

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

LA MOLINA

FACULTAD DE CIENCIAS



**“DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE
DE LA MEZCLA DE UN EXTRACTO PROTEICO DE CUSHURO
(*Nostoc sphaericum* Vaucher ex Bornet & Flahault) E INFUSIÓN
DE TÉ VERDE”**

Presentada por:

VICTOR MARCELO UTRILLA PAREDES

Tesis para Optar el Título Profesional de:

BIÓLOGO

Lima – Perú














2023

La UNALM es la titular de los derechos patrimoniales de la presente investigación
(Art. 24. Reglamento de Propiedad Intelectual)

Document Information

Analyzed document	Tesis Final - Utrilla.pdf (D158742808)
Submitted	2/15/2023 11:55:00 PM
Submitted by	Roberto Carlos Mansilla Samaniego
Submitter email	rmansilla@lamolina.edu.pe
Similarity	4%
Analysis address	rmansilla.unalm@analysis.arkund.com

Sources included in the report

SA	M4.669_20212_El teu diari de treball o quadern de bitcola_17817161.txt Document M4.669_20212_El teu diari de treball o quadern de bitcola_17817161.txt (D140409660)		1
SA	DOC ICESI 2 accion_proliferativa_propiedad_2014.pdf Document DOC ICESI 2 accion_proliferativa_propiedad_2014.pdf (D112826240)		1
W	URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6306908/ Fetched: 3/27/2020 3:23:48 PM		1
W	URL: https://www.nature.com/articles/s41598-020-67133-z Fetched: 11/13/2020 9:29:22 PM		1
W	URL: https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/7885972.pdf Fetched: 11/24/2021 1:33:29 AM		2
W	URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4665450/ Fetched: 4/21/2020 3:25:51 PM		2
SA	Universidad Nacional Agraria La Molina / Borrador deTesis. Inga Jesarella (1).docx Document Borrador deTesis. Inga Jesarella (1).docx (D158302292) Submitted by: crivera@lamolina.edu.pe Receiver: crivera.unalm@analysis.arkund.com		8
W	URL: https://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12672/16456/Sosa_tc.pdf?sequence=1&isA... Fetched: 11/16/2021 7:47:28 AM		1
SA	Cap1_CRivera_20-nov-19.doc Document Cap1_CRivera_20-nov-19.doc (D16285381)		1
W	URL: https://repositorio.upeu.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12840/1612/Percy_Tesis_Licenciatura_20... Fetched: 2/10/2023 2:45:54 AM		1
SA	1473253240_587__Determinaci%2525C3%2525B3n%252Bde%252Bcompuestos%252Bfen%2525C3%2525B3licos.pdf Document 1473253240_587__Determinaci%2525C3%2525B3n%252Bde%252Bcompuestos%252Bfen%2525C3%2525B3licos.pdf (D21655191)		1
SA	Fernandez Viejo, Carlota_TFG-DG.pdf Document Fernandez Viejo, Carlota_TFG-DG.pdf (D112051078)		1
SA	TESIS Nostoc sp - Esttefany.pdf Document TESIS Nostoc sp - Esttefany.pdf (D144875727)		1

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

FACULTAD DE CIENCIAS

**“DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE
DE LA MEZCLA DE UN EXTRACTO PROTEICO DE CUSHURO
(*Nostoc sphaericum* Vaucher ex Bornet & Flahault) E INFUSIÓN
DE TÉ VERDE”**

Presentada por:

VICTOR MARCELO UTRILLA PAREDES

Tesis para Optar el Título Profesional de:

BIÓLOGO

Sustentada y aprobada por el siguiente jurado:

Mg. Sc. María del Rosario Castro Muñoz
PRESIDENTE

Mg. Epifanio Teófilo Chire Murillo
MIEMBRO

Blgo. Roberto Raúl Ramos Chaupín
MIEMBRO

Ph.D. Roberto Carlos Mansilla Samaniego
ASESOR

DEDICATORIA

A Dios que siempre guía mi camino

A mi madre y padre que añoraban mi titulación

A mi hermana que sin ella no sería quien soy

A mi tía por siempre apoyarme

A Bbdoch por haber sido catalizadora de mi presente

A mí, por haber confiado en mí

AGRADECIMIENTOS

A mi madre y mi familia en general por siempre haber estado presentes.

A mi asesor Roberto Mansilla por haberme brindado la oportunidad de desarrollar mi tesis junto a él y apoyarme durante todo el proceso.

A los profesores Abelardo Calderon y Victor Meza quienes me apoyaron en la realización de este proyecto, pero que sin embargo ya no se encuentran más con nosotros.

A Paola Finetti y Martha León por haber colaborado en esta investigación.

A mi empresa P.B.J.M SAC por haber financiado este estudio.

A mi compañero Luis Gutierrez Mesias por facilitarme algunos reactivos para la investigación.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	vi
ABSTRACT	vii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1. Nostoc sphaericum.....	3
2.2. Composición nutricional del cushuro.....	3
2.3. Camelia sinensis L.	4
2.3. Composición del té verde:	5
2.4. Estructura y función de los polifenoles del té verde	6
2.5. Interacción proteína-polifenol	7
2.6. Métodos de mezcla que propician la formación de complejos proteína- polifenol.....	8
2.6.1. Método Simple	9
2.6.2. Método Alcalino.....	9
2.6.3. Método Radicales Libres	10
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	11
3.1. LUGAR DE EJECUCIÓN	11
3.2. MATERIALES	11
3.3. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN	12
3.3.1. Elaboración de la infusión de té verde:	12
3.3.2. Preparación de mezclas por tres métodos que estimulan la formación de complejos proteína-polifenol:	12
3.3.3. Determinación del contenido fenólico total (TPC) por el método Folin-Ciocalteu.	13
3.3.4. Evaluación de la capacidad antioxidante por el método ABTS.....	14
3.4. DISEÑO ESTADISTICO.....	14

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	16
4.1. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO FENÓLICO TOTAL (TPC)	16
4.2. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE.....	18
V. CONCLUSIONES	23
VI. RECOMENDACIONES	24
VII. BIBLIOGRAFÍA	25
VIII. ANEXOS.....	38

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Composición del cushuro en base seca	4
Tabla 2: Tabla resumen de las muestras empleadas en el estudio	13
Tabla 3: Tabla resumen de la preparación de las mezclas	15
Tabla 4: Tabla resumen de los resultados obtenidos en los ensayos TPC y Antioxidante ABTS.....	20

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de las catequinas presentes en el té verde.	7
Figura 2. Esquema de conjugación por los métodos a) Alcalino no enzimático y b) Enzimático	9
Figura 3. Esquema de conjugación por el método radical libre	10
Figura 4. Diagrama de cajas del TPC de las infusiones de té verde: Té V (CMS), Té V/Alcalino (CMA), Té V/Radical (CMR).	16
Figura 5. Diagrama de cajas del TPC de los extractos proteicos de cushuro: Simple (CS), Alcalino (CA), Radicales libres (CR).	17
Figura 6. Gráfico de barras comparativo de contenidos fenólicos totales (TPC): Mezclas vs Controles.	18
Figura 7. Diagrama de cajas del TPC de las infusiones de té verde: Té V (CMS), Té V/Alcalino (CMA), Té V/Radicales libres (CMR).	19
Figura 8. Diagrama de cajas de ensayo ABTS de los extractos proteicos de cushuro: Simple (CS), Alcalino (CA), Radicales libres (CR)	21
Figura 9. Gráfico de barras comparativo de capacidad antioxidante: Mezclas vs Controles	22

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Obtención del extracto proteico del Cushuro (Concentrado proteico)	39
Anexo 2: Análisis estadístico ensayo antioxidante ABTS	44
Anexo 3: Análisis estadístico ensayo de Polifenoles Totales (TPC)	48
Anexo 4: Curva de Calibración ensayo antioxidante ABTS	52
Anexo 5: Curva de Calibración ensayo de Polifenoles Totales (TPC)	52
Anexo 6: Fotos de la experimentación.....	53

RESUMEN

En el presente estudio se evaluó el efecto en la actividad antioxidante y el contenido fenólico total (TPC), expresados en equivalentes Trolox y ácido gálico (Gae) respectivamente, causados por la mezcla de un extracto proteico de cushuro (*Nostoc Sphaericum*) a una infusión de té verde (*Camellia sinensis*). Para ello se emplearon 3 métodos de mezcla que propician la formación de complejos: Mezcla simple (MS), mezcla alcalina (MA) y mezclas radicales libres (MR). Se obtuvieron efectos tanto potenciadores como inhibitorios, que dependerá del método de mezcla empleado. Tanto MS (15.66 mmol Trolox/ml, 1.22 mg Gae/ml) como MA (12.49 mmol Trolox/ml, 0.66 mg Gae/ml) redujeron la actividad antioxidante y el TPC de la infusión de té verde (16.63 mmol Trolox/ml, 1.41 mg Gae/ml), siendo el método de mezcla alcalino el que obtuvo los menores valores. MR (17.15 mmol Trolox/ml, 1.5 mg Gae/ml), en cambio, superó en ambos ensayos a las otras dos mezclas e incluso a la infusión de té verde. Se concluye que MR genera un efecto sinérgico en cuanto a la actividad antioxidante de la infusión de té verde, por lo cual podría proponerse como una mezcla de interés para posteriores estudios y su uso en el sector alimentario/farmacológico.

Palabras clave: Cushuro, complejo proteína-polifenol, actividad antioxidante, mezclas.

ABSTRACT

The present study evaluated the effect on antioxidant activity and total phenolic content (TPC), expressed in Trolox and Gallic Acid equivalents (Gae) respectively, caused by the mixing of a cushuro protein extract (*Nostoc Sphaericum*) to a tea extract. green (*Camellia sinensis*). For this, 3 mixing methods were used that favor the formation of complexes: Simple mixture (MS), alkaline mixture (MA) and free radical mixtures (MR). Enhancer or inhibitory effects were obtained depending on the mixing method used. Both MS (15.66 mmol Trolox/ml, 1.22 mg Gae/ml) and MA (12.49 mmol Trolox/ml, 0.66 mg Gae/ml) reduced the antioxidant activity and TPC of green tea extract (16.63 mmol Trolox/ml, 1.41 mg Gae/ml), being the alkaline mixture method the one that obtained the lowest values. MR (17.15 mmol Trolox/ml, 1.5 mg Gae/ml), on the other hand, outperformed the other two mixtures and even the green tea extract in both trials. It is concluded that MR generates a synergistic effect in terms of the antioxidant activity of the green tea extract, for which it could be proposed as a mixture of interest for further studies and its use in the food/pharmaceutical sector.

Keywords: Cushuro, protein-polyphenol complex, antioxidant activity, mixtures.

I. INTRODUCCIÓN

El té verde es una bebida ampliamente conocida por sus propiedades medicinales. El mayor interés en cuanto a la salud proviene de sus altos niveles de polifenoles, los cuales son compuestos estructurados a base de un anillo aromático con uno o más sustituyentes hidroxilo, que pueden ir desde moléculas fenólicas simples hasta compuestos altamente polimerizados (Lorenzo y Munekata 2016). Los polifenoles del té verde, de entre los cuales destaca el grupo de las catequinas, se han asociado con efectos beneficiosos para la salud, por ejemplo: Efectos antioxidantes neuroprotectores, anticariogénicos, reductores del riesgo de enfermedad cardíaca, entre otros. (Riemersma et al. 2001, Chen et al. 2003, Rock 2005, Longguet-Higgins 1961, Weinreb et al. 2009, Altermann et al. 2017).

Las nuevas tendencias se enfocan hacia el desarrollo de alimentos funcionales, lo cual ha propiciado el uso de polifenoles en las composiciones farmacológicas y alimenticias (Zhang et al. 2022). No solo de forma individual, sino que se ha buscado asociarlos a otros compuestos con la finalidad de mejorar sus propiedades y biodisponibilidad (Li et al. 2021). En este sentido, las proteínas han mostrado ser buenas para ello, ya que pueden asociarse a los polifenoles a través de enlaces covalentes y no covalentes; generando efectos sobre la función y estructura, tanto de la proteína como del polifenol (Yuksel et al. 2010). Sin embargo, se han reportado efectos sinérgicos, nulos e incluso inhibitorios en cuanto a la actividad biológica (Papadopoulou y Frazier 2004). Estas aparentes contradicciones responden a la naturaleza de los complejos formados, las cuales, a su vez, dependen del tipo de proteínas y polifenoles empleados (Ribas-Agustí et al. 2018).

Por lo tanto, la búsqueda de proteínas y polifenoles que reaccionen de forma idónea es cada vez más frecuente. En este sentido la evaluación de proteínas que no sean de origen animal toma relevancia, dada su mayor eficiencia de producción, impacto reducido en el medio ambiente y la capacidad de satisfacer los hábitos alimentarios y las diferencias culturales de los consumidores actuales (Hadnadjev et al. 2017, Poore y Nemecek 2018). En tal sentido,

las cianobacterias constituyen una alternativa innovadora para ser utilizadas como células productoras de bio-masa enriquecida con proteínas (Gantar y Svirčev 2008).

Una cianobacteria perteneciente al género *Nostoc*, conocida como, el cushuro, ha sido consumida desde la antigüedad por los pobladores del ande peruano como fuente de proteínas que aportan la mayoría de los aminoácidos esenciales, además de contener minerales y antioxidantes (Ponce 2014, Galetovic et al. 2017, Nowruzi et al. 2018). Diversos estudios han identificado actividades biológicas de interés para las proteínas del cushuro, por ejemplo, actividad fotoprotectora, antidesecante, gelificante, entre otras (Hill et al. 1994, Ehling-schulz y Scherer 1999, Quineche Valladares y Valle Mendoza 2014).

Dado el reciente interés por la búsqueda de antioxidantes naturales, principalmente aquellos constituidos por mezclas de compuestos con elevada diversidad molecular y funcionalidad biológica (Quan et al. 2019), la mezcla entre cushuro y té verde, se podría perfilar como una excelente alternativa, ya que los polifenoles del té verde, que presentan un alto potencial antioxidante, podrían beneficiarse de las cualidades de las proteínas del cushuro. Además, se ha demostrado que las catequinas del té verde al formar complejos con proteínas, incrementan su estabilidad a condiciones intestinales y potencian su efecto antioxidante (Almajano et al. 2006, Chanphai y Tajmir-Riahi 2019).

El presente estudio pretende ser el primero en ofrecer resultados sobre el efecto que pueda generar la adición de proteínas de cushuro a una infusión de té verde, empleando para ello tres tipos de mezcla que propician la formación de complejos proteína-polifenol.

Objetivo principal

- Determinar el efecto en la capacidad antioxidante, causado por la adición de un extracto proteico de cushuro a una infusión de té verde, mediante 3 métodos de mezcla.

Objetivos específicos

- Evaluar el contenido fenólico total (TPC) de tres mezclas de extracto proteico de cushuro e infusión de té verde.
- Evaluar la capacidad antioxidante presente en tres mezclas de extracto proteico de cushuro e infusión de té verde.
- Proponer una mezcla de cushuro con té verde que podría ser usado en el sector alimentario.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. *Nostoc sphaericum*

Es conocido comúnmente como cushuro, murmunta, llayta, o luce, estas especies de cianobacterias pertenecientes al género *Nostoc*, entre las cuales destaca *Nostoc sphaericum* Vaucher ex Bornet & Flahault y *Nostoc commune* (Aldabe-Pajares 1969). Son especies primitivas que se han mantenido desde hace millones de años, sus capacidades de supervivencia son únicas y tienden a formar colonias gelatinosas de forma esférica o laminar, de color verde amarronado producto de sus pigmentos fotosintéticos y accesorios (Nowruzi et al. 2018). Presentan una amplia distribución, suelen vivir en climas extremos, tanto en sistemas acuáticos como en terrestres, con limitación de nutrientes y en altitudes sobre 3000 msnm. Son resistentes a la radiación ultravioleta, lo que favorece su fotosíntesis y pueden permanecer en estado latente durante años, hasta que las lluvias las rehidratan y regresan a su estado habitual (Sand-Jensen 2014).

