

**VALORACIÓN DE CATEQUINAS Y CAFEÍNA EN PRODUCTOS
COMERCIALES DE TÉ VERDE Y SU COMPARACIÓN CON TÉCNICAS
CROMATOGRÁFICAS MÁS ECONÓMICAS.**

MARÍA CAMILA FLÓREZ IDÁRRAGA

**UNIVERSIDAD ICESI
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS
SANTIAGO DE CALI, VALLE DEL CAUCA**

2018

**VALORACIÓN DE CATEQUINAS Y CAFEÍNA EN PRODUCTOS
COMERCIALES DE TÉ VERDE Y SU COMPARACIÓN CON TÉCNICAS
CROMATOGRÁFICAS MÁS ECONÓMICAS.**

MARÍA CAMILA FLÓREZ IDÁRRAGA

**TRABAJO DE GRADO PARA OPTAR AL TÍTULO DE PREGRADO EN
QUÍMICA FARMACÉUTICA**

DIRECTOR:

GUILLERMO LEÓN MONTOYA, PhD

SANTIAGO DE CALI, VALLE DEL CAUCA

2018



APROBADO POR:

Maria del Carmen Rave

María del Carmen Rave Hoyos
Evaluador

Guillermo León Montoya

Guillermo León Montoya PhD
Tutor del Proyecto.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios, por darme la fortaleza para terminar con este proyecto.

A mis Padres y Abuelos, por creer en mí, por ser mi apoyo constante, por nunca dejarme caer, por permitirme estar viviendo este momento, porque sin ustedes nada de esto sería posible.

A Guillermo Montoya, mi tutor, quien con dedicación, paciencia y su amplio conocimiento estuvo siempre para mí.

A Kevin, por escucharme, por darme la fortaleza que necesitaba para emprender y alcanzar todo lo que aquí logré.

A Sebastián, Juliana, Alberto y José David, por su gran amistad durante todos estos años, porque gracias a ustedes entendí lo que una es verdadera amistad.

A todas aquellas personas, amigos, compañeros, que en forma directa e indirecta colaboraron amablemente en la elaboración de este proyecto de grado.

Contenido

1. Introducción.....	8
2. Descripción del proyecto.....	9
2.1 Planteamiento del Problema y Pertinencia del Proyecto	9
2.2 Marco teórico y estado del arte	10
2.2.1 Estado del arte	10
2.2.2 Marco teórico.....	10
2.2.2.1 Aspectos generales de Camellia sinensis	10
2.2.2.2 Propiedades físicas y químicas de las catequinas.....	11
2.2.2.3 Propiedades físicas y químicas de la cafeína	12
2.2.2.4 Identificación y cuantificación de catequinas y cafeína	13
2.2.2.5 Parámetros cromatográficos y de idoneidad del método.....	16
2.2.2.5.1 Linealidad	16
2.2.2.5.2 Platos teóricos	16
2.2.2.5.3 Factor de capacidad	17
2.2.2.5.4 Simetría	18
2.3 Objetivos	19
2.3.1 Objetivo General	19
2.3.2 Objetivos específicos.....	19
2.4 Metodología utilizada.....	20
2.4.1 Materiales	20
2.4.2 Condiciones del método (HPLC-DAD).....	20
2.4.3 Condiciones del método (HPTLC)	21
2.4.4. Valoración de Catequina, EGCG y cafeína	21
2.4.4.3 Preparación de la muestra	22
2.5 Resultados.....	23
2.5.1 Valoración de Catequinas, EGCG y cafeína por HPTLC.	23
2.5.2 Valoración de Catequinas, EGCG y cafeína por HPLC.	26
2.6 Discusión	30
2.6.1. Preparación de la Muestra de Té verde	30
2.6.2 Valoración de Catequina, EGCG y Cafeína en Té verde mediante HPTLC.	30
2.6.3 Valoración de Catequina, EGCG y Cafeína en Té verde mediante HPLC.	31

2.6.4 Comparación de Valoraciones por HPTLC y HPLC	33
2.7 Conclusiones	35
2.8 Recomendaciones	36
3.0 Bibliografía	37
Anexos	41

Lista de Tablas

Tabla 1. Fases estacionaria y móvil utilizadas en la estandarización del método para cuantificación de catequinas y cafeína (Gil Quintero, 2012)	14
Tabla 2. Condiciones para método HPLC-DAD.....	20
Tabla 3. Gradiente utilizado para HPLC-DAD.....	21
Tabla 4. Valores reales para curvas de calibración	23
Tabla 5. Resultados valoración HPTLC	26
Tabla 6. Resultados valoración HPLC de Té verde	29
Tabla 7. Resultados de contenidos de valoraciones.....	33

Lista de Figuras

Figura 1. Estructura química de las catequinas más representativas (Tomado y adaptado de Nishitani & Sagesaka, 2004).	12
Figura 2. Estructura química de la cafeína	13
Figura 3. Muestra de cromatograma.....	17
Figura 4. Simetría de picos en cromatograma.....	18
Figura 5. Curva de Calibración y Muestra	23
Figura 6. Curva de calibración de estándar de Catequina	24
Figura 7. Curva de Calibración de estándar de EGCG	24
Figura 8. Curva de calibración de estándar de Cafeína	25
Figura 9. Valoración de muestra de Té verde por HPTLC	25
Figura 10. Curva de calibración de estándar Catequina	26
Figura 11. Curva de calibración de estándar de EGCG	27
Figura 12. Curva de calibración de estándar de Cafeína	27
Figura 13. Valoración de Catequina, EGCG y Cafeína en Muestra de Té verde	28
Figura 14. Resultados de parámetros de idoneidad de método	28

Lista de Anexos

Anexo 1. Cromatograma Curva de Calibración 300ppm.....	41
Anexo 2. Cromatograma Curva de Calibración 150ppm.....	42

Resumen

Las catequinas y la cafeína son los componentes principales del té verde, le aportan características antioxidantes y antiinflamatorias, las cuales permiten su intervención en reacciones metabólicas de óxido-reducción. Esto ha llevado a un incremento sustancial en el interés y la demanda del público hacia estos productos, generando la necesidad del desarrollo de metodologías que permitan identificar y cuantificar estos componentes de una manera confiable y rápida.

Es por esta razón que se desarrolló una metodología empleando dos técnicas cromatográficas, High-Performance liquid chromatography (HPLC) acoplado a un detector de arreglo de diodos (DAD) y High-Performance Thin-Layer Chromatography (HPTLC) empleando detección densitométrica, asegurando la obtención de resultados confiables mediante la evaluación de parámetros cromatográficos, que garantizan los resultados y la idoneidad del método (resolución, factor de capacidad, platos teóricos, y simetría de pico). Y de esta manera adjuntarlo al portafolio de servicios del Laboratorio de Instrumentación Química de la Universidad Icesi (LIQ). El desarrollo de este trabajo experimental permite ofrecer un servicio de análisis a la industria de alimentos en el Valle del Cauca, asegurando la calidad de productos que contienen dichos compuestos.

Palabras clave: Catequinas, Cafeína, HPLC, HPTLC.

Abstract

Catechins and caffeine are the main components of green tea; they provide antioxidant and anti-inflammatory characteristics, which allow their intervention in metabolic reactions of oxide-reduction. This has led to a substantial increase in the interest and demand of the public towards these products, generating the need for the development of methodologies that allow identifying and quantifying these components in a reliable and fast way.

It is for this reason that a methodology was developed using two chromatographic techniques, High-Performance liquid chromatography (HPLC) coupled to a diode array detector (DAD) and High-Performance Thin-Layer Chromatography (HPTLC) using densitometric detection, ensuring the obtaining reliable results through the evaluation of chromatographic parameters, which guarantee the results and the suitability of the method (resolution, capacity factor, theoretical plates, and peak symmetry). And in this way, attach it to the services portfolio of the Chemical Instrumentation Laboratory of the Icesi University (LIQ). The development of this experimental work allows us to offer an analysis service to the food industry in Valle del Cauca, ensuring the quality of products that contain these compounds.

Key words: Catechins, Caffeine, HPLC, HPTLC

1. Introducción

El té es una de las bebidas más populares en el mundo, es consumida por dos tercios de la población mundial y es proveniente de la planta *Camellia sinensis*, la cual es originaria del sudeste asiático. Para su fabricación se toman las hojas y se procesan para obtener distintos tipos de té. De acuerdo al procesamiento que se lleve a cabo (secado y fermentado), se determina la composición química del té. Se puede obtener negro (fermentado), verde (no fermentado) y oolong (semi fermentado) (Khan & Mukhtar, 2013).

Según datos de la Tea Association of The United States, la industria del té ha tenido un crecimiento del 375% desde 1990, alcanzando ventas de 12.5 Billones de dólares en el año 2017 en los Estados Unidos (Peter F. Goggi, 2017). En Colombia, la empresa Agrícola Himalaya, productora del té Hindú registró ventas por 30.591 millones de pesos en el 2015, lo que indicó un aumento del 36% de aumento en las ventas de este producto (El tiempo, 2015).

En las infusiones de té se encuentran componentes esenciales para la preservación de la salud, como los polifenoles, la cafeína, las vitaminas, los aminoácidos y los carbohidratos. El té verde se caracteriza por tener un mayor contenido de catequinas, ya que en su proceso no hay oxidación de los polifenoles. Existen diferentes tipos de catequinas, está el grupo de las catequinas libres entre las que se encuentran la epicatequina (EC), la epigalocatequina (EGC) y galocatequina (GC). Adicionalmente, se encuentran las catequinas esterificadas, dentro de este grupo se encuentran epigalocatequina galato (EGCG), epicatequina galato (ECG), galocatequina galato (GCG) y catequina galato (CG) (Vuong, Golding, Nguyen, & Roach, 2010).

Una de la principales y más reconocidas catequinas es la epigalocatequina galato (EGCG), debido a que se le atribuyen los efectos benéficos del té que en sinergia con la cafeína, le proveen potencial uso en terapéutica principalmente para la prevención de algunas enfermedades cardiovasculares y algunos tipos de cáncer (El-Shahawi, Hamza, Bahaffi, Al-Sibaai, & Abduljabbar, 2012).

Es por todo lo anterior, que nace la necesidad de las industrias e institutos de investigación en desarrollar métodos rápidos, costo-eficientes, sensibles y selectivos para identificar activos en productos que contienen té verde.

Teniendo en cuenta la importancia económica de este producto, se decidió desarrollar un método para HPLC-DAD y HPTLC, donde se valora catequinas y cafeína y comparar finalmente las dos metodologías para concluir si son comparables en cuanto a su desempeño analítico, teniendo en cuenta la diferencia de los costos de ambas técnicas.

