

**ESTUDIO COMPARATIVO POR ELECTROFORESIS CAPILAR Y
CROMATOGRFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA DE CATEQUINAS
EXTRAIDAS DE PLANTAS DE LA FAMILIA *LABIACEAE*, Y
DETERMINACIÓN DE SU ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE**

**MÓNICA PATRICIA CALA MOLINA
ÁNGELA MARÍA VÁSQUEZ CARDEÑO**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA
2008**

**ESTUDIO COMPARATIVO POR ELECTROFORESIS CAPILAR Y
CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA DE CATEQUINAS
EXTRAIDAS DE PLANTAS DE LA FAMILIA *LABIACEAE*, Y
DETERMINACIÓN DE SU ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE**

**MÓNICA PATRICIA CALA MOLINA
ÁNGELA MARÍA VÁSQUEZ CARDEÑO**

**Trabajo de grado presentado como requisito
parcial para optar el título de Química**

Directora: ELENA E. STASHENKO, Química, Ph.D.

Co-director: JAIRO R. MARTÍNEZ, Químico, Ph.D.

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE QUÍMICA

BUCARAMANGA

2008

Dedicatoria:

"A las personas más importantes en mi
vida y que amo con todo mi corazón:
mis padres Carlos y Paulina,
y mi hermano, Iván."

Mónica Cala

Dedicatoria:

"Al ser más especial y amoroso,
que ha colmado mi vida de alegrías
y bendiciones, mi mamá Lucía"

Ángela María Vásquez Cardeño

AGRADECIMIENTOS

A Díos.

A los Doctores, Elena E. Stashenko y Jairo R. Martínez, por todas sus enseñanzas y recomendaciones en el desarrollo de esta investigación.

A mis padres y mi hermano, ejemplos de vida, quienes me han brindado todo lo necesario para alcanzar las metas propuestas. Por sus orientaciones y por depositar su confianza en mí.

A Alejandro, por su compañía y apoyo incondicional en una de las etapas más importantes de mi vida.

A mis amigos, Lala, Paozz, Carlitos, Gato, Vero, Oscar, Albertico, Carlos Mario y Pípe por los gratos momentos compartidos.

Al Grupo de Polifenoles de la Universidad Tecnológica de Perería, especialmente al Profesor Hipólito Isaza, por su amabilidad y oportunos aportes en la investigación.

Al Laboratorio de Cromatografía y el Centro de Excelencia CENIVAM, por brindar todos los recursos necesarios para realizar este trabajo de grado.

A COLCIENCIAS (contrato RC-432-2004) por su apoyo económico para la realización de esta investigación.

A todas las personas que de una u otra forma contribuyeron en el desarrollo de este proyecto.

Mónica Cala

AGRADECIMIENTOS

A los Doctores Elena E. Stashenko y Jairo René Martínez por la enriquecedora oportunidad de trabajar junto a ellos, por su entusiasmo y disposición para educar y sus numerosas e inspiradoras enseñanzas.

A las Doctoras Marianny Yajaira Combariza y Luz Ángela Carreño, por su tiempo y objetiva evaluación del trabajo.

A mi mami quien con su amor, cuidados e incondicional apoyo me ha impulsado durante toda mi vida; igualmente a mi familia mi papá, tíos y primos, especialmente a Liliam, Orlando y Mónica por su constante cariño.

A los estudiantes de postgrado del laboratorio de cromatografía, Geovanna, Amner, Elkin, Alejandro, Deyanira y William, por sus observaciones y colaboración, siempre dispuestos a compartir sus experiencias y conocimientos.

A mis amigos y compañeros del laboratorio, Freys, Martica, Lucy, Andreita, Sandrita, Adrianita V, Carolis, Sayde, Edwin, Olguita, Adrianita J, Fabio, nuevamente a Gio y Amner, a todos por su compañía, apoyo, amistad, lecciones de vida y alegría.

A mis amigos, Alex, Deysi, Leyni, Albita, Carlitos, Karime, Yenny Bueno, Johana, Jhoao, Gregorio, Santiago, Jhon, Cesitar, Laurita Quiroz, Cristy y Doña María, quienes me acompañaron a lo largo de mi vida universitaria, por su valiosa amistad, por los maravillosos recuerdos, por estar a mi lado y permitirme estar junto a ellos.

Al grupo de Polifenoles de la Universidad Tecnológica de Pereira, dirigido el Dr. Jose Hipólito Isaza, por su hospitalidad y aportes para el desarrollo experimental de esta investigación.

Al Centro de investigación CENIVAM (COLCIENCIAS, contrato RC-432-2004) y en general a todos sus integrantes, por el soporte brindado para la realización de este proyecto.

Ángela María Vásquez Cardeño

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN.	22
1 ESTADO DEL ARTE.	25
1.1 CATEQUINAS.	25
1.1.1 Generalidades.	25
1.1.2 Comercio.	28
1.1.3 Actividad antioxidante.	29
1.2 FAMILIA LABIACEAE.	31
1.2.1 <i>Origanum vulgare</i> L.	32
1.2.2 <i>Salvia aratocensis</i> .	34
1.3 DETERMINACIÓN Y ANÁLISIS DE CATEQUINAS.	36
1.3.1 Cromatografía líquida de alta eficiencia.	36
1.3.2 Electroforesis capilar.	37
1.3.3 Comparación entre las técnicas analíticas.	38
2. CIENCIOMETRÍA	40
2.1 Base de datos <i>Elsevier (Scopus)</i> y <i>Web of Science</i>.	40
2.1.1 Catequinas en plantas.	40
2.1.2 Determinación de catequinas por HPLC.	44
2.1.3 Determinación de catequinas por CE.	48
3. DESARROLLO EXPERIMENTAL.	54
3.1 MATERIALES Y REACTIVOS.	54
3.1.1 Reactivos y solventes.	54
3.1.2 Material de referencia certificado.	54
3.1.3 Material de laboratorio.	54
3.2 MATERIAL VEGETAL.	55
3.3 IMPLEMENTACIÓN DE LA METODOLOGÍA DE ANÁLISIS DE CATEQUINAS POR HPLC.	56
3.3.1 Pruebas preliminares para HPLC.	57

3.3.2	Diseño experimental para HPLC.	57
3.3.3	Determinación de las figuras analíticas de mérito para HPLC.	59
3.4	IMPLEMENTACIÓN DE LA METODOLOGÍA DE ANÁLISIS DE CATEQUINAS POR CE.	61
3.4.1	Pruebas preliminares para CE.	62
3.4.2	Diseño experimental para CE.	63
3.4.3	Determinación de las figuras analíticas de mérito para CE.	63
3.5	EXTRACCIÓN DE CATEQUINAS DE MATRICES VEGETALES.	64
3.5.1	Extracción exhaustiva.	64
3.6	DETERMINACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE CATEQUINAS.	64
3.6.1	Cuantificación con cromatografía líquida de alta eficiencia.	65
3.6.2	Cuantificación con electroforesis capilar.	65
3.7	COMPARACIÓN ENTRE CE y HPLC EN EL ANÁLISIS DE CATEQUINAS.	66
3.8	EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.	66
3.9	DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO TOTAL DE FENOLES.	67
4.	ANÁLISIS DE RESULTADOS.	69
4.1	METODOLOGÍA DE ANÁLISIS DE CATEQUINAS POR HPLC.	69
4.1.1	Selección de variables y niveles para HPLC.	69
4.1.2	Implementación de la metodología.	73
4.1.3	Figuras analíticas de mérito para HPLC.	77
4.2	METODOLOGÍA DE ANÁLISIS DE CATEQUINAS POR CE.	81
4.2.1	Selección de variables y niveles para CE.	81
4.2.2	Implementación de la metodología para CE.	86
4.2.3	Figuras analíticas de mérito para CE.	89
4.3	EXTRACCIÓN DE CATEQUINAS.	93
4.3.1	Extracción exhaustiva.	93
4.4	CUANTIFICACIÓN DE CATEQUINAS.	94

4.4.1	Cuantificación de catequinas empleando HPLC.	94
4.4.2	Cuantificación de catequinas empleando CE.	102
4.5	ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS METODOLOGÍAS DE ANÁLISIS DE CATEQUINAS POR HPLC Y CE.	107
4.5.1	Figuras analíticas de mérito.	108
4.5.2	Tiempo de análisis.	109
4.5.3	Costo de análisis.	112
4.6	ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE PATRONES DE CATEQUINAS Y EXTRACTOS.	114
4.7	CONTENIDO TOTAL DE FENOLES DE CATEQUINAS PATRÓN Y EXTRACTOS.	117
4.8	RELACIÓN ENTRE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y EL CONTENIDO TOTAL DE FENOLES.	119
5.	CONCLUSIONES.	121
6.	RECOMENDACIONES.	124
7.	BILIOGRAFÍA.	125
	ANEXOS.	137

LISTADO DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Estructura general de las catequinas.	25
Figura 2. Catequinas comúnmente encontradas en matrices vegetales.	27
Figura 3. Productores, procesadores y comercializadores de extractos de té verde, por país.	29
Figura 4. Mecanismo propuesto de inhibición del radical DPPH° por compuestos fenólicos.	30
Figura 5. Especie de <i>Origanum vulgare</i> L.	33
Figura 6. Especie de <i>Salvia aratocensis</i> .	34
Figura 7. Relación países - número de publicaciones sobre catequinas en plantas.	41
Figura 8. Relación área - número de publicaciones sobre catequinas en plantas.	42
Figura 9. Relación año - número de publicaciones sobre catequinas en plantas.	42
Figura 10. Relación revista - número de publicaciones sobre catequinas en plantas.	43
Figura 11. Relación patentes - número de publicaciones sobre catequinas en plantas.	44
Figura 12. Relación países - número de publicaciones sobre catequinas en plantas, analizadas por HPLC.	45
Figura 13. Relación año - número de publicaciones sobre catequinas en plantas, analizadas por HPLC.	46
Figura 14. Relación área - número de publicaciones sobre catequinas en plantas analizadas por HPLC.	46
Figura 15. Relación revista – número de publicación sobre catequinas en plantas, analizadas por HPLC.	47

Figura 16.	Relación patentes – número de publicación sobre catequinas en plantas, analizadas por HPLC.	48
Figura 17.	Relación países – número de publicaciones sobre catequinas analizadas por CE.	49
Figura 18.	Relación año – número de publicaciones sobre catequinas analizadas por CE.	50
Figura 19.	Relación área – número de publicaciones sobre catequinas analizadas por CE.	50
Figura 20.	Relación revista – número de publicación sobre catequinas analizadas por CE.	51
Figura 21.	Relación patentes – número de publicaciones sobre catequinas analizadas por CE.	52
Figura 22.	Cromatógrafo líquido de alta eficiencia <i>Agilent 1200 Series</i> .	56
Figura 23.	Diseño experimental central compuesto 3 ³ .	58
Figura 24.	Equipo de electroforesis capilar CAPEL 105 <i>Lumex</i> .	61
Figura 25.	Espectrofotómetro <i>VIS Jenway 6300</i>	61
Figura 26.	Variación de la composición de la fase móvil para la separación de catequinas por HPLC.	70
Figura 27.	Efecto del porcentaje de metanol en la fase móvil, para el análisis por HPLC de catequinas.	70
Figura 28.	Efecto de la temperatura de análisis, para la separación de catequinas por HPLC.	72
Figura 29.	Perfil cromatográfico de las catequinas (±)-C, (-)-EC, (-)-EGC, (-)-ECG y (-)-EGCG, obtenido por HPLC-DAD-UV-Vis columna apolar ZORBAX Eclipse XDB-C18 descritos en la Tabla 10 .	75
Figura 30.	Electroforegramas de la mezcla de patrones de catequinas en modalidad de CZE.	82
Figura 31.	Efecto de la composición de la solución <i>buffer</i> sobre la separación de catequinas por MEKC.	83