A continuación, se presenta su clasificación taxonómica, según lo descrito por Bornet y Flahault (1886):

- **Division:** Cyanobacteria
- **Clase:** Cyanophyceae
- **Sub-Clase:** Nostocophycidae
- **Orden:** Nostocales
- **Familia:** Nostocaceae
- **Género:** *Nostoc*
- **Especie:** *Nostoc sphaericum* Vaucher ex Bornet & Flahault

2.2. Composición nutricional del cushuro

Las Diversas especies de *Nostoc* han sido empleadas en la dieta humana desde hace 2000 años, por poblaciones de Asia donde utilizaban *N. commune* Vaucher ex Bornet & Flahault para sobrevivir durante la hambruna, y *N. flagelliforme* Ko-márek para tratar la diarrea, la hipertensión y la hepatitis (Sand-Jensen 2014, Li y Guo 2017). En Sudamérica constituye

parte importante de la cultura alimentaria y de las tradiciones festivas andinas (Ponce 2014). Diversos estudios han identificado los compuestos involucrados en sus principales propiedades, demostrando que *Nostoc* puede ser aprovechado como un alimento altamente nutritivo y una fuente importante de proteínas, ya que contiene compuestos bioactivos y todos los aminoácidos esenciales (Cuadro 1) (Galetovic et al. 2017, Rosales-loaiza et al. 2017, Fidor et al. 2019).

Tabla 1: Composición del cushuro en base seca

Componente	Contenido en base seca (g/100g)
Proteínas totales	30.4
Lípidos totales	1.7
Carbohidratos totales	60.8
Cenizas	6.4
Aminoácidos Totales	9.7
Ácidos grasos totales	1.4
Fibra dietética soluble	8.8
Fibra dietética insoluble	47.6
Vitamina E	4,3 mg
Vitamina C	0,7 mg
Vitamina A	<0,5 ug/100g
Vitamina D3	<0,05 ug/100g

FUENTE: Galetovic et al. 2017

2.3. *Camellia sinensis* L.

La planta del té, *Camellia sinensis*, es un árbol de hojas perennes perteneciente a la familia Theaceae (Khan y Mukhtar 2013). Su historia se remonta a China a aproximadamente 2700 a. C., en el tiempo del emperador Shen Nung, sin embargo, la primera mención bibliográfica, se encuentra en un antiguo libro de palabras chino llamado, Erh Ya, abou (Tan et al. 1989).

Todas las diferentes variedades de té, como el té negro, verde, oolong, rojo, blanco y amarillo, provienen de la misma especie *Camellia sinensis*. Son los métodos de procesamiento y el clima los que originan las diferencias en el gusto y en los compuestos activos (Weisburger 1997). El proceso de producción del té verde involucra la cosecha de hojas jóvenes y flexibles, ausencia de marchitamiento y un rápido calentamiento o vaporizado para desactivar la oxidación enzimática de los polifenoles (Enari 1976). la oxidación enzimática o también conocida como fermentación ocurre por acción de la enzima

polifenol oxidasa, la cual oxida aeróbicamente los compuestos fenólicos tan pronto como se rompe la estructura celular de las hojas (Graham 1992). Sin embargo, otros tipos de enzimas, como las esterasas, las glicosidasas y las descarboxilasas, también pueden intervenir en las transformaciones y degradaciones de los polifenoles (Komes et al. 2010). De no realizarse el proceso de calentamiento, las catequinas se oxidan a otros tipos de polifenoles, principalmente galato de thealavine y thearubinas, y el té resultante es té negro (Wang et al. 2015, Chanphai y Tajmir-Riahi 2019).

La clasificación taxonómica de té se muestra a continuación, según la Integrated Taxonomic Information System (ITIS Report 2011):

- **Reino:** Plantae
- **Sub-Reino:** Viridiplantae Super-División: Embryophyta División: Tracheophyta
- **Sub-división:** Spermatophytina Clase: Magnoliopsida Superorden: Asteranae Orden: Ericales
- **Familia:** Theaceae
- **Género:** *Camellia L.*
- **Especie:** *Camellia sinensis L.*

2.3. Composición del té verde:

El té verde es especialmente rico en un tipo de polifenol incoloro llamado catequina. Son seis catequinas las principales: (+)-catequina (C), (-)-epicatequina (EC), (-)-epigallocatequina (EGC), (-)-galocatequina galato (GCG), (-)-galato de epigallocatequina (EGCG) y (-)-galato de epicatequina (ECG) (Bhagwat y Beecher 2003, Casado 2007, Wang et al. 2015). Casi todas las características del té incluyendo su sabor, color y aroma, están directa o indirectamente asociadas con modificaciones a las catequinas, por ejemplo, se sabe que la sensación astringente y amarga del té verde está asociada con estos compuestos (Reto et al. 2007), además todas ellas han demostrado tener grandes beneficios para la salud (Khan y Mukhtar 2013).

Por otro lado, el té verde también contiene metilxantinas como: cafeína (1, 3, 5-trimetilxantina) y dos dimetilxantinas isoméricas menores, teobromina y teofilina, que son responsables de los efectos levemente estimulantes del té (Lee et al. 2017). Además, de ser factores muy importantes en la calidad del té, también se informa que estos compuestos

exhiben efectos beneficiosos para la salud. Estudios han descrito el uso de la cafeína para mejorar la actividad mental y la migraña (Iso et al. 2006). Además de los compuestos fenólicos y las metilxantinas, el té proporciona una importante fuente dietética de polisacáridos, complejo de vitamina B, vitamina C, vitamina E, ácido R-aminobutírico, fluoruro, así como minerales y oligoelementos como K, Mn, Cr, Ni y Zn (Pedro L. Fernández et al. 2002, Shen et al. 2009, Komes et al. 2010).

2.4. Estructura y función de los polifenoles del té verde

Las catequinas son las sustancias polifenólicas predominantes en el té verde, siendo la EGCG el compuesto más abundante y potente. Todas las catequinas tienen una amplia gama de acciones biológicas relacionadas particularmente con su estructura química (Taylor et al. 2009). Sin embargo, los mecanismos detrás de estas acciones no se han aclarado completamente (Sutherland et al. 2006). Hasta la fecha, la mayoría de los estudios clínicos y epidemiológicos con catequinas han examinado la posible relación entre estos compuestos y muchos tipos de cáncer o la prevención de enfermedades vasculares (Komes et al. 2010). No obstante, se han reportado otras actividades biológicas de gran importancia para la salud de la catequina, entre las cuales se encuentran, una fuerte actividad antioxidante, antiinflamatoria, hipocolesterolémicas, antibacterianas, neuroprotectora, antialérgicas, promotoras de la saciedad y otras clínicamente relevantes (Kang et al. 2001, Cabrera et al. 2006, Green et al. 2007, Weinreb et al. 2009, Lorenzo y Munekata 2016, Cascella et al. 2017).

Se ha encontrado que el consumo de té verde previene varios tipos de cáncer por su acción antioxidante y antiproliférica (Jankun et al. 1997), algunos de ellos son el cáncer de estómago, boca, intestino delgado, esófago, colon, pulmón, páncreas, riñón y glándulas mamarias (Longuet-Higgins 1961, Cooper et al. 2005, Sun et al. 2006, Bushman 2016). Por otro lado, la asociación entre las catequinas y las enfermedades vasculares se ha atribuido, en parte, a las capacidades antioxidantes de las catequinas que previenen la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y, por lo tanto, pueden reducir la aparición de enfermedades vasculares relacionadas (Riemersma et al. 2001, Khan y Mukhtar 2013). Además, se han reportado efectos antivirales del té verde contra el virus del herpes simple, virus de la influenza, el tratamiento de la fiebre tifoidea y la diarrea (Faiz et al. 2018). Así también, beneficios en el control del metabolismo, ya que, se ha demostrado que la EGCG es capaz de reducir significativamente la ingesta de alimentos, el peso corporal, los niveles

sanguíneos de testosterona, estradiol, leptina, insulina, factor de crecimiento tipo insulina I, glucosa, colesterol y triglicéridos (Kao et al. 2000).

La mayor parte de las actividades biológicas se relacionan con mecanismos de acción antioxidante y eliminación de radicales libres. Sin embargo, recientemente se ha descubierto funciones de metabolitos originados a partir de catequinas, que si bien presentan poca actividad antioxidante debido a sus propiedades reducidas de donación de hidrógenos (Harada et al. 1999), previenen la citotoxicidad tan efectivamente como su compuesto original (Schroeter et al. 2001).

Por otro lado, se sabe que la biodisponibilidad de las catequinas es limitada, esto se debe principalmente a la posible sensibilidad de la catequina a las condiciones digestivas (Record y Lane 2001, Green et al. 2007), transporte intestinal deficiente (Vaidyanathan y Walle 2003) y metabolismo rápido (Chow et al. 2005). Es por ello que existe un creciente interés por descubrir soluciones a la disponibilidad de estos compuestos (Jakobek 2015, Quan et al. 2019).

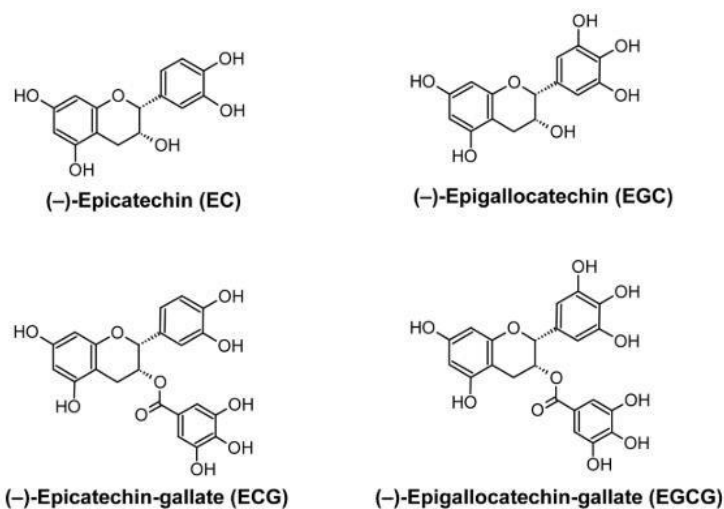


Figura 1. Estructura de las catequinas presentes en el té verde.
FUENTE: Green et al. 2007

2.5. Interacción proteína-polifenol

Los polifenoles tienen la capacidad de unirse a proteínas a través de enlaces covalentes como no covalentes, formando complejos solubles e insolubles que pueden presentar mejoras funcionales y nutricionales (von Staszewski et al. 2012).

La fuerza y tipo de unión dependerá de los parámetros físicos empleados en el proceso de mezcla; como la temperatura, pH y salinidad. Por parte de las proteínas la conformación aminoacídica y la estructura tridimensional afectan la unión. Y en el caso de los polifenoles, dependerá del número de grupos OH que presenten, la estructura, la flexibilidad y el peso molecular; siendo los polifenoles de mayor peso como los taninos los de mayor fuerza de unión (Papadopoulou y Frazier 2004, Frazier et al. 2010).

Ciertos polifenoles han mostrado la misma fuerza de unión frente a diferentes proteínas, mientras que otros mostraron preferencia por algunas (Hagerman et al. 1998, Ribas-Agustí et al. 2018). Respecto a las catequinas del té la fuerza de unión se da en el siguiente orden: C ~ EC > EGC > EGCG (Okamoto et al. 2003, Thongkaew et al. 2014).

Los efectos biológicos de las interacciones proteína-polifenol son variados, los resultados obtenidos muestran tres tipos de efectos diferentes: un efecto inhibitorio de los componentes o enmascaramiento, como la reducción de la actividad antioxidante o actividad biológica, causadas por enlaces que podrían afectar la disponibilidad de los polifenoles o cambiar la estructura de la proteína (Arts et al. 2001, Stojadinovic et al. 2013). Un efecto neutral que no implican ni enmascaramiento ni mejora (Rashidinejad et al. 2017). Y efectos sinérgicos, como la mejora de la biodisponibilidad de las catequinas por adición de suero de leche o mejoras en la capacidad antioxidante de las proteínas (Chanphai y Tajmir-Riahi 2019, Zagury et al. 2019).

2.6. Métodos de mezcla que propician la formación de complejos proteína-polifenol

Los complejos formados por enlaces no covalentes suelen generarse de manera espontánea en las mezclas y ocurren debido a fuerzas hidrofóbicas, iónicas o puentes de hidrógeno (Ribas-Agustí et al. 2018).

Los conjugados por enlace covalente puede requerir de ciertas condiciones para su formación, sin embargo, son preferidos en la industria alimentaria y farmacológica por ser más fuertes y estables. Los métodos usados generalmente en su producción son: no enzimáticos (reacción alcalina o de radicales libres) o enzimáticos (polifenoloxidasas, lacasa, tirosinasa, etc.) (Gu et al. 2017, Liu et al. 2019).

A continuación, se describen los 3 métodos para la formación de complejos, uno por la vía espontánea (Simple) y dos que generan modificaciones en la proteína o el polifenol.

2.6.1. Método Simple

De forma natural los polifenoles y las proteínas pueden llegar a reaccionar formando complejos, ejemplo de ello es la conocida de formación de turbidez en vinos, jugos y coloides en la miel (Brudzynski et al. 2013). Estas uniones son principalmente del tipo no covalente como interacciones hidrofóbicas, puentes de hidrógeno y enlaces iónicos (Yuksel et al. 2010, Quan et al. 2019). Los enlaces puentes de hidrógeno se forman entre los grupos fenólicos de los polifenoles y los grupos carbonilo (C=O), hidroxilo (-OH) o amino (-NH₂) de las proteínas (Buitimea-Cantúa, Gutiérrez-Uribe, & Serna-Saldívar, 2018). Las fuerzas hidrofóbicas por su parte, se generan a partir de los residuos hidrofóbicos de las proteínas y los anillos aromáticos no polares de los polifenoles (Kanakis et al. 2011, Ozdal et al. 2013). Finalmente los enlaces iónicos, que podrían tener un papel menor en la interacción proteína-polifenol, se forman por la unión entre los grupos cargados positivamente de proteínas (ϵ -amino de la lisina) y los grupos hidroxilo de polifenoles cargados negativamente (Han et al. 2020).

2.6.2. Método Alcalino

El método alcalino es uno de los métodos no enzimáticos más empleados para la conjugación de polifenoles y proteínas (Benjakul et al. 2021). Los polifenoles en condiciones alcalinas (pH 9,0) y presencia de oxígeno son propensos a oxidarse y formar radicales de semiquinona, que posteriormente se reorganizan en quinonas. Estos productos reaccionan fácilmente con los residuos nucleofílicos (lisina, metionina, triptófano y cisteína) en las cadenas laterales de las proteínas, pudiendo formar complejos dimerizados (Quan et al. 2019) (Figura 2).

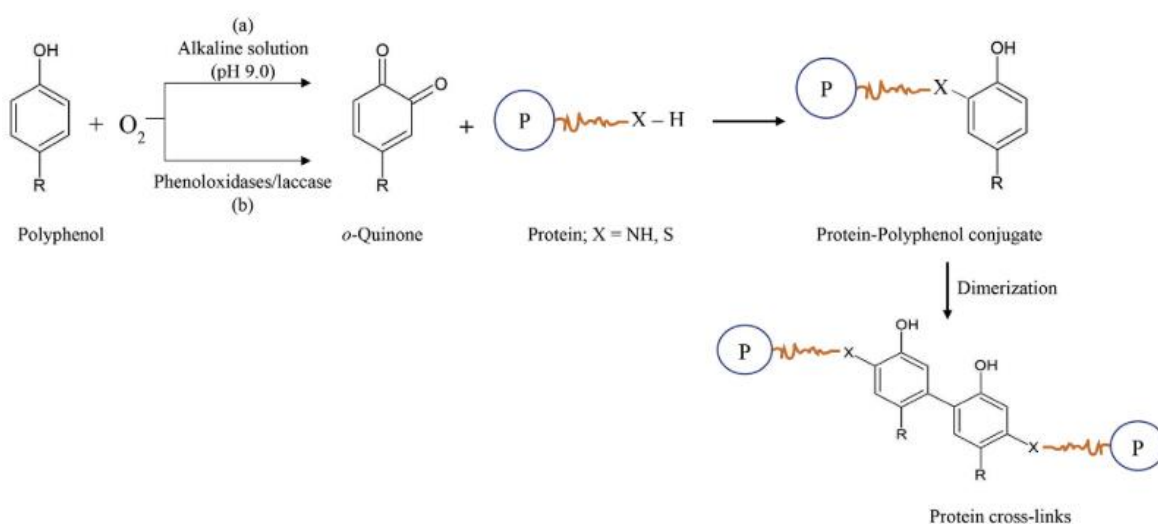


Figura 2. Esquema de conjugación por los métodos a) Alcalino no enzimático y b) Enzimático

FUENTE: Quan et al. 2019.