2. Descripción del proyecto

2.1 Planteamiento del Problema y Pertinencia del Proyecto

El incremento del uso del té verde en la actualidad se encuentra justificado por los beneficios en la protección de la salud que le han sido concedidos, principalmente su acción antioxidante y antiinflamatoria, las cuales están asociadas a la alta presencia de catequinas y sus derivados de catequinas. La cafeína es otro de los componentes del té verde, la cual aporta un estado de vigilia al consumidor. Gracias al aumento del consumo de los productos comerciales de té verde, se hace necesaria la cuantificación de catequinas y cafeína en productos que contengan estas sustancias como marcadores quimiotaxonómicos, haciendo esto parte del proceso de control de calidad de los mismos. Por lo tanto es importante la implementación de métodos que ofrezcan datos veraces pero también rentables para quienes lo realizan.

Dentro de los métodos empleados generalmente para cuantificación se encuentra el HPLC, el cual genera resultados con muy buena resolución, alta reproducibilidad y alta sensibilidad. Sin embargo, es un método costoso, no solo durante el desarrollo de la técnica, si no el valor del equipo y su operación de manera rutinaria y por esto no es necesariamente asequible para todo tipo de industria. Por otra parte se encuentra el método de HPTLC, el cual es la forma más avanzada de TLC y comprende el uso de capas cromatográficas de máxima eficacia de separación, es simple procedimentalmente, tiene sensibilidad moderada a alta y tiene bajo costo asociado, tanto para desarrollo de la técnica como para mantenimiento.

Es por todo lo anterior y respondiendo a la necesidad de desarrollar técnicas analíticas costo efectivo y confiable, se decide direccionar el enfoque de esta propuesta de investigación a desarrollar y comparar los métodos analíticos ya mencionados mediante parámetros de validación y cromatográficos básicos, que lleven a una correcta valoración del contenido de catequinas y cafeína en productos comerciales que contengan té verde, que aporten confiabilidad de los resultados y optimización de los recursos. Además, el desarrollo de las metodologías sirve como base para futuras investigaciones en las que se pretenda validar catequinas y cafeína en diversas condiciones experimentales, asegurando que brinde resultados confiables.

2.2 Marco teórico y estado del arte

2.2.1 Estado del arte

El presente proyecto de investigación aborda un tema que en las últimas décadas ha venido ganando importancia, ya que al aumentar la demanda frente a productos que contengan té verde, se necesitan técnicas que certifiquen la presencia de estas de una manera confiable, pero también que generen rentabilidad para la empresa que realiza este tipo de análisis. Actualmente, hay disponibilidad de dos técnicas principalmente (HPLC y HPTLC), en las que se han realizado investigaciones para optimizar los tiempos y el uso de solventes para la identificación y cuantificación de catequinas y té verde, los cuales son los componentes mayoritarios del té verde y en los cuales se destacan trabajos que dan muestra del estado actual de la investigación en este tema: *Rapid HPLC-MS method for the simultaneous determination of tea catechins and folates* (Araya-Farias, Gaudreau, Rozoy, & Bazinet, 2014), *Simultaneous determination of catechins, caffeine and other phenolic compounds in tea using new HPLC method* (Nishitani & Sagesaka, 2004), *Rapid High Performance Thin Layer Chromatographic Method for Quantitation of Catechin from Extracts of Cashew Leaves* (Yogini Jaiswal, Pratima Tatke, Satish Gabhe, 2013).

2.2.2 Marco teórico

2.2.2.1 Aspectos generales de *Camellia sinensis*

Es un arbusto pequeño de la familia de las teáceas, su cultivo se lleva a cabo en los cinco continentes, y cada zona origina un producto con cualidades diferenciales tanto por las condiciones agroecológicas como por sus técnicas de cultivo e industrialización. Crece hasta 10 metros de altura. Posee hojas perennes, flores blancas y fruto capsular. El brote verde es la materia prima que es sometida a diversas etapas de industrialización para la obtención del producto final que puede ser tanto Té Negro como Té Verde. Presenta una vida productiva de 30 a 50 años (Sistema Nacional Argentino de Vigilancia y Monitoreo de Plagas., 2015).

Los téis obtenidos de esta planta se caracterizan por tener distintos matices de sabor. Estos sabores se definen de manera diferente gracias a la composición química. Sin embargo, no se encuentra mucha información sobre la variabilidad química entre las variedades de *Camellia sinensis* y como la composición de las hojas se encuentra influenciada por las condiciones de crecimiento y métodos de procesamiento. Hay diversidad en cuanto al germoplasma de esta planta, y es un

recurso usado para mejora de cultivos, pero el conocimiento acerca de este germoplasma es bastante limitado (Fang et al., 2017).

Se dice que el té fue descubierto por primera vez como bebida y medicina en China alrededor de 2737 a.C. Fue introducido en Japón a principios del siglo XIII y a Europa en el siglo XVI, luego a América, África y otras regiones del mundo (Chow, K. B., Kramer, 1990)

2.2.2.2 Propiedades físicas y químicas de las catequinas

La principal fuente de catequinas conocida es el té verde, el cual proviene de la planta *Camellia Sinensis*, más no es la única manera de consumo, ya que se puede encontrar en concentraciones altas en el vino tinto, habas, uvas negras, albaricoques, fresas, manzanas y chocolate (Chellino et al., 2016).

Las catequinas obtenidas del té verde son provenientes de las hojas de una planta proveniente del sur de China y sudeste de Asia, y que actualmente se puede cultivar en regiones tropicales y subtropicales, *camellia sinensis*.

Las catequinas tienen estructura química general $C_6-C_3-C_6$, con dos anillos aromáticos sustituidos con grupos hidroxilo, pertenecen al grupo de productos químicos flavan-3-ol. Tiene dos centros quirales, uno en el carbono 2 y otro sobre el 3, generando que la molécula posea cuatro diastereómeros; dos de estos tienen una configuración pseudo trans y se denominan catequinas, mientras que los dos restantes, los cuales tienen configuración pseudo cis, se denominan epicatequinas (Chu, 2010).

En la figura 1 se pueden observar las catequinas más abundantes en el té, las cuales son: (-)epigalocatequina galato [(-)-EGCG], (-) epigalocatequina[(-)-EGC], (-)epicatequina galato [(-)-ECG], (-) epicatequina[(-)-EC], (+)-galocatequina[(+)-GC], y catequina[(+)-C], las cuales son conocidas por su fuerte actividad antioxidante y sus beneficios para la salud (Pozharitskaya, 2007).

Las catequinas son uno de los componentes mayoritarios de las hojas de té, presentan solubilidad en medios acuosos y solventes orgánicos polares, pero cuando se evalúan de manera individual esta condición varía, ya que hay factores que las afectan como la temperatura de extracción, el tipo de solvente, pH y concentración de iones en el medio (López, 2013). En cuanto a las catequinas del té verde, todas son solubles en soluciones ácidas a pH de 1,8 hasta 6,4 y su tasa de degradación incrementa de manera proporcional al aumento de pH, de concentración de oxígeno y de la temperatura, también se debe tener en cuenta que su absorción máxima en UV se encuentra entre 269 y 280nm (Litwack, 2001).

Por otra parte, las catequinas del té presentan sensibilidad a la oxidación por enzimas, ácidos y calor, y pueden llegar a convertirse en Teaflavinas y Tearubinas

por medio de la enzima polifenol oxidasa (PPO), y para eliminar la presencia de esta enzima, las hojas de té se someten a calentamiento luego de la cosecha para lograr una mayor conservación de las catequinas y menor presencia de Teaflavinas (Vuong et al., 2010).

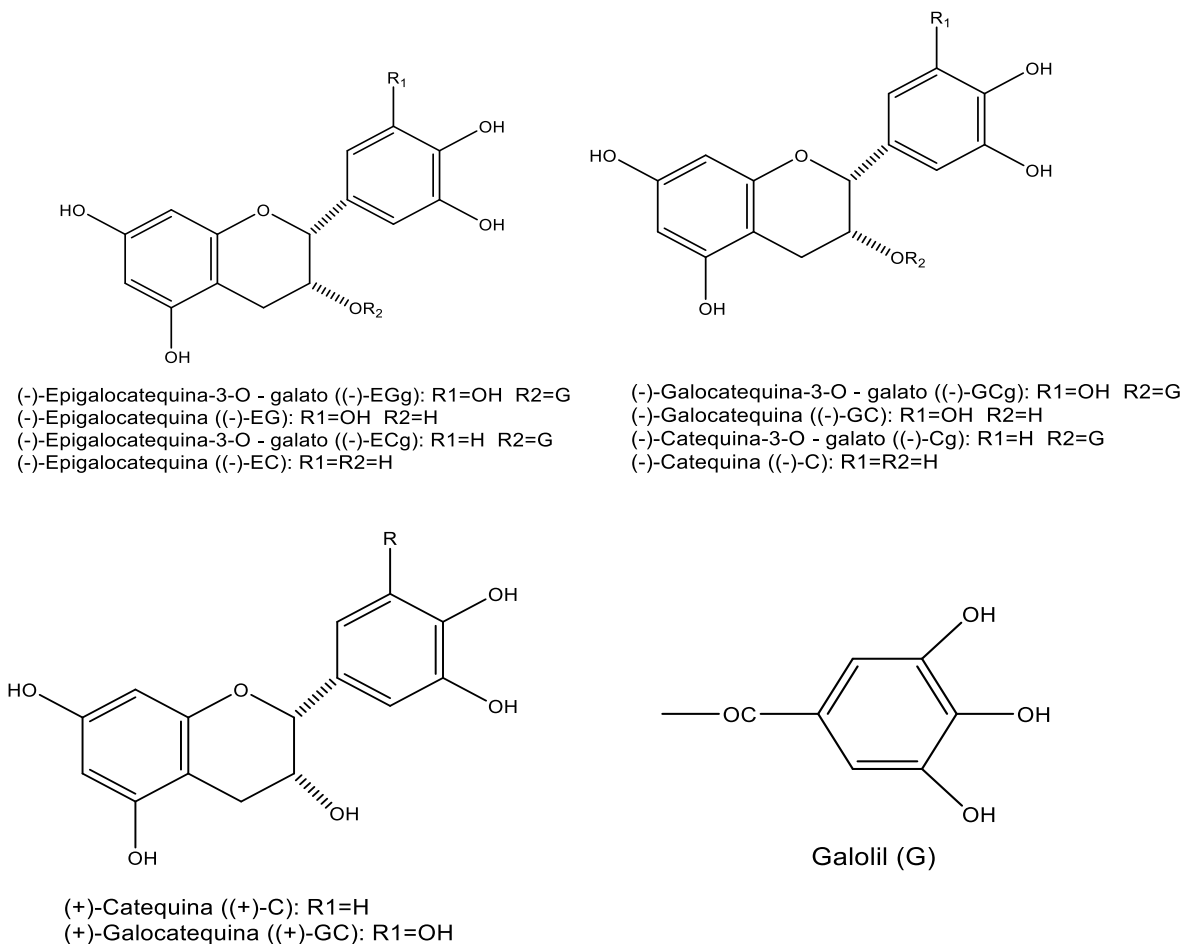


Figura 1. Estructura química de las catequinas más representativas (Tomado y adaptado de Nishitani & Sagesaka, 2004).

