

## Cuantificación de flavonoides totales y taninos presentes en el extracto acuoso de hojas de *Thea sinensis* L. y su capacidad antioxidante

*Quantification of total flavonoids and tannins present in the aqueous extract of leaves of *Thea sinensis* L. and its antioxidant capacity.*

VENEGAS CASANOVA, Edmundo Arturo<sup>1</sup>

### RESUMEN

Se estudió la Cuantificación de flavonoides totales y taninos presentes en el extracto acuoso de hojas de *Thea sinensis* L. y su capacidad antioxidante, se preparó un extracto acuoso, el cual fue posteriormente liofilizado. Así mismo se purificó y cuantificó los flavonoides totales obtenidos del mediante el método descrito por Kostennikova Z. adaptado por la Cátedra de Farmacognosia y Farmacobotánica, a 258 nm., encontrándose porcentajes expresados, para el decocto de té verde 1,6 % y para el infuso del mismo 1,3 %; así mismo tenemos que para el decocto de té negro fue de 1,21 % y para el infuso del mismo fue de 1,12 %, siendo la absorbancia promedio para el patrón como quercetina 3,87. La cuantificación de taninos se realizó por espectrofotometría mediante el método Folin adaptado, los porcentajes de taninos totales presentes en el extracto liofilizado del decocto e infuso de hojas de *Thea sinensis* L., siendo para el decocto de té verde 15,29 % y para el infuso del mismo 0,23 %; así mismo tenemos que para el decocto de té negro fue de 21,68 % y para el infuso del mismo fue de 2,61 %, siendo la absorbancia promedio para el patrón ácido tánico 0,1063. Posteriormente se determinó la capacidad antioxidante in vitro de los flavonoides totales obtenidos de las hojas de *Thea sinensis* L. expresado en porcentaje de captura de radicales, mediante el método descrito por Brand-Williams et al; por cada concentración y tiempo (1, 15, 30, 45 minutos) se determinó los porcentajes de captura del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH\*). Donde se observó que mientras mayor es la concentración, y el tiempo, mayor es este porcentaje.

**Palabras clave:** *Thea sinensis* L., flavonoides, taninos, extracto acuoso, capacidad antioxidante.

### ABSTRACT

We studied the quantification of total flavonoids and tannins present in the aqueous extract of leaves of *Thea sinensis* L. and its antioxidant capacity, he prepared an aqueous extract, which was then lyophilized. Likewise purified and quantified the total flavonoids obtained by the method described by Z. Kostennikova adapted by the department of pharmacognosy and pharmacobotany, at 258 nm., finding percentages expressed to the decoction of green tea for 1.6% and 1.3% infused the same, likewise we have for black tea decoction was of 1.21% and for the same infused was 1.12%, with the average absorbance pattern as quercetin 3.87. Quantification of tannins was performed spectrophotometrically by the Folin adapted in the department of pharmacognosy, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, the percentages of total tannins in the extract and infused lyophilized decoction of leaves *Thea sinensis* L., being for the decoction of green tea for 15.29% and 0.23% of that infused, likewise we have for black tea decoction was 21.68% and for the same was infused of 2.61%, with the average absorbance for tannic acid pattern 0.1063. Subsequently we determined the antioxidant capacity in vitro of total flavonoids from leaves of *Thea sinensis* L. expressed as a percentage of radical scavenging by the method described by Brand-Williams et al, for each concentration and time (1, 15, 30, 45 minutes) was determined by the percentage of capture of the free radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH \*). Where it was found that the higher the concentration, and time, the greater this percentage.

**Key words:** *Thea sinensis* L., flavonoids, tannins, aqueous extract antioxidant capacity.

<sup>1</sup> Dr. en Farmacia clínica, Universidad Nacional de Trujillo. edmund0373@hotmail.com

## INTRODUCCIÓN

Las plantas medicinales han constituido desde tiempos remotos un recurso de gran importancia, para cubrir las necesidades terapéuticas. Su uso como agentes de la salud es ampliamente conocido en múltiples culturas del mundo y ha sido transmitido a través de generaciones. Este saber tradicional se ha ido perfeccionando a lo largo del tiempo, por el rigor científico de ensayos químicos, farmacológicos, toxicológicos y clínicos; para explicar en forma racional el uso terapéutico de una planta y que permite además la vigencia de su empleo. Sin embargo, a pesar de los avances, éste saber no ha perdido su importancia, por el contrario, el desarrollo de los medicamentos modernos ha sido resultado de formas cada vez más complejas de aprovecharlas y su producción sigue dependiendo en gran parte de su uso, como materia prima, la identificación del valor curativo de las plantas ha provenido generalmente de la información proporcionada por el uso de la medicina tradicional, que igualmente ha sido la fuente para la investigación fitoquímica.<sup>1, 2, 3</sup> El estudio fitoquímico de las plantas usadas en medicina popular es importante ya que mediante el, es posible la identificación de los metabolitos responsables de su acción terapéutica y con ella una base científica para su uso apropiado; además estos trabajos de investigación contribuyen a un mejor conocimiento de las plantas medicinales, las cuales pueden ser extendidos a estudios farmacológicos, que justifiquen su acción biológica.<sup>4, 5</sup> Para obtener las sustancias activas de las plantas medicinales, se recurre frecuentemente a la técnica de la extracción, las más usadas son: la infusión en la que se trabaja con un disolvente (agua) a temperatura próxima a la ebullición en la que se introduce el *Thea sinensis* L. con el fin de extraer los fito constituyentes y a continuación se deja enfriar el conjunto hasta temperatura ambiente; y la decocción la que se introduce el **Thea sinensis L.** con el disolvente (agua) y el conjunto se lleva a ebullición durante 15 – 30 minutos. Una vez enfriado, se filtra y se exprime el residuo. El tiempo de decocción depende de las características de la planta; es menor para hojas, flores y mayor para corteza y semillas.<sup>7</sup> Dentro de esta línea de investigación, se vienen estudiando diferentes especies vegetales pertenecientes a la familia Teáceas, que es reconocida por sus propiedades, fundamentalmente en medicina popular, siendo el té reconocido por la infusión estimulante que se prepara con sus hojas.<sup>8</sup> Las variedades del té dependen del procedimiento que se le da a las hojas durante la fermentación una vez recolectada, y todas las variedades, vienen de la misma planta. Existen cuatro tipos principales de té (blanco, verde, rojo y negro), y son el resultado de los diferentes métodos de elaboración de la hoja.<sup>9, 10</sup> El té blanco, obtenido por recolección, se deja marchitar para que se evapore la humedad natural y a continuación se desecan. Su principal característica es la alta capacidad antioxidante.<sup>10</sup> Té rojo, se obtiene por recolección de las hojas del árbol *Camelia Sinensis*, a las cuales se le aplica un breve secado al aire libre, para después pasar a un

secado más prolongado en una habitación cerrada, extendidos los brotes tiernos del arbusto. Tiene un sabor bastante suave y con mayores propiedades aromáticas que el resto debido a la fermentación de los polifenoles para dar numerosos compuestos aromáticos. Algunas de sus propiedades: antioxidante, disminuyen el colesterol LDL y triglicéridos en sangre.<sup>10</sup> El té verde ha permanecido como bebida de preferencia en los países asiáticos (China, Japón e India), donde se ha utilizado en medicina tradicional.<sup>8</sup> El té negro y el té verde se obtienen de la misma especie de árbol, la diferencia radica en el método de preparación. En el caso del té negro las hojas se secan, se dejan fermentar y se vuelven a secar. En el té verde solo se seca, sin dejarlo fermentar. Las hojas no fermentadas al sol contienen mayor número de polifenoles, ya que las enzimas que contribuyen a su oxidación quedan inactivas.<sup>11</sup> La importancia que se le atribuye al té verde en cuanto a sus propiedades medicinales frente al resto de tés, radica en el proceso de elaboración. Para preparar el té verde inmediatamente después de recolectar las hojas, éstas se someten a un proceso de secado por acción del aire caliente para detener el proceso de oxidación de las enzimas. Este proceso casi no altera su composición química, ya que de esta manera las hojas del té verde son estabilizadas evitando su oxidación enzimática, por lo que conservan su contenido en catequinas.<sup>11</sup> Sin embargo, el té negro se prepara apilando las hojas frescas en habitaciones ventiladas, hasta que éstas empiezan a fermentar, luego se secan rápidamente con calor artificial. En este proceso, los fenómenos más importantes que se producen son la oxidación y la polimerización de los catecoles, formándose teaflavinas, que son compuestos colorantes que confieren a las hojas del té negro su coloración característica de marrón-rojizo a negro (frente al color verde-amarillento a verde oscuro de las hojas del té verde). También debido a este proceso de elaboración, la infusión de té negro resulta muy aromática, con sabor astringente, mientras que la de té verde es ligeramente aromática y de sabor algo amargo y ligeramente astringente.<sup>11</sup> Por otro lado, la presencia de teaflavinas y sus galatos confiere al té negro una actividad antibacteriana respecto al té verde, sobre todo frente a determinadas bacterias intestinales.<sup>12</sup> **Thea sinensis L.** es una de las fuentes principales de Quercetina, principalmente en Japón y los Países Bajos, como lo es el vino tinto en Italia y las cebollas en los Estados Unidos y Grecia. Su ingesta promedio de flavonoles y flavonas se sitúa entre los 20 y 26 mg/día. Excede, por tanto, a la de otros antioxidantes en la dieta, como el beta-caroteno (2-3 mg/día) y vitamina E (7-10 mg/día) y representa a un tercio de aporte de vitamina C (70-100 mg/día).<sup>13</sup> El consumo de té es muy prevalente en todo el mundo, y se ha postulado que tienen una variedad de beneficios para la salud, principalmente por estar relacionado con la complejidad de sus polifenoles antioxidantes, como theaflavin y thearubigin en té negro.<sup>14</sup> Los principales principios activos a los que el té verde debe su actividad son: bases xánticas y