2.6.3. Método Radicales Libres

Este método ha demostrado ser simple y rápido en la fabricación de complejos proteína-polifenol, además podría realizarse a temperatura ambiente sin generar productos tóxicos ni descomposición de los antioxidantes (Gu et al. 2017, Feng et al. 2017). Se utiliza al ácido ascórbico y al peróxido de hidrógeno como par iniciador de una reacción redox, en la cual se generan radicales hidroxilos que se encargarán de oxidar a los aminoácidos de la cadena lateral de las proteínas (Benjakul et al. 2021). Los que finalmente reaccionaran con los polifenoles a través de un enlace covalente (Quan et al. 2019) (Figura 3).

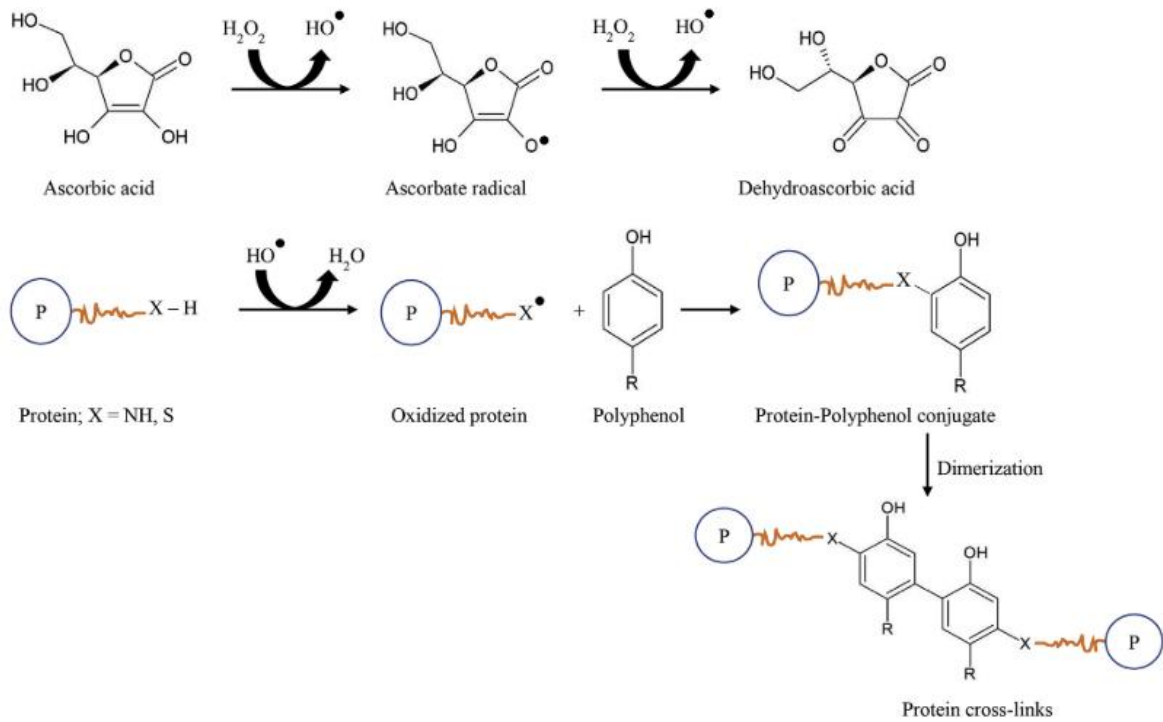


Figura 3. Esquema de conjugación por el método radical libre
FUENTE: Quan et al. 2019.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. LUGAR DE EJECUCIÓN

El presente trabajo realizó en El Instituto de Biotecnología (IBT) perteneciente a la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Agraria La Molina.

3.2. MATERIALES

a. Material de vidrio

- Cubetas de espectrofotómetro
- Matraces Erlenmeyer de 250 ml
- Pipetas graduadas de 1 ml y 5 ml
- Perlas de vidrio de 3 y 12 mm de diámetro
- Probetas de 100 ml y 50 ml
- Vaso de precipitado de 50 ml, 250ml y 500 ml

b. Material de plástico

- Puntas de micropipetas de 20-200 μ l, 100-1000 μ l
- Tubos Corning de 50 ml, 15 ml
- Micropipetas de 20-200 μ l, 100-1000 μ l

c. Otros materiales

- Agitadores Magnéticos
- Gradilla
- Papel aluminio
- Guantes de látex
- Mascarilla
- Nitrógeno líquido

d. Equipos

- Mortero
- Agitador magnético
- Agitador Shaker

- Balanza analítica digital
- Espectrofotómetro UV/Visible
- Horno microondas
- Refrigeradora
- Phmetro

e. Material Biológico

- *Camelia sinensis* (Té verde): Proveniente de un cultivo orgánico y en una presentación de hojas secas (hebras). Obtenido de la empresa Runaq y proveniente del Valle de la Convención en Quillabamba Cuzco.
- El extracto proteico de *Nostoc sphaericum* (Cushuro): Se obtuvo a través de un método estándar de extracción alcalina y precipitación isoeléctrica, mediante el ajuste de pH hasta el punto isoeléctrico (Anexo 1). El cushuro empleado se obtuvo de las cochas de producción de la comunidad de Mesapampa, distrito de Catac y provincia de Recuay en Huaraz. Posteriormente se realizó la determinación de proteínas utilizando la metodología Kjeldahl descrita por AOAC (1984).

3.3. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

3.3.1. Elaboración de la infusión de té verde:

El extracto acuoso de té verde se preparó por medio de infusión a 80 °C con agua destilada. Se emplearon 3,3 g de hojas de té verde y se añadieron a 200 ml del agua, obteniéndose una concentración de 0.027 g/ml. El tiempo de infusión fue de 5 minutos manteniendo la temperatura de 80 °C. Luego, se dejó enfriar hasta temperatura ambiente y posteriormente se filtró haciendo uso de un papel Whatman de 110 mm. Finalmente, se almacenó a 4 °C por 24 horas hasta la preparación de las mezclas con el fin de mantener la estabilidad de los polifenoles (Yang et al. 2007).

3.3.2. Preparación de mezclas por tres métodos que estimulan la formación de complejos proteína-polifenol:

Las mezclas se prepararon en base a una formulación comercial de la empresa P.B.J. M S.A.C, 0,018 g/ml de proteína en solución. Los métodos de mezcla utilizados se basaron en tres tipos de condiciones, según el trabajo de You et al. (2014) con ciertos cambios, estos fueron: Simple (MS), Alcalino (MA) y Radicales libres (MR), cada uno con su respectivo control que consistió en ausencia de proteína (Cuadro 1). Para el MR, se dispersaron 0,5 g

de infusión de cushuro en 5 ml de agua destilada, luego se adición 1,0 ml de H₂O₂ 5,0 mM y 0,25 g de ácido ascórbico (1,4 mmol). La mezcla se mantuvo a 25 °C bajo aire atmosférico, 2 h después se añadieron 12 ml de infusión madre de té verde y se mantuvo en agitación por 24 h. La mezcla alcalina se preparó dispensando 0,5 g de extracto de cushuro en 5 ml de agua destilada, se ajustó el pH a 9,0 con NaOH y se mantuvo a 25 °C bajo aire atmosférico. Después de 2 h, se añadió 12 ml de infusión madre de té verde y se mantuvo en agitación durante 24 h. La mezcla simple se preparó usando 0,5 g de extracto de cushuro en 5 ml de agua destilada, posteriormente se agregó 12 ml de infusión madre de té verde y se mantuvo en agitación por 24 horas. Finalmente, de cada una de las mezclas se extrajo la fase soluble resultante, se filtró y se conservó en refrigeración a 4 °C para los posteriores ensayos. De forma adicional se prepararon las muestras CS, CA Y CR, usando para cada una de ellas 0,5 g de extracto de cushuro y 18 ml de agua destilada, empleando las condiciones de mezcla simple, alcalina y radicales libres respectivamente.

Tabla 2: Tabla resumen de las muestras empleadas en el estudio

Abreviación	Muestra	Contenido
CMS	Control M. Simple	Infusión de té verde
CMA	Control M. Alcalina	
CMR	Controles M. Radicales libres	
MS	Mezcla Simple	Extracto proteico de cushuro + Infusión de té verde
MA	Mezcla Alcalina	
MR	Mezcla Radicales libres	
CS	Extracto Proteico Simple	Extracto proteico de cushuro
CA	Extracto Proteico Alcalino	
CR	Extracto Proteico Radicales libres	

3.3.3. Determinación del contenido fenólico total (TPC) por el método Folin-Ciocalteu.

La concentración de fenoles totales se determinó según lo descrito por Singleton y Rossi (1965). Para lo cual, se usó 0,5 ml de la muestra y se mezcló con 0,5 ml de H₂O destilada y 2 ml de reactivo de Folin-Ciocalteu (1: 5 H₂O), y luego de 3 minutos se añadió 10 ml de Na₂CO₃ al 10%. Finalmente, se mezclaron y se dejaron reposar durante 60 minutos. Se midió la absorbancia a 725 nm en un espectrofotómetro UV-Vis. Los contenidos fenólicos totales se calcularon sobre la base de la curva de calibración de ácido gálico y se expresaron como equivalentes de ácido gálico (GAE), en miligramos por gramo de la muestra.

3.3.4. Evaluación de la capacidad antioxidante por el método ABTS

Se empleó el método descrito por Katalinic et al. (2005) con algunas modificaciones, para el cual, el reactivo ABTS se disolvió en agua destilada hasta una concentración stock de 7 mM. Luego se produjo el catión radical ABTS (ABTS +) al hacer reaccionar la solución stock de ABTS con una solución de persulfato de potasio 2,45 mM (concentración final) en oscuridad y a temperatura ambiente entre 12 y 16 h antes de su uso. Posteriormente, la solución ABTS + fue diluida en solución salina tamponada con fosfato pH 7,4 (PBS). Para la curva de calibración y ensayos posteriores, se empleó 2,0 ml de solución ABTS + diluida y se agregaron 20 µL de estándar Trolox o muestra biológica respectivamente. La mezcla de reacción se incubó durante 6 min y la disminución de la absorbancia se determinó a 734 nm. El porcentaje de inhibición de ABTS + de las muestras se calculó de acuerdo con la fórmula:

$$\% \text{Inhibición} = (Ac(0) - Aa(t) / Ac(0)) * 100$$

Dónde:

- Ac(0) es la absorbancia del control en t = 0 min
- Aa(t) es la absorbancia del antioxidante (muestra biológica o estándar Trolox) en t = 6 min.

La capacidad de eliminación de radicales libres de la muestra biológica, se calculó como la inhibición porcentual de ABTS +, y fue equiparada con una curva estándar Trolox (0-1 µmol/ml, concentraciones finales). Los resultados fueron expresados como µmol de equivalentes Trolox por ml de muestra.

3.4. DISEÑO ESTADÍSTICO

Con la finalidad de determinar si existen diferencias significativas respecto al contenido fenólico total y la actividad antioxidante entre las muestras. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para evaluar las diferencias significativas entre 3 o más tratamientos. De existir diferencia se procedió a usar la prueba de Tukey para establecer diferencias significativas entre las medias. Adicionalmente, se empleó la prueba T de Student para comparar cada mezcla con su control respectivo. Los análisis de datos fueron llevados a cabo con el programa estadístico Minitab 17. Para los análisis estadísticos se consideró un nivel de confianza de 95% ($\alpha=0.05$) y la hipótesis nula se rechazó considerando el p-valor ≥ 0.05 .

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO FENÓLICO TOTAL (TPC)

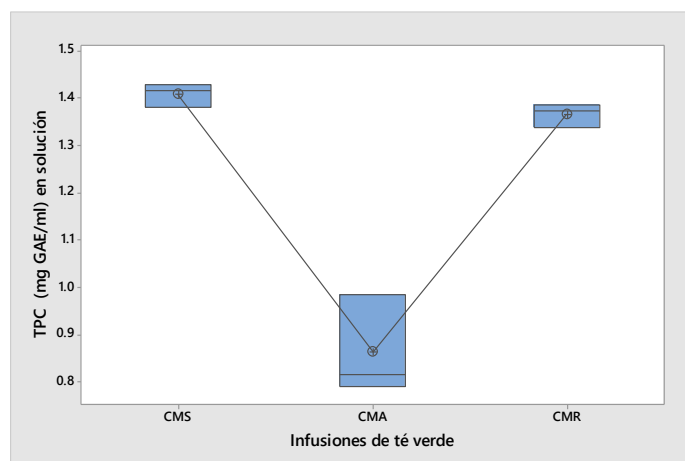


Figura 4. Diagrama de cajas del TPC de las infusiones de té verde: Té V (CMS), Té V/Alcalino (CMA), Té V/Radical (CMR).

El contenido fenólico total (TPC) encontrado en las hojas de té verde e infusión de té verde (CMS) fue de 85.41 mgGAE/g y 1.41 mgGAE/ml (Tabla 4), respetivamente. El valor del TPC en infusión fue muy similar a los hallados por Komes et al. (2010) y Coelho et al. (2020), quienes reportaron 1.6 mgGAE/ml y 1.7 mgGAE/ml respectivamente. En relación al TPC por hebra o peso seco, Catunta Cachi (2012) reporta una concentración de 72.84 mgGAE/g, valor semejante al obtenido en el presente trabajo; mientras que Rodrigo Rojas (2019) halló una mayor concentración (163,99 mgGAE/g); cabe destacar que ambos estudios, al igual que el presente trabajo, fueron realizados con muestras de té obtenido del Valle de la Convención en Cusco. Investigaciones con ecotipos asiáticos, como las de Zhao et al. (2019) y Tang et al. (2019), reportaron mayores valor de TPC, 215.15 mgGAE/g y 195.79 mgGAE/g respectivamente. Dicha variabilidad en los resultados puede deberse a las condiciones de cultivo y procesado del té (Graham 1992), así como a los parámetros empleados en la elaboración de la infusión, como el tiempo, la temperatura, el pH, el tamaño de partícula y el tipo de solvente empleado (Komes et al. 2010, Samaniego-Sánchez et al. 2011, Vinci et al. 2022).

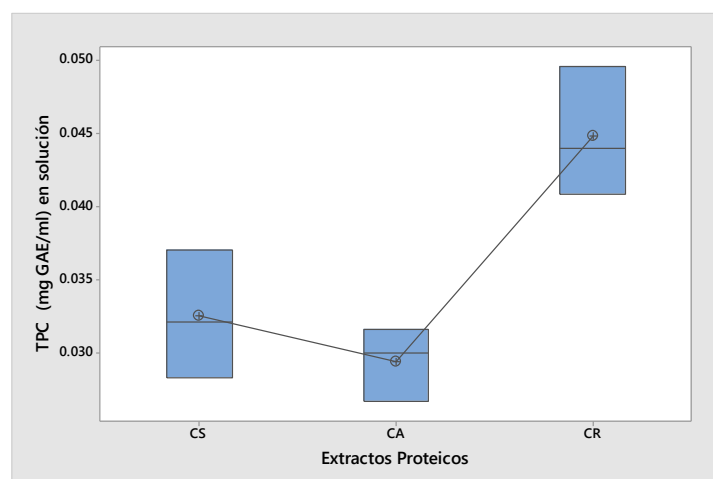


Figura 5. Diagrama de cajas del TPC de los extractos proteicos de cushuro: Simple (CS), Alcalino (CA), Radicales libres (CR).