2.2.2.3 Propiedades físicas y químicas de la cafeína.

La cafeína (1,3,7-Trimetilxantina) es una molécula aquiral, alcaloide dentro de las bases xánticas, las cuales tienen poco carácter básico, solubles en agua y disolventes de tipo orgánico clorados (Gracia-Lor, 2017).

Es un sólido de tipo cristalino estimulante del sistema nervioso central que se encuentra principalmente en los granos de café y hojas de té. También se puede fabricar de forma sintética para su uso como aditivo alimentario, en suplementos

dietéticos y en medicamentos de venta libre o preparados farmacéuticos en los que la cafeína sintética es idéntica a la cafeína derivada de plantas. Se ha descrito como la sustancia alimentaria farmacológicamente activa más frecuentemente ingerida en el mundo (Turnbull, Rodricks, Mariano, & Chowdhury, 2017).

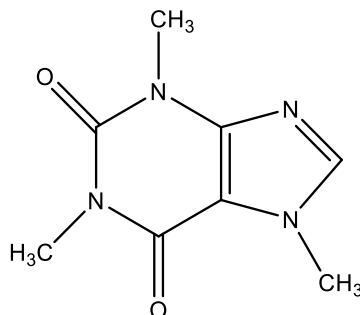


Figura 2. Estructura química de la cafeína

Aunque la principal fuente de la cafeína es el grano de café, no es la única manera de obtenerla. El té es otra fuente común de cafeína, aunque generalmente contiene aproximadamente la mitad de cafeína por porción que el café (15 mg por porción de 240 mL) (Verkhratsky, 2005).

2.2.2.4 Identificación y cuantificación de catequinas y cafeína

La huella digital cromatográfica ha sido aceptada por la OMS como un enfoque para la evaluación de calidad de productos naturales medicinales. Técnicas de análisis cromatográfico como HPLC y HPTLC han ganado importancia creciente debido a su utilidad en la caracterización de la muestra (Yogini Jaiswal, Pratima Tatke, Satish Gabhe, 2013).

La cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), es uno de los métodos analíticos más efectivos y usados para la identificación de catequinas y cafeína.

De acuerdo a (Gil Quintero, 2012), se usó un HPLC-DAD a una longitud de onda de 280nm para la cuantificación de catequinas y cafeína, y se consideraron tres variables que afectan la separación de analitos: modificación de las fases estacionaria, fase móvil y la temperatura de la columna. Emplearon ácido acético y fórmico entre 0,1% y 0,2% como modificadores de pH en la fase móvil, trabajaron con flujos de la fase móvil entre 0,5 y 1,0mL y la temperatura de la columna se varió entre 25 y 35°C.

En la Tabla 1 se muestran las fases estacionaria y móvil que se utilizaron para la cuantificación de catequinas y cafeína,

Tabla 1. Fases estacionaria y móvil utilizadas en la estandarización del método para cuantificación de catequinas y cafeína (Gil Quintero, 2012)

	- Columna Supelco C18 (250x4.6mm). Tamaño de partícula:5µm
Fase estacionaria	- Columna VARIAN C18 (150x4.6mm). Tamaño de partícula:5µm
	- Columna Phenomenex C18 (100x4.6mm). Tamaño de partícula:5µm
Fase móvil	(1) Acetonitrilo:Agua* (2)Metanol:Agua* * Incluye una mezcla agua-ácido acético como solvente modificador (0,1-0,2%)

Continuando con el método de HPLC, (Henning et al., 2003), se realizó con un columna de HPLC Waters NovaPak C18 (150 x 3,9 mm, 4 µm). La fase móvil fue 960 ml de ácido acético al 0, 1% (pH 3, 5) + 20 ml de acetonitrilo + 20 ml de tetrahidrofurano. Se eluyeron las muestras mediante un método isocrático, con un período de equilibrio de la columna por 8 minutos. Se utilizó un sistema 1050 HPLC de Agilent Technologies (San Diego, CA) con un espectrofotómetro UV-VIS (260 nm) de Shimadzu (Cole Scientific Inc., Moorpark, CA) SPD-6AV.

Esta técnica tiene múltiples ventajas, entre ellas la alta resolución, velocidad de análisis y proporciona un control de los parámetros que pueden afectar la eficiencia de la separación (HPLC : Waters, 2013).

Uno de los detectores más usados que permiten cuantificar concentraciones bajas de analitos en muestras, y comparar los espectros a distintas longitudes de onda, es el detector de matriz de fotodiodos PDA, ya que permite cuantificar impurezas traza a niveles de 0,004% con una relación señal ruido baja, logra separaciones con control de parámetros y frecuencias de muestreo flexibles para lograr una integración precisa y reproducible, y además abarca longitudes de onda de 190 a 500 nm (Waters, 2013).

La cromatografía de capa fina (TLC), es una técnica de separación simple, flexible y rentable, es un método rápido para el análisis cuantitativo que permite el análisis simultaneo de muchos analitos con un mínimo de tiempo requerido y a medida que aumentan las expectativas sobre la calidad y el valor de análisis, se ponen a disposición instrumentación adecuada para su análisis. Pero al ser comparada con HPLC, se pueden ver deficiencias como la baja eficacia, baja sensibilidad y poca precisión. Es por eso que la técnica tiene una evolución que es HPTLC (Tang Tie-xin, 2008).

La cromatografía de capa fina de alto rendimiento (HPTLC), es una forma mejorada de la cromatografía en capa fina. HPTLC ofrece ventajas significativas en el sentido de que utiliza menos solventes y tiene la capacidad de ejecutar simultáneamente múltiples muestras ahorrando tiempo y dinero, además los resultados se pueden ver directamente en la placa en forma de bandas de color, lo

que permite la fácil identificación de los estándares y de las muestras (Loescher, Morton, Razic, & Agatonovic-Kustrin, 2014).

La aplicación de la muestra es el primer paso para el desarrollo del método de HPTLC, y es un paso determinante, ya que afecta directamente la calidad del proceso a realizar. La elección de la técnica a utilizar depende de los requisitos de precisión, volúmenes de muestra y grado de automatización deseado. La forma más sencilla de hacerlo, es la aplicación de muestra por un capilar de volumen fijo y suele usarse el Nanomat 4 (Camag, 2017), el cual sirve para la fácil aplicación de la muestra en forma de mancha, lo hace con precisión y sin dañar la capa de la placa.

Posterior al desarrollo de la placa, esta debe registrarse fotográficamente, el cual es otro punto crítico, ya que de la calidad de la fotografía depende la lectura que el software pueda hacer. Un equipo calificado para realizar esta documentación fotográfica es el Amersham Imager 600, el cual tiene la capacidad de generar imágenes robustas y sensibles dirigidas a análisis de alta resolución. Este reproductor de imagen trae un alto rendimiento de imágenes para fluorescencia, quimioluminiscencia y aplicaciones colorimétricas. El sistema tiene un software de análisis integrado para analizar datos de forma rápida y fácil ("Amersham TM Imager 600," 2014).

A partir de la imagen obtenida se debe realizar un análisis para realizar la cuantificación. La tendencia actual para realizar la cuantificación es el análisis densitométrico, en donde se realiza cuantificación de una banda directamente de la placa, con un instrumento que determina absorción de luz visible, UV, fluorescencia o radioactividad.

Entre los programas más utilizados para realizar este tipo de análisis se encuentra ImageJ, MATLAB, Sorbfil TLC, los cuales se encuentran en internet de manera gratuita o a bajo costo. Lo que este software hace es convertir la imagen a escala de grises y según el R_f , la concentración relativa, área, ancho y ancho, cuantifica la cantidad de analito en la placa. Este software da la opción de determinar un área de trabajo, la cual comprende desde el punto de aplicación de la muestra hasta el final de su corrida. También se realiza una detección de los carriles para hacer una diferenciación de cada muestra corrida (Báez Pérez, Quiñones Gálvez, Toca, & Torres, 2017).

Existe también una manera acoplada de todos los procesos anteriores, y es un scanner de TLC SCANNER CAMAG 4, el cual trae integrado el software para realizar todo el proceso anteriormente explicado y dar como resultado el cromatograma esperado, pero tiene un alto costo en el mercado y es por eso que la mayoría de investigaciones se prefieren realizar por el proceso ya descrito (Popovic Nevena, 2014)

De acuerdo con (Yogini Jaiswal, Pratima Tatke, Satish Gabhe, 2013), para la identificación y cuantificación de catequinas y cafeína se desarrollaron las placas

con tolueno: etilo acetato: metanol: ácido fórmico (6: 6: 1: 0,1) como solvente sistema con tiempo de saturación de 15 min en un gemelo CAMAG cámara de desarrollo de placas y posteriormente se llevaron a un espectrodensitómetro donde la absorción/remisión se realizó a una velocidad de escaneo de 20mm/s. Los densitogramas se registraron a una longitud de onda de 254nm para catequinas.

2.2.2.5 Parámetros cromatográficos y de idoneidad del método

La verificación de estos parámetros asegura que los resultados que se entregan son confiables y también demuestran que el método es el adecuado para los fines previstos. Es por esto necesario que se efectúen de manera metódica, ordenada, trazable y confiable (Duffau Boris, Rojas Fabiola, 2010).

2.2.2.5.1 Linealidad

La linealidad de un método de análisis se evalúa en la capacidad que este tiene, en un determinado intervalo, de dar respuesta o resultados que sean proporcionales a la cantidad de analito que se va a determinar en la muestra. Para que este parámetro se cumpla, se necesita que los resultados obtenidos describan un comportamiento lineal cuando se realiza la regresión lineal (Duffau Boris, Rojas Fabiola, 2010).

2.2.2.5.2 Platos teóricos

Se evalúa este parámetro para definir la eficacia, o sea, que tan eficiente es la columna para separar el soluto del solvente, y depende principalmente de la longitud de la columna. Cada plato teórico representa un equilibrio teórico de distribución entre las fases. Entre más platos teóricos tenga una columna, mejor será su rendimiento (García & Susana, 2002).

