b>0,240</b>	<b>0,649</b>
<b>Método Fe-P60</b>	<b>Blanco</b>	<b>P1</b>	<b>P2</b>	<b>P3</b>
<b>mg P60</b>	<b>0</b>	<b>0,05</b>	<b>0,15</b>	<b>0,40</b>
<b>Replicado 1A</b>	0	0,092	0,244	0,663
<b>Replicado 1B</b>	0	0,085	0,231	0,640
<b>Replicado 1C</b>	0	0,081	0,245	0,643
<b>Promedio</b>	0	0,086	0,240	0,649
<b>D. E.</b>	0	0,006	0,008	0,013

**Tabla R17. Método del tricloruro de hierro. Robustez. Tampón acetato-acético 30 mM pH=3,6. Ensayo n° 2.**

<b>Método Fe-P60 Ensayo n° 2</b>	<b>Blanco</b>	<b>P1</b>	<b>P2</b>	<b>P3</b>
<b>FeCl<sub>3</sub> 0,1% (µl)</b>	1000	1000	1000	1000
<b>Tampón Acetato Acético 30 mM pH= 3,6</b>	100	100	100	100
<b>Polyphenon 60 5 mg/ml (µl)</b>	0	10	30	80
<b>Agua</b>	0	380	350	330
<b>Tiempo 10 minutos</b>				
<b>Abs. 400 nm</b>	<b>0,000</b>	<b>0,088</b>	<b>0,241</b>	<b>0,653</b>
<b>Método Fe-P60</b>	<b>Blanco</b>	<b>P1</b>	<b>P2</b>	<b>P3</b>
<b>mg P60</b>	<b>0</b>	<b>0,05</b>	<b>0,15</b>	<b>0,40</b>
<b>Replicado 1A</b>	0	0,091	0,242	0,661
<b>Replicado 1B</b>	0	0,089	0,238	0,650
<b>Replicado 1C</b>	0	0,083	0,243	0,649
<b>Promedio</b>	0	0,088	0,241	0,653
<b>D. E.</b>	0	0,004	0,003	0,007

**Tabla R18. Método del tricloruro de hierro. Robustez. Tampón Fosfato (NaCl 0,28 M – PNa 5 mM pH=3,6). Ensayo n° 1.**

<b>Método Fe-P60 Ensayo n° 1</b>	<b>Blanco</b>	<b>P1</b>	<b>P2</b>	<b>P3</b>
<b>FeCl<sub>3</sub> 0,1% (μl)</b>	1000	1000	1000	1000
<b>Tampón Fosfato pH= 3,6</b>	100	100	100	100
<b>Polyphenon 60 5 mg/ml (μl)</b>	0	10	30	80
<b>Agua</b>	0	380	350	330
<b>Tiempo 10 minutos</b>				
<b>Abs. 400 nm</b>	<b>0,000</b>	<b>0,096</b>	<b>0,250</b>	<b>0,661</b>
<b>Método Fe-P60</b>	<b>Blanco</b>	<b>P1</b>	<b>P2</b>	<b>P3</b>
<b>mg P60</b>	<b>0</b>	<b>0,05</b>	<b>0,15</b>	<b>0,40</b>
<b>Replicado 1A</b>	0	0,098	0,251	0,671
<b>Replicado 1B</b>	0	0,093	0,248	0,661
<b>Replicado 1C</b>	0	0,097	0,250	0,652
<b>Promedio</b>	0	0,096	0,250	0,661
<b>D. E.</b>	0	0,003	0,002	0,010

**Tabla R19. Método del tricloruro de hierro. Robustez. Tampón Fosfato (NaCl 0,28 M – PNa 5 mM pH=3,6). Ensayo n° 2.**

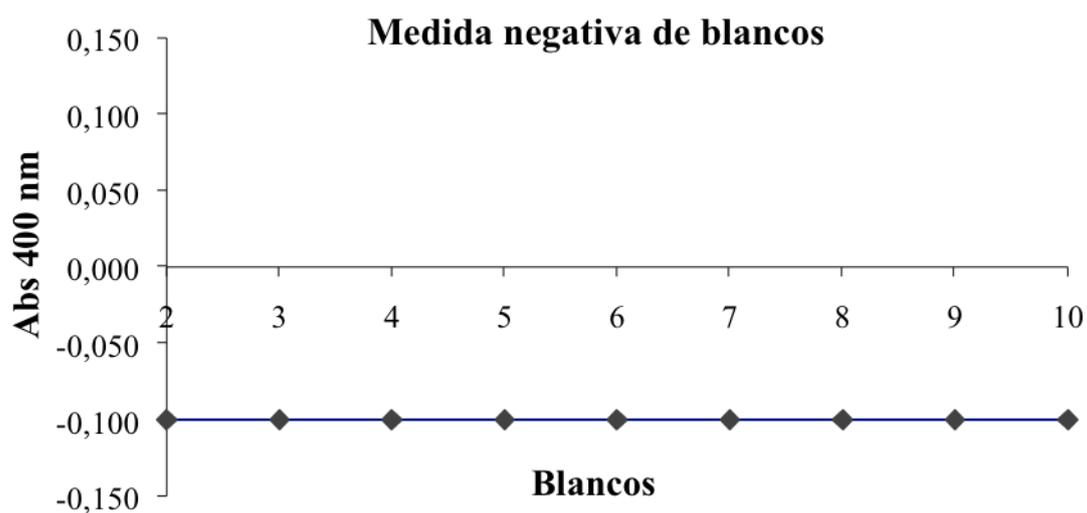
<b>Método Fe-P60 Ensayo n° 2</b>	<b>Blanco</b>	<b>P1</b>	<b>P2</b>	<b>P3</b>
<b>FeCl<sub>3</sub> 0,1% (μl)</b>	1000	1000	1000	1000
<b>Tampón Fosfato pH= 3,6</b>	100	100	100	100
<b>Polyphenon 60 5 mg/ml (μl)</b>	0	10	30	80
<b>Agua</b>	0	380	350	330
<b>Tiempo 10 minutos</b>				
<b>Abs. 400 nm</b>	<b>0,000</b>	<b>0,090</b>	<b>0,247</b>	<b>0,658</b>
<b>Método Fe-P60</b>	<b>Blanco</b>	<b>P1</b>	<b>P2</b>	<b>P3</b>
<b>mg P60</b>	<b>0</b>	<b>0,05</b>	<b>0,15</b>	<b>0,40</b>
<b>Replicado 1A</b>	0	0,094	0,251	0,665
<b>Replicado 1B</b>	0	0,090	0,244	0,654
<b>Replicado 1C</b>	0	0,087	0,247	0,656
<b>Promedio</b>	0	0,090	0,247	0,658
<b>D. E.</b>	0	0,004	0,004	0,006

#### 4.7.3. Límites de detección y cuantificación.

**Tabla R20. Método del tricloruro de hierro. Límites de detección y cuantificación.**

**Ensayo n° 1.**

B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	B <sub>3</sub>	B <sub>4</sub>	B <sub>5</sub>	B <sub>6</sub>	B <sub>7</sub>	B <sub>8</sub>	B <sub>9</sub>	B <sub>10</sub>
-0,100	-0,100	-0,100	-0,100	-0,100	-0,100	-0,100	-0,100	-0,100	-0,100
FeCl <sub>3</sub> a 0,1%				1000 µl					
Tampón Acetato 30 mM pH = 3,6				100 µl					
Agua				400 µl					