Se evaluó también el TPC presente en el extracto proteico de cushuro CS, CA, CR, ya que en anteriores estudios se ha demostrado la presencia de polifenoles en cushuro (Chávez Hidalgo 2014, Yucharoen et al. 2017, Galetovic et al. 2017, Fernández y Suyón G 2018). Los resultados obtenidos para las tres muestras CS, CA y CR, mostraron valores promedio diferentes de cero (Figura 5), lo que podría deberse a restos de polifenoles u otros compuestos fenólicos presentes en el extracto proteico, ya que el porcentaje de purificación de este fue de 58.99% (Anexos). Fernández y Suyón G (2018) reportaron 2.8 mgGAE/g de TPC en la materia seca de cushuro, mientras que en el presente estudio el valor de CS, fue de 1.17 mg/g. Las condiciones del método radicales libres, aplicadas al extracto proteico, incrementaron los valores de TPC, con 1.61 mgGAE/g; mientras que CCA no generó diferencias significativas respecto a CS (Figura 5). Una posible explicación de estos resultados, podría estar en que las condiciones radicales libres sean capaces de desplegar la estructura tridimensional de las proteínas de cushuro; dejando expuestos residuos como la tirosina, los cuales podrían reducir al reactivo Folin generando un cambio de coloración (Singleton y Rossi 1965, Dorsey et al. 1977, Wolff et al. 1986, Davies et al. 1987, Galetovic et al. 2017, Alavi et al. 2019).

Respecto a las mezclas (Figura 6, Tabla 4), se comparó el efecto resultante de la adición de proteínas provenientes del cushuro a una infusión de té verde. Tanto MA (40.16 mgGAE/g) como su control CMA (52.29 mgGAE/g) obtuvieron los menores valores de TPC (Figura 4, Tabla 4), además que no mostraron diferencias significativas entre ellas. Esto se debe probablemente a la baja estabilidad que presentan los polifenoles del té verde a condiciones alcalinas, a pH de 9.0 pueden oxidarse fácilmente hasta formar quinonas (Zhu et al. 1997,

Chen et al. 1998, Jang et al. 2014). Por su parte, MS (74.02 mgGAE/g) mostró un ligero efecto de enmascaramiento de los polifenoles respecto a su control CMS (85.41 mgGAE/g). Anteriores estudios han descrito efectos de enmascaramiento del contenido fenólico por adicción de proteínas, esto es debido a las uniones formadas entre ambos tipos de compuestos, las cuales reducen u ocultan los grupos OH involucrados en la reacción con el reactivo Folin-Ciocalteu (Ozidal et al. 2013, Rashidinejad et al. 2017, B. Al-Ghafari et al. 2017, Quan et al. 2019). No obstante, MR obtuvo la mayor presencia de polifenoles de todas las muestras con 83.13 mgGAE/g, superando a su control CMR con 75.92 mgGAE/g y a la infusión simple (CMS) con 78.29 mgGAE/g. Estos resultados podrían indicar, que la adición de proteínas de cushuro a condiciones de radicales libres, no interfiere ni inhibe la reacción entre los polifenoles del té y el reactivo Folin-Ciocalteu, sino que al contrario la potencian. Un efecto similar fue descrito por B. Al-Ghafari et al. (2017), quien obtuvo mayores valores de TPC con la mezcla de leche entera y café, que con café solo. Además, este efecto también se pudo apreciar con la muestra de extracto proteico a condiciones de radicales libres (CR), lo cual podría estar indicando la formación de complejos conjugados que reaccionan con el reactivo Folin (Folin y Ciocalteu 1927, Dorsey et al. 1977, Everette et al. 2010).

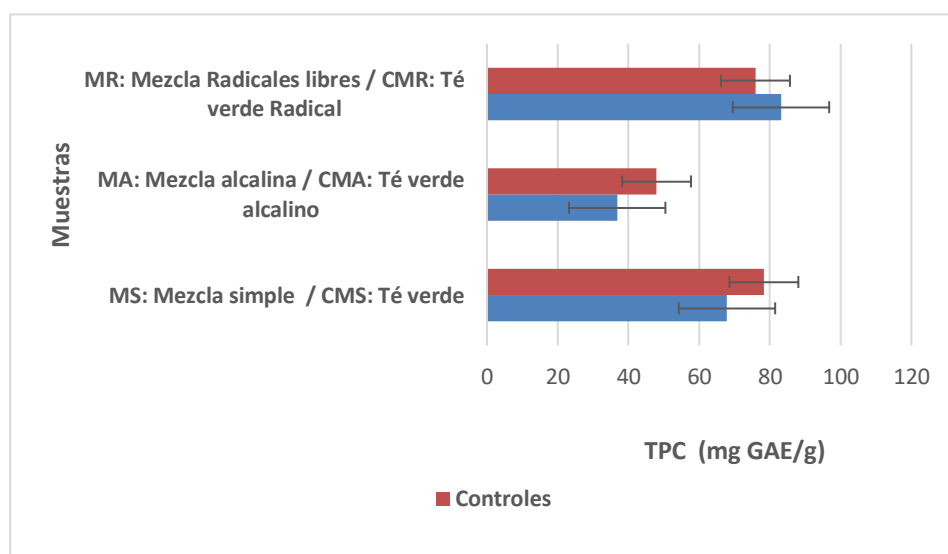


Figura 6. Gráfico de barras comparativo de contenidos fenólicos totales (TPC): Mezclas vs Controles.

4.2. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

La capacidad antioxidante constituye una de las principales cualidades del té verde y se encuentra fuertemente ligada a sus compuestos fenólicos, los cuales en su mayoría pertenecen al grupo de los flavonoides, siendo la subclase flavanoles la más abundante pudiendo llegar a representar más del 70% del contenido fenólico total y más del 92% de su

potencial antioxidante (Spáčil et al. 2010, Van Der Hoof et al. 2012, Lorenzo y Munekata 2016). Los principales flavanoles del té verde son las catequinas, que incluyen la epigallocatequina galato (EGCG), epigallocatequina (EGC), epicatequina galato (ECG), y epicatequina (EC) (Bhagwat y Beecher 2003, Reto et al. 2007). Samaniego-Sánchez et al. (2011) reportaron que infusiones prolongadas podían degradar el contenido fenólico, reduciendo de esta manera su actividad antioxidante; así mismo, Kodama et al. (2010) reportaron que aproximadamente el 84 % de la actividad antioxidante de sus muestras se solubilizó dentro de los primeros 5 minutos de infusión. En el presente estudio se empleó una extracción por infusión tradicional a 80 °C por 5 minutos, con la finalidad de reducir la degradación de las catequinas por largos periodos bajo altas temperaturas (Wang et al. 2006, Lončarić et al. 2018) y obtener una bebida de baja astringencia y amargor (Wang et al. 2000).

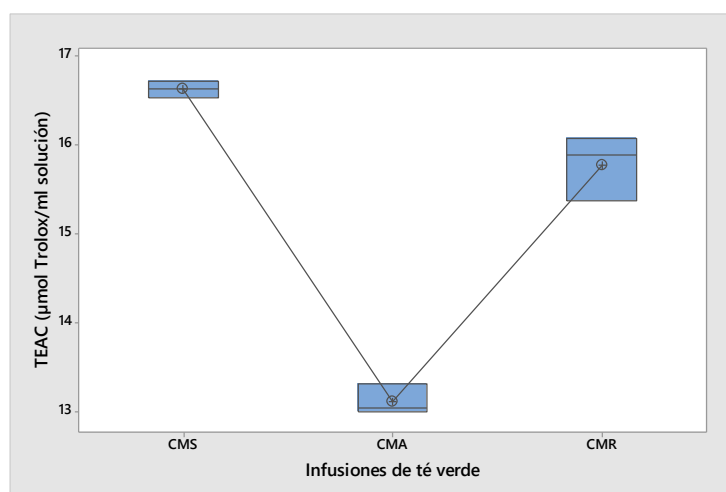


Figura 7. Diagrama de cajas del TPC de las infusiones de té verde: Té V (CMS), Té V/Alcalino (CMA), Té V/Radicales libres (CMR).

Para la determinación de la capacidad antioxidante se empleó el ensayo ABTS, el cual consiste en la reducción de la absorbancia por inhibición o reducción del radical ABTS⁺ por parte de la muestra (Rock 2005). Los resultados fueron expresados en porcentaje de inhibición del radical y valores TEAC o equivalentes trolox, según se observa en la Tabla 4. Los mayores valores promedio de TEAC e inhibición de los controles (Figura 7) fueron alcanzados por la muestra de té verde sin tratamiento (CMS), con 923.65 un trolox/g y 52.6%, seguido por CMR con 876.12 un trolox/g y 50.0% y finalmente CMA con 728.34 µn trolox/g y 41.8%. Estos resultados se corresponden con los valores de TPC descritos anteriormente, siendo CMA la más baja, posiblemente por la oxidación de las catequinas a pH alto (Zhu et al. 1997). Otros autores como Zhao et al. (2019) y Ramírez-Aristizabal et al. (2015) reportaron mayores valores de TEAC, 1935 µmol/g y 1772 µg/g respectivamente;

mientras que Rodrigo Rojas (2019), quien empleó un ecotipo similar al de este estudio, obtuvo un menor valor (53.5 $\mu\text{mol/g}$). Esta amplia variabilidad de la capacidad antioxidante del té verde podría deberse al tipo de extracción, pulverizado de muestras y temperatura de infusión aplicados en cada estudio (Castiglioni et al. 2015).

Tabla 4: Tabla resumen de los resultados obtenidos en los ensayos TPC y Antioxidante ABTS

	Capacidades Antioxidantes			Contenido Fenólico Total	
	% de Inhibición ABTS+	TEAC (μmol Trolox/ml solución)	TEAC (μmol Trolox/g hebras)	TPC (mg GAE/ml) en solución	TPC (mg GAE/g) en materia seca
CMS: Té verde	52.6%	16.63 ^a	1007.62	1.41 ^a	85.41
CMA: Té verde alcalino	41.8%	13.11 ^b	794.56	0.86 ^b	52.29
CMR: Té verde Radical	50.0%	15.77 ^c	955.77	1.37 ^a	82.82
MS: Mezcla simple	49.6%	15.66 ^d	949.17	1.22 ^c	74.02
MA: Mezcla alcalina	39.9%	12.49 ^e	756.85	0.66 ^b	40.16
MR: Mezcla Radicales libres	54.2%	17.15 ^f	1039.67	1.5 ^d	90.69
(CS) Extracto de Cushuro Simple	9.9%	0.68 ^e	24.47	0.03 ^e	1.17
(CA) Extracto de Cushuro Alcalino	8.9%	0.60 ^e	21.53	0.03 ^e	1.06
(CR) Extracto de Cushuro radical	13.8%	0.99 ^h	35.95	0.04 ^f	1.61

Las muestras con diferentes superíndices fueron significativamente diferentes ($P < 0,05$)

El extracto proteico de cushuro (CS) mostró actividad antioxidante al igual que CA y CR, sin embargo, con CA no se obtuvieron diferencias significativas mientras que el método radical libres (CR) obtuvo la mayor inhibición y valores TEAC (Figura 8). Estos resultados se corresponden con lo descrito en el ensayo TPC (Tabla 4), lo cual podría deberse a restos de polifenoles en el extracto, como se mencionó anteriormente, o por una actividad antioxidante propia de las proteínas o péptidos del cushuro. Galetovic et al. (2017) reportaron presencia de metionina, tirosina y lisina en muestras de cushuro, aminoácidos que han demostrado tener actividad antioxidante en péptidos y de forma independiente (Matsui et al. 2018). Así también, se han identificado compuestos con actividad antioxidante en otras especies de Nostoc, como por ejemplo los aminoácidos tipo micosporina encargados de brindar una actividad fotoprotectora UV (Matsui et al. 2011, Rastogi et al. 2016). Sin embargo, el alcance de este estudio no permitió identificar los compuestos del extracto proteico involucrados en la actividad antioxidante, ni el efecto potenciador que parece generar el método de radicales libres sobre estos.

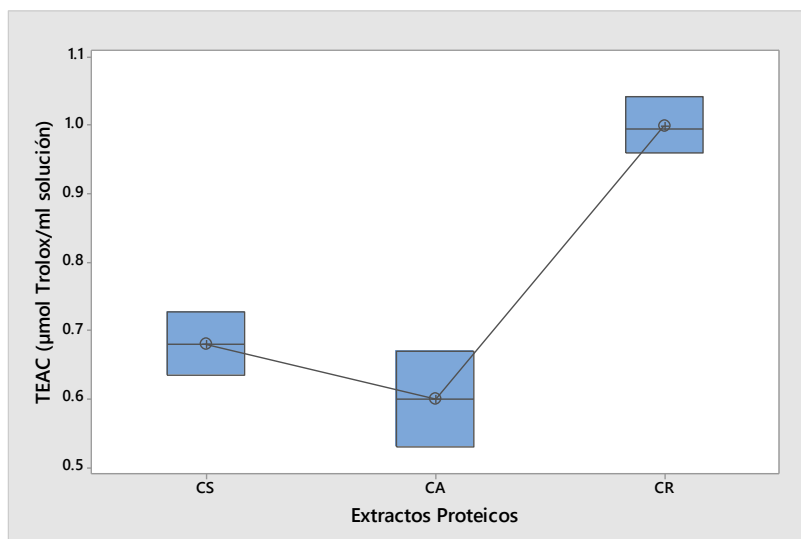


Figura 8. Diagrama de cajas de ensayo ABTS de los extractos proteicos de cushuro: Simple (CS), Alcalino (CA), Radicales libres (CR)

Diferentes estudios han evaluado el efecto de mezclar proteínas y polifenoles, ya sea en soluciones mixtas o en sustancias purificadas (Benjakul et al. 2021). Las mezclas de proteínas de la leche con té verde han producido resultados variados en cuanto a la capacidad antioxidante, dependiendo del tipo de leche y los ensayos empleados, se han presentado efectos neutros, potenciadores y en su mayor parte debilitantes o inhibitorios, principalmente por un enmascaramiento de los compuestos fenólicos (Leenen et al. 2000, Dubeau et al. 2010, Rashidinejad et al. 2017, Chanphai et al. 2017). Sin embargo, otro tipo de mezclas como las de leche de vaca con café o leche de soya con té negro, han mostrado mejoras significativas en relación a su capacidad antioxidante (Ryan y Sutherland 2011, B. Al-Ghafari et al. 2017). Ello refuerza la hipótesis que la naturaleza y tipo de proteínas/polifenoles que interactúen influirá con en la actividad antioxidante de la mezcla (Quan et al. 2019, Dai et al. 2019). También se ha evaluado el efecto independiente de diversas proteínas en conjugación con distintos tipos de catequinas, obteniéndose aumentos de la capacidad antioxidante y adicionalmente efectos como mejora de la biodisponibilidad, inhibición de la peroxidación lipídica, variación del punto isoelectrico, entre otros (You et al. 2014, Feng et al. 2017, Gu et al. 2017, Zagury et al. 2019).

En el presente estudio se evaluó el efecto de la adición de un extracto proteico de cushuro a una infusión de té verde. La mezcla simple (MS) se preparó emulando una mezcla casera sin una posterior separación entre compuestos libres y conjugados, lo cual posiblemente influyó la formación de enlaces no covalentes entre proteína y polifenol (Gu et al. 2017). Además, se aplicaron los métodos alcalino y de radicales libres, los cuales propician las

formación de complejos covalentes en las mezclas (You et al. 2014, Benjakul et al. 2021). Los resultados mostraron diferencias significativas entre cada mezcla y su respectivo control, así también, se observaron patrones similares a los observados en el ensayo TPC, siendo MR la que obtuvo mayor concentración TEAC (1039.67 μ n/g) y porcentaje de inhibición (54.2%), seguida de MS (949.17 μ n/g y 49.6%, respectivamente) y finalmente MA (756.85 μ n/g y 39.9%, respectivamente) (Figura 9 y Tabla 4). Este resultado sugeriría la existencia de un efecto sinérgico entre los polifenoles del té y las proteínas del cushuro a condiciones de radicales libres, perfilándose como una mezcla de interés para la industria alimentaria y farmacológica. Ello se corresponde con lo obtenido por Gu et al. 2017 y Feng et al. 2018, quienes documentaron que los conjugados resultantes, inducidos por radicales libres, exhibieron una mayor actividad antioxidante que los formados por el método alcalino. Además, se podría evidenciar que en todas las mezclas hubo formación de complejos, lo cual se observa en la reducción del contenido TPC y actividad antioxidante por un posible efecto de enmascaramiento; que se produciría por la disminución de los grupos hidroxilo disponibles luego de las uniones con las proteínas (Tajmir-Riahi et al. 2010, Avan et al. 2016, Quan et al. 2019). Si bien este trabajo no se enfocó en caracterizar la naturaleza de los complejos formados, se puede inferir en base a otros estudios, que el orden de unión de los polifenoles en la mezcla fue el siguiente EGCG>ECG>EC>C, ya que este aumenta en función al número de grupos OH del compuesto (Kanakakis et al. 2011).