Figura 32.	Electroforegrama de catequinas usando solución <i>buffer</i> con mezcla de NaH ₂ PO ₄ (20 mM), H ₃ BO ₃ (25 mM) y SDS (5 mM) pH: 8.23.	84
Figura 33.	Efecto de los modificadores orgánicos en la separación de catequinas por MEKC.	85
Figura 34.	Electroforegrama de las catequinas: (±)-C, (-)-EC, (-)-EGC, (-)-ECG y (-)-EGCG.	88
Figura 35.	Perfil cromatográfico de catequinas extraídas de té verde usando diferentes medios de extracción, obtenido por HPLC-DAD-UV-Vis columna apolar ZORBAX Eclipse XDB-C18.	94
Figura 36.	Perfil cromatográfico de catequinas extraídas de <i>Salvia aratocensis</i> , obtenido por HPLC-DAD-UV-Vis columna apolar ZORBAX Eclipse XDB-C18.	95
Figura 37.	Perfil cromatográfico de catequinas extraídas de <i>Origanum vulgare</i> L., obtenido por HPLC-DAD-UV-Vis columna apolar ZORBAX Eclipse XDB-C18.	96
Figura 38.	Espectros ultravioleta de las señales presentes en el perfil cromatográfico de extracto de <i>Salvia aratocensis</i> (Figura 36) y de los estándares de (±)-catequina y de (-)-epigallocatequina galato.	97
Figura 39.	Espectros ultravioleta de las señales presentes en el perfil cromatográfico de extracto de <i>Origanum vulgare</i> L. (Figura 37) y de los estándares de (±)-catequina y de (-)-epigallocatequina galato.	98
Figura 40.	Perfil cromatográfico de catequinas extraídas de té verde, obtenido por HPLC-DAD-UV-Vis columna apolar ZORBAX Eclipse XDB-C18 y los espectros UV de cada compuesto.	99
Figura 41.	Perfil cromatográfico de catequinas extraídas de Cacao, obtenido por HPLC-DAD-UV-Vis columna	100

apolar ZORBAX Eclipse XDB-C18 y los espectros UV de cada compuesto.

- | | | |
|-------------------|--|-----|
| Figura 42. | Electroforegramas del extracto de <i>Salvia aratocensis</i> y del extracto enriquecido. | 103 |
| Figura 43. | Electroforegramas del extracto de <i>Origanum vulgare</i> L. y del extracto enriquecido. | 104 |
| Figura 44. | Electroforegramas del extracto de té verde. | 105 |
| Figura 45. | Electroforegramas del extracto de <i>Theobroma cacao</i> . | 106 |
| Figura 46. | Antioxidantes de referencia empleados para medir la actividad antioxidante de los extractos vegetales. | 116 |
| Figura 47. | Relación entre la actividad antioxidante y el contenido total de fenoles de las sustancias puras. | 120 |
| Figura 48. | Relación entre la actividad antioxidante y el contenido total de fenoles de los extractos acuosos de <i>Origanum vulgare</i> L., <i>Salvia aratocensis</i> , té verde y cacao. | 120 |

LISTADO DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Catequinas estudiadas en alimentos y plantas.	28
Tabla 2. Resumen comparativo de los resultados obtenidos del estudio cuantitativo sobre catequinas analizadas por HPLC y CE.	53
Tabla 3. Especificaciones del material de referencia certificado.	54
Tabla 4. Identificación taxonómica de las especies bajo estudio.	55
Tabla 5. Variables y niveles del diseño experimental central compuesto 3^3 .	58
Tabla 6. Diseño experimental central compuesto 3^3 completo.	59
Tabla 7. Diseño experimental factorial multinivel 3^2 completo.	63
Tabla 8. Variables y niveles del diseño experimental factorial multinivel 3^2 .	63
Tabla 9. Resultados del diseño experimental de campo centrado.	73
Tabla 10. Coeficientes de la ecuación de regresión del modelo.	74
Tabla 11. Parámetros cromatográficos propuestos para el análisis de catequinas por HPLC.	74
Tabla 12. Tiempos de retención de las catequinas, analizadas por HPLC.	75
Tabla 13. Repetibilidad de los t_R de las catequinas, analizadas por HPLC.	76
Tabla 14. Repetibilidad de áreas de picos de las catequinas, analizadas por HPLC.	77
Tabla 15. Porcentaje de recuperación de las catequinas en el	78

	procedimiento de limpieza de la muestra.	
Tabla 16.	Linealidad y sensibilidad del método por HPLC.	78
Tabla 17.	Límite de detección y cuantificación para (±)-C, (-)-EC, (-)-EGC, (-)-ECG y (-)-EGCG por HPLC.	79
Tabla 18.	Reproducibilidad de las áreas cromatográficas de catequinas por HPLC.	80
Tabla 19.	Reproducibilidad de los t_R por HPLC.	80
Tabla 20.	Resultados del diseño experimental factorial multinivel.	86
Tabla 21.	Coeficientes de la ecuación de regresión del modelo del diseño experimental para CE.	86
Tabla 22.	Metodología propuesta para el análisis y la cuantificación de catequinas por CE.	87
Tabla 23.	Tiempo de migración de las catequinas, analizadas por CE.	88
Tabla 24.	Repetibilidad de t_M de las catequinas por CE.	90
Tabla 25.	Repetibilidad de áreas de las catequinas por CE.	90
Tabla 26.	Evaluación de la linealidad y la sensibilidad del método.	91
Tabla 27.	Límite de detección y cuantificación para (±)-C, (-)-EC, (-)-EGC, (-)-ECG y (-)-EGCG.	92
Tabla 28.	Reproducibilidad del método para t_M de las catequinas extraídas de té verde, por CE.	92
Tabla 29.	Reproducibilidad de áreas, por CE, de las catequinas extraídas de té verde.	93
Tabla 30.	Cuantificación de (±)-C, (-)-EC, (-)-EGC, (-)-ECG y (-)-EGCG en los extractos de Té verde y Cacao, por HPLC.	101
Tabla 31.	Cuantificación de (±)-C, (-)-EC, (-)-EGC, (-)-ECG y (-)-EGCG en extractos de té verde (<i>Camellia sinensis</i>) y <i>Theobroma cacao</i> , por CE.	107

Tabla 32.	Límites de detección y cuantificación de HPLC y CE de las catequinas analizadas.	108
Tabla 33.	Linealidad y sensibilidad de los métodos HPLC y CE.	109
Tabla 34.	Respuesta del detector (área) para catequina en 2 mg/L.	109
Tabla 35.	Repetibilidad de los métodos de CE y HPLC en el análisis de catequinas.	110
Tabla 36.	Reproducibilidad de los métodos de CE y HPLC para el análisis de catequinas.	111
Tabla 37.	Tiempos de análisis de cada catequina obtenidos por HPLC y CE.	112
Tabla 38.	Valores de análisis de una muestra por HPLC y CE empleando la metodología de análisis implementada en este estudio.	113
Tabla 39.	Capacidad de atrapamiento de radicales de los patrones de catequinas y antioxidantes las sustancias de referencia.	115
Tabla 40.	Valores del EC ₅₀ de extractos acuosos de las plantas bajo estudio.	116
Tabla 41.	Contenido total de fenoles de los patrones de catequinas y antioxidantes de referencia.	117
Tabla 42.	Contenido total de fenoles de diferentes extractos acuosos de muestras vegetales.	118

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

AA	Actividad antioxidante.
AG	Ácido gálico.
ARP	<i>Antiradical power</i> (Poder antirradical).
B	Pendiente de la recta.
ca.	<i>circa</i> (Aproximadamente).
(±)-C	(±)-Catequina.
CE	<i>Capillary Electrophoresis</i> (Electroforesis capilar).
CTF	Contenido total de fenoles.
CV	Coefficiente de variación.
CZE	<i>Capillary Zone Electrophoresis</i> (Electroforesis capilar en zona).
DAD	<i>Diode Array Detector</i> (Detector de arreglo de diodos).
DPPH	<i>α,α-Diphenyl-β-Picrylhydrazyl Radical</i> (Radical α,α-difenil-β-picrilhidracilo).
EC₅₀	<i>Efficient Concentration</i> (Concentración eficiente).
(-)-EC	(-)-Epicatequina.
(-)-ECG	(-)-Epicatequina galato.
(-)-EGC	(-)-Epigallocatequina.
(-)-EGCG	(-)-Epigallocatequina galato.
et al.	<i>Et alii</i> (y otros).
EOF	<i>Electrosmotic Flow</i> (Flujo electrosmótico).
EPO	<i>European Patent Office</i> (Oficina de Patentes Europea).
FAO	<i>Food and Agricultura Organization</i> (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura).
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> (Administración de drogas y alimentos).
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografía líquida de alta eficiencia).
i.d.	Diámetro interno (μm).

<i>i.e.</i>	<i>Id ets</i> (Es decir, osea).
LOD	<i>Limit of Detection</i> (Límite de detección).
LOQ	<i>Limit of Quantitation</i> (Límite de cuantificación).
MEKC	<i>Micellar Electrokinetic Chromatography</i> (Cromatografía electrocinética micelar).
MeOH	Metanol.
MRC	Material de referencia certificado.
ND	No detectado.
ODS	Octadecilsiloxano.
PVDF	<i>Polyvinylidene Fluoride</i> (Fluoruro de Polivinilideno).
S	Desviación estándar.
S_b	Desviación estándar de la pendiente de la recta.
S_{y/x}	Desviación estándar de la recta.
R²	Coefficiente de correlación.
RP	<i>Reverse Phase</i> (Fase reversa).
RP-HPLC	<i>Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa).
SB	Solución <i>Buffer</i> .
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> (Dodecil sulfato de sodio).
t_M	Tiempo de migración, <i>min</i> .
TFA	Ácido trifluoroacético.
t_R	Tiempo de retención, <i>min</i> .
UKIPO	<i>United Kingdom Intellectual Property Office</i> (Oficina de Propiedad Intelectual del Reino Unido).
USPTO	<i>US Patent Office</i> (Oficina de Patentes de Estados Unidos).
UV-Vis	Ultravioleta –Visible.
WHO	<i>World Health Organization</i> (Organización Mundial de la Salud).
WIPO	<i>World Intellectual Property Organization</i> (Organización Mundial de la Propiedad Intelectual).
<X>	Promedio.

RESUMEN

TÍTULO: ESTUDIO COMPARATIVO POR ELECTROFORESIS CAPILAR Y CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA DE CATEQUINAS EXTRAÍDAS DE PLANTAS DE LA FAMILIA LABIACEAE, Y DETERMINACIÓN DE SU ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE**

Autores: Mónica Patricia Cala Molina
Ángela María Vásquez Cardeño**

Palabras clave: Catequinas, CE, HPLC, *Plectranthus amboinicus* L., *Salvia aratocensis*, Té verde, *Camellia sinensis*, *Theobroma cacao*.

En la presente investigación se implementaron las metodologías de análisis por electroforesis capilar (CE) y cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) para la separación y cuantificación en matrices vegetales de las catequinas: (±)-catequina, (-)-epicatequina, (-)-epigallocatequina, (-)-epicatequina galato y (-)-epigallocatequina galato. La cuantificación de las 5 catequinas se realizó a los extractos acuosos de dos especies de la familia Labiaceae (*Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. y *Salvia aratocensis*) y con el propósito de comparación, fueron incluidas en el estudio el té verde (*Camellia sinensis*) y el cacao (*Theobroma cacao*) dos especies reconocidas mundialmente por su contenido de catequinas.

A continuación, se procedió a realizar un estudio comparativo de ambas técnicas empleando como criterios, las figuras de mérito analítica, el tiempo y los costos de análisis. Los resultados permitieron concluir que HPLC es una técnica más repetible y reproducible, mientras que CE resultó ser más rápida, económica y menos contaminante; por lo tanto, HPLC se recomienda para el análisis donde se requiera mayor precisión y la concentración de los analitos sea menor, y CE para análisis de rutina, tipo *screening* o prospección.