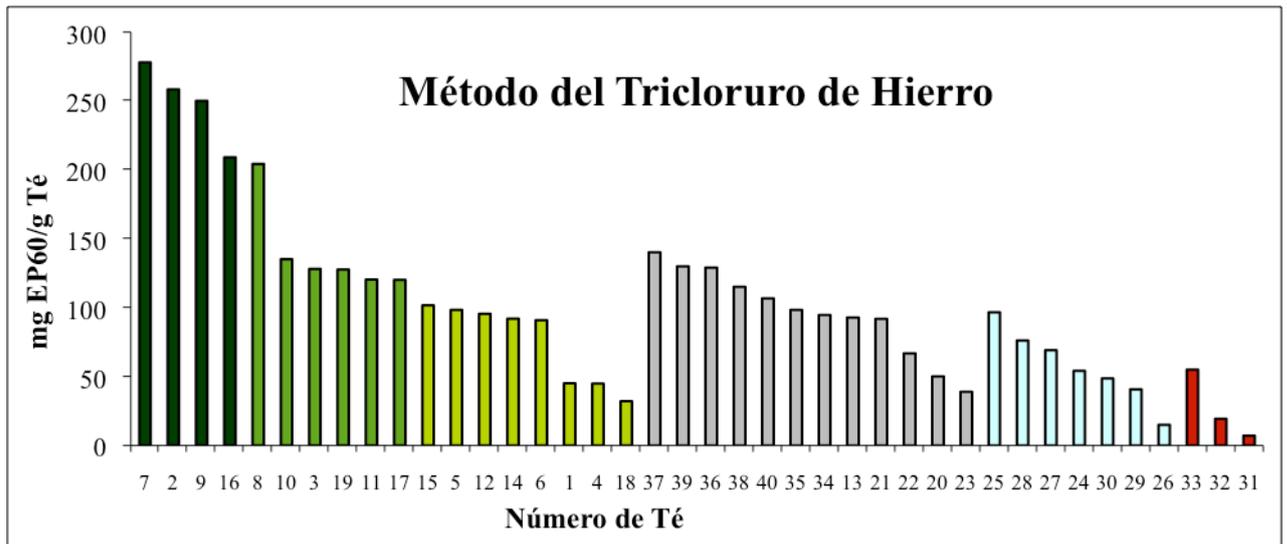
**Figura R16. Recta patrón. Método del tricloruro de hierro. Límites de detección y cuantificación. Ensayo n° 1.**

#### 4.7.4. Selectividad y especificidad.

**Tabla R21. Método del Tricloruro de hierro. Patrón P60. Capacidad antioxidante de los diferentes té. Media y desviación estándar.**

<b>Té</b>	<b>Nombre</b>	<b>mg equiv. de P60/g de té Media</b>	<b>mg equiv. de P60/g de té Desviación Estándar</b>
1	Kukicha 3 años	45,2	2,0
2	Sencha	258,5	11,5
3	Kukicha	128,2	4,0
4	Hojicha 3 años	44,9	4,3
5	Bancha	98,4	10,7
6	Bancha leaf	91,0	1,7
7	Matcha segunda	278,1	17,4
8	Gyokuro	204,3	6,3
9	Matcha primera	250,1	6,6
10	Green salvaje	135,2	13,2
11	Special Gunpowder	120,5	8,7
12	Bi Luo Chung	95,6	3,3
13	Negro	92,5	1,4
14	Long Jing	92,1	4,1
15	Tai Ping Hou Kui	101,7	7,8
16	Chun Mee	209,2	10,7
17	Jade Rings	120,2	2,7
18	Mo Li Feng Yan	32,2	1,7
19	Long Jing Dragon Well	127,7	2,6
20	Orange Pekoe	49,8	1,7
21	Yunnan Supreme	91,6	2,7

<b>Té</b>	<b>Nombre</b>	<b>mg equiv. de P60/g de té Media</b>	<b>mg equiv. de P60/g de té Desviación Estándar</b>
22	Keemun	67,0	1,7
23	Lapsang Souchong	38,8	3,3
24	Wen Shan Bao Zhong	54,2	1,7
25	Ba Xian (Colied leaves)	96,7	3,3
26	Tung Ting	15,0	1,7
27	Da Hong Pao	69,2	2,3
28	Ro Gui (Cassia)	76,2	1,3
29	Bai Hao Oolong	40,8	2,3
30	Don Ding	48,7	3,0
31	Ya bao (Silver puer bud raw)	7,1	1,4
32	Old Puer	19,4	1,3
33	Puer bloque	55,1	4,1
34	FTGFOP1	95,1	2,0
35	SFTGFOP	98,4	4,0
36	First Flush	129,5	2,7
37	Second Flush	139,8	4,3
38	First Flush	114,7	3,8
39	Negro	130,1	1,7
40	Negro	106,6	4,1



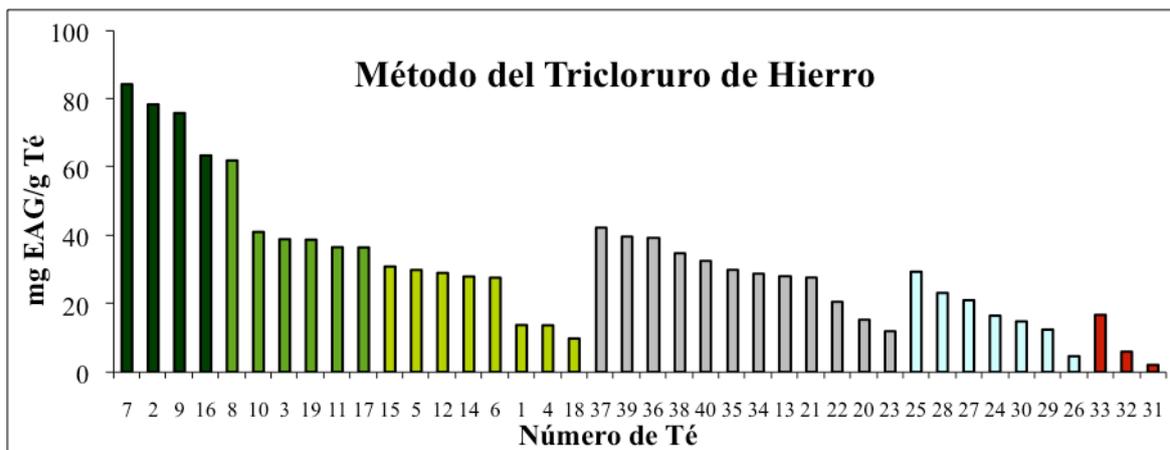
**Figura R17. Histograma. Método del Tricloruro de hierro. Capacidad antioxidante de los diferentes té.**

#### 4.8. MÉTODO DEL TRICLORURO DE HIERRO UTILIZANDO EL ÁCIDO GÁLICO COMO PATRÓN.

**Tabla R22. Método del Tricloruro de hierro. Patrón ácido gálico. Capacidad antioxidante de los diferentes té. Media y desviación estándar.**

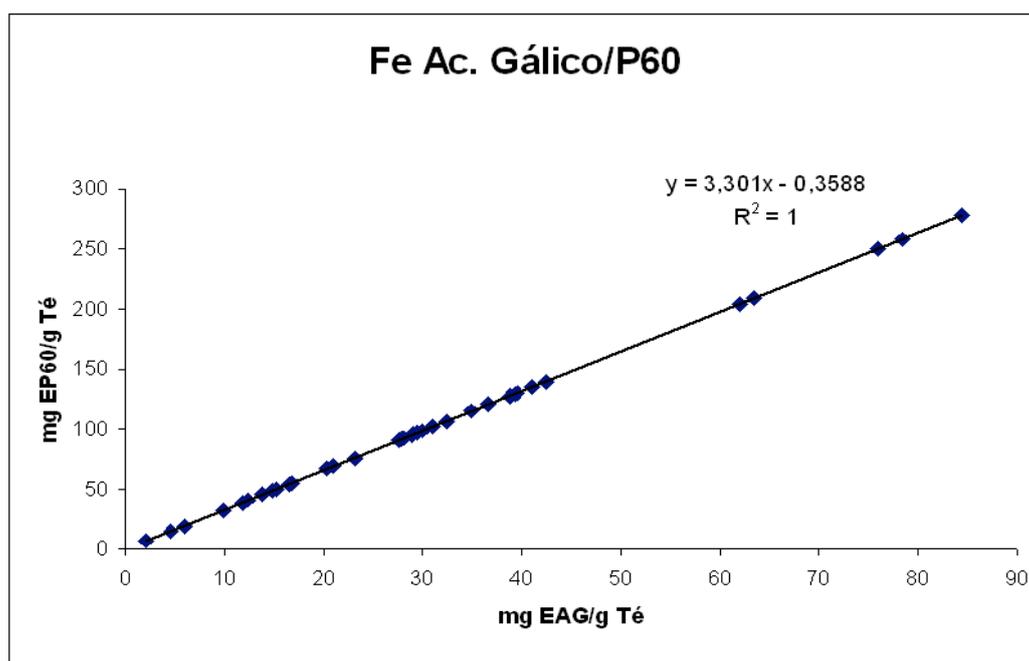
<b>Té</b>	<b>Nombre</b>	<b>mg equiv. de ac. gálico/g de té Media</b>	<b>mg equiv. de ac. gálico/g de té Desviación Estándar</b>
1	Kukicha 3 años	13,8	0,6
2	Sencha	78,4	3,5
3	Kukicha	38,9	1,2
4	Hojicha 3 años	13,7	1,3
5	Bancha	29,9	3,3
6	Bancha leaf	27,7	0,5
7	Matcha segunda	84,3	5,3
8	Gyokuro	62,0	1,9
9	Matcha primera	75,9	2,0
10	Green salvaje	41,1	4,0
11	Special Gunpowder	36,6	2,6
12	Bi Luo Chung	29,1	1,0
13	Negro	28,1	0,4
14	Long Jing	28,0	1,2
15	Tai Ping Hou Kui	30,9	2,4
16	Chun Mee	63,5	3,2
17	Jade Rings	36,5	0,8
18	Mo Li Feng Yan	9,9	0,5
19	Long Jing Dragon Well	38,8	0,8
20	Orange Pekoe	15,2	0,5
21	Yunnan Supreme	27,9	0,8