polifenoles (flavonoides, cateoles, taninos catéquicos y ácidos fenólicos). Los flavonoides más representativos son el kempferol, la quercetina y la miricetina.<sup>15</sup> Los flavonoides constituyen un amplio y diverso grupo de metabolitos secundarios de plantas, se encuentran en abundancia en las uvas, manzanas, cebollas, cerezas, repollos; además del *Thea sinensis* L. (té verde). Tienen propiedades antiinflamatorias, antimicrobianas, antitrombóticas, antialérgicas, antitumorales, anticancerígenas y antioxidantes. De esta última, principalmente, radica su función en el sistema nervioso, pues se ha visto relación de protección en enfermedades neurodegenerativas, asimismo, son utilizados para el tratamiento de la fragilidad capilar, en diabetes, en afecciones cardíacas, por lo que merecen ser incorporados al grupo de los nutrientes esenciales.<sup>12,15,16</sup> Los flavonoides, que poseen un gran número de grupos hidroxilos formando glicósidos, son polares, por lo que son ligeramente solubles en disolventes polares, como el metanol, etanol, acetato de etilo o agua.<sup>17</sup> Los taninos constituyen un grupo de sustancias ampliamente distribuidas en el reino vegetal, se presentan como mezclas de polifenoles, muy difíciles de separar, con el agua forman soluciones coloidales de reacción ácida y sabor astringente. De acuerdo a su comportamiento frente a los agentes hidrolíticos (principalmente ácidos minerales diluidos), los podemos dividir en: taninos hidrolizables y taninos condensados.<sup>18</sup> Los taninos hidrolizables, constituidos generalmente por una molécula de un monosacárido (glucosa en la mayoría de los casos) a la cual se unen varias unidades de ácidos polifenólicos. El ácido polifenólico más simple es el ácido gálico, un trifenol que contiene además un grupo carboxilo.<sup>18</sup> Los taninos condensados, resultan de la condensación (polimerización) de unidades de flavanoles, tales como la catequina y la leucocianidina, quienes cumplirían el papel de precursores. Por tratamiento con reactivos hidrolíticos, los taninos condensados no liberan sus unidades estructurales, sino que por el contrario tienden a polimerizarse aún más (especialmente en solución ácida), originando productos rojos, amorfos e insolubles, conocidos como flobafenos o rojos de tanino.<sup>18</sup> La cuantificación de flavonoides en productos naturales usualmente se hace mediante cromatografía de capa fina, cromatografía de gases, cromatografía líquida de alta eficiencia y espectrofotometría. Los métodos por cromatografía de gases y de alta eficiencia aportan información definitiva en la caracterización de las muestras pero presentan limitaciones importantes debido a los costos del equipamiento. En cambio los métodos espectrofotométricos permiten cuantificar flavonoides con estructuras similares y son convenientes y apropiadas en las determinaciones rutinarias.<sup>19</sup> Los polifenoles confieren al *Thea sinensis* L. (té verde) propiedades hipolipemiantes, con lo que su consumo mejora el perfil lipídico; existen ensayos epidemiológicos en los que se ha comprobado que en poblaciones consumidoras de té verde existe una menor incidencia de accidentes cardiovasculares

ateroescleróticos.<sup>12</sup> En un meta-análisis, sobre el consumo a largo plazo de té asociado con una disminución de la prevalencia de diabetes mellitus en población anciana de las islas del mediterráneo descrito por Demosthenes B y Panagiotakos<sup>19</sup>, se reportó que el consumo moderado de té (1- 2 tazas/día) se asoció con un 70% inferior a las probabilidades de tener la diabetes, independientemente de la edad, el sexo, el peso, el consumo de tabaco, actividad física, hábitos alimentarios y otras características clínicas. Asimismo se encontraron un 11% de menor incidencia de infarto de miocardio asociado con la ingesta de tres tazas de té por día en comparación con la abstención de *Thea sinensis* L.<sup>20</sup> Los procesos metabólicos normales de todos los organismos que utilizan oxígeno pueden producir especies reactivas del oxígeno (EROS), se estima que cerca del 2 al 5% del oxígeno total consumido se convierte en EROS ( $O_2^-$ ,  $OH^\cdot$ ,  $H_2O_2$ , entre otros). Quizá la fuente endógena más importante generadora de EROS es la cadena respiratoria mitocondrial, aunque también pueden incluirse algunas reacciones del metabolismo de los prostanoïdes, la autooxidación de las catecolaminas, la actividad de la xantina oxidasa y la activación de fagocitos y células endoteliales.<sup>20</sup> En situación patológica se incrementan sustancialmente estas especies químicas, provocando una alteración orgánica conocida como estrés oxidativo caracterizado por el daño a biomoléculas, viéndose implicadas en la génesis o exacerbación de numerosos procesos en el aparato cardiovascular (aterosclerosis, cardiopatía alcohólica), sistema neurológico (enfermedad de Parkinson, Alzheimer, traumatismos craneales), aparato ocular (catarata, fibroplasia), aparato respiratorio (cáncer de pulmón), riñón (nefrotoxicidad por metales), artritis reumatoidea.<sup>27,29</sup> Si bien los organismos vivos soportan multitudinarios factores endógenos y exógenos de estrés oxidativo, también poseen numerosos sistemas de defensa antioxidantes regulables, enzimáticos (superóxido dismutasa, la catalasa, la GSH-peroxidasa, las quinonas reductasas y hemoxigenasa) y no enzimáticos (Se, Zn, vitaminas C y E y carotenoides) que conforman la defensa antioxidante frente a las EROS, pero que no siempre resultan ser una barrera efectiva.<sup>22,28</sup> Una alternativa válida son los fitoconstituyentes, quienes contienen amplia variedad de compuestos con capacidad de atrapar EROS: vitaminas, carotenoides, compuestos nitrogenados (alcaloides, aminos, betalainas) e incluso ciertos terpenoides; quizá los metabolitos más reconocidos por su actividad antioxidante son los de naturaleza fenólica: ácidos fenólicos, flavonoides, quinonas, cumarinas, lignanos, estilbenos y taninos.<sup>27,28</sup> En países europeos se estima que el consumo promedio de fenoles es 23 mg/día y el principal flavonoïde consumido es la quercetina, siendo el té su principal fuente. He allí su interés creciente por los flavonoides, debido a su efecto contra algunas enfermedades como ciertos cánceres y desordenes cardíacos derivados de su poderosa actividad

antioxidante.<sup>17</sup> Debido al interés actual del uso dietético y sus diferentes beneficios terapéuticos, *Thea sinensis* L., los cuales brindan sus constituyentes fitoquímicos importantes para la salud, se plantea el siguiente problema: ¿Cuál es la concentración de flavonoides totales y taninos presentes en el extracto acuoso de hojas de *Thea sinensis* L. y su capacidad antioxidante?

Planteándose el objetivo de: Determinar la concentración mediante espectrofotometría ultravioleta-visible de flavonoides totales y taninos presentes en el decocto e infuso de hojas de *Thea sinensis* L. y determinar la capacidad antioxidante in vitro de los flavonoides totales y taninos presentes en el decocto e infuso de hojas de *Thea sinensis* L.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### 1. MATERIAL :

Material vegetal: Se utilizaron 20 cajas de té filtrante que contiene hojas procesadas de *Thea sinensis* L. (Té Verde): ® China Green tea y 20 cajas de té filtrante que contiene hojas procesadas de *Thea sinensis* L. (Té Negro): ® Mc Collins. Material de laboratorio De uso común en el Laboratorio.