Por otra parte, se evaluó la actividad antioxidante y el contenido total de fenoles de las 5 catequinas y los extractos acuosos de las especies en estudio, y se encontró que existe una relación directa entre estos valores y el número de grupos hidroxilo presentes en la molécula.

* Trabajo de grado.

** Facultad de Ciencias, Escuela de Química, Directores: Elena E. Stashenko y Jairo R. Martínez.

ABSTRACT

TITLE: DETERMINATION OF ANTIOXIDANT ACTIVITY OF CATECHINS EXTRACTED OF LABIACEAE SPECIES AND COMPARATIVE STUDY OF THEIR QUANTIFICATION BY CAPILLARY ELECTROPHORESIS AND HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY*

Authors: Mónica Patricia Cala Molina
Ángela María Vásquez Cardeño**

Keywords: Catechins, CE, HPLC, *Plectranthus amboinicus* L., *Salvia aratocensis*, green tea, *Camellia sinensis*, *Theobroma cacao*.

Analytical methodologies based on capillary electrophoresis (CE) and high performance liquid chromatography (HPLC) for the separation and quantification of catechins in vegetal matrices were implemented. Standards of (\pm)-catechin, (-)-epicatechin, (-)-epigallocatechin, (-)-epicatechin gallate and (-)-epigallocatechin gallate were used during method development. The method was tested with the determination of these 5 catechins in aqueous extracts of two Labiaceae species (*Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. and *Salvia aratocensis*), and of two species recognized worldwide as catechin sources, green tea (*Camellia sinensis*) and cacao (*Theobroma cacao*).

Analytical figures of merit, execution time and cost of analysis, were used to compare both analytical methods. Results showed that HPLC affords better repeatability and reproducibility, while CE is faster, less expensive and causes a lower environmental impact; Therefore, HPLC is recommended for analysis that require greater precision and fewer concentration analytes, and CE for screening or prospecting routine analysis.

The antioxidant activity and the phenol content were determined for all extracts and standards. A linear relationship was found between the number of hydroxyl groups and the measured antioxidant activity.

* Graduation project.

** Science Faculty, School of Chemistry. Directors, Elena E. Stashenko and Jairo René Martínez.

INTRODUCCIÓN

Las plantas han sido tradicionalmente empleadas para el tratamiento de numerosas enfermedades, hecho atribuido a su capacidad de sintetizar una serie de compuestos, principios activos, que emplean para su defensa contra agentes externos. Entre los compuestos estudiados provenientes de las plantas, se encuentran las catequinas, flavonoides que, gracias a la presencia en su estructura de grupos hidroxilo, actúan como eficientes agentes reductores. El interés suscitado por los derivados catequínicos surgió tras observar los numerosos beneficios que acarrea el consumo habitual de alimentos como té, chocolate, vinos, frutas y vegetales, ricos en estos compuestos. Hoy día, las investigaciones se enfocan principalmente en la búsqueda de nuevas fuentes vegetales de catequinas.

El análisis de catequinas se ha realizado por diversas técnicas. Entre ellas, se destacan la electroforesis capilar (CE) y la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), por su amplia polifuncionalidad, al permitir simultáneamente una identificación y cuantificación rápidas de diversos tipos de catequinas, en matrices con diferentes características. Aunque ambas técnicas han mostrado excelentes resultados en cuanto a la separación de catequinas, la discusión sobre cuál de las dos resulta más adecuada continúa abierta, ya que cada una presenta diferentes ventajas y desventajas. En consecuencia, la cantidad de publicaciones encontrada, está enfocada al estudio comparativo de las técnicas analíticas en mención, en términos de las figuras de mérito, los tiempos de análisis y su costo.

En esta investigación, se realizó un estudio comparativo de dos metodologías, *i.e.* HPLC y CE, implementadas para el análisis de catequinas en matrices vegetales. Se analizaron cuatro matrices vegetales, a saber: *Salvia aratocensis* y *Origanum vulgare* L. (Familia Labiaceae), especies identificadas taxonómicamente en el Herbario Nacional Colombiano de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá. Estas dos plantas, se sembraron en el área de cultivos experimentales del Complejo Agroindustrial Piloto del Centro de Investigación de Excelencia, CENIVAM. Asimismo, con el propósito de comparación y validación, fueron incluidas en el estudio el té verde (*Camellia sinensis*) y el cacao (*Teobroma cacao*).

Las cuatro especies mencionadas se sometieron al mismo procedimiento de extracción (agua, cloroformo y acetato de etilo), y a las técnicas análisis y cuantificación por HPLC y CE, estas últimas mediante el empleo de materiales de referencia certificados (MRC) de algunas catequinas, a saber, (\pm)-catequina ((\pm)-C), (-)-epicatequina ((-)-EC), (-)-epigalocatequina ((-)-EGC), (-)-epicatequina galato ((-)-ECG) y (-)-epigalocatequina galato ((-)-EGCG). Finalmente, se evaluaron la actividad antioxidante y el contenido total de fenoles de cada uno de los extractos y de los materiales de referencia certificados.

Esta investigación, presenta un marco teórico sobre los analitos bajo estudio (catequinas), las técnicas de análisis (HPLC y CE) y las metodologías para la evaluación de la actividad biológica. Luego, se describe la metodología empleada, los resultados obtenidos y, por último, se hacen las conclusiones y recomendaciones pertinentes. Con los resultados del presente trabajo de investigación se espera facilitar la exploración, análisis o seguimiento de plantas o productos con altos contenidos de catequinas, útiles como agentes antioxidantes.

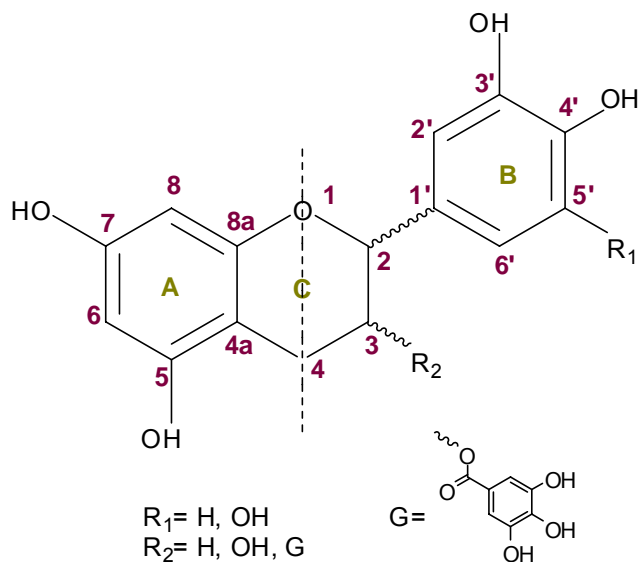
El proyecto se llevó a cabo en las instalaciones del Centro Nacional de Investigación para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Tropicales Aromáticas y Medicinales, CENIVAM, y en el Laboratorio de Cromatografía de la Universidad Industrial de Santander, y fue financiado a través del Contrato CENIVAM- COLCIENCIAS, RC-432-2004.

1. ESTADO DEL ARTE

1.1 CATEQUINAS.

1.1.1 Generalidades. Catequinas son compuestos fenólicos clasificados como “flavonoides del tipo 2-fenilbenzopirano”, presentan un esqueleto carbonado $C_6-C_3-C_6$, es decir, dos anillos aromáticos enlazados por un heterociclo oxigenado que tiene tres átomos de carbono y, debido al grado de oxidación en su estructura, se conocen también como “flavan-3-oles”. Estructuralmente están constituidas por dos sistemas, producto de las rutas biosintéticas a través de las cuales tienen origen, la del shikimato y la del acetato [1,2]. Estos sistemas son: sistema benzoilo (anillo A) y el sistema cinamoilo (anillo B) (**Figura 1**). Además, las catequinas tienen dos carbonos quirales (C_2, C_3), razón por la cual presentan el fenómeno de rotación óptica, dando lugar a cuatro formas ópticamente activas (dos racémicas) [3], dependiendo de los sustituyentes que las conforman.

Figura 1. Estructura general de las catequinas.

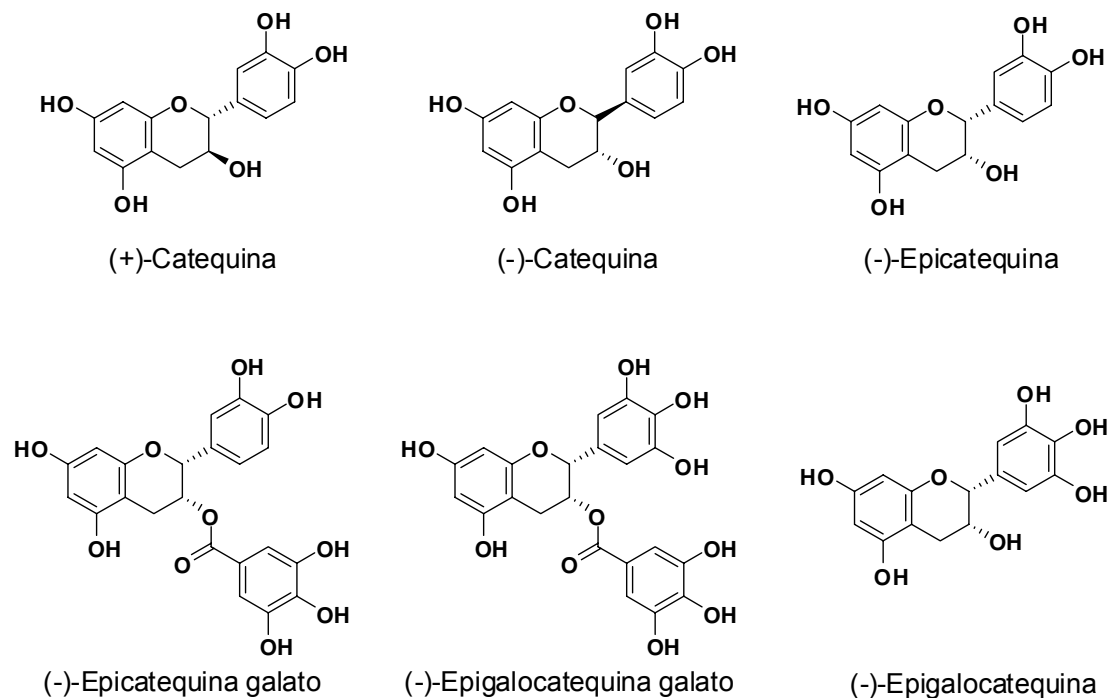


Las catequinas se caracterizan por ser sólidos blancos a temperatura ambiente, de relativamente elevado peso molecular (> 250 g/mol), puntos de fusión altos y son solubles en solventes polares. El espectro de absorción UV-Vis es característico para los flavonoides en general, presenta dos bandas de mayor intensidad, la primera entre 210 – 240 nm, a razón del sistema benzoilo y otra banda entre 280 – 350 nm, debido al sistema cinamoilo. La máxima absorbancia a una determinada longitud de onda depende del número, posición y tipo de sustituyentes adicionales. Así, la sustitución *orto*- y *meta*- en el anillo B, tienen por resultado un cambio batocrómico de las bandas de mayor absorción, mientras que el grupo galato (C_3) induce un cambio hipsocrómico, además de un ensanchamiento de las bandas. Puede darse el caso que aparezca una tercera banda entre estos dos máximos, siempre que los sustituyentes estén conjugados con el anillo aromático [4].

Las catequinas se encuentran de manera exclusiva en las plantas como metabolitos secundarios, que las protegen de los potenciales daños ocasionados por los radicales generados durante el proceso de fotosíntesis, y actúan como antioxidantes [5,6]. Se encuentran distribuidas en todas las partes de la planta, hojas, tallos, flores y frutos, ya sea como moléculas libres o como monómeros constituyentes de proantocianidinas o taninos condensados. Constituyen el grupo de flavonoides más estudiados, debido a su presencia en alimentos de consumo diario y a los potenciales beneficios para la salud en el tratamiento de problemas circulatorios, arteriosclerosis, trombosis arteriales, entre otros padecimientos [7]. En la actualidad, debido a su comprobada capacidad de inhibir la oxidación lipídica y atrapar radicales, se utilizan como aditivos en carnes de todo tipo y como suplementos en crecimiento, para animales, destinados para consumo humano [8].