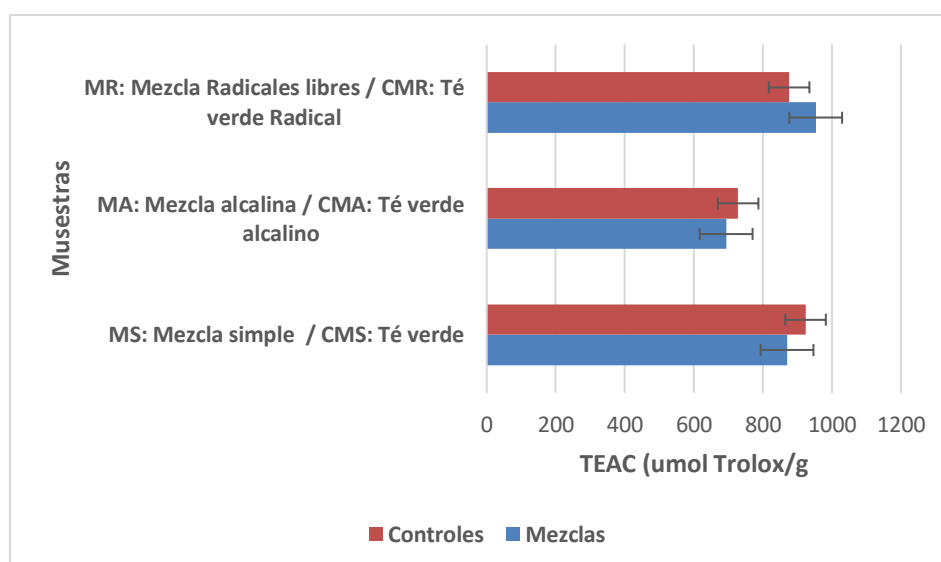


Figura 9. Gráfico de barras comparativo de capacidad antioxidante: Mezclas vs Controles

V. CONCLUSIONES

1. La mezcla simple (MS) generó un ligero efecto de enmascaramiento del contenido fenólico total. Por su parte la mezcla alcalina (MA) presentó los menores valores de TPC y no obtuvo diferencias significativas respecto a su control. Por otro lado, la mezcla de radicales libres si incrementa el valor de TPC.
2. La mezcla entre un extracto proteico de cushuro con infusión de té verde modificó la capacidad antioxidante de esta última; produciéndose tanto un efecto potenciador como inhibitorio, los cuales dependieron del método de mezcla utilizado. La mezcla de radicales libres, de forma análoga al ensayo TPC, generó la mayor capacidad antioxidante de todas las muestras, superando incluso a la infusión sin tratamiento (CMS). Por el contrario, las mezclas simple y alcalina generan reducción de la actividad antioxidante.
3. Debido a que la mezcla de radicales libres presentó un efecto sinérgico en cuanto a su actividad antioxidante, podría proponerse como una mezcla potencial para ser usada en el sector alimentario y farmacológico.

VI. RECOMENDACIONES

1. Se recomienda una caracterización de las proteínas del cushuro y su posterior evaluación bajo condiciones de radicales libres. Ello con el fin de describir el efecto potenciador visto en la determinación fenólica y antioxidante.
2. Se recomiendan estudios más detallados para la identificación de los grupos funcionales involucrados en las uniones proteína/polifenol, las estructuras formadas y el tipo de enlaces predominantes.
3. Se recomienda evaluar otras propiedades de interés para la mezcla radicales libres, como, por ejemplo: emulsificante, mejora de la biodisponibilidad, capacidad de gelatinización, etc.
4. Finalmente, se recomiendan estudios individuales entre los principales polifenoles del té verde y proteínas específicas del cushuro con actividades de interés.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- AOAC (Association of Official Agricultural Chemists). (1984). Official Methods of Analysis. Kjeldahl method (2.062). 14th edition. Washington D.C., USA.
- Alabe-Pajares, A. (1969). Cuschuro, algas azul-verdes utilizadas como alimento en la región altoandina peruana. *Bol. Soc. Bot.* 1(2): 9–22.
- Alavi, F.; Emam-Djomeh, Z.; Momen, S.; Mohammadian, M.; Salami, M. & Moosavi-Movahedi, A.A. (2019). Effect of free radical-induced aggregation on physicochemical and interface-related functionality of egg white protein. *Food Hydrocolloids* 87: 734–746.
- Ali, H. 2002. Protein-Phenolic Interactions in Food
- Almajano, MP; Delgado, ME; Gordon, MH. (2006). Changes in the antioxidant properties of protein solutions in the presence of epigallocatechin gallate. *Food Chemistry* 101(1): 126–130.
- Altermann, C.D.C.; Souza, M.A.; Schimidt, H.L.; Izaguirry, A.P.; Martins, A.; Garcia, A.; Santos, F.W. & Mello-Carpes, P.B. (2017). Short-term green tea supplementation prevents recognition memory deficits and ameliorates hippocampal oxidative stress induced by different stroke models in rats. *Brain Research Bulletin* 2017.
- Arts, M.J.T.J.; Haenen, G.R.M.M.; Voss, H. & Bast, A. (2001). Masking of antioxidant capacity by the interaction of flavonoids.pdf. 39: 787–791.
- Avan, A.N.; Çekiç, S.D.; Uzunboy, S.; Apak, R. (2016). Spectrophotometric determination of phenolic antioxidants in the presence of thiols and proteins. *International Journal of Molecular Sciences* 17(8): 1–16.
- Al-Ghafari, A. B., Alharbi, R. H., Al-Jehani, M. M., Bujeir, S. A., Al Doghaither, H. A., & Omar, U. M. (2017). The effect of adding different concentrations of cows' milk on the antioxidant properties of coffee. *Biosciences Biotechnology Research Asia*, 14(1), 177-184.

- Benjakul, S., Singh, A., Chotphruethipong, L., & Mittal, A. (2021). Protein-polyphenol conjugates: Preparation, functional properties, bioactivities and applications in foods and nutraceuticals. In *Advances in Food and Nutrition Research* (Vol. 98, pp. 281-320). Academic Press.
- Bhagwat, S. & Beecher, G. (2003). Flavonoid composition of tea: Comparison of black and green teas. *Agricultural Research ...* 15(2001): 20705.
- Bornet, É. & Flahault, C. (1886). Revision des Nostocacées hétérocystées contenues dans les principaux herbiers de France. *Annales des Sciences Naturelles Septième Série* 7: 177–262.
- Brudzynski, K.; Sjaarda, C. & Maldonado-Alvarez, L. (2013). A New Look on Protein-Polyphenol Complexation during Honey Storage: Is This a Random or Organized Event with the Help of Dirigent-Like Proteins? *PLoS ONE* 8(8): e72897.
- Bushman, J.L. (2016). A review of the literature Green Tea and Cancer in Humans. 5581(July): 37–41.
- Cabrera, C.; Artacho, R. & Giménez, R. (2006). Beneficial Effects of Green Tea—A Review. *Journal of the American College of Nutrition* 25(2): 79–99.
- Casado, M. (2007). Modelos animales en el estudio de la diabetes Animal models in diabetes research. *Av Diabetol* 23(6): 432–438.
- Cascella, M.; Bimonte, S.; Muzio, M.R.; Schiavone, V. & Cuomo, A. (2017). The efficacy of Epigallocatechin-3-gallate (green tea) in the treatment of Alzheimer’s disease: an overview of pre-clinical studies and translational perspectives in clinical practice. *Infectious agents and cancer* 12: 36.
- Castiglioni, S.; Damiani, E.; Astolfi, P. & Carloni, P. (2015). Influence of steeping conditions (time, temperature, and particle size) on antioxidant properties and sensory attributes of some white and green teas. *International journal of food sciences and nutrition* 66(5): 491–497.
- Catunta Cachi, R.E. (2012). Extracto del té verde (*Camellia sinensis*) en la termorregulación de ratas albinas obesas (Holtzman). s.l.,
- Chanphai, P.; Bourassa, P.; Kanakis, C.D.; Tarantilis, P.A.; Polissiou, M.G. & Tajmir-Riahi, H.A. (2017). Review on the loading efficacy of dietary tea polyphenols with milk proteins. *Food Hydrocolloids* 77: 322–328.

- Chanphai, P. & Tajmir-Riahi, H.A. (2019). Tea polyphenols bind serum albumins: A potential application for polyphenol delivery. *Food Hydrocolloids* 89: 461–467.
- Chávez Hidalgo, L. (2014). “ Composición química y actividad antioxidante in vitro del extracto acuoso de *Nostoc sphaericum* (Cushuro), laguna Cushurococha – Junín ”.
- Chen, Z.; Pettinger, M.B.; Ritenbaugh, C.; LaCroix, A.Z.; Robbins, J.; Caans, B.J.; Barad, D.H. & Hakim, I.A. (2003). Habitual tea consumption and risk of osteoporosis: A prospective study in the women’s health initiative observational cohort. *American Journal of Epidemiology* 158(8): 772–781.
- Chen, Z.; Zhu, Q.Y.; Wong, Y.F.; Zhang, Z. & Chung, H.Y. (1998). Stabilizing Effect of Ascorbic Acid on Green Tea Catechins. *8561(97): 2512–2516*.
- Chow, H. S., Hakim, I. A., Vining, D. R., Crowell, J. A., Ranger-Moore, J., Chew, W. M., Celaya, C.A.; Rodney, S.R.; Hara, Y. & Alberts, D. S. (2005). Effects of dosing condition on the oral bioavailability of green tea catechins after single-dose administration of Polyphenon E in healthy individuals. *Clinical cancer research*, 11(12), 4627-4633.
- Coelho, K.Y., de Oliveira, A.A., Brumano, M.H.N., & Fidelis, P.C. (2020). Stability of total phenolic and antioxidant capacity in ready-to-drink black and green tea formulations. *Research, Society and Development*, 9(10), e219108160.
- Cooper, R.; Morr , D.J. & Morr , D.M. (2005). Medicinal Benefits of Green Tea: Part I. Review of Noncancer Health Benefits. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine* 11(3): 521–528.
- Dai, T.; Chen, J.; McClements, D.J.; Hu, P.; Ye, X.; Liu, C. & Li, T. (2019). Function Protein – polyphenol interactions enhance the antioxidant capacity of phenolics : analysis of rice glutelin – procyanidin dimer interactions. 765–774.
- Davies, K.J.; Lin, S.W. & Pacifici, R.E. (1987). Protein damage and degradation by oxygen radicals. IV. Degradation of denatured protein. *Journal of Biological Chemistry* 262(20): 9914–9920.
- Dorsey, T.E.; McDonald, P.W. & Roels, O.A. (1977). A heated biuret-Folin protein assay which gives equal absorbance with different proteins. *Analytical Biochemistry* 78(1): 156–164.
- Dubeau, S.; Samson, G. & Tajmir-Riahi, H.A. (2010). Dual effect of milk on the antioxidant

- capacity of green, Darjeeling, and English breakfast teas. *Food Chemistry* 122(3): 539–545.
- Ehling-schulz, M. & Scherer, S. (1999). UV protection in cyanobacteria. no.October.
- Enari, L. (1976). Tea [History of *Camellia sinensis* introduction, culture and processing]. LASCA Leaves - Los Angeles State and County Arboretum (USA).
- Everette, J.D., Bryant, Q.M., Green, A.M., Abbey, Y.A., Wangila, G.W., & Walker, R.B. (2010). Thorough study of reactivity of various compound classes toward the Folin– Ciocalteu reagent. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(14), 8139-8144.
- Faiz, N; Vishnu, P V; R, G. 2018. The health effects of green tea. 9(2): 423–426.
- Feng, J; Cai, H; Wang, H; Li, C; Liu, S. 2017. Improved Oxidative Stability of Fish Oil Emulsion by Grafted Ovalbumin-Catechin Conjugates. *Food Chemistry* 2017.
- Feng, J., Cai, H., Wang, H., Li, C., & Liu, S. (2018). Improved oxidative stability of fish oil emulsion by grafted ovalbumin-catechin conjugates. *Food Chemistry*, 241, 60-69.
- Fernández, W. & Suyón, G.S. (2018). Universidad Nacional Mayor de San Marcos Efecto del secado convectivo en el valor nutricional , compuestos bioactivos y capacidad antioxidante in vitro del *Nostoc sphaericum* Vaucher ex Bornet & Flahault “cushuro ” procedente de Recuay Para optar el Títul. s.l.,
- Fidor, A.; Konkel, R. & Mazur-Marzec, H. (2019). Bioactive peptides produced by cyanobacteria of the genus *Nostoc*: A review. *Marine Drugs* 17(10): 1–16.
- Folin, O. & Ciocalteu, V. (1927). On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. *The Journal of Biological Chemistry* LXXIII(2): 627–648.
- Folin, O., & Ciocalteu, V. (1927). On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. *J. biol. Chem*, 73(2), 627-650.
- Frazier, R.A.; Deaville, E.R.; Green, R.J.; Stringano, E.; Willoughby, I.; Plant, J. & Mueller-Harvey, I. (2010). Interactions of tea tannins and condensed tannins with proteins. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 51(2): 490–495.
- Galetovic, A.; Araya, J.E. & Gómez-Silva, B. (2017). Composición bioquímica y toxicidad de colonias comestibles de la cianobacteria andina *Nostoc* sp. Llayta. *Revista chilena de nutrición* 44(4): 360–370.

- Gantar, M. & Svirčev, Z. (2008). Microalgae and cyanobacteria: food for thought. *Journal of Phycology* 44(2): 260–268.
- Graham, H.N. (1992). Green tea composition, consumption, and polyphenol chemistry. *Preventive Medicine* 21(3): 334–350.
- Green, R.J.; Murphy, A.S.; Schulz, B.; Watkins, B.A. & Ferruzzi, M.G. (2007). Common tea formulations modulate in vitro digestive recovery of green tea catechins. *Molecular Nutrition and Food Research* 51(9): 1152–1162.
- Gu, L.; Peng, N.; Chang, C.; McClements, D.J. & Su, Y. (2017). Fabrication of Surface-Active Antioxidant Food Biopolymers : Conjugation of Catechin Polymers to Egg White Proteins.
- Hadnadjev, M.; Dapcevic-Hadnadjev, T.; Pojic, M.; Sakac, M.; Jovanov, P.; Saric, B. & Misan, A. (2017). Progress in vegetable proteins isolation techniques: A review. *Food and Feed Research* 44(1): 11–21.
- Hagerman, A.E.; Rice, M.E. & Ritchard, N.T. (1998). Mechanisms of Protein Precipitation for Two Tannins , Pentagalloyl Glucose and Epicatechin 16 (4 f 8) Catechin (Procyanidin). 16(97): 2590–2595.
- Han, Y.; Lin, Z.; Zhou, J.; Yun, G.; Guo, R.; Richardson, J.J. & Caruso, F. 2020. Polyphenol-Mediated Assembly of Proteins for Engineering Functional Materials. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* 59(36): 15618–15625.
- Harada, M.; Kan, Y.; Naoki, H.; Fukui, Y.; Kageyama, N.; Nakai, M.; Miki, W. & Kiso, Y. (1999). Identification of the Major Antioxidative Metabolites in Biological Fluids of the Rat with Ingested (+)-Catechin and (-)-Epicatechin. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 63(6): 973–977.
- Hill, D.R.; Hladun, S.L.; Scherer, S. & Potts, M. (1994). Water stress proteins of *Nostoc commune* (Cyanobacteria) are secreted with UV-A/B-absorbing pigments and associate with 1,4-beta-D-xylanxylanohydrolase activity. *The Journal of biological chemistry* 269(10): 7726–34.
- Van der Hooft, J.J., Akermi, M., Ünlü, F.Y., Mihaleva, V., Roldan, V.G., Bino, R.J., ... & Vervoort, J. (2012). Structural annotation and elucidation of conjugated phenolic compounds in black, green, and white tea extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(36), 8841-8850.