### 2. MÉTODO:

**2.1. Adquisición del producto:** Las hojas de ***Thea sinensis* L.** (té verde y té negro), se adquirieron en el Supermercado Metro de Trujillo.

Té Verde ® China Green tea, Lote N° GT-701

Registro Sanitario Q3305-277 N/NAARSA

Té Negro ® Mc Collins, Lote N° 546-JPG

Registro Sanitario Q2176-277 N/NAARSA

**2.2. Muestreo:** Se realizó tomando al azar como muestra 20 paquetes de ***Thea sinensis* L.** (té verde y té negro) a analizar.<sup>21</sup>

### 2.3. Obtención del extracto acuoso:

a. Por el método de de cocción<sup>21</sup>

Se pesaron 2 g de té verde (peso promedio de un filtrante a determinar) el cual se colocó en contacto con 250 mL de agua en un vaso de precipitación, se llevó a ebullición por espacio de 10 minutos, obteniéndose el extracto acuoso (decocto) que contenían los metabolitos solubles en éste, como los flavonoides totales, taninos entre otros. Inmediatamente liofilizo. El mismo procedimiento se realizó con el té negro.

b. Por el método de Infusión<sup>21</sup>

Se pesaron 2g de té verde (peso promedio de un filtrante a determinar), se colocó en un vaso de precipitación y posteriormente se vertió la cantidad suficiente de agua hirviendo sobre la droga y se tapó por 5 minutos, obteniéndose el extracto acuoso (infuso) que contenían los metabolitos solubles en éste como los flavonoides totales, taninos entre otros. Inmediatamente se liofilizo. El mismo procedimiento se llevó a cabo con el té negro

### 2.4. Obtención del extracto liofilizado del decocto e infuso del *Thea sinensis* L. verde y negro:

El proceso de liofilización se realizó en tres etapas:

1. Precongelamiento, que preparó los extractos para la sublimación.

2. Secado primario, el hielo se sublimó.

3. Secado secundario, en el cual la humedad residual ligada al material sólido fue sublimado, dejando los extractos secos, que fueron

protegidos de la luz y conservados en bolsas de polietileno herméticas, para evitar su humectación.

### 2.5. Método para la cuantificación de flavonoides totales y taninos mediante espectrofotometría UV- visible.

2.5.1. Descripción del método espectrofotométrico para la cuantificación de flavonoides totales.<sup>19, 22, 23</sup> La cuantificación de los flavonoides totales se realizó por el método descrito por Kostennikova Z. adaptado en la cátedra de Farmacognosia de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la U.N.T., utilizando espectrofotómetro UV-visible Hewlett Packard 8452 A expresándose como mg de quercetina/g de *Thea sinensis* L.

a. Cuantificación de flavonoides totales presentes en el liofilizado del decocto e infuso de *Thea sinensis* L. expresados en quercetina.<sup>19, 23</sup>

Del liofilizado se pesó un equivalente a 0.5 g de la droga y se llevó a reflujo durante 2 h con 40 mL de solución de ácido sulfúrico al 10 % p/v y 40 mL de etanol al 50 % v/v, luego se enfrió y se filtró al vacío. El residuo se lavó con 60 mL de etanol al 50 % v/v, para desecharlo finalmente; el filtrado se concentró en baño maría hasta la mitad del volumen inicial, se enfrió sobre baño de hielo durante 1 hora y luego se filtró, lavando el precipitado formado con porciones de 20 mL de agua bidestilada fría (10-15 °C). Se eliminó el filtrado y los lavados, y el residuo tanto del filtro como del recipiente, se disolvió con 70 mL de etanol al 96° Gay-Lussac (GL) calentando previamente a 50 °C; la solución se pasó a una fiola de 100 mL y se aforó con etanol de 96° GL. Posteriormente, a la solución anteriormente preparada, se realizó la lectura de las absorbancias a 258 nm en el Espectrofotómetro UV-visible Hewlett Packard 8452 A. Este mismo proceso se realizó por 6 veces tanto para el decocto e infuso del ***Thea sinensis* L.** té negro y té verde.

b. Preparación de la solución patrón de Quercetina.<sup>19</sup> El blanco consistió en una solución de etanol al 96° GL. Como patrón se empleó 0,08 g de quercetina, los cuales se disolvieron con etanol al 96 ° GL hasta completar un volumen de 100 mL; lo cual representó nuestra solución madre, de esta solución se midió 1 mL y se aforó a 100 mL con etanol al 96° GL. Posteriormente se realizó la lectura a una absorbancia de 258 nm. en el Espectrofotómetro UV-visible Hewlett

Packard 8452 A. La expresión empleada para el cálculo fue la siguiente:

$$X = \frac{A_m \times P_R \times 5}{A_R} \times 100$$

Donde:

X: Contenido de flavonoides totales expresados como quercetina (%).

A<sub>m</sub>: Absorbancia de la solución muestra (nm)

P<sub>R</sub>: Peso de la sustancia de referencia (g)

A<sub>R</sub>: Absorbancia de la solución de referencia (nm)

Expresión matemática extraída del método espectrofotométrico descrito por Kostennikova Z.<sup>19</sup>

2.5.2. Descripción del método espectrofotométrico para la cuantificación de taninos<sup>19,22,23</sup>.

La cuantificación de taninos se realizó por espectrofotometría mediante el método Folin (Tungsto-molibdico-fosforico) adaptado en la cátedra de Farmacognosia de la Facultad de Farmacia y Bioquímica utilizando espectrofotometría UV-visible.

a. Cuantificación de taninos presentes en el liofilizado del la decocto e infuso del **Thea sinensis L.** expresados ácido tánico.<sup>19,22</sup>

Del liofilizado se pesó un equivalente a 5g de la droga y se trasvasó a una fiola de 250 mL y se enrasó con agua destilada, luego se llevó a baño maría por una hora, se filtró y se aforó a 250 mL con etanol 50% v/v. De la solución anterior se midió 3 mL, se llevó a una fiola de 50 mL y se diluyó con agua destilada hasta enrase. Finalmente se lleva 1 ml de la solución anterior una fiola de 25 mL y se le añadió 4 mL de agua bidestilada, aforándose luego con los reactivos de desarrollo de color.

## 2.6. Determinación de la capacidad antioxidante in vitro de los flavonoides totales y taninos presentes en el decocto e infuso de hojas de **Thea sinensis L.**<sup>20</sup>

Fundamento del método: El fundamento del método descrito por Brand Williams et al, consiste en que el radical libre estable 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH\*) tiene un electrón desapareado y la solución es de color azul-violeta, virando hacia amarillo pálido por reacción con una sustancia capturadora de radicales libres; la absorbancia es medida espectrofotométricamente a 517 nm. La diferencia de absorbancias, permite obtener el porcentaje de captación de radicales libres.

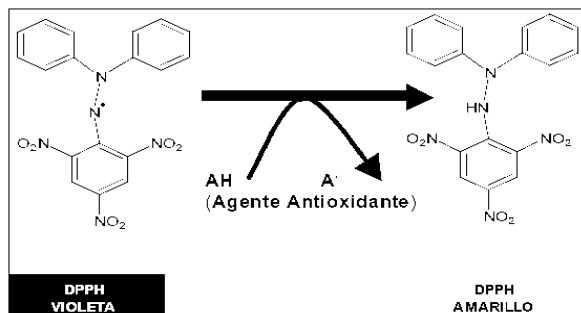


Figura 1: Método del 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH\*)

## Preparación de la solución etanólica de Flavonoides Totales y taninos presentes en el decocto e infuso de hojas de **Thea sinensis L.**

En ambos casos, tanto para los cristales de flavonoides y taninos presentes en el decocto e infuso de hojas de **Thea sinensis L.**; se pesaron 8.4 mg de los cristales purificados equivalentes a 0.5 % de flavonoides totales del decocto de té verde, así como 5,6 mg de los cristales purificados equivalentes a 0.5 % de flavonoides totales del infuso de té negro, de la misma manera se pesaron 443,6 mg de los cristales purificados equivalentes a 2 % de taninos totales del decocto de té negro y por último 4,6 mg de los cristales purificados equivalentes a 2 % de taninos totales del infuso de té verde, respectivamente, luego aforamos a 100 mL. con etanol de 96 °GL. De esta solución se toman volúmenes de 1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9 y 10 mL. y aforar a 10 mL. con etanol de 96 °GL.