Entre las catequinas de mayor distribución en las diferentes matrices figuran las siguientes: (\pm)-catequina, (-)-epicatequina, (-)-epigalocatequina, (-)-epicatequina galato y (-)-epigalocatequina galato (**Figura 2**).

Figura 2. Catequinas comúnmente encontradas en matrices vegetales.



Dentro de las principales fuentes de catequinas conocidas hasta el momento, se encuentran algunas plantas como la especie *Camellia sinensis* [9], reconocida en el mundo por ser empleada en la preparación de las diversas clases de té, y la especie *Theobroma cacao* [10,11], nombre científico del árbol de cacao, de cuyo fruto se obtiene una gran cantidad de productos, además de algunas frutas, alimentos y bebidas de consumo masivo como vinos, chocolate, café, entre otros (**Tabla 1**).

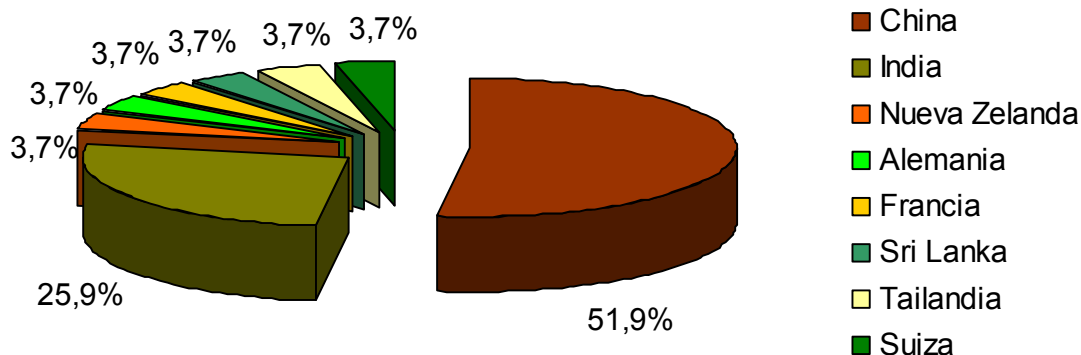
Tabla 1. Catequinas estudiadas en alimentos y plantas.

Matriz	Catequinas	Ref. Bibliográfica
Bebidas		
Té verde	(+)-C, (-)-EC, (-)-EGC, (-)-EGCG, (-)-ECG, (+)-GC	9,12,13 14,15
Té negro	(+)-C, (-)-EC, (+)-GC, (-)-EGC (-)-ECG, (-)-EGCG	14,15,16
Chocolate	(+)-C, (-)-EC	17
Vino	(+)-C, (-)-EC	18,19, 20
Jugo de uva	(+)-C	21
Jugo de manzana	(+)-C, (-)-EC	22,23
Granos		
Lentejas	(+)-C, (-)-EC	24
Café	(+)-C, (-)-EC	25
Frutas		
Manzana, durazno, pera, uva, ciruela, cereza, melón.	(+)-C, (-)-EC	26
Cacao	(+)-C, (-)-EC	27
Plantas		
<i>Theobroma cacao</i>	(+)-C, (-)-C, (+)-EC (-)-EC	10, 11
<i>Foeniculum vulgare</i>	(+)-C, (-)-EC	28
<i>Geranium purpureum</i>		
<i>Nepeta cataria</i>		
<i>Ruta graveolens</i>		
<i>Styrax officinalis</i>		
<i>Urtica dioica</i>		
Otros		
Levadura	(+)-C	29
Trigo	(+)-C	30

1.1.2 Comercio. Comercialmente, las catequinas se promocionan como extracto de té verde obtenido de la especie *Camellia sinensis*, que se utilizan como antioxidantes en productos cosméticos y alimenticios [8], en dietas para disminuir de peso [31], como saborizantes en bebidas dietéticas [32], entre otros; los mayores productores de estos extractos se encuentran en

Asia y Europa (**Figura 3**), principales productores, procesadores y comercializadores de té en el mundo.

Figura 3. Productores, procesadores y comercializadores de extractos de té verde, por país [33].

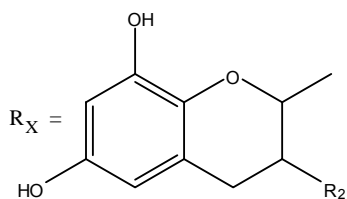
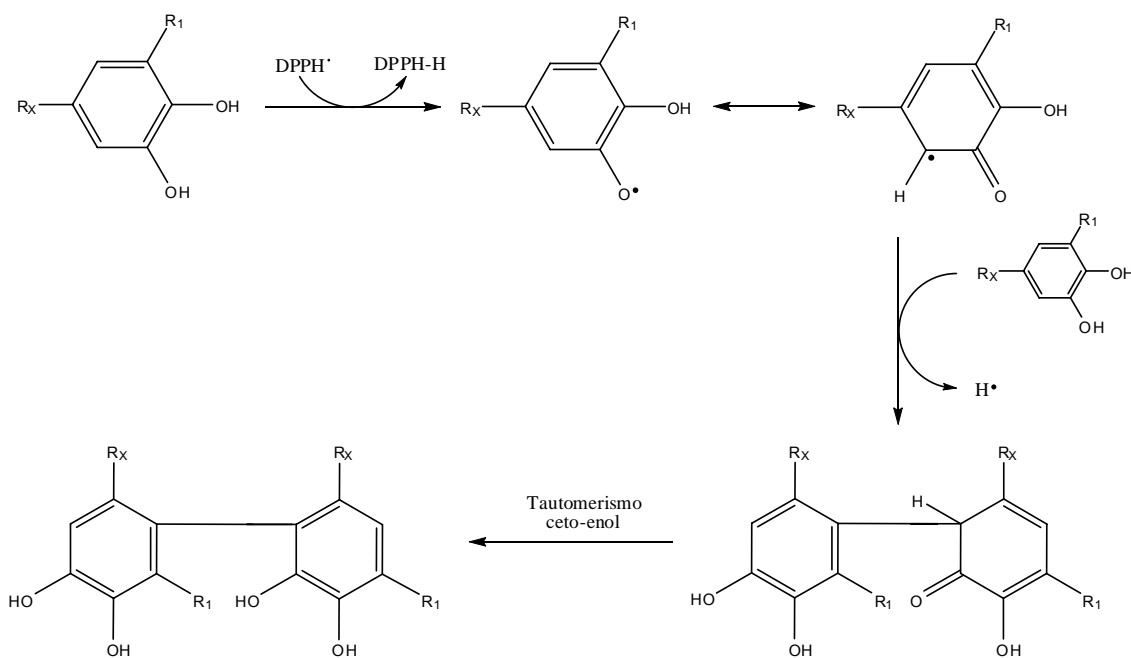


Aunque el auge de productos ricos en antioxidantes es reciente y los índices de producción y comercio no alcanzan cifras importantes, se estima que el crecimiento anual del mercado para estos productos está en el rango del 3 – 4%, con tendencia al aumento, dado el creciente interés mundial por el consumo de productos de origen natural [34]. Además, cabe destacar la reciente aparición de un medicamento aprobado por la FDA, con base en extracto de té verde para el tratamiento tópico de verrugas genitales [35], y el reconocimiento por parte de las organizaciones internacionales como FAO y WHO, de sus beneficios para el tratamiento de algunos padecimientos, tales como ansiedad, cáncer de pulmón y arterosclerosis, entre otros [36, 37].

1.1.3 Actividad antioxidante. Las catequinas, como principales constituyentes del té, han sido objeto de diversos estudios, encaminados a la búsqueda de una posible actividad biológica que explique los múltiples beneficios atribuidos al consumo regular de té verde. La actividad biológica estudiada es la actividad antioxidante. Para evaluarla, se han utilizado diversos métodos, que han permitido establecer un posible mecanismo de acción de catequinas frente a la presencia de sustancias oxidantes. Es así

como la reacción con un radical DPPH°, el aislamiento y la posterior identificación de sus productos de reacción, han permitido proponer un mecanismo de inhibición del radical DPPH° por compuestos fenólicos, que podría explicar los potenciales beneficios atribuidos a estas sustancias (**Figura 4**)[38, 39].

Figura 4. Mecanismo propuesto de inhibición del radical DPPH° por compuestos fenólicos [40].



Catequina	$R_1=$	Configuración	$R_2=$
(±)- C	H	2R-, 3S- 2S-, 3R-	OH
(-)-EC	H	2R-, 3R-	OH
(-)-EGC	OH	2R-, 3R-	OH
(-)-ECG	H	2R-, 3R-	GA
(-)-EGCG	OH	2R-, 3R-	GA

Este mecanismo podría explicar las propiedades medicinales atribuidas a estos compuestos en el tratamiento de enfermedades relacionadas con la acción de radicales, ya que a diferencia de otros reconocidos antioxidantes, la reacción de las catequinas frente a compuestos radicalarios genera especies menos reactivas que no dan lugar a nuevas reacciones de oxidación [40]. Los estudios mencionados también han permitido establecer que la actividad antioxidante de las catequinas depende de su estructura química, en especial, de los dos rasgos estructurales fundamentales, a saber:

- Presencia de grupos hidroxilo en las posiciones C3' y C5'.
- Presencia del grupo galato en la posición 3.

Estas características permiten establecer diferencias en su capacidad de atrapar radicales, de acuerdo con los grupos sustituyentes que conforman cada catequina. De esta manera, se ha logrado establecer que la (-)-EGCG y la (-)-ECG, gracias a la presencia del grupo galato en sus estructuras, presentan la mayor capacidad antiradicalaria, seguidas de la (-)-EGC, con tres grupos hidroxilo en el anillo B (C3', C4', C5') y, por último, la (±)-C y la (-)-EC, las cuales carecen del grupo hidroxilo en C5' [40].

1.2 FAMILIA LABIACEAE.

La familia de las Labiadas está constituida de ca. 200 géneros que agrupan cerca 3000 especies de plantas, distribuidas por todo el mundo, especialmente, en la cuenca mediterránea, donde cuentan con especial reconocimiento por sus propiedades medicinales y organolépticas, razón por la cual han sido empleadas durante años para el tratamiento de algunos padecimientos de la salud y como condimentos y especias en la cocina [41].

Esta familia de plantas está conformada por hierbas perennes, algunos subarborescentes y, en menor proporción, arbustos y trepadoras. Deben su nombre (*Labiata*, en latín “labio”) a la forma característica de su flor, que cuenta con cinco pétalos fusionados en forma de boca con un labio superior, generalmente, bilobulado y más corto, y uno inferior, trilobulado. Las hojas de estas plantas no están divididas y sus tallos son leñosos y no superan los 2.5 m de altura; crecen en climas preferentemente húmedos y se adaptan fácilmente a diversas condiciones del suelo y terreno, característica favorable al momento de contemplar su agroindustrialización (cultivo a gran escala) [42]. Entre las plantas más conocidas pertenecientes a esta familia se encuentran las siguientes: el toronjil (*Melissa officinalis*), el orégano (*Origanum vulgare* L.), el romero (*Rosmarinus officinalis*), la salvia (*Salvia officinalis*), la menta (*Mentha piperita*), el tomillo (*Thymus vulgaris*) y el hisopo (*Hyssopus officinalis*) [43].