Los platos teóricos se calculan por medio de la ecuación 1 o 2, adicionalmente en la figura 3, se ilustra a que parte de la señal del cromatograma corresponde w_b y $w_{\frac{1}{2}}$, respectivamente.

$$N = 16 \left(\frac{t_r}{w_b} \right)^2 \quad (1)$$

$$5,545 \left(\frac{t_r}{w_{1/2}} \right)^2 \quad (2)$$

Dónde:

t_r : *Tiempo de retención*

w_b : *Ancho a la base*

$w_{1/2}$: *Ancho a la mitad de la altura*

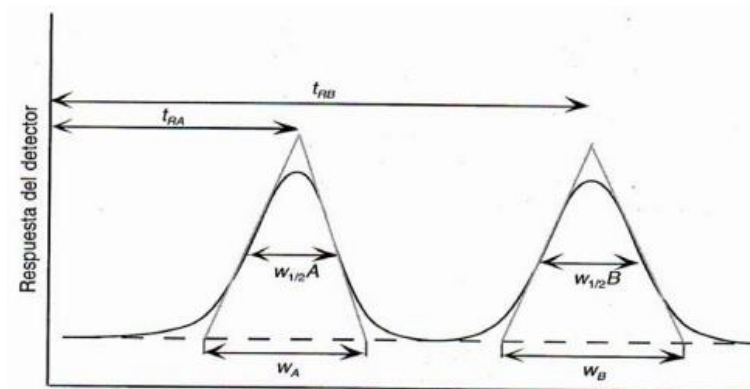


Figura 3. Muestra de cromatograma

2.2.2.5.3 Factor de capacidad

Este parámetro describe las velocidades de migración de los analitos en las columnas y mientras este valor se haga más grande, la velocidad de migración de soluto en la columna se hará más pequeña (Skoog, 1992), y se calcula por medio de la ecuación 3.

$$k'_A = \frac{K_A V_S}{V_M} \quad (3)$$

Donde:

K_A : *Constante de distribución*

V_S : *Volumen de fase estacionaria*

V_M : *Volumen de la fase móvil*

2.2.2.5.4 Simetría

Los picos de cola son la distorsión de forma de pico cromatográfica más común. Un pico se clasifica como cola si su asimetría es mayor que 1,2, aunque los picos con valores de A_s tan altos como 1,5 son aceptables para muchos ensayos. El factor de asimetría de pico (A_s) se determina usando la ecuación (4) (Crawford scientific, n.d.)

$$A_s = \frac{B}{A} \quad (4)$$

Dónde:

B = ancho pico después del centro del pico a una altura del pico del 10%

A = ancho del pico al inicio del estudio antes del centro del pico.

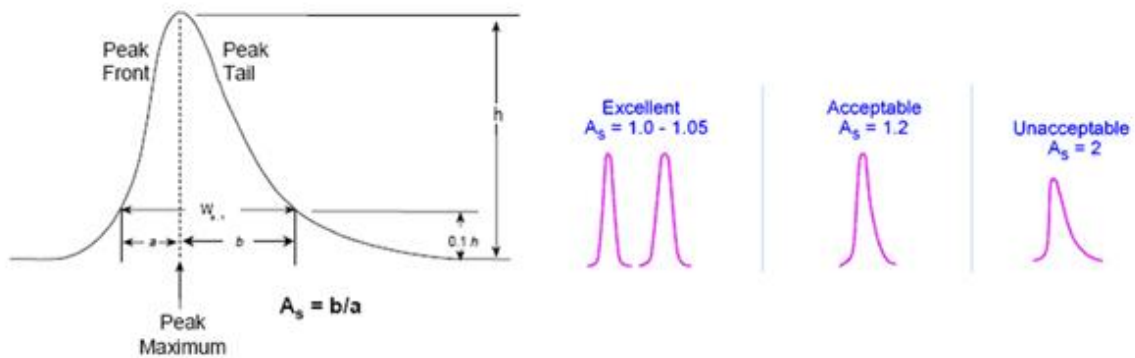


Figura 4. Simetría de picos en cromatograma.

2.3 Objetivos

2.3.1 Objetivo General

- Valorar catequinas y cafeína por dos diferentes métodos analíticos (HPLC-DAD y HPTLC-Densitometría) en productos comerciales de té verde y comparar los resultados empleando parámetros de validación y cromatográficos básicos (Resolución, factor de capacidad, platos teóricos, linealidad, simetría y ancho del pico).

2.3.2 Objetivos específicos

1. Desarrollar un método HPLC-DAD para valorar contenido de catequinas y cafeína en muestras comerciales.
2. Establecer parámetros que comprueben la idoneidad de método para la valoración por HPLC (Resolución, factor de capacidad, platos teóricos, linealidad, simetría y ancho del pico).
3. Desarrollar un método HPTLC empleando densitometría para la valoración de catequinas y cafeína en muestras comerciales.
4. Establecer parámetros que comprueben la idoneidad de método para la valoración por HPTLC.

2.4 Metodología utilizada

Para el desarrollo experimental de esta investigación se usaron los estándares puros de catequina, epigalocatequina galato y cafeína, para la realización de las curvas de calibración, las cuales sirvieron como referencia para la valoración obtenida por HPLC-DAD y HPTLC.

2.4.1 Materiales

Muestra

Té Verde Hindú

Estándares

Cafeína

Catequina

Epigalocatequina Galato (EGCG, mayor o igual 80%). Peso molecular 458,37, formula molecular C₂₂H₁₈O₁₁ (proveniente de Laboratorios Sigma-Aldrich).

Solventes

Acetonitrilo, agua tipo 1 (conductividad de 0,05 μ S/cm y filtrada por membrana de 0,22 μ m), metanol, tolueno, acetato de etilo, ácido acético y tetrahidrofurano.

2.4.2 Condiciones del método (HPLC-DAD)

Para la determinación de catequinas, EGCG y cafeína presentes en las muestras comerciales que contienen té verde se seleccionaron las características mostradas en la Tabla 2. La separación cromatográfica se optimizó con la fase móvil, garantizando un pH de 3,08.

Tabla 2. Condiciones para método HPLC-DAD

Columna	Phenomenex, C18 (150 x 2,1mm) 2,6 μ m
Velocidad Flujo	0,400 mL/min
Volumen de Inyección	4,00

Detector	DAD
Temperatura de la Columna	35°C
Eluentes	A: Acetonitrilo
	B: 960 mL ácido acético + 20 mL acetonitrilo + 20 mL tetrahidrofurano

Las muestras y estándares se eluyeron con el gradiente mostrado en la Tabla 3.

Tabla 3. Gradiente utilizado para HPLC-DAD

Gradiente	Tiempo	%A	%B
	0	0	100
	9	50	50
	15	30	70
	18	0	100
	25	0	100

2.4.3 Condiciones del método (HPTLC)

La metodología para el método HPTLC se realizó en placas de TLC con respaldo de aluminio (10cmx 10cm, espesor de 0,2mm), se pusieron las muestras en la placa con un CAMAG Nanomat 4 con un capilar de 1,0 μ L, se llevaron a una cámara CAMAG de doble canal. Las placas se desarrollaron usando Tolueno: Acetato de etilo: Ácido Acético (2:3:1). Posteriormente se secó la placa en una plancha de calentamiento a 35°C hasta que no quedaran rastros de solvente. Se revelaron con cloruro de hierro (III), luego se tomó una fotografía de la placa con el equipo Amersham Image 600 para la posterior identificación de catequinas y EGCG, mientras que para cafeína se tomó la fotografía en la cámara UV y se analizaron los resultados con el software Image J, el cual es un programa de procesamiento digital de dominio público desarrollado en el National Institute of Health (Schneider, Rasband, & Eliceiri, 2012).

2.4.4. Valoración de Catequina, EGCG y cafeína

2.4.4.1 Preparación del estándar de catequina, EGCG y cafeína para HPLC

En una balanza Sartorius se pesó 5,0mg de cada estándar y se llevó a un matraz, y se aforó a 5mL con agua: acetonitrilo (80:20) para crear una solución madre de 5000ppm. Posteriormente se realizaron diluciones en serie para obtener concentraciones de 500, 300, 230, 180 y 150ppm para la obtención de la curva de calibración.

2.4.4.2 Preparación del estándar de catequina, EGCG y cafeína para HPTLC

En una balanza Sartorius se pesó 7,5mg de cada estándar y se llevó a un vial, se aforó a 1,5mL con agua: acetonitrilo (80:20), haciendo uso de una micropipeta de 1000 μL (Gilson™ F123602), para crear una solución madre 5,0 μg . Posteriormente se realizaron diluciones en serie para obtener contenido de 3,0, 2,0, 1,0 y 0,5 μg para la obtención de la curva de calibración.

2.4.4.3 Preparación de la muestra

En una balanza Sartorius se pesó 1,0g de muestra de té verde y disolver en 10mL de agua: acetonitrilo (80:20), llevar al sonicador ultrasónico multifrecuencia (Elmasonic E-120H) por 15 minutos a 50°C. Posteriormente se filtró al vacío con filtros Fisher Brand de diámetro de 150mm. Para el caso de la muestra que iba a ser llevada al HPLC, se realizó una dilución de 200 μL de la muestra en 1mL de Agua: Acetonitrilo (80:20).

2.5 Resultados

A continuación se muestran los resultados obtenidos por las valoraciones realizadas por el método usualmente usado, HPLC y el método que se busca comparar, HPTLC.

2.5.1 Valoración de Catequinas, EGCG y cafeína por HPTLC.

Se realizaron las curvas de calibración, las cuales se realizaron por duplicado, con los estándares (Catequina, EGCG y Cafeína), con 5 puntos para cada curva de calibración. Se obtuvieron los datos a partir de la placa de TLC mostrada en la Figura 5, imagen que fue capturada por el Amersham 600 y procesada por el programa ImageJ.

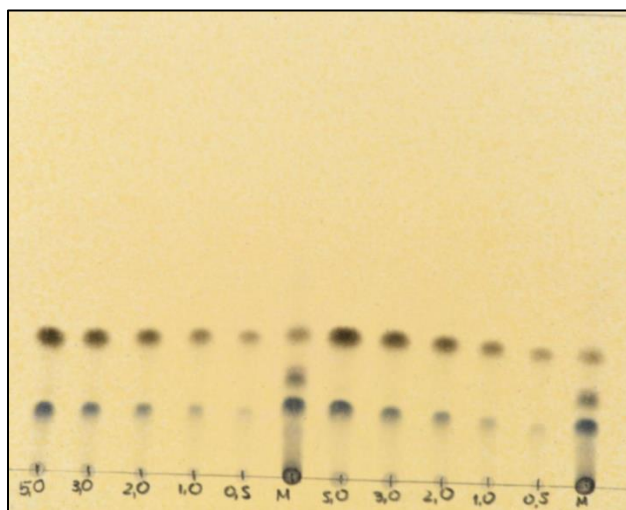


Figura 5. Curva de Calibración y Muestra

Se debió recalcular la cantidad realmente sembrada en la placa, ya que no se pesó exactamente lo estipulado. En la Tabla 4 se muestran los valores reales sembrados en la placa de TLC.

Tabla 4. Valores reales para curvas de calibración

	Catequina	EGCG	Cafeína
Valor esperado (µg)	Valor real (µg)		
5,00	5,33	4,73	4,13
3,00	3,19	2,84	2,48
2,00	2,67	2,37	2,01
1,00	1,33	1,18	1,03
0,50	0,67	0,59	0,51

Para catequinas se obtuvo un coeficiente de correlación de 0,9999 y la ecuación de la recta obtenida fue $Y = 1099 \cdot X - 184,20$.