## Preparación del Reactivo: Solución 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH\*)

Preparar una solución de DPPH\* con etanol de 96° GL a una concentración de DPPH 0.1 mM (0.03943 mg/mL). Preparación de la recta de calibración para la solución de radical DPPH. Procedimiento:

-De la solución de DPPH 0.1 mM se midieron volúmenes de 2; 4; 6; 8 y 10 mL.; y se trasvasaron a fiolas de 10 mL. aforándolas con etanol de 96° GL., para obtener concentraciones de 0,02; 0,04; 0,06; 0,08 y 0.1 mM respectivamente. (Cuadro 1)

Cuadro 1: Concentración de los standards de DPPH para obtener la recta de calibración

Concentración de solución de DPPH*	Volumen de solución de DPPH 0,1 mM	Volumen de etanol 96 °GL csp
0,02 mM	2 mL	10 mL
0,04 mM	4 mL	10 mL
0,06 mM	6 mL	10 mL
0,08 mM	8 mL	10 mL
0,1 mM	10 mL	10 mL

-Se realizaron un barrido espectrofotométrico con la solución DPPH\* 0.1 mM para encontrar la longitud de onda de máxima absorbancia, el cual fue de 519 nm.

-Se realizó tres lecturas de absorbancias en el espectrofotómetro THERMO modelo GENESYS 10 UV a 519 nm, de las cuales se obtiene un promedio, utilizándose un blanco que consiste en etanol de 96° GL.

## Determinación de los porcentajes de captura del radical DPPH\*

Procedimiento

-En un set de 10 fiolas, se adiciona en cada uno de ellos 10 mL de la solución de DPPH 0,1 mM.

-Se tomaron alícuotas de 1 mL. de cada concentración de solución etanólica de flavonoides totales y taninos presentes y se enfrenta a la solución de DPPH\* 0,1 Mm.

-Se realizaron tres lecturas de cada sistema a una absorbancia de 519 nm, al minuto 1', 15', 30', y 45'.

Se preparó un control (que consistió en 10 mL de solución de DPPH\* 0,1 mM) y se realizó su lectura a 519 nm en el espectrofotómetro.

-Como blanco se utilizó etanol de 96°GL.

-Posteriormente, se utilizan los valores de absorbancia de los tubos problema y la absorbancia del tubo control, para calcular el porcentaje de radicales DPPH\* que fueron capturados.

-Se calcula el porcentaje de radicales DPPH\* capturados, con la siguiente fórmula:

**% de captura de radicales DPPH\* =**

$$\frac{\text{Abs. control m.} - \text{Abs. muestra}}{\text{Abs. control m.}} \times 100$$

Donde:

Abs. control m: Absorbancia control de la muestra

Abs. m: Absorbancia de la muestra

### 2.7. Evaluación estadística

Los resultados promedios de la cuantificación de taninos y flavonoides encontrados en cada muestra de té fueron sujetos a parámetros descriptivos como la media aritmética, desviación estándar, coeficiente de variación, así como a un ensayo T-student, con un nivel de probabilidad del 95 % ( $\alpha = 0.05$ ).<sup>24, 25, 26</sup>

## RESULTADOS

**Tabla 1: Porcentaje de flavonoides totales presentes en el extracto liofilizado del decocto e infuso de hojas de Thea sinensis L. "té" verde - negro.**

MUESTRAS		Absorbancias Promedio Patrón Quercetina	Absorbancias promedio de la solución muestra a 258 nm	Porcentaje de flavonoides totales
TÉ	Infuso	3.87	1.2704	1.3%
VERDE	Decocto	3.87	1.5574	1.6%
TÉ	Infuso	3.87	1.0847	1.12 %
NEGRO	Decocto	3.87	1.1677	1.21 %

Utilizando un nivel de significancia del 95% ( $P < 0.05$ ), se determinó que existe diferencia significativa

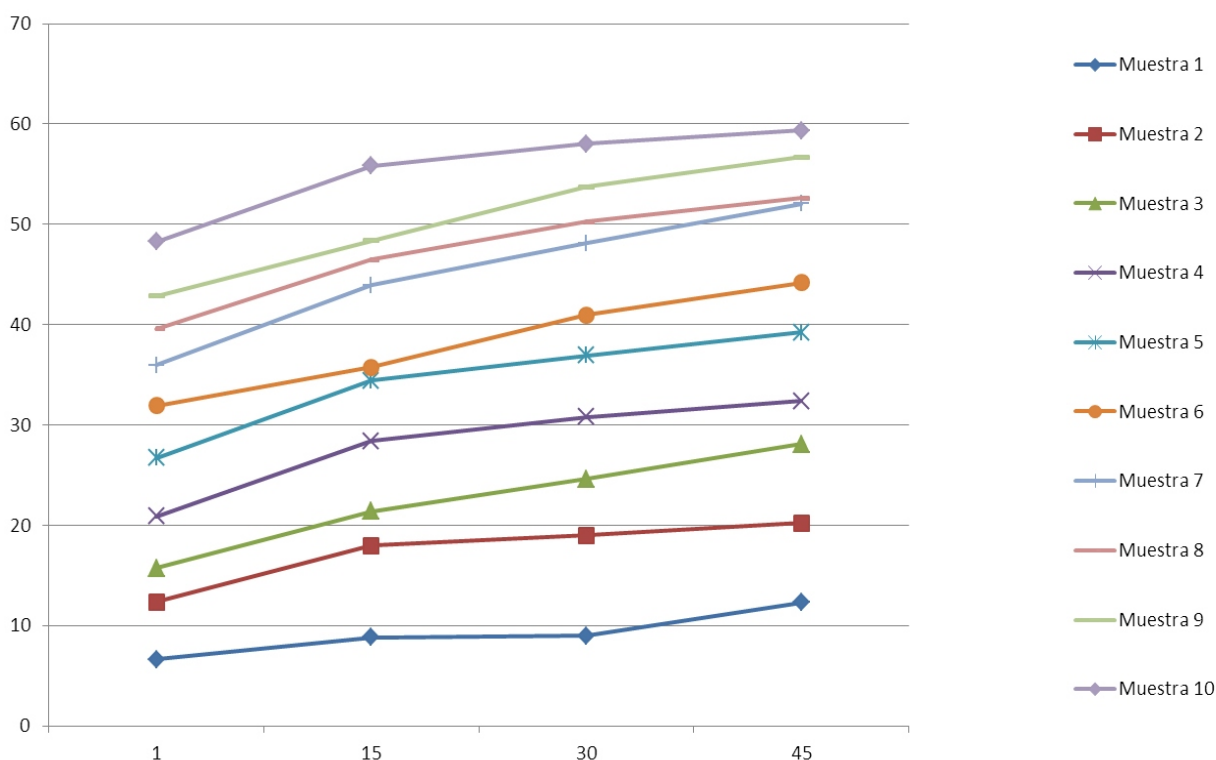
**Tabla 2: Porcentaje de taninos totales presentes en el extracto liofilizado del decocto e infuso de hojas de Thea sinensis L. "té" verde - negro.**

MUESTRAS		Absorbancias Promedio Patrón ácido tánico	Absorbancias promedio de la solución muestra a 700 nm	Contenido promedio de taninos totales expresados como ácido tánico (%)
TE	Infuso	0.1063	0.4453 E-2	0.23%
VERDE	Decocto	0.1063	0.2944	15.29%
TE	Infuso	0.1063	4.9701 E-2	2.61 %
NEGRO	Decocto	0.1063	0.4128	21.68 %

Utilizando un nivel de significancia del 95% ( $P < 0.05$ ), se determinó que existe diferencia significativa. Leyenda: E-2:  $10^{-2}$

**Tabla 3: Porcentajes de captura del radical DPPH\* de la solución etanólica de flavonoides totales de las hojas de Thea sinensis L. (té verde- decocto)**

Muestra	mL. de solución de DPPH 0,1 mM	mL. de Solución etanólica de flavonoides totales	Concentración de la solución etanólica de flavonoides totales (ug/mL)	% de captura Minuto 1	% de captura Minuto 15	% de captura Minuto 30	% de captura Minuto 45
1	10	1	0.008	6.36	8.48	8.79	12.82
2	10	1	0.016	12.73	17.79	19.20	20.24
3	10	1	0.024	15.27	21.83	24.36	28.13
4	10	1	0.032	20.78	28.83	30.18	32.63
5	10	1	0.040	26.37	34.04	36.19	39.32
6	10	1	0.048	31.09	35.57	40.69	44.12
7	10	1	0.056	35.49	43.19	48.41	52.40
8	10	1	0.064	39.16	46.05	50.82	52.46
9	10	1	0.072	42.68	48.73	53.67	56.86
10	10	1	0.080	48.92	55.28	58.30	59.73