1.2.1 *Origanum vulgare* L. La planta se conoce como “orégano común”, es una planta herbácea, perenne, de la familia Labiaceae (**Figura 5**), cuyas hojas son muy utilizadas en la cocina mediterránea como condimento. Es originaria de la cuenca mediterránea, Oriente Medio y Arabia, y crece principalmente en las colinas secas y soleadas. Se cree que fue introducida a nuestro país desde la época de la Conquista, tiempo desde el cual ya era conocida por sus propiedades organolépticas y medicinales. La hoja del orégano se utilizaba por los griegos antiguos para tratar el asma, la indigestión, y el dolor de cabeza [44].

Figura 5. Especie de *Origanum vulgare* L.



Estudios previos han demostrado que los extractos metanólicos de esta planta contienen una gran variedad de compuestos fenólicos. De esta manera, Kikuzaki y Nakatani aislaron cinco compuestos fenólicos de las hojas del orégano. Entre éstos, el ácido rosmarínico presentó la concentración más alta [45-48], compuesto que ha mostrado sus capacidades antirradicalaria y antiinflamatoria importantes. Otros compuestos de interés, aislados de esta planta, ácidos caféico y cumárico y quercetina, son efectivos agentes antimicrobianos [49].

Puertas, Hillebrand, Stashenko y Winterhalter [50] hallaron actividad antioxidante en el aceite esencial del orégano. Cervato *et al.* encontraron actividad antirradicalaria en extractos acuosos y metanólicos de hojas del orégano [44]. También, en los extractos del orégano están presentes compuestos fenólicos tales como luteolina [51], hispidulina, apigenina [48], acacetina, diosmetina, herbacetin [52], quercitina y naringenina [53]. La flavona-1 es uno de los compuestos más importantes en términos de abundancia en los extractos analizados, el cual demostró una estrecha relación con la actividad antioxidante [54].

Aunque aún no se encuentran reportes acerca del contenido de catequinas en los extractos de la especie *Origanum vulgare* L., los estudios realizados en búsqueda de compuestos fenólicos y la capacidad antirradicalaria de sus extractos, permiten considerar esta planta como una posible fuente de catequinas.

1.2.2. *Salvia aratocensis*. La especie *Salvia aratocensis* se encuentra ubicada en la región meridional del Cañón del Chicamocha [55], es una de las nuevas especies identificadas pertenecientes al género *Salvia*, razón por la cual los estudios sobre ésta permanecen restringidos al ámbito nacional [56] y aún no se reportan estudios sobre el contenido de catequinas en sus extractos (**Figura 6**).

Figura 6. Especie de *Salvia aratocensis*.



Esta especie se encuentra ocasionalmente entre las plantas medicinales que se venden en las plazas de mercado, con el nombre genérico de *Salvia*, (quizás por el ligero parecido de esta especie con la *Salvia officinalis*). Se emplea habitualmente en medicina en la zona del altiplano cundiboyacense para el tratamiento de las dolencias de riñón [57].

Los diversos estudios realizados a otras especies pertenecientes al género *Salvia* sirven como referencia para la especie *Salvia aratocensis*, ya que no se encuentran reportes respecto a la composición química de sus extractos. El género *Salvia* es una fuente rica de polifenoles, de los cuales 160 han sido identificados. La naturaleza de estos polifenoles se ha divulgado junto con datos de su bioactividad, en un esfuerzo por demostrar el rápido desarrollo en la fitoquímica y los usos terapéuticos del género *Salvia*. Sin embargo, en estos últimos años la atención ha estado dirigida a los componentes biológicamente activos, solubles en agua. Estos estudios, particularmente, realizados en China, han conducido al aislamiento y a la identificación de metabolitos derivados del ácido caféico, muchos de los cuales poseen variedad de actividades biológicas, e.g antioxidante, antitumoral y antiviral [58].

Los ácidos fenólicos polares constituyen la parte principal de los componentes solubles en agua del género *Salvia*. Los monómeros que frecuentemente se presentan en las especies de *Salvia* están representados por ácidos caféico, láctico y ferúlico.

Prokonenko, *et al.* [59] y Ulubelen, *et. al.* [60], encontraron que en diferentes especies del género *Salvia* se presenta gran variedad de compuestos fenólicos, especialmente, flavonas, flavonoles y sus glicósidos.

Asen, en 1961 [61], encontró, que las antocianinas son particularmente abundantes en las flores rojas y púrpuras de algunas *Salvias*. En 1977 Murko y Baldasar [62] reportaron la presencia de proantocianidinas o taninos condensados en la especie *Salvia officinalis*, compuestos polifenólicos de considerable interés comercial, por ser colorantes naturales de baja toxicidad. En el 2007, se reportó la actividad antioxidante del extracto etanólico de esta especie, evaluada a través del ensayo de descoloramiento del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo, DPPH^o, y el contenido total de fenoles

mediante el método de Folin-Ciocalteu; se determinó la actividad antioxidante superior a la reportada para la vitamina E [56], hecho que justifica el estudio de esta especie como posible fuente de catequinas debido a las reconocidas propiedades antioxidantes de estos compuestos.

1.3 DETERMINACIÓN Y ANÁLISIS DE CATEQUINAS.

Debido a las propiedades físico-químicas de las catequinas, elevado peso molecular, naturaleza polar y alto punto de fusión, para la determinación y análisis de éstas en diversas matrices, se han empleado fundamentalmente dos técnicas de análisis: cromatografía líquida de alta eficiencia y electroforesis capilar, en sus diferentes modalidades [63].

1.3.1 Cromatografía líquida de alta eficiencia. Este tipo de cromatografía representa una de las herramientas más empleadas en los laboratorios analíticos, gracias a que permite el análisis de una amplia variedad de moléculas, particularmente, de alto peso molecular y termolábiles, que no se pueden separar por cromatografía de gases.

Para el caso específico de las catequinas, la técnica HPLC ha permitido la identificación de estas moléculas en diversas matrices, empleando principalmente la cromatografía líquida en fase reversa, cuando la fase estacionaria es de mucho menor polaridad que la fase móvil; así, la fase estacionaria retendrá con mayor fuerza los analitos menos polares, permitiendo que el orden de su elución sea del más polar al menos polar [64]. En cuanto a la fase móvil, se han utilizado mezclas de agua y modificadores orgánicos como acetonitrilo, metanol, tetrahidrofurano, entre otros. Estos solventes pueden ser utilizados cada uno por aparte o como mezclas, dando la opción de utilizar una fase móvil de composición constante (elución isocrática) o variable, con el fin de dar a la fase móvil diferentes

grados de polaridad (elución en gradiente), durante el tiempo en el que los analitos pasan por la columna.

Para la detección de las catequinas, uno de los detectores más utilizados es el de arreglo de diodos ultravioleta-visible (DAD UV-Vis), porque ha mostrado buena sensibilidad y amplio rango dinámico lineal; permite trabajar en el rango aproximado entre 190-1100 nm, además se obtienen tanto cromatogramas, como los espectros UV-Vis de cada uno de los componentes de la mezcla. Lo mencionado anteriormente ofrece un criterio más amplio para llevar a cabo el análisis de componentes, puesto que se puede realizar su identificación mediante comparación de tiempos de retención y espectros UV-Vis con los del respectivo material de referencia certificado [65].

1.3.2 Electroforesis capilar. Electroforesis capilar es un método micro-analítico, aplicable para análisis de una amplia gama de compuestos, incluyendo productos naturales y metabolitos de la planta. CE proporciona ventajas en términos de velocidad, bajo costo y simplicidad. Por tanto, este método se puede emplear como una excelente alternativa para análisis de sustancias fitoquímicas [66].

En esta técnica, la separación de los analitos se basa en las diferencias de las movilidades electroforéticas de los solutos iónicos que determinarán la migración de los analitos a través del capilar bajo la acción del campo eléctrico aplicado, que ocasiona que lleguen al detector en tiempos diferentes. La movilidad electroforética de un soluto es función de su carga, del radio (suponiendo una geometría esférica) y de la viscosidad del medio [67]. Por tanto, a mayor carga y menor radio, mayor será su movilidad electroforética, siendo estos analitos los primeros en ser detectados. El medio en donde se realiza la separación es una solución *buffer* (SB), característica para cada clase de analito. En el caso de las catequinas,

cuando el detector empleado es de absorción UV o UV-Vis, se busca una SB de baja absorptividad molar para que la detección se realice de manera directa, es decir, por aumento de la señal cuando cada catequina pase por el detector, aprovechando que éstas tienen una absorptividad molar (ξ) alta [68].

Entre las modalidades de CE utilizadas para la separación de catequinas se encuentran principalmente las siguientes: electroforesis capilar de zona (CZE) [12, 69], utilizada para el análisis de sustancias cargadas, y cromatografía electrocinética micelar (MECK), para el análisis de sustancias neutras [70, 71]. Para el caso de MECK la movilidad electroforética de los analitos se ve afectada por la presencia y la clase de un surfactante utilizado, respecto a la carga y radio de las micelas que lo conforman. Por tanto, el orden en que llegan al detector los analitos dependerá específicamente de su interacción con la micela.

En determinación y cuantificación de catequinas, se han utilizado estas dos modalidades con bastante éxito, gracias a la posibilidad de cambiar el pH de la SB, permitiendo de esta manera tener las catequinas como moléculas cargadas o neutras.

1.3.3 Comparación entre las técnicas analíticas. Las técnicas analíticas CE y HPLC, han sido exitosamente empleadas para la identificación y la cuantificación de catequinas en diferentes matrices. Sin embargo, las diferencias en cuanto a mecanismos de separación de los analitos e instrumentación, han generado un debate que permanece abierto en cuanto a las ventajas y desventajas que estas técnicas presentan, hecho que ha generado numerosos estudios de tipo comparativo.

Algunos de estos estudios demuestran que mientras la CE resulta más ventajosa en términos de costo, debido al gasto reducido de solventes, la HPLC es más sensible, y permite detectar concentraciones hasta de 0.05

$\mu\text{g/mL}$ [72]. De manera similar se ha llegado a considerar que la CE resulta útil para realizar análisis preliminares o cualitativos debido a los tiempos de análisis cortos, mientras que la HPLC es más sensible y resulta mucho más útil para análisis de tipo cuantitativo en muestras diluidas [73]. Se estima, que los límites de detección mínimos en CE se encuentran entre 0.1 – 0.5 $\mu\text{g/mL}$, mientras que los límites de detección por HPLC han alcanzado rangos entre 0.01 – 0.03 $\mu\text{g/mL}$, dependiendo del detector empleado para los análisis [74].

Vale la pena resaltar que para análisis cuantitativos, cuando se cuente con poca cantidad de muestra y la concentración de analitos se encuentre en rangos detectables por ambas técnicas, la CE podría ser la técnica apropiada, ya que para realizar los análisis solo se necesitan entre 5 – 50 nL de muestra [75].

Se han estudiado la robustez de la técnica y la instrumentación empleada. Los resultados demuestran que la HPLC resulta ser más robusta por ser menos dependiente de la matriz de origen de los analitos. Por tanto, los métodos implementados para esta técnica pueden ser aplicados a diferentes matrices [72, 76].

También se han evaluado algunos criterios cromatográficos, los cuales han permitido establecer en general, que por HPLC se alcanza una mayor resolución, debido a la posibilidad de variar la composición de la fase móvil durante los análisis; mientras que la CE resulta mucho más eficiente en términos del número de platos teóricos calculados, debido al perfil plano del flujo que llega al detector [67].

En resumen, se ha podido establecer que HPLC resulta más útil para el análisis cuantitativo de catequinas a nivel de trazas en diversas matrices, mientras que CE resulta más ventajosa para análisis cualitativo o cuantitativo en muestras más concentradas [74].