CURVA DE CALIBRACIÓN - CATEQUINA

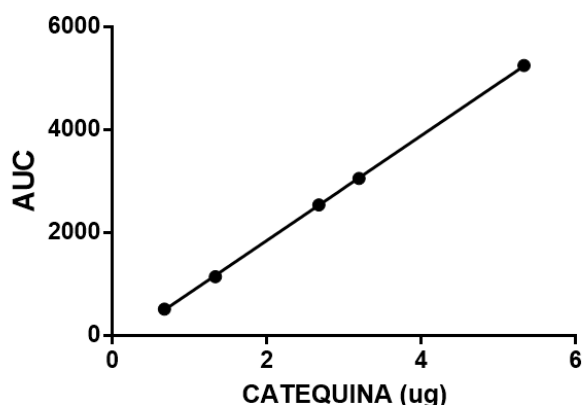


Figura 6. Curva de calibración de estándar de Catequina

Para EGCG se obtuvo un coeficiente de correlación de 0,9997 y la ecuación de la recta obtenida fue $Y = 2489x - 88,09$

CURVA DE CALIBRACIÓN - EGCG

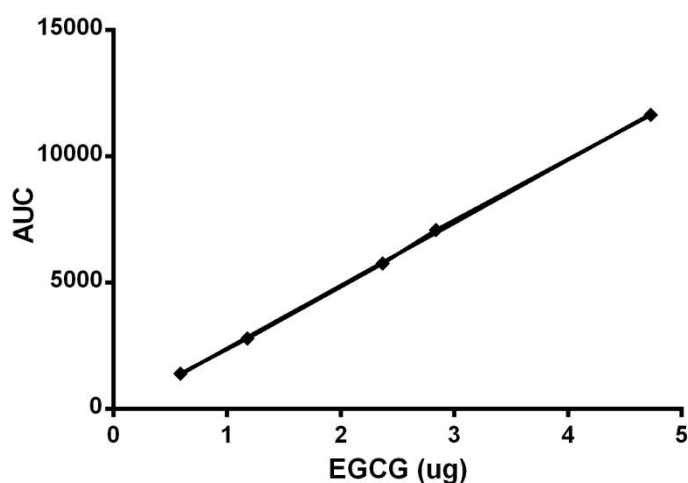


Figura 7. Curva de Calibración de estándar de EGCG

Para cafeína se obtuvo un coeficiente de correlación de 0,9997 y la ecuación de la recta fue $Y = 597,5x - 23,03$.

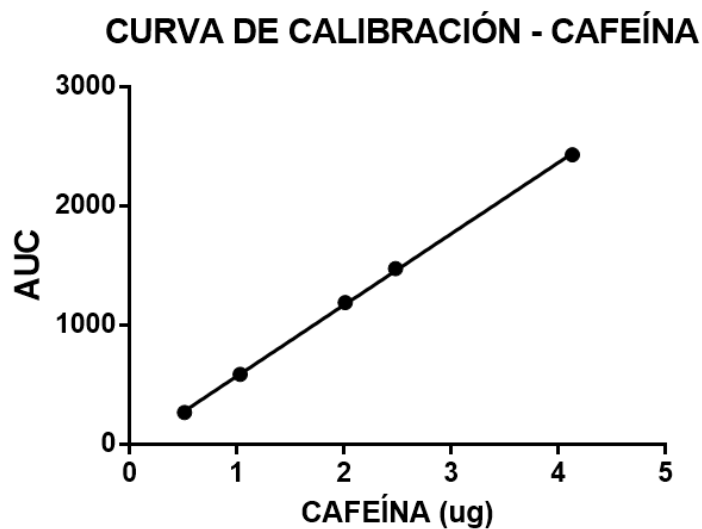


Figura 8. Curva de calibración de estándar de Cafeína

En la figura 8 se muestra el resultado de la valoración realizada por HPTLC, donde la imagen obtenida se procesó por el software ImageJ obteniendo un cromatograma.

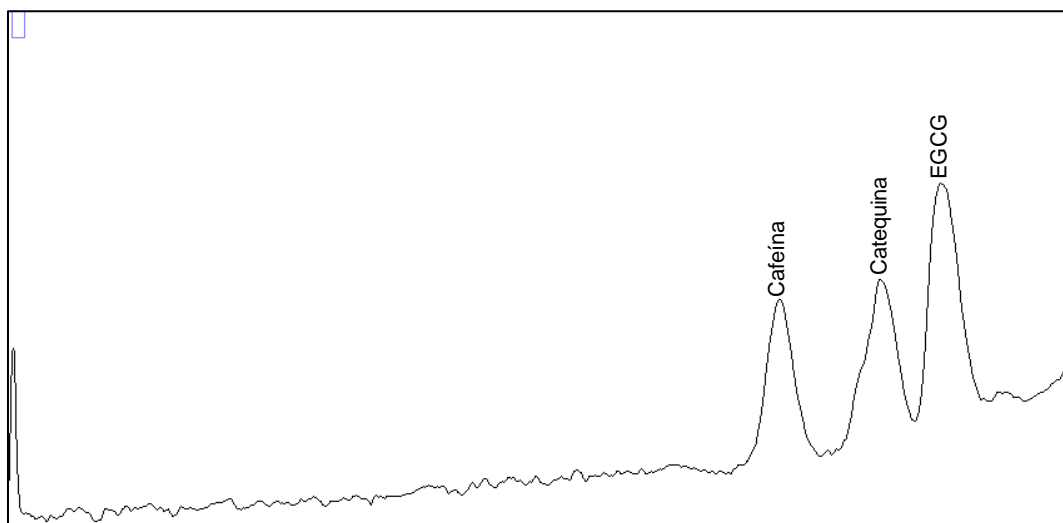


Figura 9. Valoración de muestra de Té verde por HPTLC

En la Tabla 5, se presenta una recopilación de los datos obtenidos para la valoración de Catequina, EGCG y Cafeína, mediante el método de HPLC. Se encuentran las áreas obtenidas luego del tratamiento de las placas, la cantidad que se obtuvo interpolando el resultado de la muestra, y la concentración de la misma luego de realizar los cálculos estequiométricos necesarios.

Tabla 5. Resultados valoración HPTLC

Nombre	Área	Cantidad (µg)	Concentración (ppm)
Cafeína	1028,560	1,760	1760
Catequina	3649,740	3,762	3762
EGCG	5887,255	2,400	2400

2.5.2 Valoración de Catequinas, EGCG y cafeína por HPLC.

A continuación se muestran las curvas de calibración obtenidas para catequina, EGCG y Cafeína, las cuales se realizaron a concentraciones de 500, 300, 230, 180 y 150ppm.

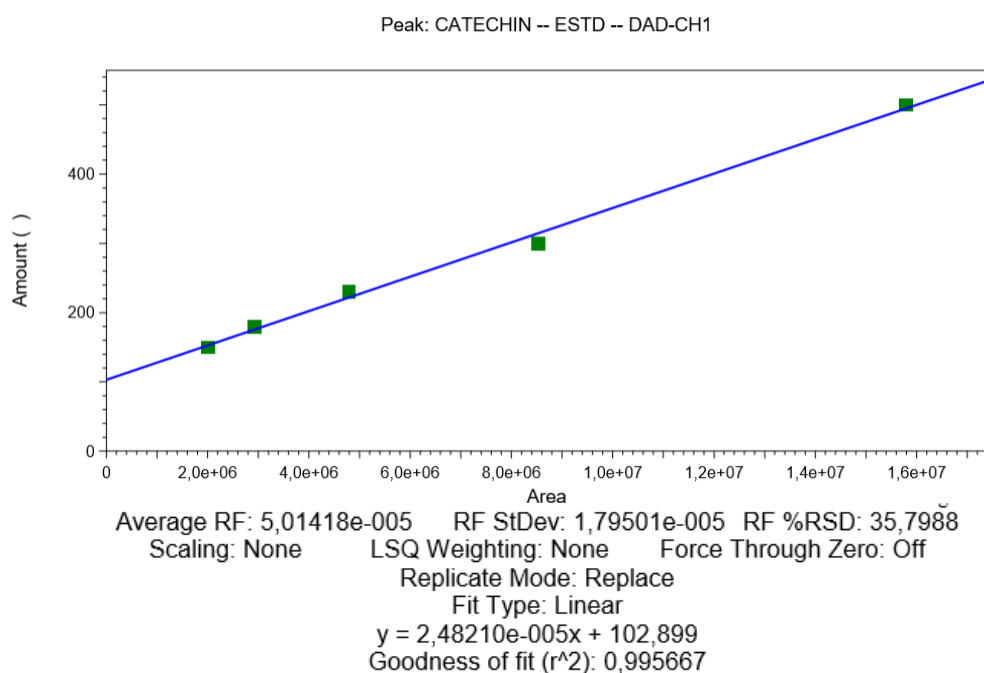
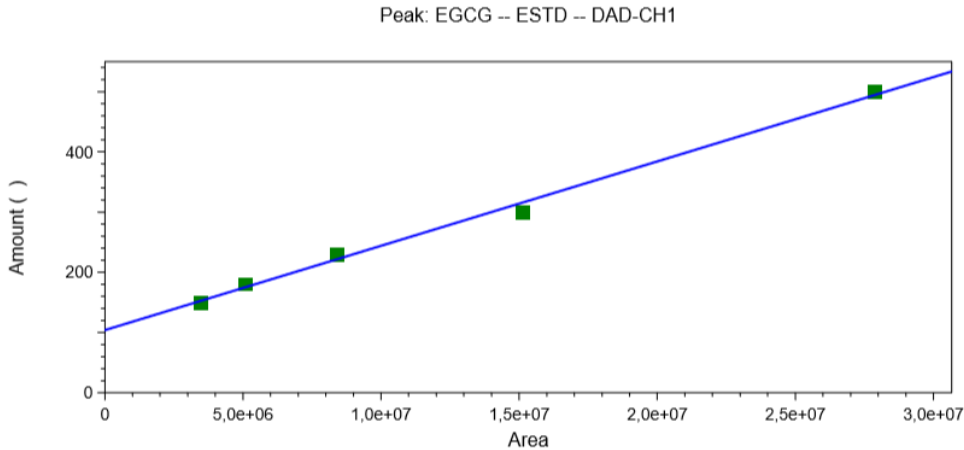
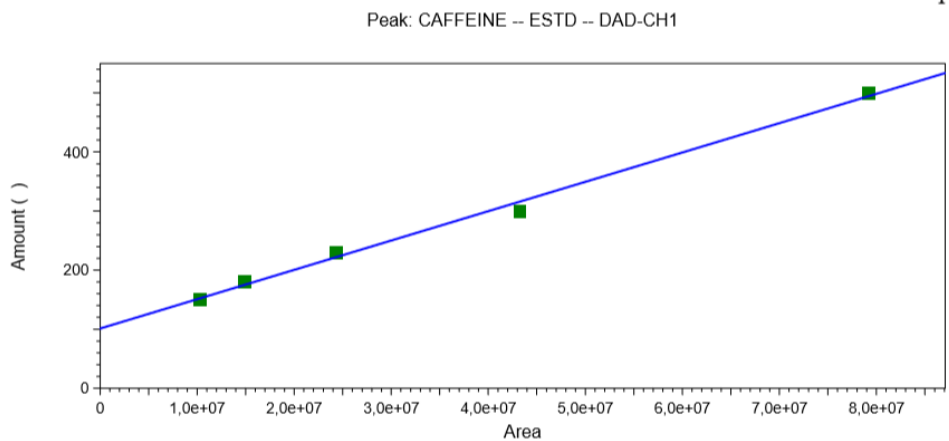


Figura 10. Curva de calibración de estándar Catequina



EGCG (DAD-CH1)
 Average RF: 2,87326e-005 RF StDev: 1,06004e-005 RF %RSD: 36,8933
 Scaling: None LSQ Weighting: None Force Through Zero: Off
 Replicate Mode: Replace
 Fit Type: Linear
 $y = 1,40056e-005x + 104,021$
 Goodness of fit (r^2): 0,995181

Figura 11. Curva de calibración de estándar de EGCG



CAFFEINE (DAD-CH1)
 Average RF: 9,87442e-006 RF StDev: 3,49053e-006 RF %RSD: 35,3492
 Scaling: None LSQ Weighting: None Force Through Zero: Off
 Replicate Mode: Replace
 Fit Type: Linear
 $y = 4,96497e-006x + 101,260$
 Goodness of fit (r^2): 0,995162

Figura 12. Curva de calibración de estándar de Cafeína

A continuación se muestra el resultado de la valoración en la muestra de Té verde, por el método de HPLC incluyendo los parámetros que garantizan la idoneidad del método.