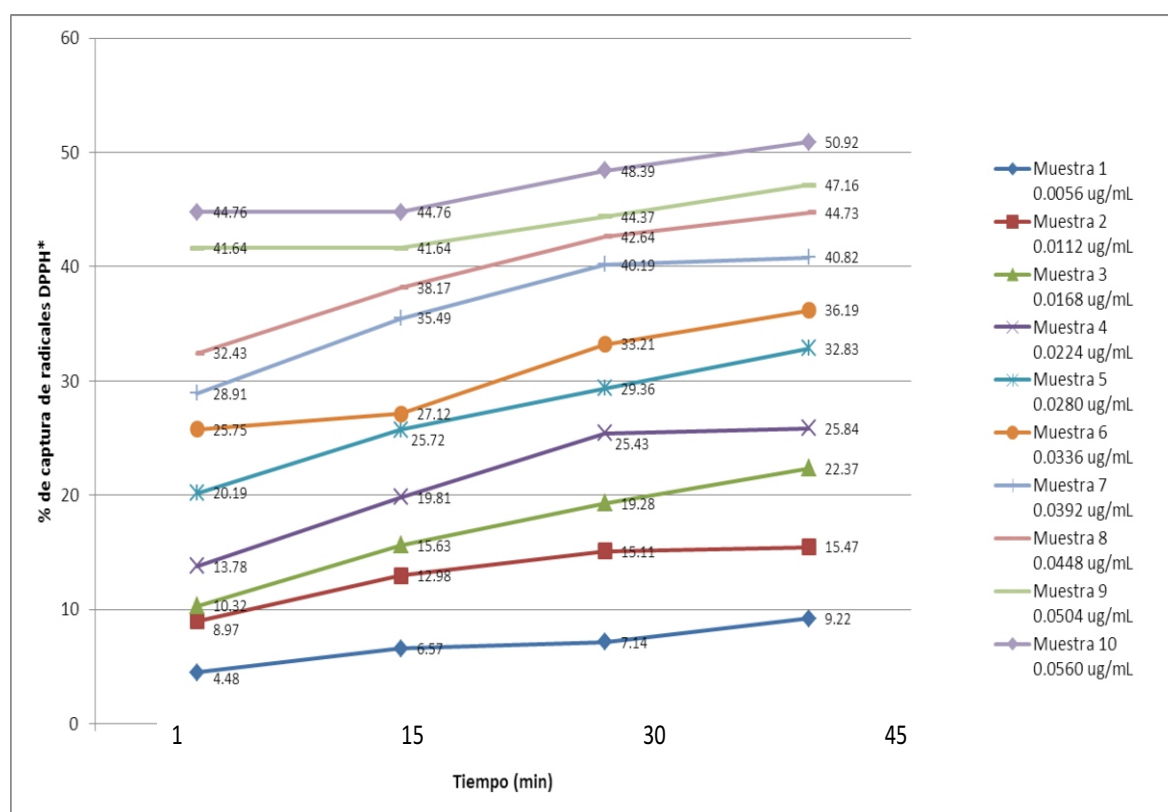
**Figura 1:** Porcentajes de captura del radical DPPH\* de la solución etanólica de flavonoides totales de las hojas de *Thea sinensis* L. vs tiempo (té verde- decocto)

**Tabla 4:**  $\mu\text{g/mL}$  del radical DPPH\* capturado por la solución etanólica de flavonoides totales de las hojas de *Thea sinensis* L. (té verde- decocto)

Muestra	mL. de solución de DPPH 0,1 mM	mL. de Solución etanólica de flavonoides totales	Concentración de la solución etanólica de flavonoides totales ( $\mu\text{g/mL}$ )	$\mu\text{g/mL}$ de DPPH* capturado) Minuto 1	$\mu\text{g/mL}$ de DPPH* capturado Minuto 15	$\mu\text{g/mL}$ de DPPH* capturado Minuto 30	$\mu\text{g/mL}$ de DPPH* capturado Minuto 45
1	10	1	0.008	2.51	3.35	3.40	4.65
2	10	1	0.016	4.69	6.81	7.21	7.66
3	10	1	0.024	5.96	8.10	9.33	10.65
4	10	1	0.032	7.91	10.75	11.67	12.26
5	10	1	0.040	10.13	13.04	13.99	14.87
6	10	1	0.048	12.09	13.55	15.52	16.75
7	10	1	0.056	13.62	16.64	18.24	19.72
8	10	1	0.064	15.01	17.62	19.05	19.94
9	10	1	0.072	16.24	18.33	20.37	21.48
10	10	1	0.080	18.30	21.15	21.99	22.50

**Tabla 5: Porcentajes de captura del radical DPPH\* de la solución etanólica de flavonoides totales de las hojas de Thea sinensis L. vs tiempo (té negro – infuso)**

Muestra	mL. de solución de DPPH 0,1 mM	mL. de solución etanólica de flavonoides totales	Concentración de la solución etanólica de flavonoides totales (ug/mL)	% de captura Minuto 1	% de captura Minuto 15	% de captura Minuto 30	% de captura Minuto 45
1	10	1	0.0056	4.48	6.57	7.14	9.22
2	10	1	0.0112	8.97	12.98	15.11	15.47
3	10	1	0.0168	10.32	15.63	19.28	22.37
4	10	1	0.0224	13.78	19.81	25.43	25.84
5	10	1	0.0280	20.19	25.72	29.36	32.83
6	10	1	0.0336	25.75	27.12	33.21	36.19
7	10	1	0.0392	28.91	35.49	40.19	40.82
8	10	1	0.0448	32.43	38.17	42.64	44.73
9	10	1	0.0504	41.64	41.64	44.37	47.16
10	10	1	0.0560	44.76	44.76	48.39	50.92



**Figura 2:** Porcentajes de captura del radical DPPH\* de la solución etanólica de flavonoides totales de las hojas de Thea sinensis L. vs tiempo (té negro – infuso)

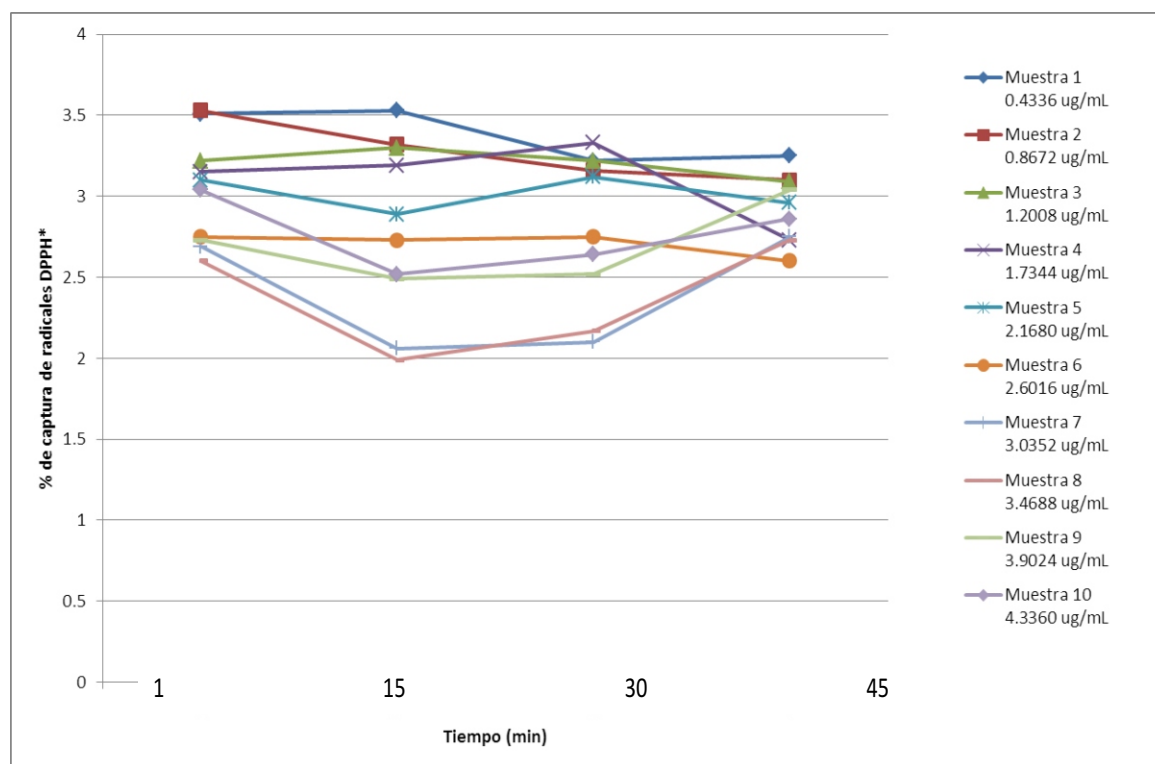


**Tabla 6: ug/mL del radical DPPH\* capturado por la solución etanólica de flavonoides totales de las hojas de Thea sinensis L. vs tiempo (té negro – infuso)**