2. CIENCIOMETRÍA

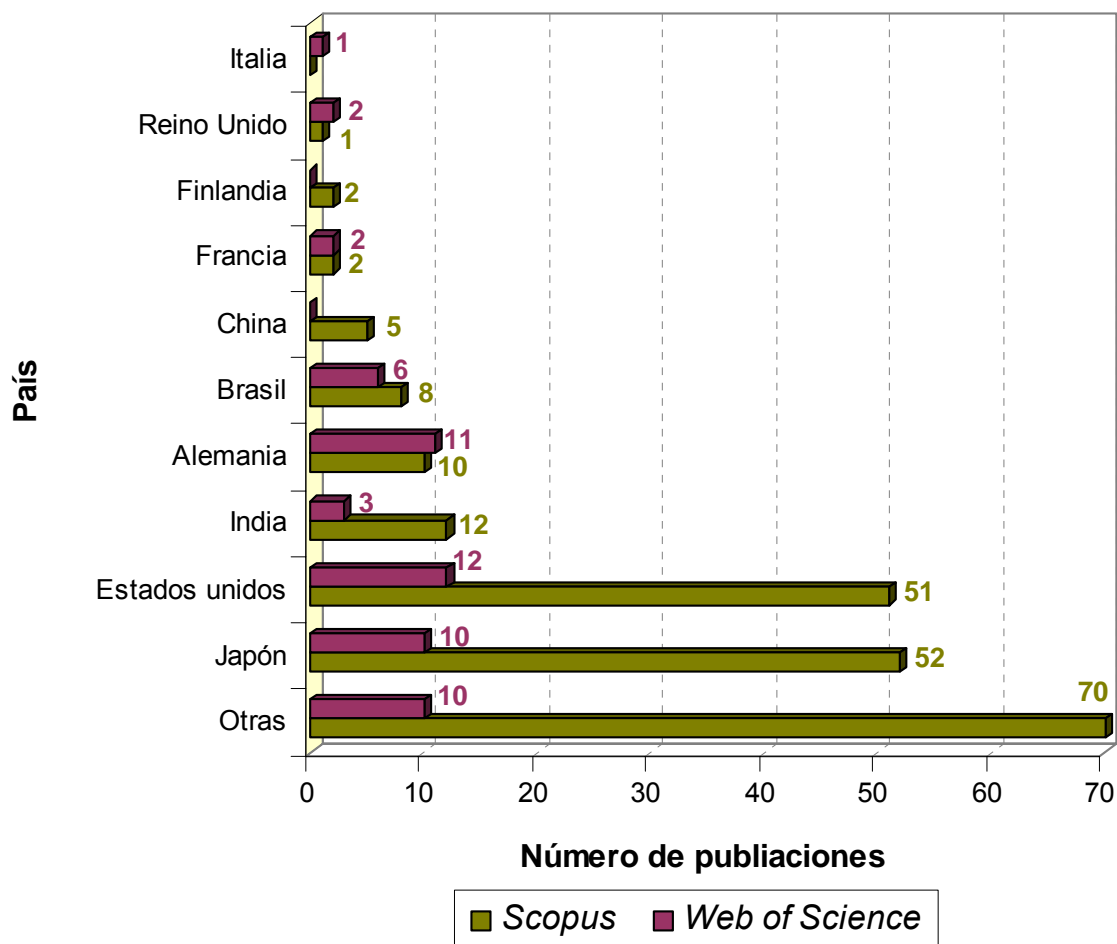
La cienciometría es un instrumento que nos permite cuantificar la actividad científica en función de tiempo. Los análisis cienciométricos analizan la ciencia como una disciplina o actividad económica, comparan las políticas de investigación desarrolladas por distintos países y sus resultados desde una perspectiva económica y social. Algunas de las herramientas fundamentales utilizadas para realizar el ejercicio de la cienciometría son las bases de datos de artículos y patentes [76].

Con el objetivo de analizar el estado actual de las investigaciones acerca de las catequinas en plantas, se realizó un estudio cienciométrico de la producción científica existente utilizando dos bases de datos, *Elsevier (Scopus)* y *Web of Science (ISI Web of Knowledge, Thomson, Versión 3.0)*.

2.1 Base de datos *Elsevier (Scopus)* y *Web of Science*.

2.1.1 Catequinas en plantas. Según los resultados obtenidos en el estudio cienciométrico sobre catequinas en plantas, se observa que éstos se han desarrollado principalmente en Estados Unidos y países europeos (**Figura 7**), en las áreas de agricultura, química y medicina (**Figura 8**). Esto se puede interpretar como una consecuencia del creciente interés mundial por compuestos de origen natural, con capacidad antioxidante, presentes en alimentos de consumo masivo, y su incidencia en la prevención y el tratamiento de diversos problemas de salud.

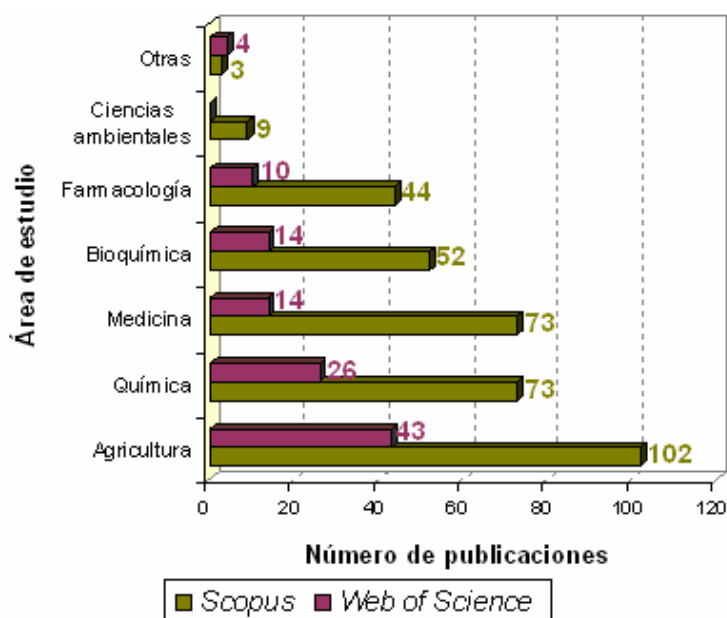
Figura 7. Relación países – número de publicaciones sobre catequinas en plantas.



Fuente: *Scopus* y *Web of Science*. Periodo de observación: 2001 - 2007. Fecha de consulta: 11 de agosto de 2007. Ecuación de búsqueda: (TITLE-ABS-KEY(catechins) AND TITLE-ABS-KEY(plants))

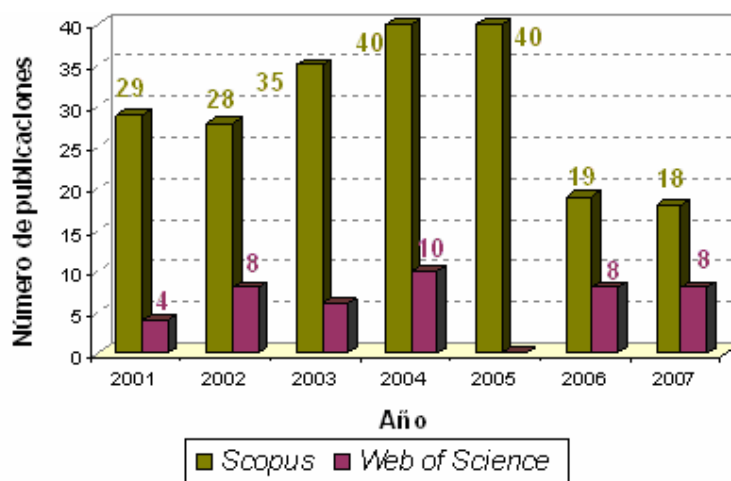
Se observa un interés principalmente hacia la llamada “dieta mediterránea”, propia de regiones europeas en la cuales se ha demostrado una favorable reducción en los casos de enfermedades relacionadas con procesos de oxidación y presencia de radicales, tales como enfermedades cardiovasculares y mal de Parkinson, entre otras. Los estudios mencionados han tenido numerosas publicaciones en los últimos siete años (**Figura 9**), en reconocidas revistas especializadas del mundo (**Figura 10**).

Figura 8. Relación área- número de publicaciones sobre catequinas en plantas.



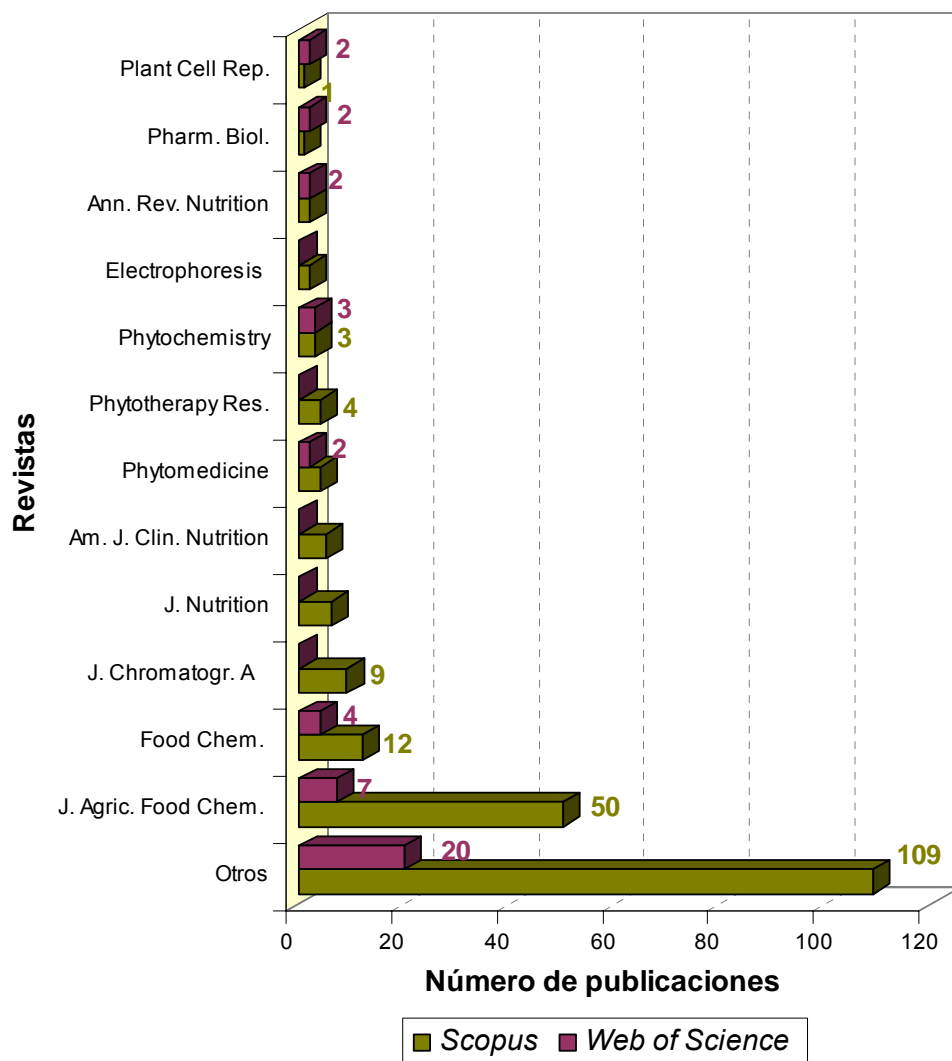
Fuente: *Scopus* y *Web of Science*. Periodo de observación: desde el año 2001 hasta el 2007. Fecha de consulta: 11 de agosto de 2007. Ecuación de búsqueda: (TITLE-ABS-KEY(catechins) AND TITLE-ABS-KEY(plants))

Figura 9. Relación año- número de publicaciones sobre catequinas en plantas.



Fuente: *Scopus* y *Web of Science*. Periodo de observación: 2001 - 2007. Fecha de consulta: 11 de agosto de 2007. Ecuación de búsqueda: (TITLE-ABS-KEY(catechins) AND TITLE-ABS-KEY(plants))

Figura 10. Relación revista – número de publicaciones sobre catequinas en plantas.