VALORACIÓN POLIFENOLES Y CAFEINA EN TE VERDE
LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES

Area % Report

Data File: C:\PROYECTOS LCU No.3\TE VERDE\Data\MUESTRA TE VERDE002.dat
Method: C:\PROYECTOS LCU No.3\TE VERDE\Method\TE VERDE RENOVADO.met
Acquired: 23/04/2018 11:03:49
Printed: 30/04/2018 17:41:13

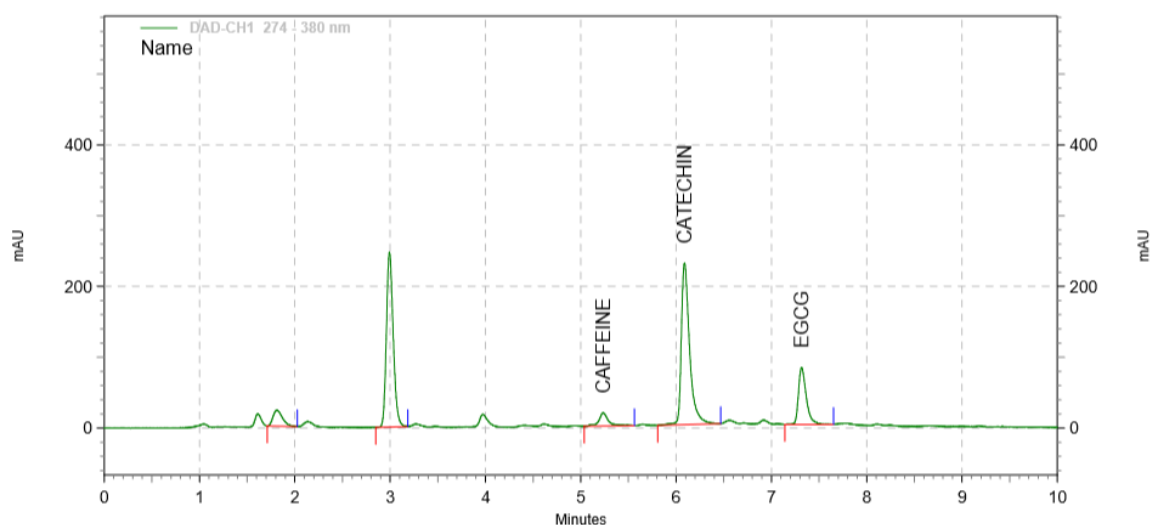


Figura 13. Valoración de Catequina, EGCG y Cafeína en Muestra de Té verde

**DAD-CH1
274 - 380
nm Results**

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates (USP)	Capacity factor	Resolution (USP)	Asymmetry	Raw Amount
CAFFEINE	5,236	529342	17511	2,51398	15,50908	1,130	103,88772
CATECHIN	6,089	5500886	26860	3,08669	5,56125	1,688	239,43637
EGCG	7,317	1840222	40110	3,91051	8,32908	1,513	129,79402
Totals		7870450					

Figura 14. Resultados de parámetros de idoneidad de método

Debido a que se realizó una dilución de la muestra para la inyección en el HPLC, se realizaron los cálculos necesarios para hallar la concentración real de la muestra, estos se encuentran en la Tabla 6.

Tabla 6. Resultados valoración HPLC de Té verde

Nombre	Concentración (ppm)
Cafeína	519,439
Catequina	1197,18
EGCG	618,970

2.6 Discusión

2.6.1. Preparación de la Muestra de Té verde

La preparación de la muestra de Té verde se realizó como se haría una preparación de la infusión normalmente para consumo. Se escogió la temperatura de 50°C, ya que luego de la revisión bibliográfica se concluyó que era la temperatura óptima para no afectar los contenidos ni las características de los componentes de importancia en este proyecto.

La disolución de la muestra de té se realizó en una mezcla de Agua: Acetona (80:20), ya que la extracción solamente con agua presenta baja eficiencia comparado con los solventes polares como lo es el acetonitrilo. (Vuong et al., 2010).

2.6.2 Valoración de Catequina, EGCG y Cafeína en Té verde mediante HPTLC.

Para la valoración de catequina, EGCG y cafeína mediante HPTLC, se optimizó el método mediante el uso de solventes, ya que se buscaba que hubiera buena resolución de las bandas y que el R_f no fuera tan alto. Luego de pruebas con solventes como tolueno, metanol, acetato de etilo, ácido fórmico y ácido acético, a diferentes proporciones, la combinación más adecuada fue tolueno: Acetato de etilo: ácido acético (2:3:1), donde el ácido acético se usó como acondicionador de pH para garantizar el de máxima estabilidad para los polifenoles, el cual es igual o menor a 4.

Para realizar la curva de calibración se realizó un mix de los tres estándares en cantidades definidas para lograr siembras desde 0,5 a 5,0 µg, las cuales son las típicas para esta técnica (Boudesocque-Delaye et al., 2018). Y para la identificación de las bandas se realizaron pruebas preliminares con cada estándar por separado.

El sembrado en la placa se realizó con el Nanomat 4 y un capilar de 1,0 µL con el fin de realizar un sembrado volumétrico que hiciera más fácil la cuantificación de catequina, cafeína y EGCG. También se realizó un revelado con cloruro de hierro (III), para lograr la visualización de los polifenoles (Catequina y EGCG), donde las bandas tomaban una coloración de color negro azulado, indicando su presencia. Para cafeína el revelado se lograba por medio de una cámara de UV, donde se podía visualizar la banda generada en la placa.

Inicialmente se pretendía usar el equipo *Amersham Image 600* y su software para obtener los resultados por medio de densitometría de las bandas obtenidas en las TLC, pero el software no era lo suficientemente flexible para lograr obtener los resultados esperados, por tanto, se decidió usar únicamente para realizar el

registro fotográfico de catequina, EGCG y cafeína y analizar lo allí obtenido por ImageJ, un programa de procesamiento de imagen digital.

En la figura 8 se muestra el cromatograma obtenido luego del procesamiento de la imagen por medio del programa ImageJ, el cual a pesar de contar con una resolución buena, no cumple satisfactoriamente con algunos parámetros como el ancho de pico o la simetría del mismo, además con lo observado en el cromatograma también es posible aseverar que la relación señal/ruido no es la óptima.

Lo anterior puede deberse a la calidad de imagen obtenida, ya que el tiempo de exposición de la placa a la luz es proporcional a la calidad de la imagen obtenida, también, que la imagen para cafeína no se tomó en un lugar oscuro y que no existió la seguridad acerca de si la luz UV iluminaba toda la placa por igual, lo que pudo causar problemas en la línea base del cromatograma obtenido. También pudo afectar la derivatización que se realizó a la placa, ya que se debe procurar tener un recubrimiento uniforme para poder tener una correcta cuantificación.

Los análisis realizados por este tipo de algoritmos aún no tienen una alta precisión y son útiles para verificar presencia de compuestos más no para la cuantificación de los mismos con altos niveles de confianza (Tang Tie-xin, 2008). Esto se debe a que los algoritmos ofrecidos en la actualidad, no eliminan el fondo y actúan por reconocimiento de bordes, integrando así el valor de las bandas, lo que genera alto contenido de ruido y posibles imprecisiones en el contenido real de la banda.

Mediante los argumentos anteriores se encuentra una explicación a las concentraciones tan altas halladas para catequina, EGCG y cafeína en la valoración por medio de esta técnica.

2.6.3 Valoración de Catequina, EGCG y Cafeína en Té verde mediante HPLC.

Para la valoración de Catequina, EGCG y Cafeína mediante HPLC se utilizó una columna Phenomenex, C18 (150 x 2,1mm) 2,6 μm , que es de fase reversa, lo que quiere decir que separa las moléculas teniendo como base su polaridad, y se rige por el carácter hidrófobo del analito, lo que quiere decir que al aumentar el número de grupos apolares la interacción es mayor.

Se hace necesario tener en cuenta los grupos funcionales polares que contienen los analitos, ya que aunque las interacciones hidrófobas sean quienes determinan la retención, son estos grupos funcionales quienes favorecen la interacción con la fase móvil.

Para obtener una resolución adecuada de los picos en un tiempo razonable, se desarrollaron pruebas de solventes. Se probaron varias fases móviles acuosas con acetonitrilo, metanol y tetrahidrofurano como codisolventes, los mejores resultados se obtuvieron con acetonitrilo, tetrahidrofurano y ácido acético como

modificador de pH, ya que la catequina y la EGCG contienen muchos grupos hidroxilo en su estructura que al exponerse a un medio polar pueden formar puentes de hidrógeno y modificar el pH requerido de 4, donde se encuentra la máxima estabilidad de estas moléculas.

A partir de la revisión bibliográfica, se encontró que los máximos de absorción en UV para estas tres moléculas, aparecía cuando se usaba 274nm como la longitud de onda analítica. En la figura 12 se muestra el cromatograma obtenido bajo estas condiciones.

Los tiempos de retención obtenidos en cromatograma de la Figura 12, los cuales pertenecen a la muestra, se pueden explicar mediante el coeficiente de reparto octanol/agua, el cual mide la solubilidad diferencial de un analito en estos dos solventes, y ayuda a deducir el grado de hidrofobicidad que tiene el mismo. Para el caso de los analitos aquí valorados son de -0,55 para cafeína, 1,80 para catequina y 3.08 para EGCG ("Chemicalize," n.d.). Cabe aclarar que a medida que aumenta el valor de este coeficiente de reparto, aumenta la hidrofobicidad y que este valor se encuentra estrechamente relacionado con la polaridad de la molécula, por lo que a partir de este dato se podía inferir el orden de salida de las moléculas en valoración.