Muestra	mL. de solución de DPPH 0,1 mM	mL. de solución etanólica de flavonoides totales	Concentración de la solución etanólica de flavonoides totales (ug/mL)	ug/mL de DPPH* capturado Minuto 1	ug/mL de DPPH* capturado Minuto 15	ug/mL de DPPH* capturado Minuto 30	ug/mL de DPPH* capturado Minuto 45
1	10	1	0.0056	2.08	3.12	3.28	5.94
2	10	1	0.0112	3.59	4.37	6.51	7.32
3	10	1	0.0168	4.15	6.81	7.95	9.23
4	10	1	0.0224	6.53	9.56	10.32	11.49
5	10	1	0.0280	9.87	11.74	12.37	13.21
6	10	1	0.0336	11.58	12.84	13.28	14.84
7	10	1	0.0392	12.50	15.14	15.47	17.91
8	10	1	0.0448	14.87	16.54	16.48	18.49
9	10	1	0.0504	15.62	17.26	18.59	19.84
10	10	1	0.0560	16.43	18.35	19.03	20.86

**Tabla 7: Porcentajes de captura del radical DPPH\* de la solución etanólica de taninos totales de las hojas de Thea sinensis L. (té negro – de cocto)**

Muestra	mL. de solución de DPPH 0,1 mM	mL. de solución etanólica de flavonoides totales	Concentración de la solución etanólica de flavonoides totales (ug/mL)	% de captura Minuto 1	% de captura Minuto 15	% de captura Minuto 30	% de captura Minuto 45
1	10	1	0.4336	3.51	3.53	3.22	3.25
2	10	1	0.8672	3.53	3.32	3.16	3.10
3	10	1	1.2008	3.22	3.30	3.22	3.09
4	10	1	1.7344	3.15	3.19	3.33	2.73
5	10	1	2.1680	3.10	2.89	3.12	2.96
6	10	1	2.6016	2.75	2.73	2.75	2.60
7	10	1	3.0352	2.69	2.06	2.10	2.75
8	10	1	3.4688	2.60	1.99	2.17	2.73
9	10	1	3.9024	2.73	2.49	2.52	3.04
10	10	1	4.3360	3.04	2.52	2.64	2.86



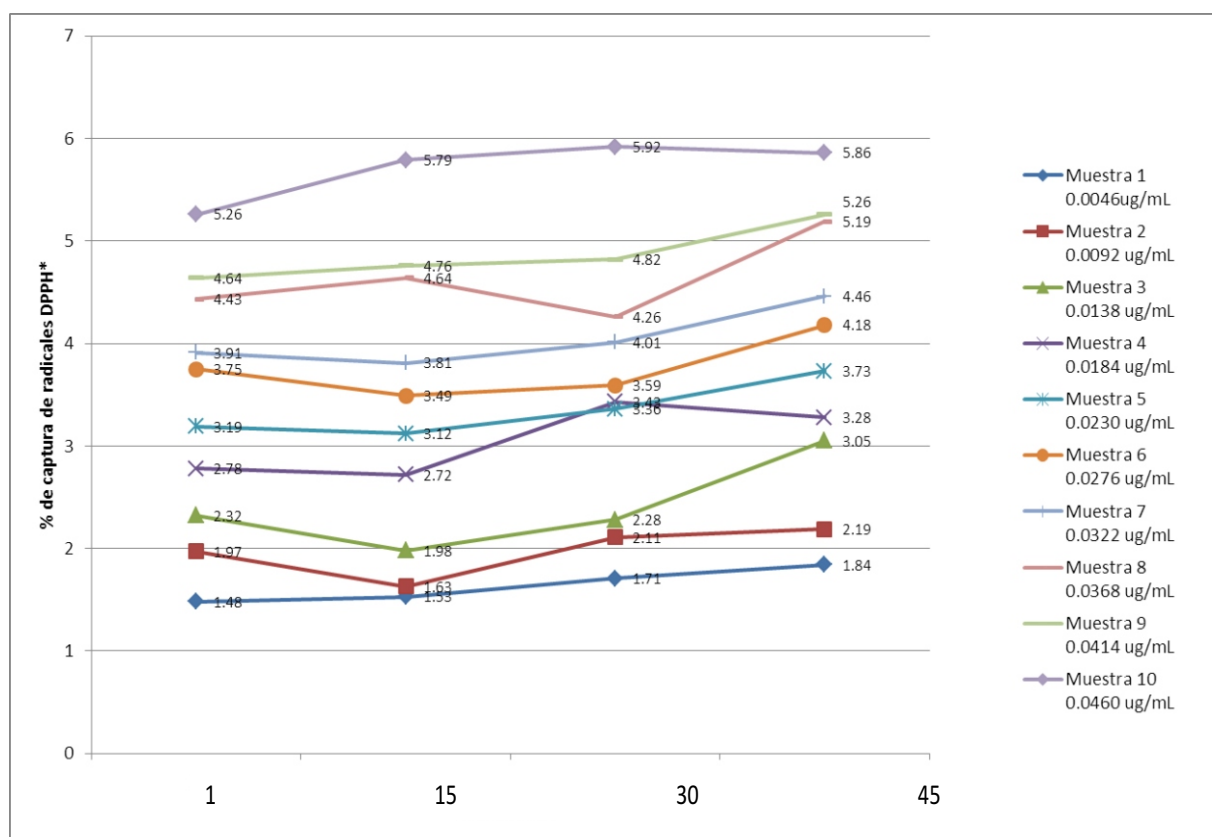
**Figura 3:** Porcentajes de captura del radical DPPH\* de la solución etanólica de taninos totales de las hojas de *Thea sinensis* L. (té negro - decocto)

**Tabla 8:** ug/mL del radical DPPH\* capturado por la solución etanólica de taninos totales de las hojas de *Thea sinensis* L. (té negro - decocto)

Muestra	mL. de solución de DPPH 0,1 mM (mL.)	mL. de solución etanólica de flavonoides totales	Concentración de la solución etanólica de flavonoides totales (ug/mL)	µg/mL de DPPH* capturado Minuto 1	µg/mL de DPPH* capturado Minuto 15	µg/mL de DPPH* capturado Minuto 30	µg/mL de DPPH* capturado Minuto 45
1	10	1	0.4336	1.03	1.19	2.18	2.56
2	10	1	0.8672	2.14	2.36	4.23	4.59
3	10	1	1.2008	2.73	3.49	5.32	5.43
4	10	1	1.7344	4.33	5.18	6.14	7.82
5	10	1	2.1680	5.78	7.43	7.28	9.36
6	10	1	2.6016	8.64	8.19	8.73	10.28
7	10	1	3.0352	10.18	9.26	10.37	10.49
8	10	1	3.4688	10.76	10.43	11.24	11.58
9	10	1	3.9024	11.08	11.83	12.25	12.37
10	10	1	4.3360	11.92	12.13	12.43	12.73

**Tabla 9: Porcentajes de captura del radical DPPH\* de la solución etanólica de taninos totales de las hojas de Thea sinensis L. (té verde – infuso)**

Muestra	mL. de solución de DPPH 0,1 mM	mL. de solución etanólica de flavonoides totales	Concentración de la solución etanólica de flavonoides totales (ug/mL)	% de captura Minuto 1	% de captura Minuto 15	% de captura Minuto 30	% de captura Minuto 45
1	10	1	0.0046	1.48	1.53	1.71	1.84
2	10	1	0.0092	1.97	1.63	2.11	2.19
3	10	1	0.0138	2.32	1.98	2.28	3.05
4	10	1	0.0184	2.78	2.72	3.43	3.28
5	10	1	0.0230	3.19	3.12	3.36	3.73
6	10	1	0.0276	3.75	3.49	3.59	4.18
7	10	1	0.0322	3.91	3.81	4.01	4.46
8	10	1	0.0368	4.43	4.64	4.26	5.19
9	10	1	0.0414	4.64	4.76	4.82	5.26
10	10	1	0.0460	5.26	5.79	5.92	5.86