Té	Nombre	mg equiv. de ac. gálico/g de té	
		Media	Desviación Estándar
22	Keemun	20,4	0,5
23	Lapsang Souchong	11,9	1,0
24	Wen Shan Bao Zhong	16,5	0,5
25	Ba Xian (Colied leaves)	29,4	1,0
26	Tung Ting	4,7	0,5
27	Da Hong Pao	21,1	0,7
28	Ro Gui (Cassia)	23,2	0,4
29	Bai Hao Oolong	12,5	0,7
30	Don Ding	14,9	0,9
31	Ya bao (Silver puer bud raw)	2,1	0,3
32	Old Puer	6,0	0,4
33	Puer bloque	16,8	1,2
34	FTGFOP1	28,9	0,6
35	SFTGFOP	29,9	1,2
36	First Flush	39,3	0,8
37	Second Flush	42,5	1,3
38	First Flush	34,9	1,1
39	Negro	39,5	0,5
40	Negro	32,4	1,2



**Figura R18. Método del Tricloruro de hierro. Patrón ácido gálico. Capacidad antioxidante de los diferentes té.**

**4.8.1. Método del Tricloruro de Hierro. Correlación de los patrones de Ácido Gálico y Polyphenon 60.**



**Figura R19. Método del Tricloruro del Hierro. Correlación entre los patrones ácido gálico y P60 de los diferentes té.**

#### 4.9. ANÁLISIS POR HPLC DE DIFERENTES TÉS VERDES, NEGROS, OOLONG Y PUERH.

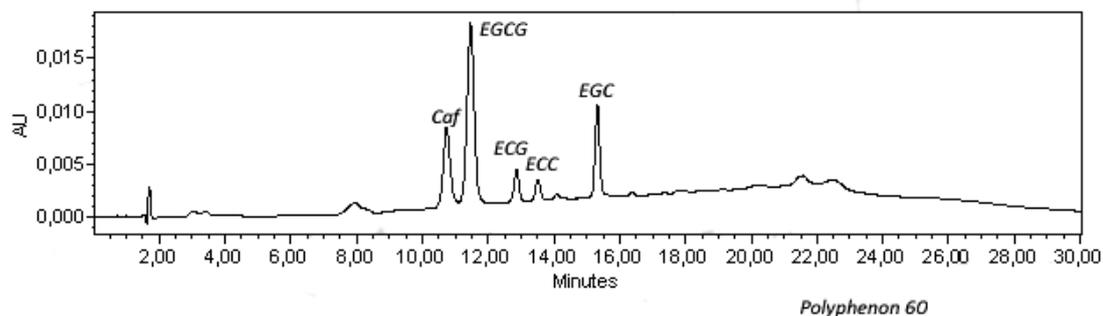


Figura R20. Cromatograma. HPLC del patrón P60.

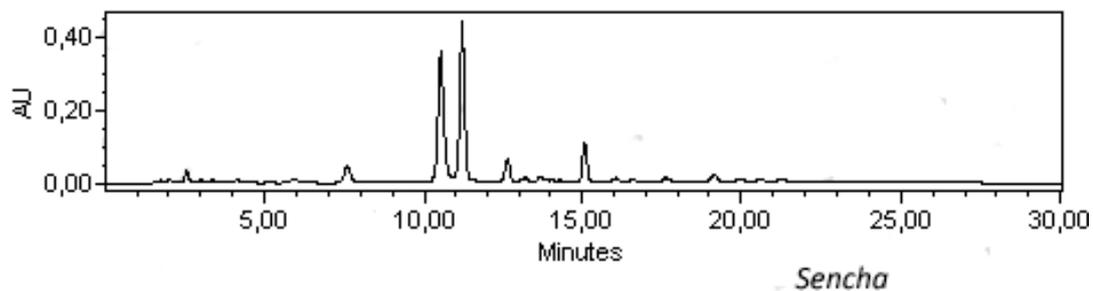


Figura R21. Cromatograma. HPLC de té Sencha.

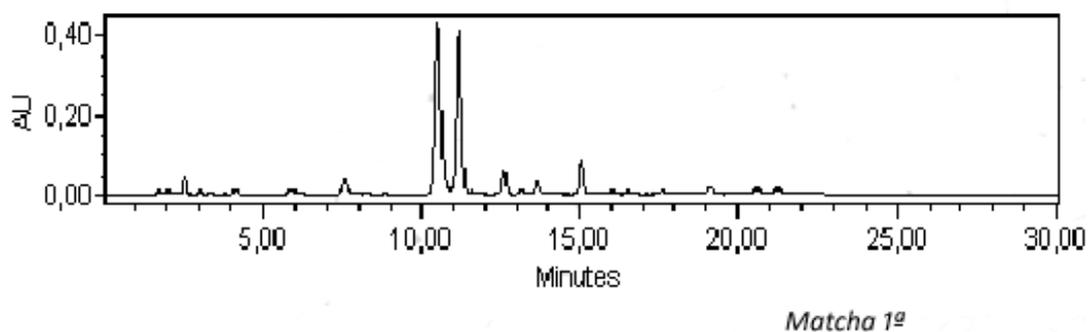
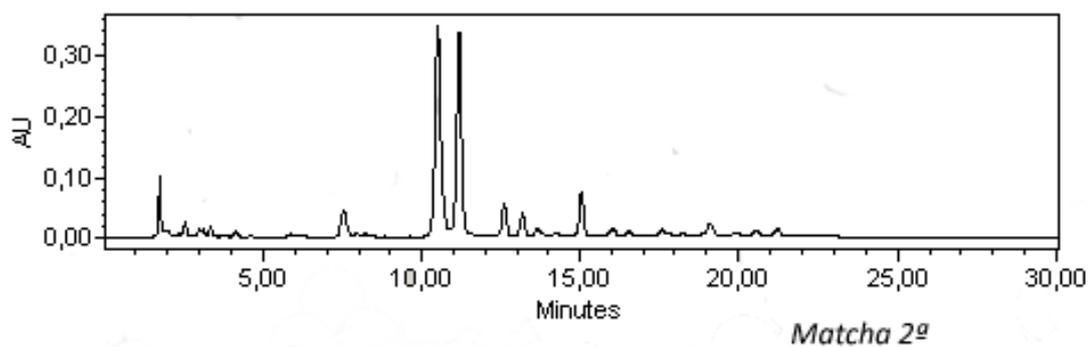
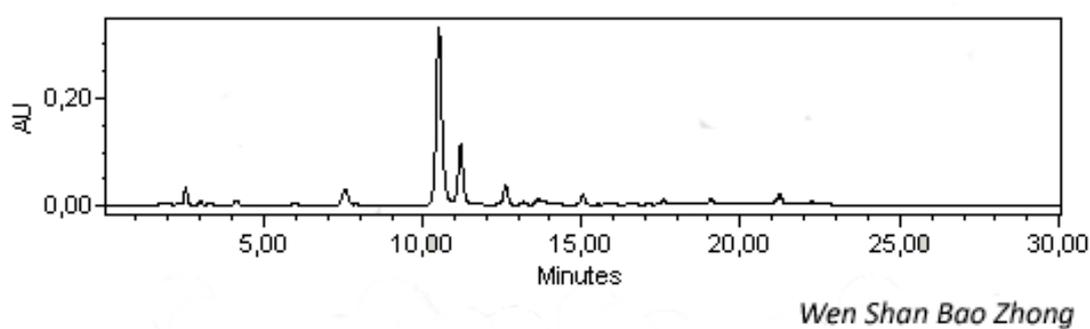