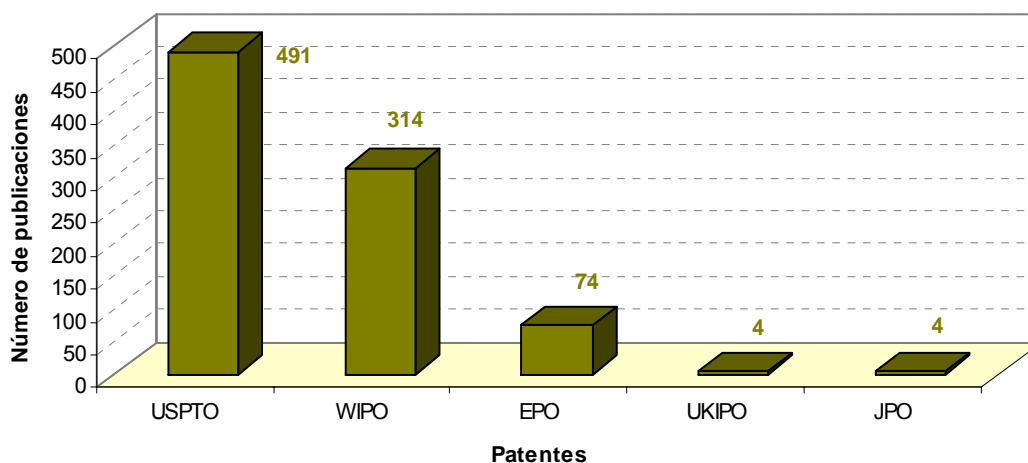


Fuente: *Scopus* y *Web of Science*. Periodo de observación: 2001 - 2007. Fecha de consulta: 11 de agosto de 2007. Ecuación de búsqueda: (TITLE-ABS-KEY(catechins) AND TITLE-ABS-KEY(plants))

En el estudio de catequinas en plantas se encuentra un gran número de patentes, siendo la *US Patent Office* (USPTO) y *World Intellectual Property Organization* (WIPO) las oficinas con mayor número de patentes registradas (**Figura 11**). Estas patentes están relacionadas con la producción de extractos de plantas con contenido alto de catequinas, empleadas en la

prevención del cáncer, enfermedades degenerativas de Alzheimer, Parkinson y cardiovasculares.

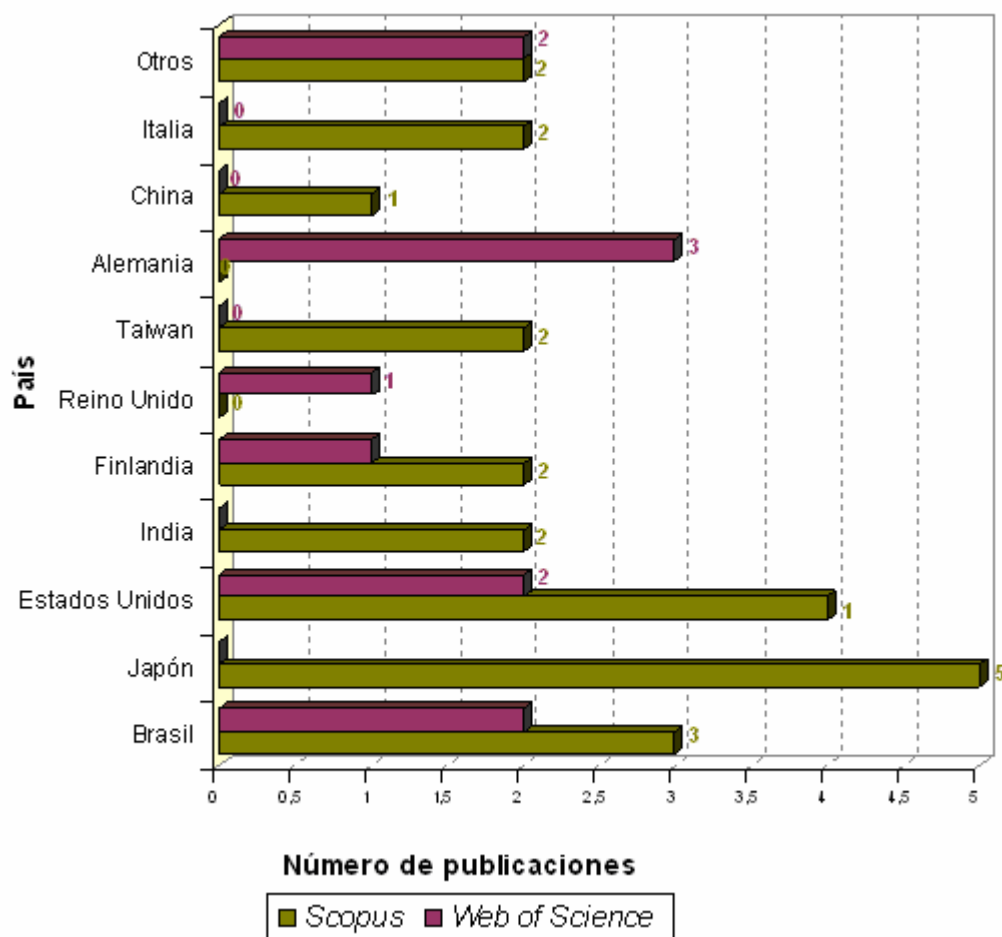
Figura 11. Relación patentes – número de publicaciones sobre catequinas en plantas.



Fuente: *Scopus*. Periodo de observación: 2001 - 2007. Fecha de consulta: 11 de agosto de 2007. Ecuación de búsqueda: (TITLE-ABS-KEY(catechins) AND TITLE-ABS-KEY(plants))

2.1.2 Determinación de catequinas por HPLC. De acuerdo con el estudio cuantitativo realizado sobre la determinación de catequinas en plantas por HPLC, se observa que un gran número de países emplea esta técnica (**Figura 12**), lo cual evidencia el interés generalizado de la comunidad científica por este tipo de compuestos y cómo esta técnica gradualmente toma mayor relevancia como herramienta de análisis gracias a sus múltiples ventajas. En la **Figura 13**, se observa el número de publicaciones sobre este tipo de compuestos, realizados en los últimos siete años que se han realizado (**Figura 13**).

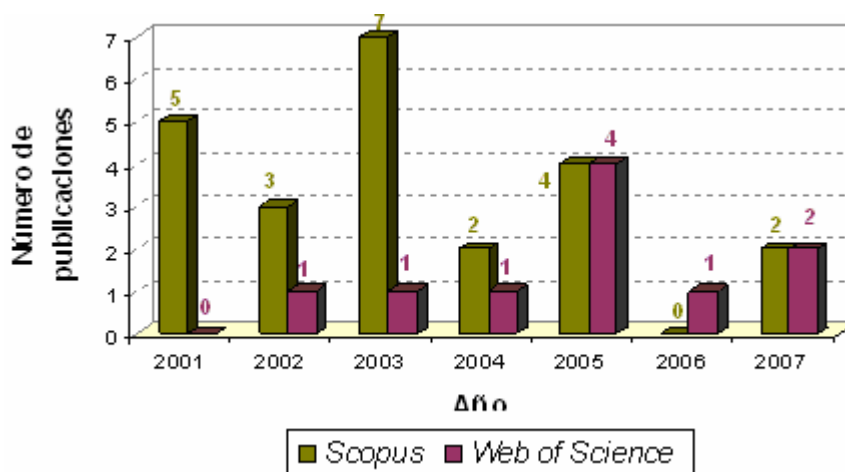
Figura 12. Relación países – número de publicaciones sobre catequinas en plantas analizadas por HPLC.



Fuente: *Scopus* y *Web of Science*. Periodo de observación: 2001 - 2007. Fecha de consulta: 11 de agosto de 2007. Ecuación de búsqueda: (TITLE-ABS-KEY(**catechins**) AND TITLE-ABS-KEY(**plants**) AND TITLE-ABS-KEY(**hplc**))

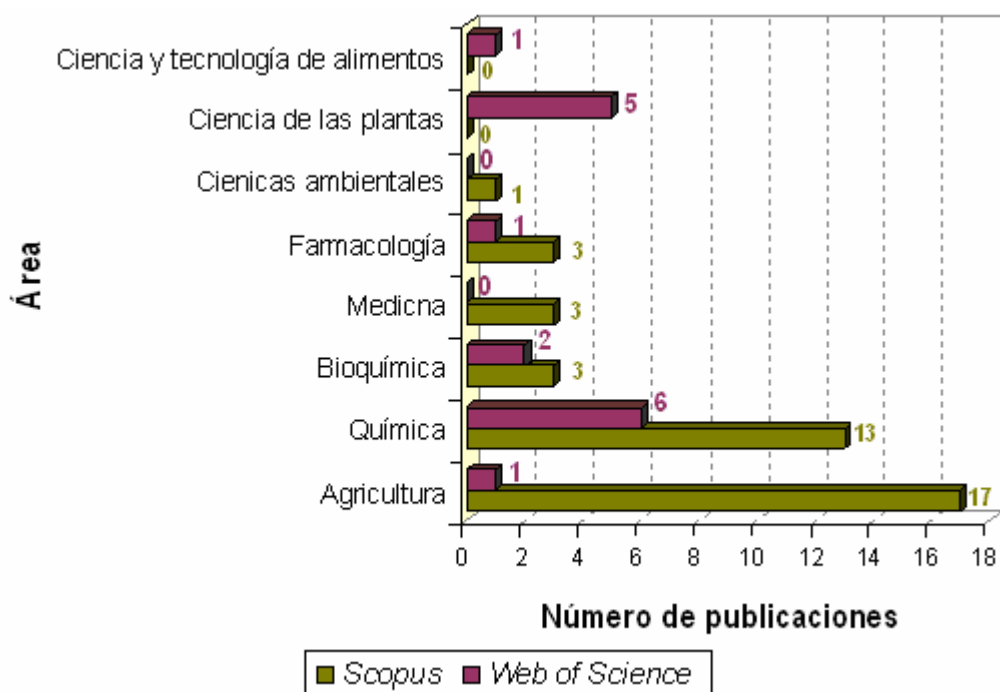
Dadas las diversas aplicaciones que se han encontrado para catequinas, las áreas de estudio de estos compuestos comprenden diversas ramas de la ciencia entre las cuales se destacan agricultura, química y ciencia de las plantas (**Figura 14**), cuyo principal interés radica en el estudio de varias actividades biológicas atribuidas a estos compuestos. Estos estudios han sido tema de interés de diversas publicaciones especializadas sobre productos naturales y alimentos, industrias en las cuales estos compuestos han encontrado su principal aplicación (**Figura 15**).

Figura 13. Relación año- número de publicaciones sobre catequinas en plantas analizadas por HPLC.