**Figura 4: Porcentajes de captura del radical DPPH\* de la solución etanólica de taninos totales de las hojas de Thea sinensis L. vs tiempo (té verde – infuso)**

**Tabla 10: ug/mL del radical DPPH\* capturado por la solución etanólica de taninos totales de las hojas de *Thea sinensis* L. (té verde – infuso)**

Muestra	mL. de solución de DPPH 0,1 mM	mL. de Solución etanólica de flavonoides totales	Concentración de la solución etanólica de flavonoides totales (ug/mL)	ug/mL de DPPH* capturado Minuto 1	ug/mL de DPPH* capturado Minuto 15	ug/mL de DPPH* capturado Minuto 30	ug/mL de DPPH* capturado Minuto 45
1	10	1	0.0046	0.83	0.91	0.95	1.07
2	10	1	0.0092	1.02	1.14	1.36	1.23
3	10	1	0.0138	1.13	1.21	1.49	1.34
4	10	1	0.0184	2.32	2.03	2.35	2.16
5	10	1	0.0230	2.87	2.39	2.93	2.58
6	10	1	0.0276	3.13	2.74	3.24	3.32
7	10	1	0.0322	3.51	2.98	3.47	4.64
8	10	1	0.0368	3.92	3.44	4.18	5.17
9	10	1	0.0414	4.30	3.91	4.83	5.69
10	10	1	0.0460	4.86	4.93	5.19	5.73

## DISCUSIÓN

En el presente trabajo de investigación se cuantificaron los flavonoides totales y taninos presentes en el extracto liofilizado de hojas de *Thea sinensis* L. "té" verde y negro expresados en quercetina y ácido tánico respectivamente, así como la actividad antioxidante de cada uno de ellos.

En la tabla 1, se tiene que la absorbancia promedio de la solución patrón de quercetina para la cuantificación de flavonoides fue igual a 3.870; así también las absorbancias promedios para cada una de las muestras, así se tiene que para la muestra té verde, la absorbancia fue 1.2704 y 1.5574 para infuso y el decocto respectivamente. Asimismo se tiene que para el té negro las absorbancias fueron 1.0847 y 1.1677 en infuso y decocto respectivamente. La tabla 1, también muestra la concentración promedio de flavonoides (%) expresados en quercetina, para el té verde en infuso dio un valor de 1.3% , el cual indica que presenta mayor concentración de flavonoides comparado con el infuso de té negro el cual fue de 1.12% , el análisis estadístico indica un grado de significancia de  $2.39891E^{-6}$  ( $P < 0.05$ ), el cual corrobora que hay diferencia significativa entre los 2 tipos de muestra. Así mismo los resultados obtenidos para decocto del té verde fueron de 1.6% , el cual fue mayor comparado con el de té negro que fue de 1.21% , con un grado de significancia de  $6.12526E^{-13}$  ( $P < 0.05$ ), indicando diferencia estadísticamente significativa. Según la literatura revisada; la concentración más alta de flavonoides se presentó en la extracción mediante el método de decocción, debido a que este procedimiento permite

que el solvente se encuentre en contacto permanente con la droga un tiempo de 5 a 10 minutos después de su ebullición.<sup>13</sup> En los resultados obtenidos se observa que el té verde presenta mayor concentración de flavonoides, esto debido a que éste, está menos procesado que el té negro, porque contiene más cantidad de antioxidantes y por ello, es el más potente de los dos. Para la cuantificación de taninos, el método empleado se basa en la reacción de los compuestos fenólicos con el reactivo de Folin (tungsto-fosfomolibdico; carbonato de sodio al 20 %), el cual produce un complejo de color azul, cuya lectura es medida a 700 nm, determinando el contenido total de fenoles.<sup>22</sup> En la tabla 2, se tiene que la absorbancia promedio de la solución patrón de ácido tánico para la cuantificación de taninos fue igual 0.1063; así también las absorbancias promedios para cada una de las muestras, así se tiene que para la muestra de té verde en infuso la absorbancia fue de  $0.4453E^{-2}$  y para decocto fue de 0.2944. Asimismo se tiene que para té negro las absorbancias fueron  $4.9701E^{-2}$  y 0.4128, en infuso y decocto respectivamente. La tabla 2, también muestra la concentración promedio de taninos totales (%) expresados en ácido tánico; así tenemos que para la muestra de té verde en infuso dio un valor de 0.23 % y de 2.61% para infuso de té negro, el cual indica que presenta mayor concentración de taninos comparado con el infuso té verde. Aplicando la prueba estadística T - student, con un nivel de significancia de 95% ( $p < 0.05$ ), indica que hay diferencia significativa entre las dos muestras.

Así mismo los resultados obtenidos para decocto fueron de 15.29%, y 21.68%, en té verde y té negro respectivamente, el cual fue mayor en este último, con un grado de significancia de  $7.78585E^{-9}$  ( $p < 0.05$ ), indicando diferencia significativa entre ambas muestras. El análisis de las propiedades antioxidantes in vitro de cualquier fármaco o sustancia natural antes de considerarlo un antioxidante. La actividad antioxidante se evaluó mediante método indirecto que es lo más utilizado para cuantificar capacidad captadora de radicales libres, utilizando radicales libres coloreados y estables, que presenten una fuerte absorción en la región visible<sup>22,23</sup>. Si bien es cierto existen diferentes métodos para evaluar la actividad antioxidante, ya sea in vitro o in vivo, el método del DPPH in vitro permite tener una idea aproximada de lo que ocurre en situaciones complejas in vivo. Este método presenta una excelente estabilidad en ciertas condiciones por presentar un radical libre que puede obtenerse directamente sin una preparación previa, mientras que otros tienen que ser generados tras una reacción que puede ser química, enzimática o electroquímica<sup>22</sup>. En la Tabla 3 y Figura 1, se observa que a mayor concentración de los flavonoides totales enfrentados con la solución de DPPH\*, mayor son los porcentajes de captura de radicales de DPPH\*, así como que a mayor tiempo transcurrido, este porcentaje aumenta. Encontrándose el valor máximo a los 45 minutos para la solución de mayor concentración de flavonoides totales (0.080 ug/mL), siendo de 59.73% que equivale a una concentración de 22.50  $\mu\text{g/mL}$  de DPPH\* capturado (Tabla 4). En la Tabla 5 y Figura 2, se observa que a mayor concentración de los flavonoides totales enfrentados con la solución de DPPH\*, mayor son los porcentajes de captura de radicales de DPPH\*, así como que a mayor tiempo transcurrido, este porcentaje aumenta. Encontrándose el valor máximo a los 45 minutos para la solución de mayor concentración de flavonoides totales (0.0560 ug/mL), siendo de 50.92 % que equivale a una concentración de 20.86  $\mu\text{g/mL}$  de DPPH\* capturado (Tabla 6). Lo mencionado anteriormente corrobora otros trabajos realizados sobre capacidad antioxidante con otras especies, Bartolo et al. (2010) demostraron que la capacidad antioxidante del decocto de *Zea mays L.* variedad morado procedente de Cajamarca aumenta a medida que aumenta la concentración

del extracto, obteniendo un valor máximo de porcentaje de inhibición de DPPH de 87.02 %, correspondiente a un tiempo de 60 minutos. Rojas et al. (2009) obtuvieron un valor máximo de porcentaje de inhibición de DPPH para un extracto hidroalcohólico de la hoja de *Piper aduncum* procedente de Cajamarca de 49.98 %, correspondiente a un tiempo de 30 minutos. Por otra parte Diaz et al.. realizaron un estudio detallado sobre la capacidad antioxidante de las isoflavonas totales obtenidas de las semillas de *Glycine mas L.* procedentes de Jaén, expresando los resultados en eficiencia antiradicalaria la cual fue igual a 0.00250  $\text{mL} \times \text{ug}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ .<sup>27, 28, 29</sup> En la Tabla 7 y Figura 3, se observa que a mayor concentración de los taninos totales enfrentados con la solución de DPPH\*, mayor son los porcentajes de captura de radicales de DPPH\*, así como que a mayor tiempo transcurrido, este porcentaje aumenta. Encontrándose el valor máximo a los 45 minutos para la solución de mayor concentración de taninos totales (0.4336 ug/mL), el cual fue de 2.86 % que equivale a una concentración de 12.73  $\mu\text{g/mL}$  de DPPH\* capturado (Tabla 8). Por último, en la Tabla 9 y Figura 4, se observa que a mayor concentración de los taninos totales enfrentados con la solución de DPPH\*, mayor son los porcentajes de captura de radicales de DPPH\*, así como que a mayor tiempo transcurrido, este porcentaje aumenta. Encontrándose el valor máximo a los 45 minutos para la solución de mayor concentración de taninos totales (0.046 ug/mL), el cual fue de 5.86 % que equivale a una concentración de 5.73  $\mu\text{g/mL}$  de DPPH\* capturado (Tabla 10). El té negro es sumamente astringente. Esto se debe a que tiene una gran concentración de taninos, superior a otras variedades como el té verde o el té rojo. Esto lo hace más amargo y, a su vez, con una mayor capacidad para normalizar las funciones digestivas que se alteran durante una diarrea. Por eso mismo, el consumo de té negro durante una diarrea puede resultar muy beneficioso. Basta con tomar unas tres o cuatro tazas al día de una infusión preparada bien cargada, sin azúcar, así el efecto astringente es superior. Según los resultados obtenidos se recomienda, el consumo de té verde ya que este contiene mayor concentración de flavonoides los cuales merecen ser incorporados al grupo de los nutrientes esenciales por su variedad de beneficios en la salud siendo el té su principal fuente.