- Iso, H., Date, C., Wakai, K., Fukui, M., Tamakoshi, A., & JACC Study Group*. (2006). The relationship between green tea and total caffeine intake and risk for self-reported type 2 diabetes among Japanese adults. *Annals of internal medicine*, 144(8), 554-562.
- ITIS Report. (2011). ITIS Standard Report Page: *Camellia sinensis*. Consultado 3 abr. 2019. Disponible en https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt.jsessionid=FEE4EA275B93F12D8A3F0E4A6E73718A?search_topic=TSN&search_value=506801#null (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze, Taxonomic Serial No.: 506801).
- Jakobek, L. (2015). Interactions of polyphenols with carbohydrates, lipids and proteins. *Food Chemistry* 175: 556–567.
- Jang, J.; Park, Y.; Ahn, H.; Kim, S.; Lee, J.; Kim, E.; Chang, Y.; Song, Y. & Kwon, H. 2014. Analysis of Green Tea Compounds and Their Stability in Dentifrices of Different pH Levels. 62(4): 328–335.
- Jankun, J.; Selman, S.H.; Swiercz, R. & Skrzypczak-Jankun, E. (1997). Why drinking green tea could prevent cancer. *Nature* 387(6633): 561–561.
- Kanakis, C.D.; Hasni, I.; Bourassa, P.; Tarantilis, P.A.; Polissiou, M.G. & Tajmir-Riahi, H.A. (2011). Milk β -lactoglobulin complexes with tea polyphenols. *Food Chemistry* 127(3): 1046–1055.
- Kang, W.; Chung, K.; Chung, J.; Lee, J.; Park, J.; Zhang, Y.; Yoo, H. & Yun, Y. (2001). Antiplatelet Activity of Green Tea Catechins Is Mediated by Inhibition of Cytoplasmic Calcium Increase. no.2: 875–884.
- Kao, Y.H., Hiipakka, R.A., & Liao, S. (2000). Modulation of endocrine systems and food intake by green tea epigallocatechin gallate. *Endocrinology*, 141(3), 980-987.
- Katalinic, V.; Modun, D.; Music, I. & Boban, M. (2005). Gender differences in antioxidant capacity of rat tissues determined by 2,2V-azinobis (3-ethylbenzothiazoline 6-sulfonate; ABTS) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays. *Comparative Biochemistry and Physiology* 140(1): 47 – 52.
- Khan, N. & Mukhtar, H. (2013). Tea and health: studies in humans. *Current pharmaceutical design* 19(34): 6141–7.
- Kodama, D.H., Gonçalves, A.E.D.S.S., Lajolo, F.M., & Genovese, M.I. (2010). Flavonoids,

total phenolics and antioxidant capacity: comparison between commercial green tea preparations. *Food Science and Technology*, 30, 1077-1082.

Komes, D.; Horžić, D.; Belščak, A.; Ganić, K.K. & Vulić, I. (2010). Green tea preparation and its influence on the content of bioactive compounds. *Food Research International* 43(1): 167–176.

Lee, L.S.; Kim, S.H. & Young-Boong. (2017). Quantitative Analysis of Major Constituents in Green Tea with Different Plucking Periods and Their Antioxidant Activity. *Advances in Modelling and Analysis A* 78(3): 316–336.

Leenen, R.; Roodenburg, A.J.C.; Tijburg, L.B.M. & Wiseman, S.A. (2000). A single dose of tea with or without milk increases plasma antioxidant activity in humans. *European Journal of Clinical Nutrition* 2000 54:1 54(1): 87–92.

Li, Y.; He, D.; Li, B.; Lund, M.N.; Xing, Y.; Wang, Y.; Li, F.; Cao, X.; Liu, Y.; Chen, X.; Yu, J.; Zhu, J.; Zhang, M.; Wang, Q.; Zhang, Y.; Li, B.; Wang, J.; Xing, X. & Li, L. (2021). Engineering polyphenols with biological functions via polyphenol-protein interactions as additives for functional foods. *Trends in Food Science and Technology* 110(February): 470–482.

Li, Z. & Guo, M. (2017). Healthy efficacy of *Nostoc commune* Vaucher. *Oncotarget* 9(18): 14669–14679.

Liu, J.; Yong, H.; Yao, X.; Hu, H.; Yun, D. & Xiao, L. (2019). Recent advances in phenolic-protein conjugates: Synthesis, characterization, biological activities and potential applications. *RSC Advances* 9(61): 35825–35840.

Lončarić, A.; Pablo Lamas, J.; Guerra, E.; Kopjar, M. & Lores, M. (2018). Thermal stability of catechin and epicatechin upon disaccharides addition. *International Journal of Food Science & Technology* 53(5): 1195–1202.

Longuet-Higgins, M.S. (1961). Cancer preventive effects of flavonoid. *Ocean Wave Spectra* 56: 111–136.

Lorenzo, J.M. & Munekata, P.E.S. (2016). Phenolic compounds of green tea: Health benefits and technological application in food. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 6(8): 709–719.

Lorenzo, J. M., & Munekata, P. E. S. (2016). Phenolic compounds of green tea: Health benefits and technological application in food. *Asian Pacific Journal of Tropical*

Biomedicine, 6(8), 709-719.

- Matsui, K.; Nazifi, E.; Kunita, S.; Wada, N.; Matsugo, S. & Sakamoto, T. (2011). Novel glycosylated mycosporine-like amino acids with radical scavenging activity from the cyanobacterium *Nostoc commune*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 105(1): 81–89.
- Matsui, R.; Honda, R.; Kanome, M.; Hagiwara, A.; Matsuda, Y.; Togitani, T.; Ikemoto, N. & Terashima, M. (2018). Designing antioxidant peptides based on the antioxidant properties of the amino acid side-chains. *Food Chemistry* 245: 750–755.
- Nowruzi, B.; Haghghat, S.; Fahimi, H. & Mohammadi, E. (2018). *Nostoc* cyanobacteria species: a new and rich source of novel bioactive compounds with pharmaceutical potential. *Journal of Pharmaceutical Health Services Research* 9(1): 5–12.
- Okamoto, M.; Leung, K.P.; Ansai, T.; Sugimoto, A. & Maeda, N. (2003). Inhibitory effects of green tea catechins on protein tyrosine phosphatase in *Prevotella intermedia*. *Oral Microbiology and Immunology* 18(3): 192–195.
- Ozdal, T.; Capanoglu, E. & Altay, F. (2013). A review on protein-phenolic interactions and associated changes. *Food Research International* 51(2): 954–970.
- Papadopoulou, A.; Frazier, R.A. (2004). Characterization of protein-polyphenol interactions. *Trends in Food Science and Technology* 15(3–4): 186–190.
- Fernández, P.L., Pablos, F., Martín, M.J., & González, A.G. (2002). Study of catechin and xanthine tea profiles as geographical tracers. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(7), 1833-1839.
- Ponce, E. (2014). *Nostoc*: un alimento diferente y su presencia en la precordillera de Arica. *Nostoc: A different food and their presence in the precordillera of Arica*. 32(2).
- Poore, J. & Nemecek, T. (2018). Reducing food's environmental impacts through producers and consumers. *Science (New York, N.Y.)* 360(6392): 987–992.
- Quan, T.H.; Benjakul, S.; Sae-leaw, T. & Khansaheb, A. (2019). Trends in Food Science & Technology Protein – polyphenol conjugates : Antioxidant property , functionalities and their applications. *Trends in Food Science & Technology* 91(June): 507–517.
- Quineche Valladares, D.A. & Valle Mendoza, J.J. (2014). Elaboración y digestibilidad in vitro de gel proteico de cushuro (*Nostoc sphaericum vaucher*) y linaza (*Linum*

- usitatissimum L.). Huacho, Universidad Nacional José Faustino Sánchez Carrión.
- Ramírez-Aristizabal, L.S.; Ortiz, A. & Ospina-Ocampo, L.F. (2015). Evaluation of the antioxidant capacity and characterization of phenolic compounds obtained from tea (*Camellia sinensis*) for products of different brands sold in Colombia. *Pharmacologyonline* 3(2015-DECEMBER): 149–159.
- Rashidinejad, A.; Birch, E.J.; Sun-Waterhouse, D. & Everett, D.W. (2017). Addition of milk to tea infusions: Helpful or harmful? Evidence from in vitro and in vivo studies on antioxidant properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 57(15): 3188–3196.
- Rastogi, R.P.; Sonani, R.R.; Madamwar, D. & Incharoensakdi, A. (2016). Characterization and antioxidant functions of mycosporine-like amino acids in the cyanobacterium *Nostoc* sp. R76DM. *Algal Research* 16: 110–118.
- Record, I.R. & Lane, J.M. (2001). Simulated intestinal digestion of green and black teas. *Food Chemistry* 73(4): 481–486.
- Reto, M.; Figueira, M.E.; Filipe, H.M. & Almeida, C.M.M. (2007). Chemical composition of green tea (*Camellia sinensis*) infusions commercialized in Portugal. *Plant Foods for Human Nutrition* 62(4): 139–144.
- Ribas-Agustí, A.; Martín-Belloso, O.; Soliva-Fortuny, R. & Elez-Martínez, P. (2018). Food processing strategies to enhance phenolic compounds bioaccessibility and bioavailability in plant-based foods. *Critical reviews in food science and nutrition* 58(15): 2531–2548.
- Riemersma, R.A.; Tyrrell, R.M. & Clifford, M.N. (2001). QJM Tea flavonoids and cardiovascular health. *no.Figure 1: 277–282.*
- Rock, L. (2005). *Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements*. 2005.
- Rodrigo Rojas, M.E. (2019). *Actividad antioxidante del té verde nacional como prototipo de análisis para otros cultivos de clima tropical húmedo del Perú*. 2019.
- Rosales-loaiza, N.; Díaz, L.; Aiello-mazzarri, C. & Avendaño, E.M. (2017). Cultivos a cielo abierto de las cianobacterias *Nostoc* LAUN0015 y *Anabaena* MOF015 para la producción de biomasa enriquecida . *Pruebas piloto para cultivos masivos*. 48(3): 81–86.

- Ryan, L. & Sutherland, S. (2011). Comparison of the effects of different types of soya milk on the total antioxidant capacity of black tea infusions. *Food Research International* 44(9): 3115–3117.
- Samaniego-Sánchez, C., Inurreta-Salinas, Y., Quesada-Granados, J.J., Blanca-Herrera, R., Villalón-Mir, M., de la Serrana, H.L. G., & Martínez, M.L. (2011). The influence of domestic culinary processes on the Trolox Equivalent Antioxidant Capacity of green tea infusions. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24(1), 79-86.
- Sand-Jensen, K. (2014). Ecophysiology of gelatinous Nostoc colonies: unprecedented slow growth and survival in resource-poor and harsh environments. *Annals of botany* 114(1): 17–33.
- Schroeter, H.; Spencer, J.P.; Rice-Evans, C. & Williams, R.J. (2001). Flavonoids protect neurons from oxidized low-density-lipoprotein-induced apoptosis involving c-Jun N-terminal kinase (JNK), c-Jun and caspase-3. *The Biochemical journal* 358(Pt 3): 547–57.
- Shen, C-L; Yeh, JK; Cao, JJ; Wang, J-S. 2009. Green tea and bone metabolism. *Nutrition research (New York, N.Y.)* 29(7): 437–56.
- Singleton, V.L. & Rossi, J.A. (1965). Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. s.l., American Society of Enologists, v.16, 144–158.
- Spáčil, Z.; Nováková, L. & Solich, P. (2010). Comparison of positive and negative ion detection of tea catechins using tandem mass spectrometry and ultra high performance liquid chromatography. *Food Chemistry* 123(2): 535–541.
- von Staszewski, M., Jara, F.L., Ruiz, A.L., Jagus, R.J., Carvalho, J.E., & Pilosof, A.M. (2012). Nanocomplex formation between β -lactoglobulin or caseinomacropeptide and green tea polyphenols: Impact on protein gelation and polyphenols antiproliferative activity. *Journal of Functional Foods*, 4(4), 800-809.
- Stojadinovic, M., Radosavljevic, J., Ognjenovic, J., Vesic, J., Prodic, I., Stanic-Vucinic, D., & Velickovic, T.C. (2013). Binding affinity between dietary polyphenols and β -lactoglobulin negatively correlates with the protein susceptibility to digestion and total antioxidant activity of complexes formed. *Food chemistry*, 136(3-4), 1263-1271.

- Sun, C.L., Yuan, J.M., Koh, W.P., & Yu, M.C. (2006). Green tea, black tea and breast cancer risk: a meta-analysis of epidemiological studies. *Carcinogenesis*, 27(7), 1310-1315.
- Sutherland, B.A., Rahman, R.M., & Appleton, I. (2006). Mechanisms of action of green tea catechins, with a focus on ischemia-induced neurodegeneration. *The Journal of nutritional biochemistry*, 17(5), 291-306.
- Hasni, I., Bourassa, P., Hamdani, S., Samson, G., Carpentier, R., & Tajmir-Riahi, H.A. (2011). Interaction of milk α - and β -caseins with tea polyphenols. *Food chemistry*, 126(2), 630-639.
- Tan, YJ; Chen, BH; Yu, FL; Wang, HS; Wang, P.C. (Tea Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou, Z (China)). 1989. New species and new varieties of tea-trees in Yunnan, China. *International Camellia Journal* (United Kingdom).
- Tang, G.Y.; Zhao, C.N.; Xu, X.Y.; Gan, R.Y.; Cao, S.Y.; Liu, Q.; Shang, A.; Mao, Q.Q. & Li, H. Bin. (2019). Phytochemical composition and antioxidant capacity of 30 chinese teas. *Antioxidants* 8(6).
- Taylor, P.; Balentine, D.A.; Wiseman, S.A.; Bouwens, L.C.M.; Balentine, D.A.; Wiseman, S.A. ;& Bouwens, L.C.M. (2009). *Critical Reviews in Food Science and Nutrition: The chemistry of tea flavonoids*. *Food Science and Nutrition* no.June 2012: 37–41.
- Thongkaew, C.; Gibis, M.; Hinrichs, J. & Weiss, J. (2014). Polyphenol interactions with whey protein isolate and whey protein isolate-pectin coacervates. *Food Hydrocolloids* 41: 103–112.
- Vaidyanathan, J.B. & Walle, T. (2003). Cellular Uptake and Efflux of the Tea Flavonoid (-)Epicatechin-3-gallate in the Human Intestinal Cell Line Caco-2. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 307(2): 745–752.
- Vinci, G.; D'ascenzo, F.; Maddaloni, L.; Prencipe, S.A. & Tiradritti, M. (2022). The Influence of Green and Black Tea Infusion Parameters on Total Polyphenol Content and Antioxidant Activity by ABTS and DPPH Assays. *Beverages* 8(2).
- Wang, H.; Provan, G.J. & Helliwell, K. (2015). Tea flavonoids: their functions, utilisation and analysis. *11(2000): 1–6*.
- Wang, L.F.; Kim, D.M. & Lee, C.Y. (2000). Effects of heat processing and storage on flavanols and sensory qualities of green tea beverage. *Journal of Agricultural and*

- Food Chemistry 48(9): 4227–4232.
- Wang, R.; Zhou, W. & Wen, R.A.H. (2006). Kinetic Study of the Thermal Stability of Tea Catechins in Aqueous Systems Using a Microwave Reactor. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54(16): 5924–5932.
- Weinreb, O., Amit, T., Mandel, S., & Youdim, M. B. (2009). Neuroprotective molecular mechanisms of (–)-epigallocatechin-3-gallate: a reflective outcome of its antioxidant, iron chelating and neuritogenic properties. *Genes & nutrition*, 4(4), 283-296.
- Weisburger, J.H. (1997). Tea and health : a historical perspective. 114.
- Wolff, S.P.; Garner, A. & Dean, R.T. (1986). Free radicals, lipids and protein degradation. *Trends in Biochemical Sciences* 11(1): 27–31.
- Yang, D.J.; Hwang, L.S. & Lin, J.T. (2007). Effects of different steeping methods and storage on caffeine, catechins and gallic acid in bag tea infusions. *Journal of Chromatography A* 1156(1-2 SPEC. ISS.): 312–320.
- You, J.; Luo, Y. & Wu, J. (2014). Conjugation of ovotransferrin with catechin shows improved antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62(12): 2581–2587.
- Yucharoen, R.; Srisuksomwong, P. & Tragoolpua, Y. (2017). Nostoc commune Vaucher ex Bornet & Flahault Antibacterial and antioxidant activities of Nostoc commune Vaucher ex Bornet & Flahault. *RMUTT Journal* 53(7): 401–405.
- Yuksel, Z.; Avci, E. & Erdem, Y.K. (2010). Characterization of binding interactions between green tea flavanoids and milk proteins. *Food Chemistry* 121(2): 450–456.
- Zagury, Y.; Kazir, M. & Livney, Y.D. (2019). Improved antioxidant activity, bioaccessibility and bioavailability of EGCG by delivery in β -lactoglobulin particles. *Journal of Functional Foods* 52(July 2018): 121–130.
- Zhang, Z.; Li, X.; Sang, S.; McClements, D.J.; Chen, L.; Long, J.; Jiao, A.; Jin, Z. & Qiu, C. (2022). Polyphenols as Plant-Based Nutraceuticals: Health Effects, Encapsulation, Nano-Delivery, and Application. *Foods* 2022, Vol. 11, Page 2189 11(15): 2189.
- Zhao, C.N.; Tang, G.Y.; Cao, S.Y.; Xu, X.Y.; Gan, R.Y.; Liu, Q.; Mao, Q.Q.; Shang, A. & Li, H. Bin. (2019). Phenolic profiles and antioxidant activities of 30 tea infusions

from green, black, oolong, white, yellow and dark teas. *Antioxidants* 8(7): 9–13.