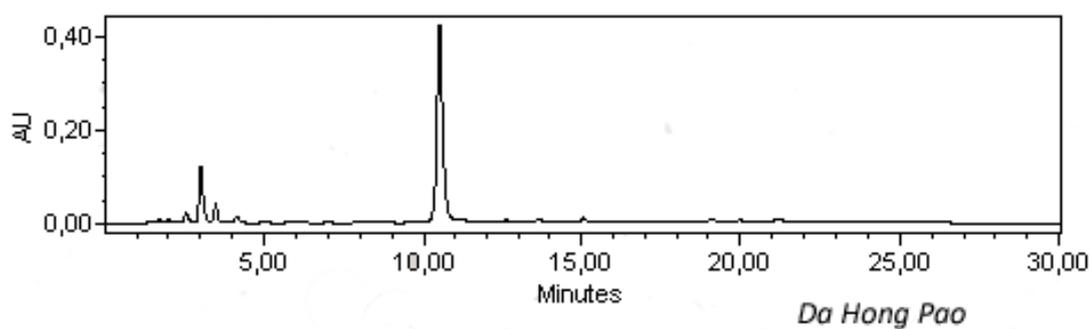
Figura R22. Cromatograma. HPLC de té Matcha 1ª.



**Figura R23. Cromatograma. HPLC de té Matcha 2ª.**



**Figura R2.4 Cromatograma. HPLC de té Wen Shan Bao Zhong.**



**Figura R25. Cromatograma. HPLC de té Da Hong Pao.**

Tabla R23. HPLC. Polifenoles del patrón P60 y 5 tipos de té (mg/g de té).

Tabla. Polifenoles de diversos tipos de té (mg/g de té)								
N°	Té	Tipo	Cafeína	EGCG	EGC	ECG	EC	Total
0	Polyphenon 60	Patrón	11,40	39,47	12,56	4,87	3,09	59,99
2	Sencha	Verde	39,72	26,67	12,53	6,08	3,57	48,86
9	Matcha primera	Verde	51,66	25,33	10,37	5,95	3,35	45,00
7	Matcha segunda	Verde	40,74	20,93	8,63	5,30	5,30	40,15
24	Wen Shan Bao Zhong	O'olong	34,93	6,92	2,11	2,88	1,04	12,96
27	Da Hong Pao	O'olong	47,09	0,56	0,84	0,34	0,40	2,14

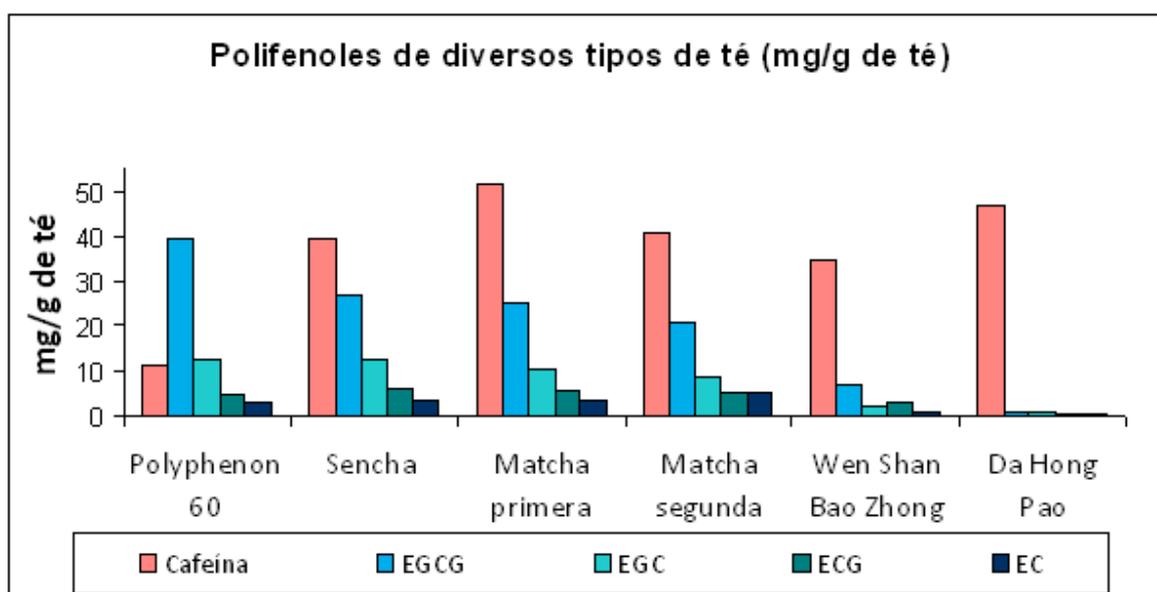


Figura R26. Histograma. HPLC de polifenoles del patrón P60 y de 5 tipos de té.

---

## **5. DISCUSIÓN**

---

El té es la segunda bebida más utilizada en el mundo. Existen tres tipos de té en función del grado de fermentación a que son sometidos. El té verde no sufre proceso de fermentación. Los té oolong y puerh sufren una fermentación parcial. El té negro es el que se obtiene después de una fuerte fermentación.

Cada tipo de té puede a su vez mezclarse con otras sustancias entre ellas aromas. Su consumo tiene efectos beneficiosos debido a los componentes polifenólicos que contiene, en particular las catequinas.

Los hábitos alimentarios influyen en el riesgo de desarrollar distintas enfermedades, especialmente el cáncer y enfermedades del corazón. El uso de determinadas sustancias en la dieta está recibiendo cada vez más atención como un enfoque práctico para reducir el riesgo de desarrollar estas enfermedades. El té puede desempeñar un papel activo en la prevención de ciertas tipos enfermedades de los seres humanos.

Observaciones epidemiológicas y estudios de laboratorio han indicado que el consumo de té puede tener efectos beneficiosos en la reducción de ciertos tipos de cáncer en algunas poblaciones (Venkata y cols., 2011).

En nuestro trabajo se prepararon infusiones de agua de té y se analizaron los fenoles totales con el reactivo de Folin-Ciocalteu. La actividad antioxidante se evaluó por el método de CUPRAC y la capacidad antirradicalaria por el método del radical DPPH

La administración de grandes dosis orales de un té verde concentrado conocido como Polyphenon 60 aumenta la toxicidad de la proteína inactivadora de ribosomas Ebulina f debido a una acción sinérgica de proapoptosis de las catequinas del té con Ebulina f (Jiménez y cols., 2014b). Durante estos estudios, encontramos diferentes efectos del té dependiendo del tipo de té. Con el fin de obtener conocimientos sobre estas diferencias se analizaron 40 muestras de té (verdes, negros, oolong y puerh), procedentes en su mayoría de distintos países de Asia y África y se analizó el contenido de fenoles totales, la actividad antioxidante y la actividad antirradicalaria.

Los fenoles totales se determinaron con el reactivo de Folin-Ciocalteu. La reacción es un ensayo de transferencia de electrones típico basado en la reacción de

---

oxidación / reducción de las muestras (Prior y cols., 2005; Huang y cols., 2005). El reactivo de Folin-Ciocalteu reacciona también con compuestos no fenólicos como el ácido ascórbico, cisteína, fructosa, sacarosa, ácido úrico, xantina, sulfato de hierro, fosfato de sodio y cloruro de estaño (Prior y cols., 2005). Por lo tanto, nuestras medidas pueden ser debidas no sólo a los compuestos fenólicos, sino también a otras sustancias reductoras solubles en agua presentes en los extractos

Nuestros resultados indican claramente que el contenido total de compuestos fenólicos depende del tipo de té. En general, las muestras más ricas pertenecen a los tés verdes. Las muestras más pobres pertenecen a los tés negros. Los tés oolong mostraron valores intermedios. La riqueza en compuestos fenólicos es muy diferente dependiendo de la parte de la planta utilizada y el proceso aplicado al material para la preparación de la presentación final de té. La extracción fenólica de polvo de té es mayor que en los tallos y las hojas.