## CONCLUSIONES

1. En la cuantificación espectrofotométrica de los flavonoides totales expresados como quercetina, se determinó que el liofilizado con mayor porcentaje correspondió a la extracción por decocción de té verde con 1.6 %, y comparado con el 1.12 de flavonoides totales extraídos del té negro.

2. En la cuantificación espectrofotométrica de los taninos totales expresados como ácido tánico, se determinó que el liofilizado con mayor porcentaje

correspondió a la extracción por decocción de té negro con 21.68 %, y el de menor porcentaje fue el liofilizado del infuso de té verde con 0.23 %.

3. El porcentaje de captación de DPPH\* por los flavonoides totales (59.73 %) y taninos totales (5.86 %) totales, es mayor a medida que se aumenta la concentración de ambos, así mismo el porcentaje de captación del DPPH\* de los mismos se va incrementando según el tiempo de exposición.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Muñoz O, Montes M, Wilkomirsky T. Plantas Medicinales de Uso en Chile. Química y Farmacología. Chile. Editorial Universal. 2001. p.15-16.
- Hoogesteger C. Uso de plantas medicinales en México. México. Árbol Editorial. 1994. p.1-3.
- Alonso J. Tratado de Fitofármacos y Nutracéuticos. Argentina. CORPUS. 2004. 803-805
- Castillo P, Ramírez L. Estudio fitoquímico de *Clerodendrum frogans* utilizando solventes de diferente polaridad por maceración comparada con alcohol de 70 ° por lixiviación. Tesis (Bachiller en farmacia y Bioquímica) Trujillo, Perú. Universidad Nacional de Trujillo, Facultad de Farmacia y Bioquímica, 1994. p.2.
- Flores E. Estudio fitoquímico de la Corteza de *Banisteriopsis caapi* Morton tourn. Tesis (Bachiller en Farmacia y Bioquímica) Trujillo. Universidad Nacional de Trujillo, Facultad de Farmacia y Bioquímica, 1992. p.3.
- Asociación Española para la Cultura, el Arte y la Educación (ASOCAE O.N.G.D.). Usos y Técnicas. Extracción y preparación - 1ª parte. [online]. 2010[citado 01 Mayo 2011]. Disponible en: [http://www.natureduca.com/med\\_usos\\_extraccion1.php](http://www.natureduca.com/med_usos_extraccion1.php)
- Kuklinski C. Farmacognosia. Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. Barcelona- España. Ediciones Omega. 2003.35.
- Mostacero J. Taxonomía de las fanerógamas útiles del Perú. 1ª ed. Ed. Concytec. Perú. 2002. vol. I págs. 852 - 854.
- Miranda M. Manual de prácticas de laboratorio. Universidad de la Habana. Cuba. 2002. págs. 70-110.
- Martínez A. Flavonoides. Curso de farmacognosia y fitoquímica. Universidad de Antioquia. Medellín, Setiembre 2006. págs. 7 - 49.
- Hernández F, Rodríguez E, Sánchez F. El Té Verde ¿una buena elección para la prevención de enfermedades cardiovasculares? Departamento de Nutrición y bromatología 1 (Nutrición) .Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid [online]. 2004.
- Tránsito L. Fitoterapia: El Té Verde. [online]. 2002 [citado 05 Julio 2009]; p.21. Disponible En: <http://external.doyma.es/pdf/4/4v21n05a13032231>
- Martínez F, González G, Culebras M, Tuñón S. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. CODEN NUHOEQ. 2002 [citado 05 Noviembre 2010]; 17(6): p.271-276. Disponible en: <http://www.nutricionhospitalaria.com/mostrarfle.asp?ID=33.2002> [citado 05 Noviembre 2010]; 17(6): p.271-276. Disponible en: <http://www.nutricionhospitalaria.com/mostrarfle.asp?ID=33>
- Lock O, Cabello I, Doroteo V. Análisis de flavonoides en plantas. Pontificia Universidad Católica del Perú. [online]. 2006 [citado 2009 Julio 05]; Disponible en: [http://old.iupac.org/publications/cd/medicinal\\_chemistry/](http://old.iupac.org/publications/cd/medicinal_chemistry/)
- Escamilla J, Cuevas M, Guevara F. Flavonoides y sus acciones antioxidantes. Rev Fac Med UNAM [online]. 2009 [citado 2010 Julio 05]; 52(2): p. 73 - 75. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/facmed/gracia.n>. Cuantificación de fenoles y flavonoides totales en extractos naturales. Universidad Autónoma de Querétaro [online]. 2000 [citado 2010 Julio 05]; 23(1) Disponible en: [http://bvs.sld.cu/revistas/pla/vol5\\_1\\_00/pla05100.pdf](http://bvs.sld.cu/revistas/pla/vol5_1_00/pla05100.pdf)
- Miranda M, Cuellar A. Farmacognosia y productos naturales. La Habana. Félix Varela. 2001. p.109.
- Gutiérrez Y, Miranda M, Varona N, Rodríguez A. Validación de 2 Métodos Espectrofotométricos para la cuantificación de Taninos y Flavonoides (Quercetina) en *Psidium guajaba* L. Rev Cubana Farmacia; Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad de La Habana. [online]. 2000 [citado: 19 Marzo 2011]; 34(1): 50-5. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/far/v34n1/far07100.pdf>
- Demosthenes B, Consumo a largo plazo de té asociado con una disminución de la prevalencia de diabetes mellitus (tipo 2) en población anciana de las islas del mediterráneo: MEDIS Estudio Epidemiológico [online]. 2009. Disponible en: <http://www.pubmedcentral.ni.gov/articlerender.cgi?>
- Miranda M, Cuellar A. Farmacognosia y productos naturales. La Habana. Félix Varela. 2001. p.136.
- Lastra H, Rodríguez E, Ponce de León H, González M. Método analítico para la cuantificación de taninos en el extracto acuoso de romerillo. Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM). Rev Cubana Plant Med [online]. 2000 [citado: 20 Agosto 2010]; 5(1) Disponible en: [http://bvs.sld.cu/revistas/pla/vol5\\_1\\_00/pla05100.htm](http://bvs.sld.cu/revistas/pla/vol5_1_00/pla05100.htm)
- Ruiz S, Determinación de la Técnica de extracción de flavonoides totales de las hojas de *Mangifera indica* L. [Trabajo de Habilitación para el ingreso a la docencia en Facultad de Farmacia y Bioquímica]. Universidad Nacional de Trujillo. Perú. 2008. p.12.
- Boncún B y col. Guía de prácticas de Farmacognosia I. Universidad Nacional de Trujillo. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Departamento de Farmacotecnia. Trujillo- Perú. 2006. p.5-6.
- Azzimonti J, Bioestadística aplicada a Bioquímica y Farmacia. 2ª ed. Argentina. Universitaria de la UNAM. [online]. 2003 Disponible en: <http://www.fceqyn.unam.edu.ar/bio>.
- Domenech J. Bioestadística. Métodos Estadísticos Para Investigadores. 1º ed. España: Ed. Herder S.A.; 1980. págs. 315-320, 617.
- Glantz S. Bioestadística. 6º ed. México: Ed. Mc. Graw-Hill/Interamericana Editores, S.A de C.V.; 2005. págs. 73-81.
- Bartolo R., Chávez C. Determinación de la capacidad antioxidante in vitro del decocto de la coronta de *Zea mays* L. (variedad morado) del Distrito de Cajabamba, departamento de Cajamarca 2010. Disponible en la Biblioteca de la Facultad de Farmacia y Bioquímica la Universidad Nacional de Trujillo.

Recibido: 23 Julio 2012 | Aceptado: 15 Octubre 2012