Zhu, Q.Y.; Zhang, A.; Tsang, D.; Huang, Y. & Chen, Z.Y. (1997). Stability of Green Tea Catechins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45(12): 4624–4628.

VIII. ANEXOS

Anexo 1: Obtención del extracto proteico del Cushuro (Concentrado proteico)

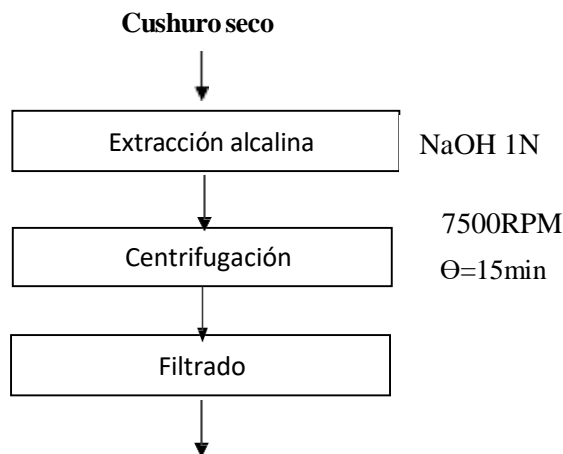
1.1. Determinación de la proteína soluble

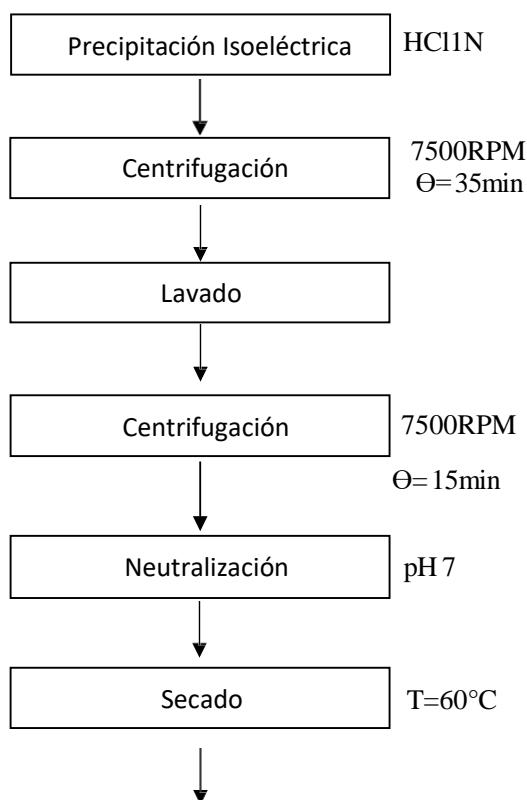
Se determinará la curva estándar de Lowry a una absorbancia de 750 nm. Se preparará una solución proteica de albúmina sérica de bovina de 0.5mg/ml en agua destilada y los reactivos A y B. El reactivo A, es una solución que se preparara con una mezcla de carbonato de sodio al 2 por ciento en NaOH al 0,1 con una solución de sulfato de cobre pentahidratado al 1% y una solución de tartrato de sodio al 1%; en una proporción 1:1. El reactivo B, es una solución que se preparara con el reactivo de folin-ciocalteu, al 1N.

Se realizará una curva de calibración en la cual se usarán diferentes volúmenes de la solución proteica como: 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6 ml, a la cual se le añadirá agua destilada hasta completar el 0,8 ml de volumen final. A esta solución se le añaden 4 ml de reactivo A más conocido como Lowry el cual estará en 10 minutos de oscuridad y 0.4 ml del reactivo B durante 30 minutos de oscuridad, donde se dará un cambio de color de amarillo a azul.

1.2. Esquema metodológico de extracción proteica del cushuro

Se empleó la siguiente metodología para extraer las proteínas del cushuro y obtener el extracto proteico.





Extracto proteico de cushuro

Flujo de operaciones para la extracción proteico de cushuro.

a. Extracción alcalina

Se utilizará NaOH 1N y 25 gramos de cushuro seco molido, donde se evaluará la relación materia prima: solvente (1:35; 1:55 y 1:75 g / ml); pH (8.5, 9.5, 10.5); con una temperatura (65°, 75° y 85° C) y un tiempo (40, 60 y 80 minutos) para la extracción de proteína.

b. Centrifugación

Luego de la extracción se realizará una centrifugación a 7500 rpm durante 15 minutos a temperatura ambiente, donde se eliminará el precipitado quedándonos con el sobrenadante.

c. Filtrado

Se realizará un filtrado a vacío para eliminar posibles partículas sólidas que no se hayan eliminado durante la centrifugación.

d. Precipitación

Se realizará la precipitación isoelectrica con HCl 1N a diferentes pH (4; 6; 8 y 10) para poder determinar la mayor extracción de proteína.

e. Centrifugación

Se realizará una centrifugación a 7500 rpm durante 30 minutos a temperatura ambiente, donde se eliminará el sobrenadante recuperando el precipitado.

f. Lavado

Se realizará un lavado con alcohol al 20% para poder disminuir el contenido de polifenoles inmediatamente se realizará un segundo lavado con agua destilada (1/10) con el objetivo de reducir posibles compuestos como azúcares reductores, sales y el resto de alcohol.

g. Centrifugado

Se realizará un centrifugado a 7500 rpm durante 15 minutos a temperatura ambiente, donde se deberá obtener un precipitado más puro que el inicial.

h. Neutralizado

Se realizará un neutralizado a pH 7 al precipitado que se obtendrá en la etapa anterior para poder realizar un secado.

i. Secado

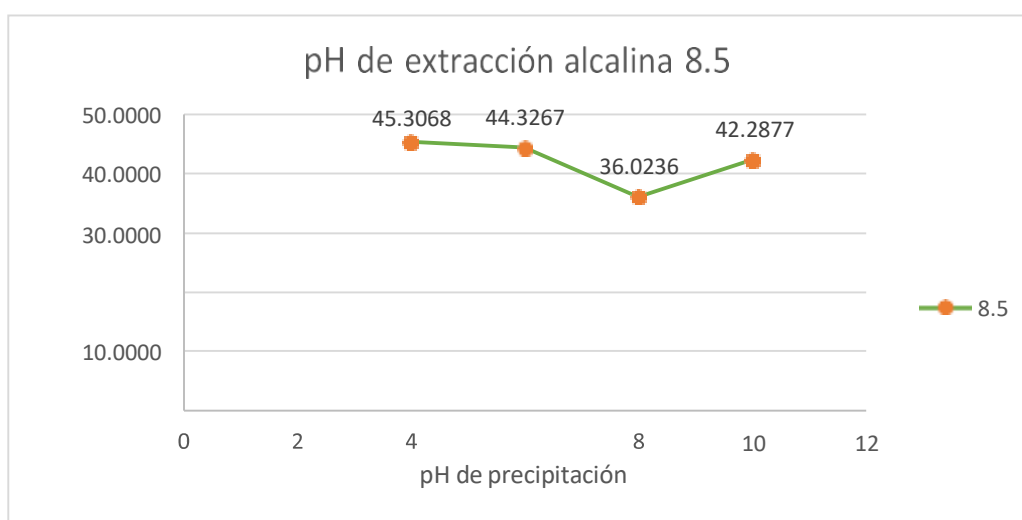
Se realizará un secado para poder obtener un extracto proteico del cushuro en forma de seca a 60°C durante 4 horas.

1.3. Resultados de la extracción proteica

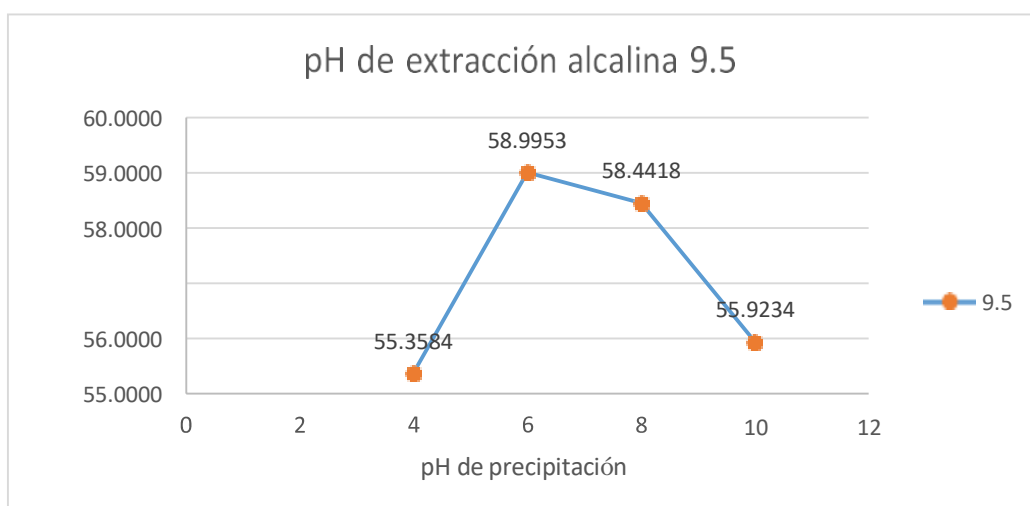
Se trabajó a tres medidas de pH para la extracción 8.5, 9.5 y 10.5 a una temperatura de 85°C con una relación materia prima: solvente de 1:35 durante una hora, luego se procedió a filtrar, en seguida a centrifugar a 7500rpm durante 15 minutos y se precipitó a cuatro medidas de pH diferentes de 4, 6, 8 y 10. El extracto se secó a 60°C durante 4 horas.

Se determinó por Kjendal el contenido de proteína bruta en estas muestras, obteniéndose lo siguiente:

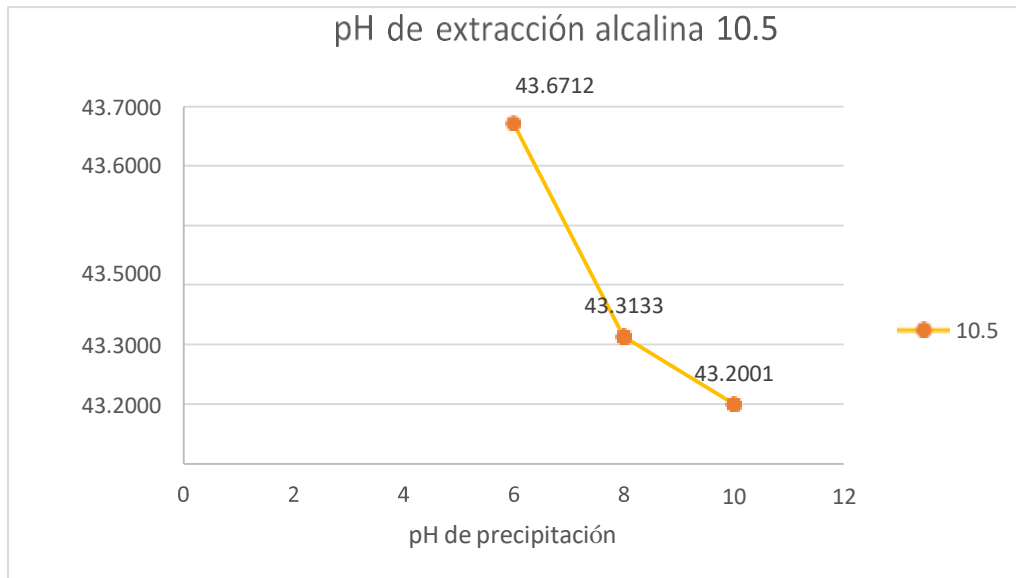
1.3. Curva de extracción de extracto proteico de cushuro a pH 8.5



1.4. Curva de extracción de extracto proteico de cushuro a pH 9.5



1.5. Curva de extracción de extracto proteico de cushuro a pH 10.5



El contenido de proteínas totales para el cushuro deshidratado fue de 31.46%, con una humedad del 16%. A pH de extracción 9.5 con un punto de precipitación de 6 se obtuvo el mayor contenido de proteínas totales (58.99%).

Anexo 2: Análisis estadístico ensayo antioxidante ABTS

2.1. ANOVA unidireccional y comparaciones en parejas de Tukey: CMS; CMA; CMR

Método

Hipótesis nula: Todas las medias son iguales

Hipótesis alterna: Por lo menos una media es diferente

Nivel de significancia: $\alpha = 0.05$

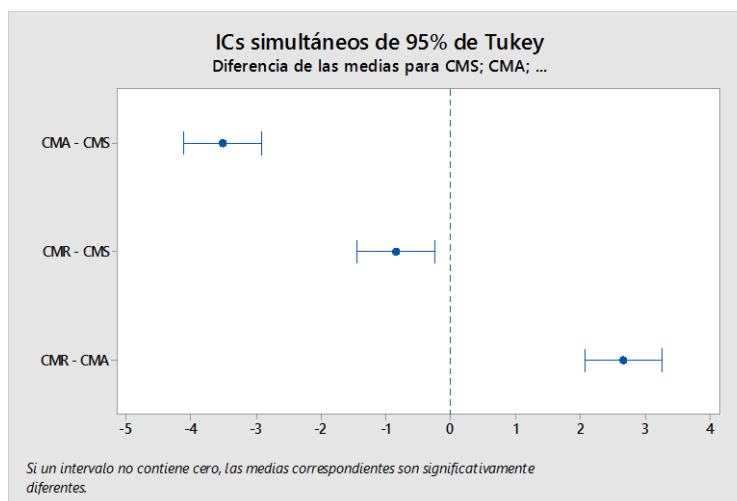
Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	2	20.1667	10.0833	176.57	0.000
Error	6	0.3426	0.0571		
Total	8	20.5093			

Agrupación de la información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Factor	N	Media	Agrupación*
CMS	3	16.6257	A
CMR	3	15.770	B
CMA	3	13.110	C

*Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.