Para obtener los resultados de la valoración mostrados en la Tabla 6, se realizaron las curvas de calibración para Catequina, EGCG y Cafeína y posteriormente se hizo el ajuste estequiométrico teniendo en cuenta la dilución que se había hecho anteriormente a la inyección en el HPLC. Los coeficientes de correlación para los tres estándares fueron más o menos 0,99, como se puede ver en las figuras 9,10 y 11. Lo que indica que el método es adecuado.

Además de la linealidad, corroborada por el coeficiente de correlación, los resultados obtenidos para resolución cromatográfica son buenos, ya que se considera que para determinar que una resolución es muy buena, considerando que los máximos de los picos deben estar separados al menos 4 desviaciones estándar, lo que quiere decir que al tener un valor mayor a 1,5, equivalente a 6 desviaciones estándar, representa una resolución completa (Bamford & Tipper, 1978).

En cuanto a la asimetría del pico, los valores son aceptables, ya que ningún valor supera el valor de 2,0 y el mayor valor es de 1,688 correspondiente al valor de asimetría de la catequina. Por otra parte para el factor de capacidad se espera que no sean mayores que 10, ya que indica que se está desperdiciando tiempo analítico, pero tampoco menores a la unidad ya que no estaría proporcionando una resolución adecuada entre los solutos de elución (Universidad de Alicante, n.d.), por tanto, los valores obtenidos para el método son adecuados y reiteran la idoneidad del método.

2.6.4 Comparación de Valoraciones por HPTLC y HPLC

Luego de haber finalizado las dos valoraciones, y teniendo en cuenta que para las dos se usó la misma muestra, se esperaba obtener los mismos o resultados muy semejantes para comprobar que había semejanza y que era indiferente emplear un método o el otro.

En la Tabla 7, se encuentran los resultados obtenidos para cada valoración y se observa claramente una diferencia significativa entre los valores obtenidos para cada uno de los métodos aplicados a la valoración.

Tabla 7. Resultados de contenidos de valoraciones

Nombre	Contenido (mg/g)	
	HPTLC	HPLC
Cafeína	17,60	5,194
Catequina	37,62	11,97
EGCG	24,00	6,189

Los datos de referencia tomados de la USDA Dietary Supplement, concuerdan con los datos obtenidos para la técnica de HPLC, ya que para catequina es de 10,8 mg, para EGCG es 4,25mg y para cafeína de 9,0mg. Los datos presentan variaciones porque como se ha explicado a lo largo del documento los contenidos de estas tres moléculas se ven modificados por el proceso de producción (Andrews et al., 2017).

Se hace evidente las deficiencias mostradas para el método de HPTLC explicadas anteriormente, las cuales son variables que podrían controlarse para obtener mejores resultados. Por su parte los resultados obtenidos en la valoración por HPLC contienen valores que concuerdan con los amplios rangos que se encuentran en la bibliografía, ya que no existe un intervalo estricto establecido de contenidos de estas moléculas en el té verde, porque estos dependen del proceso que se lleve a cabo en la producción del mismo.

Es posible afirmar con los resultados obtenidos, que las técnicas bajo las condiciones trabajadas durante esta investigación no son comparables, y que la técnica más recomendada para realizar una cuantificación es HPLC, mas sin embargo, teniendo en cuenta las variables ya mencionadas, podría generarse una mejora significativa en la técnica de HPTLC para generar mayor robustez,

precisión y exactitud a los datos que se obtienen. Ya que el problema no se encuentra durante el desarrollo de la placa, si no durante su procesamiento para obtener el cromatograma por densidad.

La Técnica de HPTLC fue capaz de identificar y separar los estándares seleccionados, pero no tuvo alta efectividad en cuanto a cuantificación. Esta metodología ofrece ventajas significativas en cuanto a la optimización de uso de solventes y la capacidad que tiene para poder ejecutar simultáneamente varias muestras, ahorrando en tiempo y costos. Mientras que el método de HPLC suele ser un método más robusto, con grados más altos de replicación y precisión en la cuantificación.

2.7 Conclusiones

Las condiciones establecidas para la valoración cromatográfica por HPLC-DAD permitieron realizar una interpretación cuantitativa de los cromatogramas y teniendo como referencia los estándares a diferentes concentraciones, se logró valorar los contenidos de catequina, cafeína y EGCG en la muestra.

El desarrollo de la metodología de HPTLC para valorar contenido de catequina, cafeína y EGCG en muestras comerciales de té verde presentó inconvenientes en la cuantificación de estas moléculas en la muestra, probablemente debido a las limitaciones de sensibilidad del software.

Los resultados obtenidos en el trabajo indicaron que las técnicas de HPLC-DAD y HPTLC no son comparables para realizar valoraciones de catequinas, cafeína y EGCG en muestras de té verde.

Los resultados de este proyecto muestran claramente que HPLC sigue siendo un método más robusto y se prefiere para el análisis cuantitativo.

2.8 Recomendaciones

Realizar una estandarización y validación de la metodología para valoración de catequina, cafeína y EGCG por HPLC-DAD, para contar con una herramienta confiable que permita realizar cuantificaciones de estos analitos en productos comerciales, teniendo en cuenta el consumo masivo de estos productos y los efectos saludables que causan en las personas.

Continuar trabajando con la metodología de HPTLC, controlando las variables que afectan los resultados que se obtienen a partir de esta técnica, ya que es una técnica más económica y más rápida.

3.0 Bibliografía

- Amersham TM Imager 600. (2014). Retrieved from http://ai.saiblogs.inf.um.es/wp-content/uploads/sites/8/2014/11/29098107ac_amersham-imager-600.pdf
- Andrews, K. W., Gusev, P. A., Savarala, S., Dang, P., Oh, L., Atkinson, R., & Mcneal, M. (2017). USDA Dietary Supplement Ingredient Database Release 4.0 (DSID-4) Green Tea Dietary Supplement Pilot Study Dietary Supplement Ingredient Database Team. Retrieved from <http://dsid.usda.nih.gov>
- Araya-Farias, M., Gaudreau, A., Rozoy, E., & Bazinet, L. (2014). Rapid HPLC-MS method for the simultaneous determination of tea catechins and folates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(19), 4241–4250. <http://doi.org/10.1021/jf4053258>
- Báez Pérez, E., Quiñones Gálvez, J., Toca, C. S., & Torres, J. M. (2017). Sistema de análisis de imágenes de placas de HPTLC Analysis System of HPTLC plate images. *Revista Cubana de Ciencias Informáticas*, 11(3). Retrieved from <http://rcci.uci.cu>
- Bamford, C. H., & Tipper, C. F. H. (Charles F. H. (1978). *Complex catalytic processes*. Elsevier Scientific Pub. Co. Retrieved from <https://es.scribd.com/doc/215256226/Introduccio-n-a-la-HPLC-Applicacio-n-y-Pra-ctica-O-A-Quattrocchi-S-A-de-Andrizzi-R-F-Laba>
- Boudesocque-Delaye, L., Lanoue, A., Dorat, J., Bruyère, F., Gueiffier, A., & Enguehard-Gueiffier, C. (2018). Quality control of commercial cranberry products: HPTLC-densitometry a new deal. *Food Control*, 86, 214–223. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.11.017>
- Camag. (2017). Sample Application | CAMAG. Retrieved May 6, 2018, from http://www.camag.com/en/tlc_hptlc/products/sample_application.cfm
- Chellino, M., Park, H. H., Ho, J., Scherr, R. E., Keen, C. L., & Zidenberg-Cherr, S. (2016). Nutrition and Health Info Sheet: Catechins and Epicatechins. Retrieved from <http://nutrition.ucdavis.edu/content/infosheets/factsheets/fact-pro-catechins.pdf>
- Chemicalize. (n.d.). Retrieved May 1, 2018, from <https://chemicalize.com/#/calculation>
- Chow, K. B., Kramer, I. (1990). All the Tea in China. Retrieved April 25, 2018, from <http://www.worldcat.org/title/all-the-tea-in-china/oclc/21596701?page=citation>
- Chu, K. O. N., Chan, K. P., Wang, C. C., Chu, C. Y., Li, Y., Choy, K. W., ... Pang, C. P. (2010). Green tea catechins and their oxidative protection in the rat eye.

Journal of Agricultural and Food Chemistry, 58(3), 1523–1534.
<http://doi.org/10.1021/jf9032602>

Crawford scientific. (n.d.). Peak Tailing in HPLC. Retrieved April 25, 2018, from <https://www.crawfordscientific.com/technical/chromatography-technical-tips/hplc-chromatography-tips/peak-tailing-in-hplc>

Duffau Boris, Rojas Fabiola, G. I. (2010). Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición. Retrieved from [http://www.ispch.cl/sites/default/files/documento_tecnico/2010/12/Guia Técnica 1 validación de Métodos y determinación de la incertidumbre de la medición_1.pdf](http://www.ispch.cl/sites/default/files/documento_tecnico/2010/12/Guia_Técnica_1_validación_de_Métodos_y_determinación_de_la_incertidumbre_de_la_medición_1.pdf)

El-Shahawi, M. S., Hamza, A., Bahaffi, S. O., Al-Sibaai, A. A., & Abduljabbar, T. N. (2012). Analysis of some selected catechins and caffeine in green tea by high performance liquid chromatography. *Food Chemistry*, 134(4), 2268–2275. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.03.039>

El tiempo. (2015). Mercado del té en Colombia y el Mundo desde 1.990 - eltiempo.com. Retrieved April 25, 2018, from <http://www.eltiempo.com/archivo/documento/CMS-16653666>

Fang, R., Redfern, S. P., Kirkup, D., Porter, E. A., Kite, G. C., Terry, L. A., ... Simmonds, M. S. J. (2017). Variation of theanine, phenolic, and methylxanthine compounds in 21 cultivars of *Camellia sinensis* harvested in different seasons. *Food Chemistry*, 220, 517–526. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.047>

García, R., & Susana, A. (2002). Cromatografía. Retrieved from <http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/Cromatografia.pdf>

Gil Quintero, J. A. (2012). Extracción y actividad antioxidante de catequinas presentes en cacao Colombianos durante los procesos de pre-industrialización. *Universidad de Antioquia*, 119. <http://doi.org/10.5334/ai.1615>

Gracia-Lor, E., Rousis, N. I., Zuccato, E., Bade, R., Baz-Lomba, J. A., Castrignanò, E., ... Castiglioni, S. (2017). Estimation of caffeine intake from analysis of caffeine metabolites in wastewater. *Science of The Total Environment*, 609, 1582–1588. <http://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.07.258>