La actividad antioxidante de las muestras de té se determinó con neocuproína (2,9-dimetil-1,10phenantroline) en el ensayo conocido como CUPRAC. En el procedimiento original se informó de que  $\text{Cu}^{+2}$  se reduce por la muestra y la resultante  $\text{Cu}^{+}$  forma un complejo con dos moléculas de neocuproína que se absorben a 450 nm (Apak y cols., 2004).

Las actividades antioxidantes eran también dependientes del tipo de té. Se estudió la actividad de eliminación de radicales libres de los tés usando el ensayo de decoloración del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidracilo estable conocido como DPPH (Bondet y cols., 1997; Prior y cols., 2005). El proceso químico es una reacción de transferencia de electrones en la que la profundidad de color púrpura de DPPH es dependiente del tiempo (10 minutos) y su decoloración puede seguirse midiendo la absorbancia a 515 nm con un colorímetro (Prior y cols., 2005; Sánchez Moreno y cols., 1998). La decoloración del té dependiente de DPPH corre en paralelo con el contenido en polifenoles y la actividad antioxidante de las muestras. En esta línea, se analizó la correlación entre los valores obtenidos en los diferentes procedimientos para determinar si existen relaciones cuantitativas entre el contenido en fenoles y la capacidad antioxidante y antirradicalaria.

Se prepararon los extractos en agua de tés según lo indicado por los fabricantes. La mayoría de ellos recomiendan 2-3 min de contacto entre la muestra de té y el agua

---

caliente. Para determinar si los tiempos más largos podrían mejorar la extracción, se seleccionaron varios té de cada tipo y se extrajeron los compuestos fenólicos con agua caliente después de 5 y 10 min de la adición de agua hirviendo. La extracción durante 10 minutos condujo a un aumento de los fenoles totales (14 al 28%) que reaccionan con el reactivo de Folin-Ciocalteu. En el caso de la reacción con DPPH las diferencias eran mucho más altas alcanzando el 56% en el té puerh. Para la mayoría de los té con alto contenido de material polifenólico 2-3 min de extracción con agua caliente aseguran una buena recuperación de los polifenoles con un mínimo de pérdida de aroma.

Con el fin de establecer una relación cuantitativa entre el contenido de polifenoles y la actividad antioxidante y de captación de radicales libres de las diferentes muestras de té que realizamos en un estudio de correlación. La correlación de la reactividad de los extractos de té acuosos con el reactivo Folin-Ciocalteu y con los valores del ensayo CUPRAC condujo a una línea recta correspondiente a la ecuación  $y = 0.3628x - 1,7827$  con un valor  $R^2$  de 0,9528. La correlación del método de Folin-Ciocalteu con los valores de la DPPH se representa con una línea recta correspondiente a la ecuación  $y = 1.3857x - 13.979$  con un valor  $R^2$  de 0,9068. Estos resultados indican que la capacidad antioxidante de los extractos acuosos de té se debe en gran medida al contenido en polifenoles. Por otro lado, nos encontramos también una buena correlación entre la actividad antioxidante evaluado por el procedimiento CUPRAC y la actividad de eliminación de radicales libres evaluado como pérdida de color de DPPH con la ecuación  $y = 3.7872x - 6.632$  y un valor de  $R^2$  de 0,9358.

Asimismo, se analizaron las diferentes muestras de té por HPLC en comparación con el contenido de catequinas y cafeína del Polyphenon 60. Las catequina más abundantes en el Polyphenon 60 son EGCG, seguido de EGC, ECG y EC. En los análisis de los diferentes té analizados se observa que algunas muestras de té eran ricas en cafeína y muy pobres en catequinas y que los resultados fueron similares por los métodos espectrofotométricos y por HPLC.

El método del tricloruro de hierro es un procedimiento para la determinación rápida y barata con tricloruro de hierro del contenido en polifenoles totales de distintas muestras de té (té verde, oolong y negro).

---

Entre ellos cabe destacar los grupos de catequinas, tearubiginas y teaflavinas. Las catequinas son polifenoles flavánicos que predominan en el té verde mientras que tearubiginas y teaflavinas son derivados flavánicos producidos durante el proceso fermentativo y predominan en los téis fermentados, en particular el té negro. El epigalocatequingalato (EGCG) es la catequina más activa y más estudiada. El epigalocatequingalato (EGCG) posee actividades antiinflamatoria y antitumoral.

Las muestras de té se obtuvieron de distribuidores autorizados. Los polifenoles totales se determinaron por reacción del té con  $\text{FeCl}_3$  y posterior determinación de la absorbancia del complejo resultante por colorimetría a 400 nm o (los resultados se expresan como  $\mu\text{g}$  equivalentes de Pol60 por gramo de té). Los experimentos se realizaron por triplicado.

Los fenoles interaccionan con el hierro de dos maneras. Con el  $\text{Fe(II)}$  se produce oxidación con el oxígeno del aire a  $\text{Fe(III)}$  y reducción concomitante del fenol a quinona. Con  $\text{Fe(III)}$  se producen complejos  $\text{Fe(III)}$ -fenoles cuya coordinación depende del pH. A pH ácido el  $\text{Fe(III)}$  absorbe mucho menos que a pH neutro o alcalino. Por ello y para rebajar la absorción del blanco, de un estudio de valores de pH y concentraciones se escogió el pH 3,6 como valor óptimo.

La absorbancia se mide a 400 nm y este valor se utiliza para analizar el contenido de polifenoles totales de los distintos téis, utilizando como referente la preparación comercial de extracto de té verde denominada Polyphenon 60 (Pol60). El Polyphenon 60 (Pol60) contiene el 60% en peso de las cuatro catequinas más importantes: epigalocatequingalato (29%), epicatequina (8%), epigalocatequina (7,5%) y epicatequin-3-galato (9%).

Los polifenoles totales pueden determinarse mediante formación de complejos con  $\text{Fe(III)}$ . La utilización de  $\text{Fe(III)}$  evita la reducción de los fenoles que sucede con  $\text{Fe(II)}$  y que puede desvirtuar las medidas de los fenoles totales. El procedimiento es muy reproducible y fiable a pH 3,6. A pH neutro la absorción de  $\text{Fe(III)}$  es tan alta que disminuye la especificidad del método y se produce la aparición de precipitados.

La reactividad del ácido gálico corresponde es 3,1 mayor que la del Polyphenon (Pol60). Si comparamos el contenido de ácido gálico en Pol60, se obtiene un valor de 27,38 % de ácido gálico en Polyphenon 60 (Pol60) que se aproxima mucho al valor

---

experimental obtenido. Es posible que los fenoles no gálicos presentes en las catequinas reaccionen también con Fe(III) y sean responsables de esta pequeña diferencia.

Beber té cada día se considera actualmente como una práctica saludable debido a las sustancias antioxidantes en él contenidas, especialmente polifenoles (Kanwar y cols., 2012; Yang y cols., 2009; Mousavi y cols., 2013; Danesi y cols., 2009). Muchas funciones biológicas están positivamente afectadas por el consumo de polifenoles. Por tanto, si el consumo del té está dirigido a mejorar el estado antioxidante de los consumidores el contenido en polifenoles debe tenerse en cuenta. Sin embargo, el té es apreciado no sólo por efectos antioxidantes sino también por su sabor y gusto.

Las catequinas del té son cada vez más conocidas como responsables de la actividad antioxidante y de la lucha contra el cáncer. Además, actúan contra la arterosclerosis, como antiinflamatorio y contra la diabetes. Debido a que los estudios epidemiológicos y los resultados de la investigación en animales de laboratorio han demostrado el potencial quimiopreventivo de los polifenoles del té en el cáncer, es muy importante desarrollar y evaluar estudios en ensayos clínicos en seres humanos.