2.2. ANOVA unidireccional y comparaciones en parejas de Tukey: CS; CA; CR

Método

Hipótesis nula: Todas las medias son iguales

Hipótesis alterna: Por lo menos una media es diferente

Nivel de significancia: $\alpha = 0.05$

Análisis de Varianza

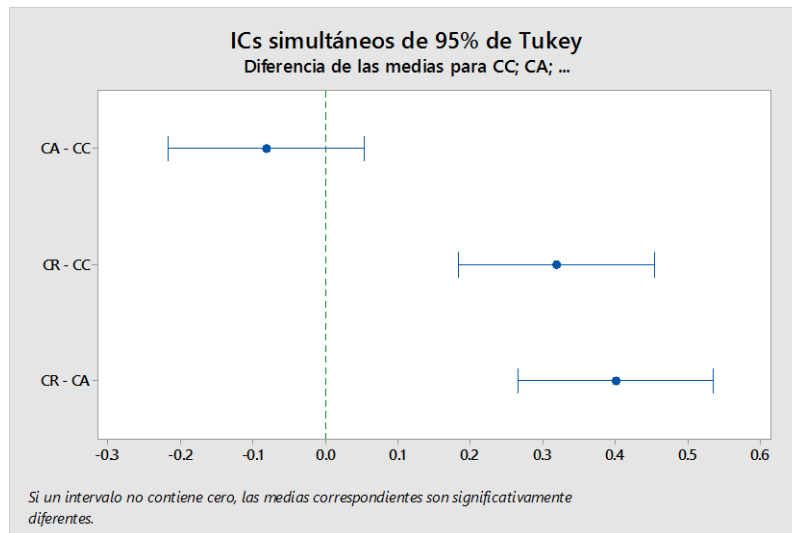
Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	2	0.26884	0.134418	46.16	0.000
Error	6	0.01747	0.002912		
Total	8	0.28631			

Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Factor	N	Media	Agrupación
CR	3	0.9987	A
CS	3	0.6797	B
CA	3	0.5981	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.



2.3. Prueba T para 2 muestras entre mezcla y su respectivo control: CMS; MS

T de dos muestras para CMS vs. MS

	N	Media	Desv.Est.	Error estándar de la media
CMS	3	16.6257	0.0933	0.054
MS	3	15.661	0.311	0.18

Diferencia = μ (CMS) - μ (MS)
Estimación de la diferencia: 0.964

IC de 95% para la diferencia: (0.158; 1.770)

Prueba T de diferencia = 0 (vs. \neq): Valor T = 5.15 Valor p = 0.036 GL = 2

2.4. Prueba T para 2 muestras entre mezcla y su respectivo control: CMA; MA

T de dos muestras para CMA vs. MA

	N	Media	Desv.Est.	Error estándar de la media
CMS	3	13.110	0.177	0.10
MS	3	12.488	0.117	0.068

Diferencia = μ (CMS) - μ (MS)

Estimación de la diferencia: 0.622

IC de 95% para la diferencia: (0.232; 1.012)

Prueba T de diferencia = 0 (vs. \neq): Valor T = 5.08 Valor p = 0.015 GL = 3

2.5. Prueba T para 2 muestras entre mezcla y su respectivo control: CMR; MR

T de dos muestras para CMR vs. MR

	N	Media	Desv.Est.	Error estándar de la media
CMS	3	15.770	0.362	0.21
MS	3	17.155	0.150	0.087

Diferencia = μ (CMS) - μ (MS)

Estimación de la diferencia: -1.384

IC de 95% para la diferencia: (-2.359; -0.410)

Prueba T de diferencia = 0 (vs. \neq): Valor T = -6.11 Valor p = 0.026 GL = 2

2.6. ANOVA unidireccional y comparaciones en parejas de Tukey: CMS; MS; MA; MR

Método

Hipótesis nula Todas las medias son iguales

Hipótesis alterna Por lo menos una media es diferente

Nivel de significancia $\alpha = 0.05$

Análisis de Varianza

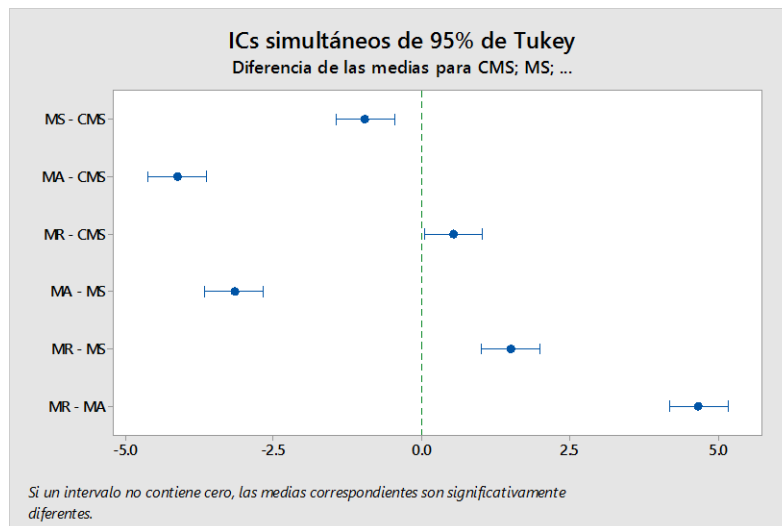
Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	3	39.3066	13.1022	370.24	0.000
Error	8	0.2831	0.0354		
Total	11	39.5897			

Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Factor	N	Media	Agrupación
MR	3	17.1546	A
CMS	3	16.6257	B
MS	3	15.661	C
MA	3	12.4880	D

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.



Anexo 3: Análisis estadístico ensayo de Polifenoles Totales (TPC)

3.1. ANOVA unidireccional y comparaciones en parejas de Tukey: CMS; CMA; CMR.

Método

Hipótesis nula Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna Por lo menos una media es diferente
Nivel de significancia $\alpha = 0.05$
Filas no utilizadas 1

Análisis de Varianza

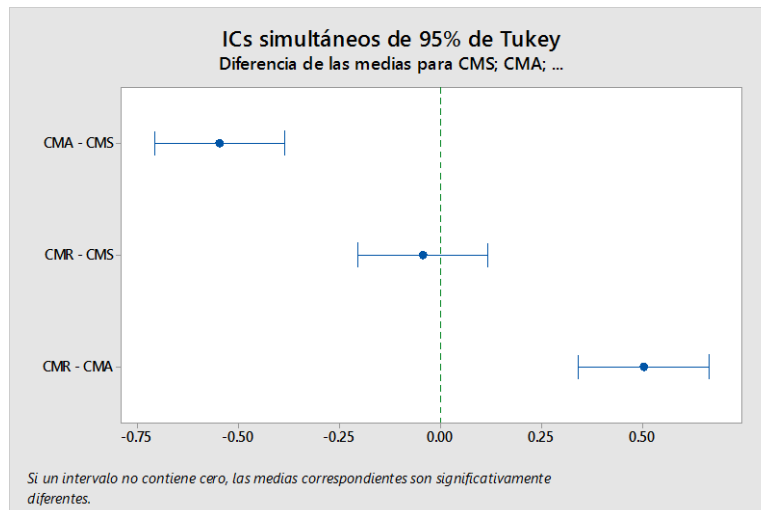
Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	2	0.55390	0.276952	67.34	0.000
Error	6	0.02468	0.004113		
Total	8	0.57858			

Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Factor	N	Media	Agrupación
CMS	3	1.4093	A
CMR	3	1.3665	A
CMA	3	0.8629	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.



3.2. ANOVA unidireccional y comparaciones en parejas de Tukey: CS; CA; CR Método

Hipótesis nula Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna Por lo menos una media es diferente
Nivel de significancia $\alpha = 0.05$

Análisis de Varianza

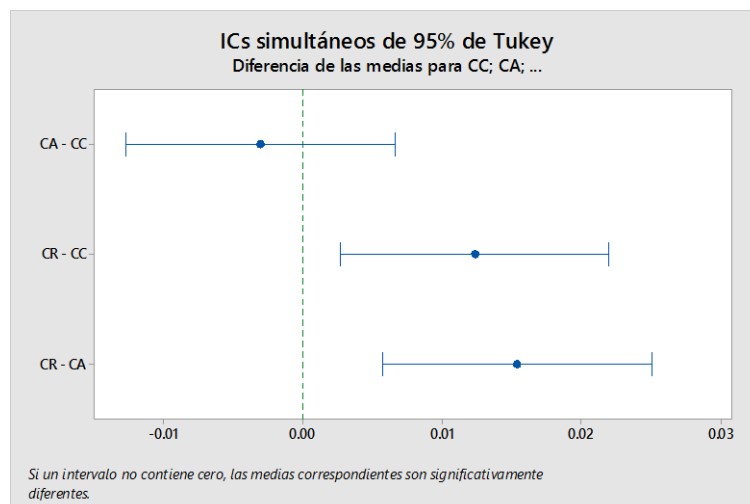
Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	2	0.000397	0.000198	13.31	0.006
Error	6	0.000089	0.000015		
Total	8	0.000486			

Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Factor	N	Media	Agrupación
CR	3	0.04481	A
CS	3	0.03252	B
CA	3	0.02944	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.



3.3. Prueba T para 2 muestras entre mezcla y su respectivo control: CMS; MS

T de dos muestras para CMS vs. MS

Error
estándar
de la

	N	Media	Desv.Est.	media
CMS	3	1.4093	0.0239	0.014
MS	3	1.2214	0.0193	0.11

Diferencia = μ (CMS) - μ (MS)

Estimación de la diferencia: 0.1879

IC de 95% para la diferencia: (0.1315; 0.2444)

Prueba T de diferencia = 0 (vs. \neq): Valor T = 10.59 Valor p = 0.002 GL = 3

3.4. Prueba T para 2 muestras entre mezcla y su respectivo control: CMA; MA

T de dos muestras para CMA vs. MA

	N	Media	Desv.Est.	Error estándar de la media
CMS	3	0.8630	0.1060	0.061
MS	3	0.6627	0.0211	0.012

Diferencia = μ (CMS) - μ (MS)

Estimación de la diferencia: 0.2003

IC de 95% para la diferencia: (0.0673; 0.4678)

Prueba T de diferencia = 0 (vs. \neq): Valor T = 3.22 Valor p = 0.084 GL = 2

3.5. Prueba T para 2 muestras entre mezcla y su respectivo control: CMR; MR

T de dos muestras para CMR vs. MR

	N	Media	Desv.Est.	Error estándar de la media
CMS	3	1.3665	0.0248	0.014
MS	3	1.4964	0.0131	0.076

Diferencia = μ (CMS) - μ (MS)

Estimación de la diferencia: -0.1299

IC de 95% para la diferencia: (0.1814; 0.0784)

Prueba T de diferencia = 0 (vs. \neq): Valor T = -8.03 Valor p = 0.004 GL = 3

3.6. ANOVA unidireccional y comparaciones en parejas de Tukey: CMS; MS; MA; MR

Método

Hipótesis nula: Todas las medias son iguales

Hipótesis alterna: Por lo menos una media es diferente

Nivel de significancia: $\alpha = 0.05$

Filas no utilizadas: 1

Análisis de Varianza

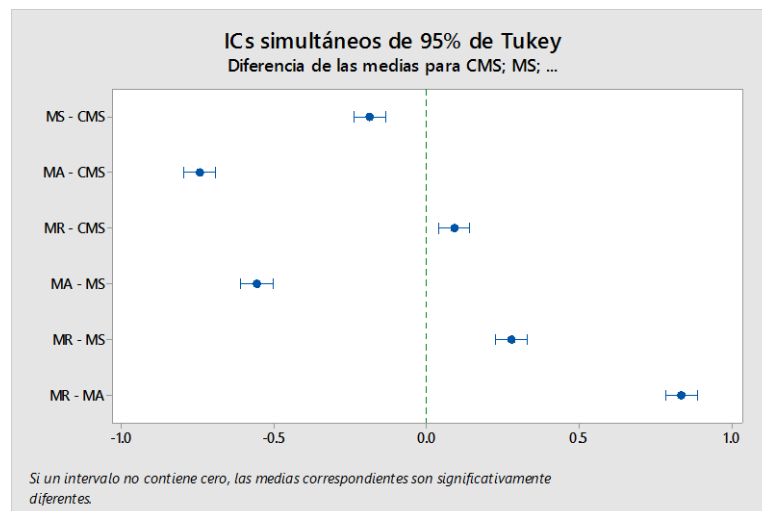
Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	3	1.26235	0.420782	1076.45	0.000
Error	8	0.00313	0.000391		
Total	11	1.26547			

Comparaciones en parejas de Tukey

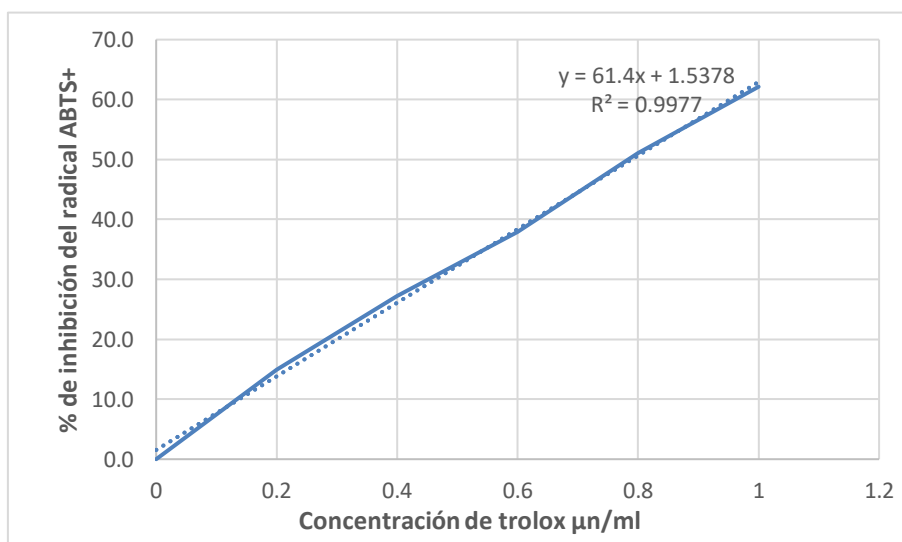
Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Factor	N	Media	Agrupación*
MR	3	1.49636	A
CMS	3	1.4093	B
MS	3	1.2214	C
MA	3	0.6627	D

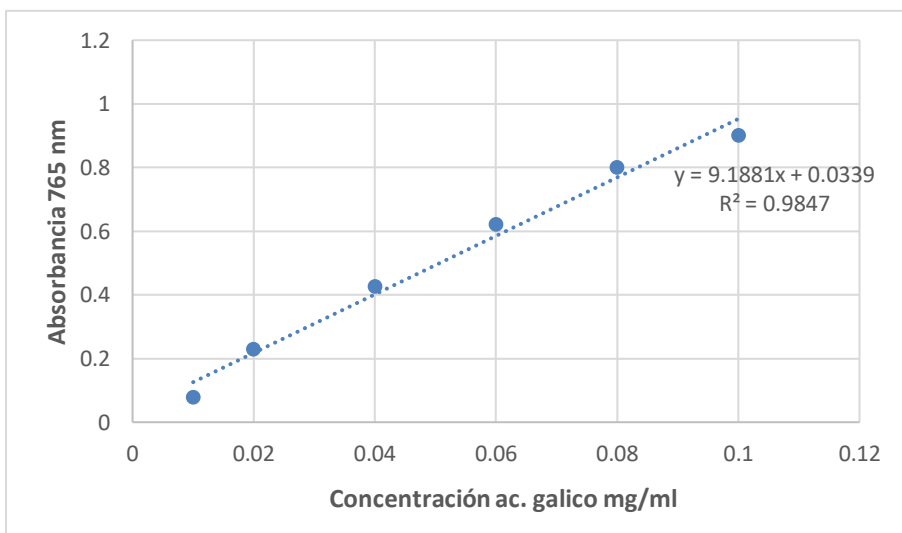
*Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.



Anexo 4: Curva de Calibración ensayo antioxidante ABTS



Anexo 5: Curva de Calibración ensayo de Polifenoles Totales (TPC)



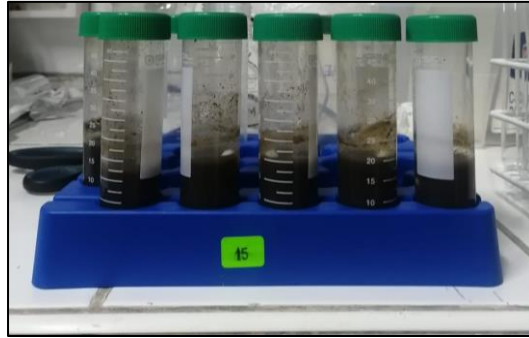
Anexo 6: Fotos de la experimentación

6.1. Lectura de muestras en espectrofotómetro UV-Visible



6.2. Preparación de las mezclas





6.3. Incubación y agitación de las mezclas