Henning, S. M., Fajardo-Lira, C., Lee, H. W., Youssefian, A. A., Go, V. L. W., & Heber, D. (2003). Catechin content of 18 teas and a green tea extract supplement correlates with the antioxidant capacity. *Nutrition and Cancer*, 45(2), 226–235. http://doi.org/10.1207/S15327914NC4502_13

HPLC: Waters. (n.d.). Retrieved November 6, 2017, from http://www.waters.com/waters/es_ES/HPLC/nav.htm?cid=514251&locale=es_ES

- Khan, N., & Mukhtar, H. (2013). Tea and health: studies in humans. *Current Pharmaceutical Design*, 19(34), 6141–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23448443>
- Litwack, G. (2001). *Vitamins and hormones: advances in research and applications. Volume 62*. Academic Press.
- Loescher, C. M., Morton, D. W., Razic, S., & Agatonovic-Kustrin, S. (2014). High performance thin layer chromatography (HPTLC) and high performance liquid chromatography (HPLC) for the qualitative and quantitative analysis of *Calendula officinalis*—Advantages and limitations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 98, 52–59. <http://doi.org/10.1016/j.jpba.2014.04.023>
- López, A. M. (2013). METODOLOGÍA PARA LA DETERMINACIÓN DE EPIGALOCATEQUINA GALATO EN TÉ VERDE POR UPLC-PDA, I.
- Nishitani, E., & Sagesaka, Y. M. (2004). Simultaneous determination of catechins, caffeine and other phenolic compounds in tea using new HPLC method. *Journal of Food Composition and Analysis*, 17(5), 675–685. <http://doi.org/10.1016/j.jfca.2003.09.009>
- Peter F. Goggi. (2017). State of the Industry. Retrieved April 25, 2018, from <http://www.teausa.com/14654/state-of-the-industry>
- Popovic Nevena, S. J. (2014). Comparative study of the quantification of thin-layer chromatograms of a model dye using three types of commercial densitometers and image analysis with ImageJ. *Trends in Chromatography*. Retrieved from <https://pdfs.semanticscholar.org/eaeb/5e19882b21bdb8e07f02183980684ff1f864.pdf>
- Pozharitskaya, O. N., Kosman, V. M., Shikov, A. N., Demchenko, D. V., Eschenko, A. Y., & Makarov, V. G. (2007). Comparison between HPLC and HPTLC densitometry for the determination of icariin from *Epimedium koreanum* extracts. *Journal of Separation Science*, 30(5), 708–712. <http://doi.org/10.1002/jssc.200600442>
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 671–675. <http://doi.org/10.1038/nmeth.2089>
- Sistema Nacional Argentino de Vigilancia y Monitoreo de Plagas. (2015). *Camellia sinensis* | Sistema Nacional Argentino de Vigilancia y Monitoreo de plagas. Retrieved April 25, 2018, from <http://www.sinavimo.gov.ar/cultivo/camellia-sinensis>
- Skoog, D. A. (1992). *Principios de Análisis Instrumental* (5th ed.). España: McGraw-Hill. Retrieved from <https://es.scribd.com/doc/63892151/Principios-de-Analisis-Instrumental-Skoog-Holler-Nieman-5ta-Edicion>

- Tang Tie-xin, W. H. (2008). An Image Analysis System for Thin-Layer Chromatography Quantification and Its Validation. *Journal of Chromatographic Science*. Retrieved from https://watermark.silverchair.com/46-6-560.pdf?token=AQECAHi208BE49Ooan9kkhW_Ercy7Dm3ZL_9Cf3qfKAc485ysgAAAAa4wggGqBgkqhkiG9w0BBwagggGbMIIBIwIBADCCAZAGCSqGS1b3DQEHATAeBglghkgBZQMEAS4wEQQMQLb1Sn-TNnlpQZmEAgEQgllBYdESchHYEaYGhoFZ1uY4BDgjRARrqE-DZLI3lnSKtpWmzeV
- Turnbull, D., Rodricks, J. V., Mariano, G. F., & Chowdhury, F. (2017). Caffeine and cardiovascular health. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 89, 165–185. <http://doi.org/10.1016/j.yrtph.2017.07.025>
- Universiad de Alicante. (n.d.). CROMATOGRAFÍA: PRINCIPIOS GENERALES. Retrieved from <https://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/8246/7/T2cromagraf.pdf>
- Verkhatsky, A. (2005). Physiology and Pathophysiology of the Calcium Store in the Endoplasmic Reticulum of Neurons. *Physiological Reviews*, 85(1), 201–279. <http://doi.org/10.1152/physrev.00004.2004>
- Vuong, Q. V., Golding, J. B., Nguyen, M., & Roach, P. D. (2010). Extraction and isolation of catechins from tea. *Journal of Separation Science*, 33(21), 3415–3428. <http://doi.org/10.1002/jssc.201000438>
- Yogini Jaiswal, Pratima Tatke, Satish Gabhe, A. V. (2013). Rapid High Performance Thin Layer Chromatographic Method for Quantitation of Catechin from Extracts of Cashew Leaves – a Short Report. *J. Food Nutr. Sci*, 63(1), 49–54. <http://doi.org/10.2478/v10222-012-0066-4>

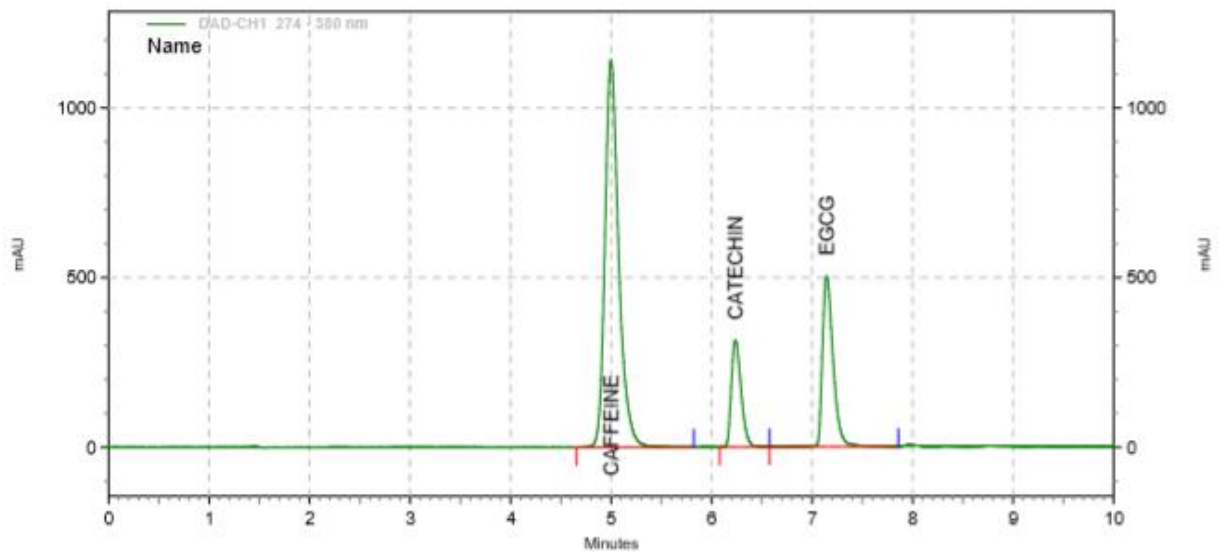
Anexos

Anexo 1. Cromatograma Curva de Calibración 300ppm

LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES

Area % Report

Data File: C:\PROYECTOS LCU No.3\TE VERDE\Data\300 PPM - 1.1-Rep1.dat
Method: C:\PROYECTOS LCU No.3\TE VERDE\Method\TE VERDE RENOVADO.met
Acquired: 12/04/2018 22:09:32
Printed: 30/04/2018 17:48:27



DAD-CHI 274 - 380 nm Results

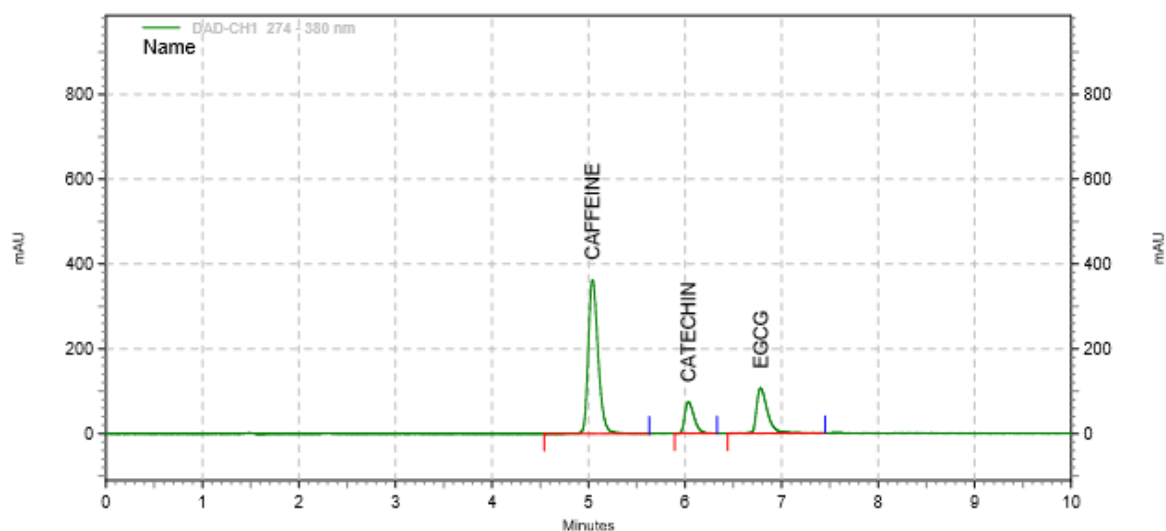
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates (USP)	Capacity factor	Resolution (USP)	Asymmetry	Raw Amount
CAFFEINE	4,999	43250862	6729	2,35515	0,00000	1,307	308,89393
CATECHI N	6,237	8487652	19330	3,18568	5,84837	1,384	307,09337
EGCG	7,144	14916690	22357	3,79474	4,89811	1,546	307,80318

Anexo 2. Cromatograma Curva de Calibración 150ppm

VALORACIÓN POLIFENOLES Y CAFEINA EN TE VERDE
LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES

Area % Report

Data File: CAPROYECTOS LCU No.3\TE VERDE\Data\150 PPM - 1-Rep1.dat
Method: CAPROYECTOS LCU No.3\TE VERDE\Method\TE VERDE RENOVADO.met
Acquired: 13/04/2018 3:54:45
Printed: 30/04/2018 17:47:42



DAD-CHI

274 - 380

nm Results

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates (USP)	Capacity factor	Resolution (USP)	Asymmetry	Raw Amount
CAFFEINE	5,042	10249918	11941	2,38367	0,00000	1,303	150,00000
CATECHI	6,036	1980033	18935	3,05089	5,52304	1,475	150,00000
N							
EGCG	6,784	3338650	18545	3,55313	3,99402	1,686	150,00000