Hay que investigar más a fondo el té para determinar las sustancias activas, la elucidación del mecanismo básico de acción, y la evaluación de la eficacia clínica. La investigación médica moderna ha proporcionado una amplia gama de pruebas de que el té puede ser eficaz en diferentes terapias. Debido a su actividad antimicrobiana el té parece ser útil para el tratamiento de ciertos tipos de infecciones. Además, el té puede utilizarse como modulador bioquímico para mejorar la eficacia terapéutica de otros fármacos.

---

## **6. CONCLUSIONES.**

- 
1. Los téis verdes Matcha, Sencha y Gyokuro Japoneses son los más ricos en fenoles totales, los téis negros, oolong y puerh tienen valores sustancialmente más bajos.
  2. La capacidad antioxidante de los téis determinados por el método de CUPRAC evidencia una mayor capacidad antioxidante de los téis Matcha, Sencha y Gyokuro.
  3. La capacidad antirradicalaria de los téis analizada por el método del radical DPPH indica resultados similares.
  4. Las correlaciones entre los resultados obtenidos por los métodos de Folin-Ciocalteu, CUPRAC y DPPH sugieren que la actividad antioxidante se debe esencialmente a los compuestos polifenólicos presentes en el té, principalmente al epigallocatequingalato (EGCG).
  5. La extracción de los fenoles totales aumenta con los tiempos de extracción (estándar, 5 y 10 minutos).
  6. Existen unas enormes diferencias en el contenido polifenólico y las capacidades antioxidantes y antirradicalarias de los distintos téis analizados. Nuestros resultados indican que los valores obtenidos dependen de la transformación de las diferentes muestras de té y de las distintas partes del té, polvo, tallos y hojas; utilizadas en las distintas muestras.
  7. La validación del método del Tricloruro de hierro para el análisis de los fenoles del té indica que dicho método pueda ser un método efectivo y a considerar en el futuro.
  8. El método del Tricloruro de hierro es económico, muy reproducible y fiable a pH 3,6. Los polifenoles totales pueden determinarse mediante la formación de complejos con Fe(III).

---

**9.** En el método del Tricloruro de Hierro podemos utilizar el ácido gálico y el Polyohenon 60 como patrones.

**10.** Los resultados por HPLC muestran un alto contenido en cafeína que sugiere una alteración en los tés analizados.

**11.** Los resultados obtenidos de las distintas catequinas en los diferentes tés analizados por HPLC son muy diferentes en los distintos tés, siendo mayores en los tés verdes y presentan una correlación alta con los valores obtenidos en los análisis espectrofotométricos.

**12.** La información sobre la biodisponibilidad de los polifenoles del té después del consumo de té es todavía limitada, por tanto, es necesario realizar estudios sobre la absorción, distribución y metabolismo de polifenoles del té en animales y humanos. Sólo después de una cuidadosa evaluación de los datos disponibles y los estudios adicionales, se podrán hacer recomendaciones específicas para el consumo de té.

---

## **7. BIBLIOGRAFÍA.**

---

Afaq F, Adhami VM, Ahmad N, Mukhtar H (2004). Health benefits of tea consumption. (eds): Wilson T, Temple NJ, Jacobs DR, Jr. *Beverages in Nutr. Health*, pp. 143-156.

Agarwal R, Katiyar SK, Khan SG, Mukhtar H (1993). Protection against ultraviolet B radiation-induced effects in the skin of SKH-1 hairless mice by a polyphenolic fraction isolated from green tea. *Photochem. Photobiol.*, 58: 695-700.

Apak, R., Güçlü, K., Ozyürek, M. and Karademir S.E. (2004) Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 7970-7981.

Ariansen J. (2009). *Historia del té*.

Aruoma, O. I. Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in food plants. *Mut. Res* v.523-524, p.9-20, 2003.

Balentine DA (1997). Introduction: tea and health. *Crit. Rev. Food Sci.Nutr.*, 8: 691-669.

B.O.E. Real Decreto 1354/1983, de 27 de abril. *Reglamentación Técnico - Sanitaria para la elaboración, circulación y comercio de té y derivados*.

Bondet, V.; Brand-Williams, W.; Berset, C. (1997) Kinetics and Mechanisms of Antioxidant Activity using the DPPH. Free Radical Method. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 30, 609-615.

Buzzini P, Vignolini P, Goretti M, Turchetti B, Branda E, Marchegiani E, Pinelli P, Romani A (2009). Green tea catechins: a class of molecules with antimicrobial activity. *Handbook of Green Tea and Health Research*. Publisher: *Nova Science Publishers, Inc. Hauppauge, NY*, pp. 23-43.

Cao H, Qin B, Panickar KS, Anderson RA (2008). Tea and cinnamon polyphenols improve the metabolic syndrome. *Agro. Food Ind. Hi Tech.*, 19: 14-17.

---

China National Bureau of Statistics. 2011. "China Statistical Yearbook (1979-2011)." China Statistical Yearbooks. *China Statistics Press*. <http://chinadatacenter.org/>.

Clifford, M.N., Vander Hoof, J.J. and Crozier, A. (2013). Human studies on the absorption, distribution, metabolism, and excretion of tea polyphenols. *Am. J. Clin. Nutr.* 98,1619–1630.

Danesi F, Di Nunzio M, Boschetti E, Bordoni A. (2009). Green tea extract selectively activates peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta in cultured cardiomyocytes. *British Journal of Nutrition*, 101, 1736-1739.

Da Silva Pinto, Marcia. 2013. "Tea: A New Perspective on Health Benefits." *Food Research International* 53 (2): 558–67.

Diker KS, Akan M, Hascelik G, Yurdako KM (1991). The bactericidal activity of tea against *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Lett. Appl. Microbiol.*, 12: 34-35.

Diker KS, Hascelik G (1994). The bactericidal activity of tea against *Helicobacter pylori*. *Lett. Appl. Microbiol.*, 19: 299-300.

Dreaosti IE, Wargovich MJ, Yang CS (1997). Inhibition of carcinogenesis by tea: the evidence from experimental studies. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 37: 761-770.

Dubick MA, Omaye ST (2001). Modification of atherogenesis and heart disease by grape wine and tea polyphenols. *Handbook of Nutraceuticals and Functional Foods*. (eds) Wildman REC, CRC Press, pp. 235-260.

FAO. (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura). *Última sesión del Grupo Intergubernamental sobre el té*. (2012). Roma. [www.fao.org/](http://www.fao.org/)

Frank, J., George, T. W., Lodge, J. K., Rodriguez-Mateos, A. M., Spencer, J. P. E., Minihane, A. M. & Rimbach, G. (2009). Daily consumption of an aqueous green tea

---

extract supplement does not impair liver function or alter cardiovascular disease risk biomarkers in healthy men. *The Journal of Nutrition*, 139, 58–62.

Fujita T (1994). Osteoporosis in Japan: factors contributing to the low incidence of hip fracture. *Adv. Nutr. Res.*, 9: 89-99. Gutman RL, Ryu BH (1996). Rediscovering tea. An exploration of the scientific literature. *Herbal Gram*, 37: 33-48.

Gao, M., Ma, W., Chen, X.B., Chang, Z.W., Zhang, X.D. and Zhang, M.Z. (2013). Meta-analysis of green tea drinking and the prevalence of gynecological tumors in women. *Asia Pacific Journal of Public Health*, 25, 43S-8S.

Gupta J, Siddique YH, Beg T, Ara G, Afzal M (2008). A review on the beneficial effects of tea polyphenols on human health. *Int. J. Pharmacol.*, 4: 314-338.

Hara Y, Luo SJ, Wickremashinghe RL, Yamanishi T (1995a). VI. Biochemistry of processing black tea. *Food Rev. Int.*, 11: 457-471.

Hara Y, Luo SJ, Wickremashinghe RL, Yamanishi T (1995b). IX. Uses and benefits of tea. *Food Rev. Int.*, 11(11): 527-542.

Heleno, S.A., Barros. L., Martins. A., Queiroz. M.J., Santos-Buelga. C. and Ferreira IC. (2012) Phenolic, polysaccharidic, and lipidic fractions of mushrooms from northeastern Portugal: chemical compounds with antioxidant properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2012 May 9;60(18):4634-40.

Hibasami H, Komiya T, Achiwa Y, Ohnishi K, Kojima T, Nakanishi K, Akashi K, Hara Y (1998). Induction of apoptosis in human stomach cancer cells by green tea catechins. *Oncol. Rep.*, 5: 527-529.

Hou, Z., Sang, S., You, H., Lee, M. J., Hong, J., Chin, K. V., & Yang, C. S. (2005). Mechanism of action of (-)-epigallocatechin-3-gallate: auto-oxidation dependent inactivation of epidermal growth factor receptor and direct effects on growth inhibition in human esophageal cancer KYSE 150 cells. *Cancer Research*, 65, 8049–8056.

---

Huang, D., Ou, Boxin and Prior, R. (2005) The chemistry behind capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1841-1856.

Imai K, Nakachi K (1995). Cross sectional study of effects of drinking green tea on cardiovascular and liver diseases. *Br. Med. J. Clin. Res.*, 310: 693-696.

Ishigami T, Hara Y (1993). Proc. Intern. Tea Sci. Tea Sci., *Human Health*, Calcutta, India, 125.

Iwashina T (2000). The structure and distribution of the flavonoids in plants. *J. Plant Res.*, 113: 287-299.

Jiménez, P., Cabrero, P., Basterrechea, J.E., Tejero, J., Cordoba-Diaz, D., Cordoba-Diaz, M. and Girbes T. (2014a) Effects of short-term heating on total polyphenols, anthocyanins, antioxidant activity and lectins of different parts of dwarf elder (*Sambucus ebulus* L.). *Plant Foods for Human Nutrition*, 69, 168-174.

Jiménez, P., Cabrero, P., Tejero, J., Gayoso, M.J., Garrosa, M., Córdoba-Díaz, D. Girbes, T (2014b). Concentrated extract of Green tea polyphenols enhances the toxicity of the elderberry lectin nigrin b to mice. *Food and Nutrition Sciences*, 5, 466-471.

Jiménez, P., Córdoba-Díaz, D., Girbés T y cols., (2013) Tesis Doctoral Capacidad antioxidante y antirradicalaria , y nuevas lectinas SELblo y ebulina blo presentes en las inflorescencias del saúco enano (*Sambucus ebulus* L.).

Johnson J.J, Bailey H.H, Mukhtar H. (2010). Green tea polyphenols for prostate cancer chemoprevention: A translational perspective. *Phytomedicine* 17: 3–13.

Ju J, Lu G, Lambert JD, Yang CS (2007). Inhibition of carcinogenesis by tea constituents. *Semin. Cancer Biol.*, 17: 395-402.

Kakuda T, Takihara T, Sakane I, Mortelmans K (1994). Antimicrobialactivity of tea extracts against peridontopathic bacteria. *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, 68: 241-243.

- 
- Kanwar, J., Taskeen, M., Mohammad, I., Huo, C., Chan, T. H., Dou, Q.P. (2012). Recent advances on tea polyphenols. *Frontiers in Bioscience (Elite Edition)*, 4, 111-131.
- Kao PC, P'eng FK (1995). How to reduce the risk factors of osteoporosis in Asia. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi (Taipei)*, 55: 209-213.
- Katiyar SK, Agarwal R, Ekker S (1993). Protection against 12-Otetradecanoylphorbol-13-acetate-caused inflammation in SENCAR mouse ear skin by polyphenolic fraction isolated from green tea. *Carcinog.*, 14: 361-365.
- Katiyar SK, Mukhtar H (1996). Tea in chemoprevention of cancer: epidemiologic and experimental studies. *Int. J. Oncol.*, 8: 221-238.
- Katiyar SK, Rupp CO, Korman NJ, Agarwal R, Mukhtar H (1995). Inhibition of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate and other skin tumorpromoter-caused induction of epidermal interleukin-1 alpha mRNA and protein expression in SENCAR mice by green tea polyphenols. *J. Invest. Dermatol.*, 105: 394-398.
- Kawakami M (1997). Comparison of extraction techniques for characterizing tea aroma and analysis of tea by GC-FTIR-MS. In: Plant volatile analysis Linskens, HF and Jackson JF. (eds) *Springer, Saladruck, Berlin*, pp. 211-229.
- Keller H.A, Gustavo Delucchiy Héctor. F. Romero. (2011). *Camellia sinensis* (Theaceae) en la Argentina: Naturalización y Usos Locales *Bol. Soc. Argent. Bot.* vol.46 no.1-2.
- Kohlmeier L, Weterings KGC, Steck S, Kok FJ (1997). Tea and cancer prevention: An evaluation of the epidemiologic literature. *Nutr. Cancer*, 27: 1-13.
- Kuhlmann MK, Burkhardt G, Horsch E, Wagner M, Kohler H (1998). Inhibition of oxidant-induced lipid peroxidation in cultures renal tubular epithelial cells (LLC-PK1) by quercetin. *Free Radic. Res.*, 29: 451-460.
- Lambert J.D, Elias RJ (2010a). The antioxidant and pro-oxidant activities of green tea polyphenols: A role in cancer prevention. *Arch. Biochem. Biophys.*, 501: 65-72.

---

Lambert, J. D., Kennett, M. J., Sang, S., Reuhl, K. R., Ju, J., Yang, C. S. (2010b). Hepatotoxicity of high oral dose (-)-epigallocatechin-3-gallate in mice. *Food and Chemical Toxicology*, 48, 409–416.

Lee VSY, Chen CR, Lio YW, Tzen JTC, Chang CI (2008). Structural determination and DPHH radical scavenging activity of two acylated tetraglycosides in Oolong Tea. *Chem. Pharm. Bull.*, 56: 851-853.

Liu, R.H. (2004). Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. *J. Nutr.* 134, 3479S–3485S.

Liu ZH, Huang XY, Shi ZP (1990). Relationship between pigments and the colors of black tea and oolong tea (Chines) (Cha Ye Ke Xue). *J. Tea Sci.*, 9: 141-158.

Matsuo N, Yamada K, Yamashita K, Shoji K, Mori M, Sugano M (1996). Inhibitory effect of tea polyphenols on histamine and leukotriene B-4 release from rat peritoneal exudates cells. In vitro. *Cell Dev. Biol.*, 32: 340-344.

Mckay D.L y Blumberg J.B (2002). *J. Am. Coll. Nutr.*, 21 (1):1-13.

Miodini P, Fioravanti L, Di FG, Cappelletti V (1999). The two phytoestrogens genestein and quercetin exert different effects on oestrogen receptor function. *Br. J. Cancer*, 80: 1150-1155.

Mitscher LA, Jung M, Shankel D, Dou JH, Steele L, Pillai S (1997). Chemoprotection: a review of the potential therapeutic antioxidant properties of green tea (*Camellia sinensis*) and certain of its constituents. *Med. Res. Rev.*, 17: 327-365.

Molan AL, De S, Meagher L (2009). Antioxidant activity and polyphenol content of green tea flavan-3-ols and oligomeric proanthocyanidins. *Int. J. Food Sci. Nutr.*, 60: 497-506.

---

Mousavi A, Vafa M, Neyestani T, Khamseh M, Hoseini F. (2013). The effects of green tea consumption on metabolic and anthropometric indices in patients with Type 2 diabetes. *J Res Med Sci.* 18(12):1080-1086.

Nakagawa M (1970). Constituents in tea leaf and their contribution to the taste of green tea liquors. *Jpn. Agric. Res. Q.*, 5: 43-47.

Nakagawa M (1975). Chemical components and taste of green tea. *Jpn. Agr. Res. Q.*, 9: 156-160.

Nie, S.P., Xie, M.Y. (2011). A review on the isolation and structure of tea polysaccharides and their bioactivities. *Food Hydrocolloids*, 25(2), 144–149.

Ohishi, T., Kishimoto, Y., Miura, N., Shiota, G., Kohri, T., Hara, Y., Hasegawa, J. & Isemura, M. (2002). Synergistic effects of (-)-epigallocatechin gallate with sulindac against colon carcinogenesis of rats treated with azoxymethane. *Cancer Letters*, 177, 49-56.

Prior, R.L., Wu, X and Schaich, K (2005) Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 4290-4302.

Rodgers EH, Grant MH (1998). The effect of the flavonoids, quercetin, myricetin, and epicatechin on the growth and enzyme activity of MCF7 human breast cancer cells. *Chem. Biol. Interact.*, 116: 213-228.

Sadzuka Y, Sugiyama T, Hirota S (1998). Modulation of cancer chemotherapy by green tea. *Clin. Cancer Res.*, 4: 153-156.

Sakanaka S, Kim M, Taniguchi M, Yamamoto T (1989). Antibacterial substances in Japanese green tea extract against *Streptococcus* mutants, a carcinogenic bacterium. *Agric. Biol. Chem.*, 53: 2307-2311.

---

Sakanaka S, Kim M, Taniguchi M, Yamamoto T (1990). Inhibitory effects of green tea polyphenols on glucan synthesis and cellular adherence of cariogenic Streptococci. *Agric. Biol. Chem.*, 54: 2925-2929.

Sakanaka S, Kim M (1997). Suppressive effect of uremic toxin formation by tea polyphenols. In T. Yamamoto, L. R. Juneja, D.-C. Chu, and M. Kim, Chemistry and applications of green tea, *Salem: CRC Press LLC*, pp. 75-86.

Sanchez Moreno, C., Larrauri, J.A. and Saura-Calixto, F. (1998) A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 76, 270-276.

Sang, S., Lambert, J.D., Ho, C.T. and Yang, C.S. (2011) The chemistry and biotransformation of tea constituents. *Pharmacology Research*, 64, 87-99.

Schreier P (1988). Analysis of black tea volatiles. In: Linskens H.F. and Jackson J.F. (eds) *Analysis of Nonalcoholic Beverages*, Springer, Saladruck, Berlin, pp. 296-320.

Schönthal, A. H. (2011). Adverse effects of concentrated green tea extracts. *Molecular Nutrition and Food Research*, 55, 874-885.

Serpen, A., Pelvan, E., Alasalvar, C., Burçe, Ataç., Mogol, B.A., Yavuz, H. T., Gökmen, V., Özcan, N., Özçelik, B.. Nutritional and Functional Characteristics of Seven Grades of Black Tea Produced in Turkey. (2012). *J. Agric. Food Chem.* 2012, 60, 7682–7689.

Shengmin Sanga,, Joshua D. Lambertb, Chi-Tang Hoc, Chung S. Yangd (2011). “The chemistry and biotransformation of tea constituents”. *Pharmacological Research* 64 (2011) 87– 99.

Shimizu, M., Adachi, S., Masuda, M., Kozawa, O. & Moriwaki, H. (2011). Cancer chemoprevention with green tea catechins by targeting receptor tyrosine kinases. *Molecular Nutrition and Food Research*, 55, 832-843.

---

Shirakami Y., Shimizu M., Tsurumi H., Hara Y., Tanaka T. & Moriwaki H. (2008). EGCG and Polyphenon 60 attenuate inflammation-related mouse colon carcinogenesis induced by AOM plus DDS. *Molecular Medicine Reports*, 1, 355–361.

Singh R, Akhtar N, Haqqi TM (2010). Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate: Inflammation and arthritis. *Life Sci.*, 86: 907-918.

Singh J, Qazi GN (2006). Immunomodulatory activity of tea. Editor(s): Jain, Narender K.; Siddiqi, Maqsood; Weisburger, John. Protective Effects of Tea on Human Health. Publisher: CAB International, Wallingford, UK CODEN: 69KBM Y *Conference; General Review written in English*, pp. 34-44.

Singleton, V.L; Rossi J.A. (1965). Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* 16 (3)144-158.

Stensvold I, Tverdal A, Solvoll K, Foss OP (1992). Tea consumption: relationship to cholesterol, blood pressure, and coronary and total mortality. *Prev. Med.*, 21: 546-553.

Takeo T (1996). The relation between clonal characteristic and tea aroma. *FFI J.*, 168: 35-45.

Thelle DS (1995). Coffee, tea and coronary heart disease. *Curr. Opin. Lipidol.*, 6: 25-27.

Tijburg LBM, Wiseman SA, Meijer GW, Weststrate JA (1997). Effects of green tea, black tea and dietary lipophilic antioxidants on LDL oxidizability and atherosclerosis in hypercholesterolaemic rabbits. *Atheroscler.*, 135: 37–48.

Toda M, Okubo S, Hiyoshi R, Tadakatsu S (1989). The bactericidal activity of tea and coffee. *Lett. Appl. Microbiol.*, 8: 123-125.

Toda M, Okubo S, Ikigai H, Suzuki T, Suzuki Y, Shimamura T (1991). The protective activity of tea against infection by *Vibrio cholerae*. *J. Appl. Bacteriol.*, 70: 109-112.

UK Tea and Infusions Association (Asociación del Té y las infusiones del Reino Unido). (2014). <http://www.tea.co.uk/>.

---

Wang H, Xu J, Deng F, Hu Z (2007). Natural extract of green tea for inhibiting hepatitis B virus and its primary active ingredient. *Faming Zhuanli Shenqing Gongkai Shuomingshu*, CN 101028382, 9pp.

Venkata Sai Prakash Chaturvedula y Indra Prakash. (2011). The aroma, taste, color and bioactive constituents of tea. *Journal of Medicinal Plants Research*. Vol. 5(11), pp. 2110-2124.

Wenyan Han (2010). Chinese Bureau of Statistics. *Tea Research Institute Chinese Ministry of Agricultural Sciences*.

Weisburger JH (1996). Tea antioxidants and health. In: Cadenas E, Packer L, eds. *Handbook of antioxidants*. New York: Marcel Dekker, pp. 469–486.

Weisburger JH (2000). Tea. In: The Cambridge World History of Food. Eds: K. Kiple and K. C. Orneals). *Cambridge Univ. Press*. Cambridge, pp. 712-720.

Weisburger, J., Hara, Y., Dolan, L., Luo F., Pittman, B. and Zang E. (1996) Tea polyphenols as inhibitors of mutagenicity of major classes of carcinogens. *Mutation Research*, 371, 57-63).

Yamanishi T (1995). Flavor of tea. *Food Rev. Int.*, 11: 477-525.

Yamanishi T (1996). Tea aroma. *FFIJ*, 168: 23-34.

Yang S, Bai G<sup>1</sup>, Chen L, Shen Q, Diao X, Zhao G. (2014). The interaction of phenolic acids with Fe(III) in the presence of citrate as studied by isothermal titration calorimetry. *Food Chemistry*.157:302–309.

Yang Z, Xu Y, Jie G, He P, Tu Y (2007). Study on the antioxidant activity of tea flowers (*Camellia sinensis*). *Asia Pac. J. Clin. Nutr.*, 16(Suppl. 1): 148-152.

Yang CS, Wang X (2010). Green Tea and Cancer Prevention. *Nutr.Cancer*, 62: 931-937.

---

Yang, C. S., Wang, X., Lu, G. & Picinich, S. C. (2009). Cancer prevention by tea: animal studies, molecular mechanisms and human relevance. *Nature Reviews Cancer*, 9, 429–439.

Yokogoshi H, Kato Y, Sagesaka MY, Takihara MT, Kakuda T, Takeuchi N (1995). Reduction effect of theanine on blood pressure and brain 5-hydroxyindoles in spontaneously hypertensive rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 59: 615-618.

Yokozawa T, Chung H, Young H, Li Q, Oura H (1996). Effectiveness of green tea tannin on rats with chronic renal failure. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 60: 1000-1005.

Yokozawa T, Dong E, Chung HY, Oura H, Nakagawa H (1997). Inhibitory effect of green tea on injury to a cultured renal epithelium cell line, LLC-PK. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 61: 204-206.

Yokozawa T, Dong E, Nakagawa T, Kashiwagi H, Nakagawa H, Takeuchi S, Chung HY (1998). In vitro and in vivo studies on the radical-scavenging activity of tea. *J. Agric. Food Chem.*, 46: 2143-2150.

Zaveri NT (2006). Green tea and its polyphenolic catechins: Medicinal uses in cancer and noncancer applications. *Life Sci.*, 78: 2073-2080.

Zeyuan D, Bingying T, Xiaolin L, Jinming H, Yifeng C (1998). Effect of green tea and black tea on the blood glucose, the blood triglycerides, and antioxidation in aged rats. *J. Agric. Food Chem.*, 46: 875-878.

Zhen Y. (2002). Tea-Bioactivity and Therapeutic Potential (ed). *Taylor and Francis*, NY, p. 58.