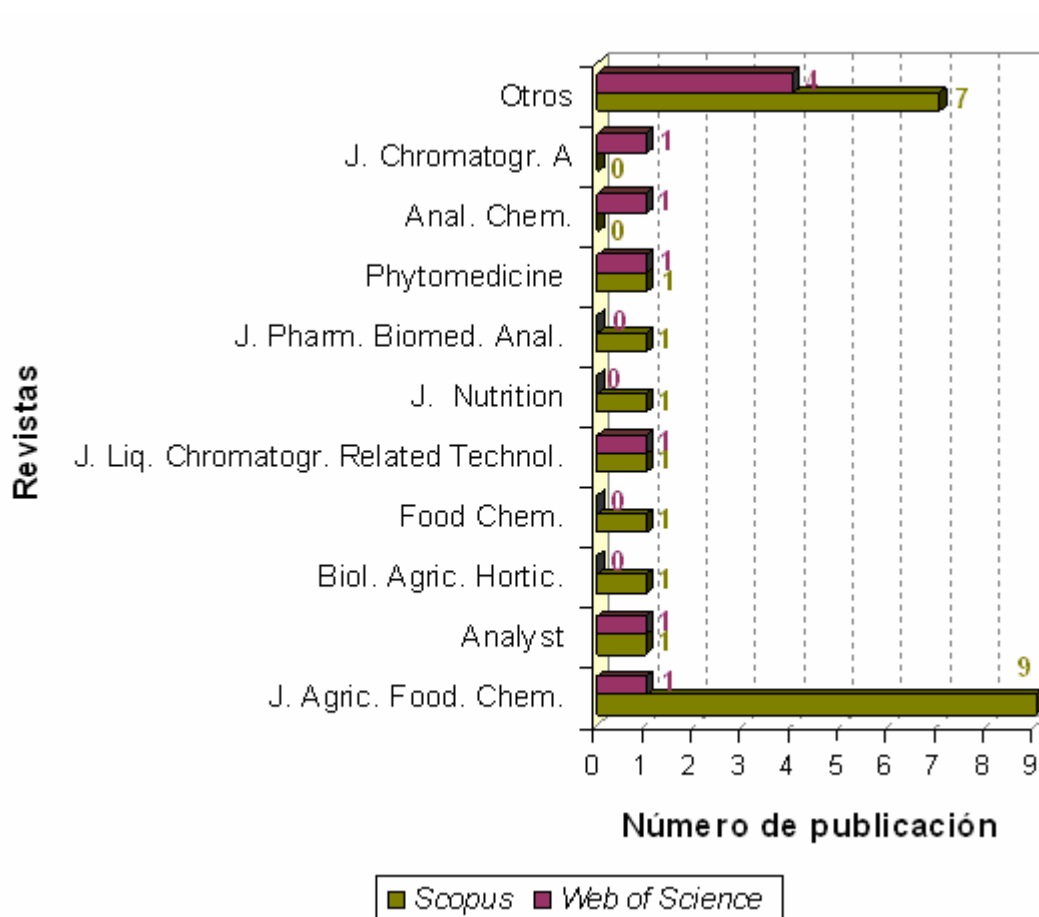
Fuente: *Scopus* y *Web of Science*. Periodo de observación: 2001 - 2007. Fecha de consulta: 11 de agosto de 2007. Ecuación de búsqueda: (TITLE-ABS-KEY(**catechins**) AND TITLE-ABS-KEY(**plants**) AND TITLE-ABS-KEY(**hplc**))

Figura 14. Relación área – número de publicaciones sobre catequinas en plantas analizadas por HPLC.



Fuente: *Scopus* y *Web of Science*. Periodo de observación: 2001 - 2007. Fecha de consulta: 11 de agosto de 2007. Ecuación de búsqueda: (TITLE-ABS-KEY(**catechins**) AND TITLE-ABS-KEY(**plants**) AND TITLE-ABS-KEY(**hplc**))

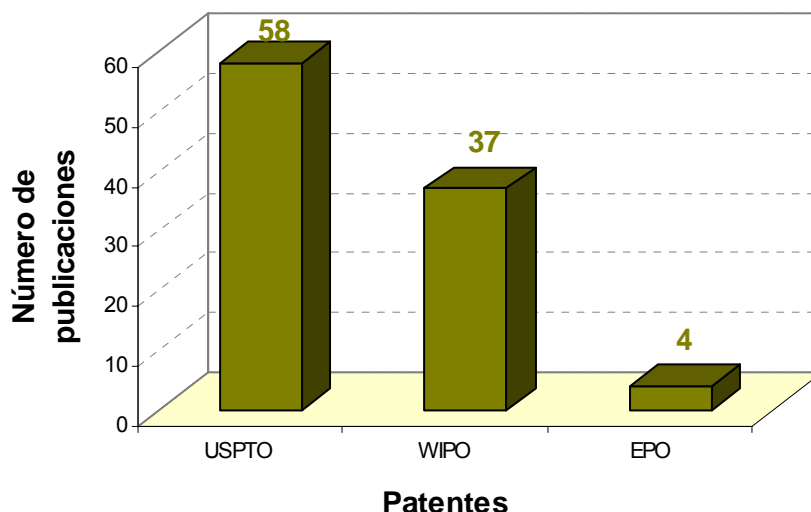
Figura 15. Relación revista – número de publicación sobre catequinas en plantas analizadas por HPLC.



Fuente: *Scopus y Web of Science*. Periodo de observación: 2001 - 2007. Fecha de consulta: 11 de agosto de 2007. Ecuación de búsqueda: (TITLE-ABS-KEY(**catechins**) AND TITLE-ABS-KEY(**plants**) AND TITLE-ABS-KEY(**hplc**))

La mayor parte de las patentes relacionadas con el estudio de catequinas empleando HPLC, se encuentran en la oficina de patentes de Estados Unidos y en la WIPO (**Figura 16**). Estas patentes están enfocadas al estudio del tipo y contenido de catequinas en los extractos de plantas, en especial, del té verde.

Figura 16. Relación número – patentes sobre catequinas en plantas analizadas por HPLC.



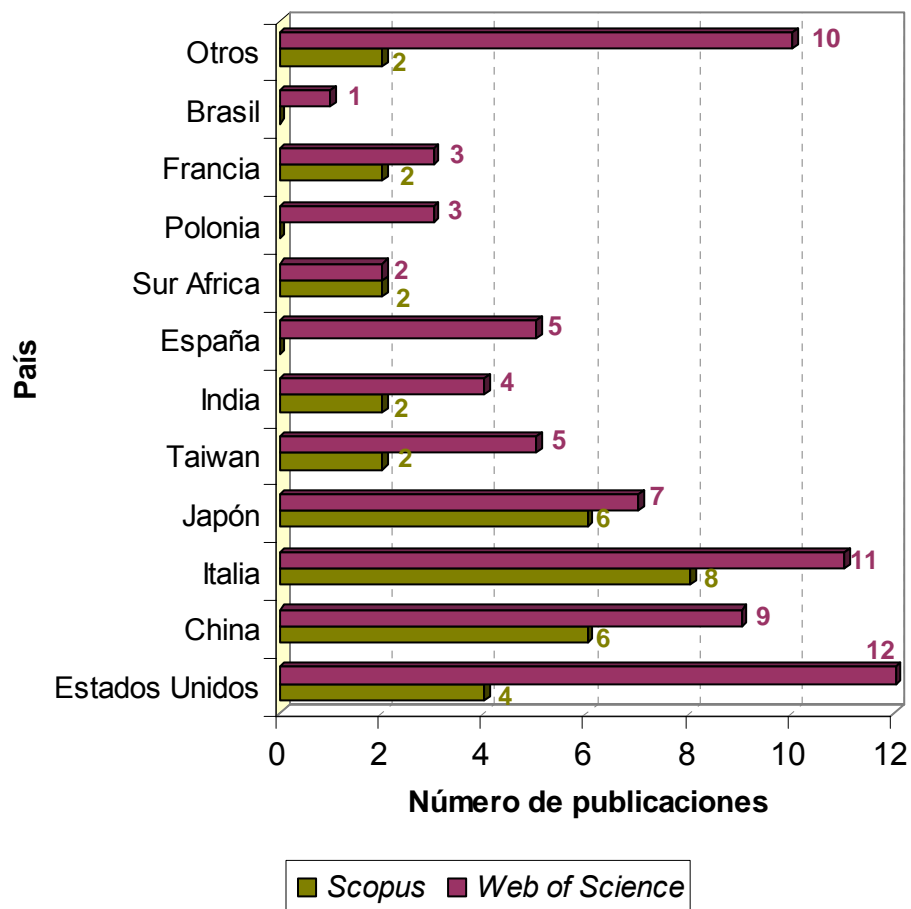
Fuente: *Scopus*. Período de observación: 2001 - 2007. Fecha de consulta: 11 de agosto de 2007. Ecuación de búsqueda: (TITLE-ABS-KEY(**catechins**) AND TITLE-ABS-KEY(**plants**) AND TITLE-ABS-KEY(**hplc**))

2.1.3 Determinación de catequinas por CE. Los resultados obtenidos del estudio cuantitativo sobre catequinas en plantas por CE, permiten observar cómo un número apreciable de países (**Figura 17**) ha aprovechado las ventajas que ofrece esta técnica y cómo en los últimos siete años (**Figura 18**) los estudios relacionados con este tema se han incrementado considerablemente.

Respecto a las áreas en las cuales se han desarrollado los estudios sobre catequinas utilizando CE, se destacan, principalmente, química, bioquímica y ciencia y tecnología de alimentos (**Figura 19**), hecho que no sorprende, porque justamente estas áreas, indistintamente de la técnica analítica empleada, han mostrado mayor interés en estos compuestos y en sus potenciales aplicaciones. Los estudios realizados pueden encontrarse en

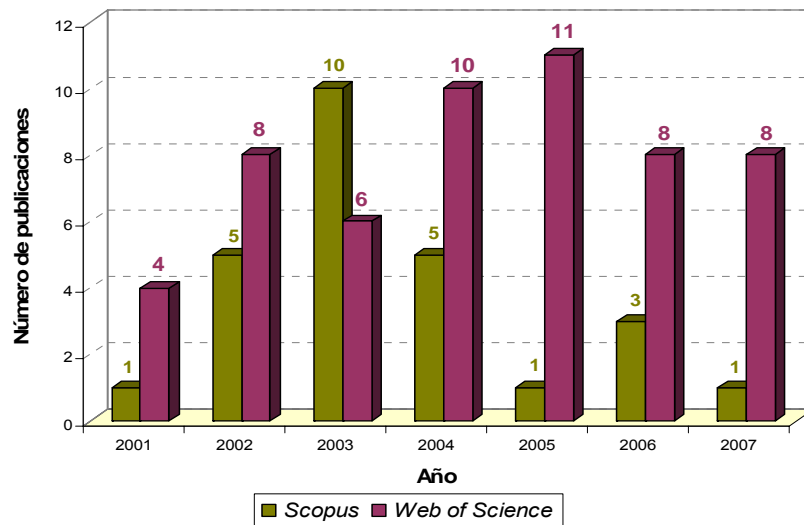
reconocidas publicaciones de orden mundial relacionadas, principalmente, con la química analítica, agricultura, productos naturales y alimentos (**Figura 20**).

Figura 17. Relación países – número de publicaciones sobre catequinas analizadas por CE.



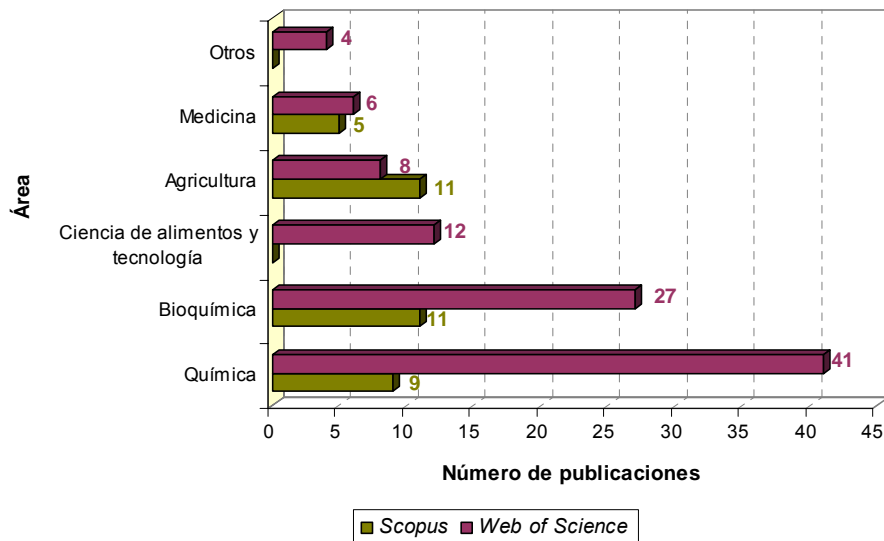
Fuente: *Scopus* y *Web of Science*. Periodo de observación: 2001 - 2007. Fecha de consulta: 11 de agosto de 2007. Ecuación de búsqueda: (TITLE-ABS-KEY(catechins) AND TITLE-ABS-KEY(electrophoresis))

Figura 18. Relación año – número de publicaciones sobre catequinas, analizadas por CE.



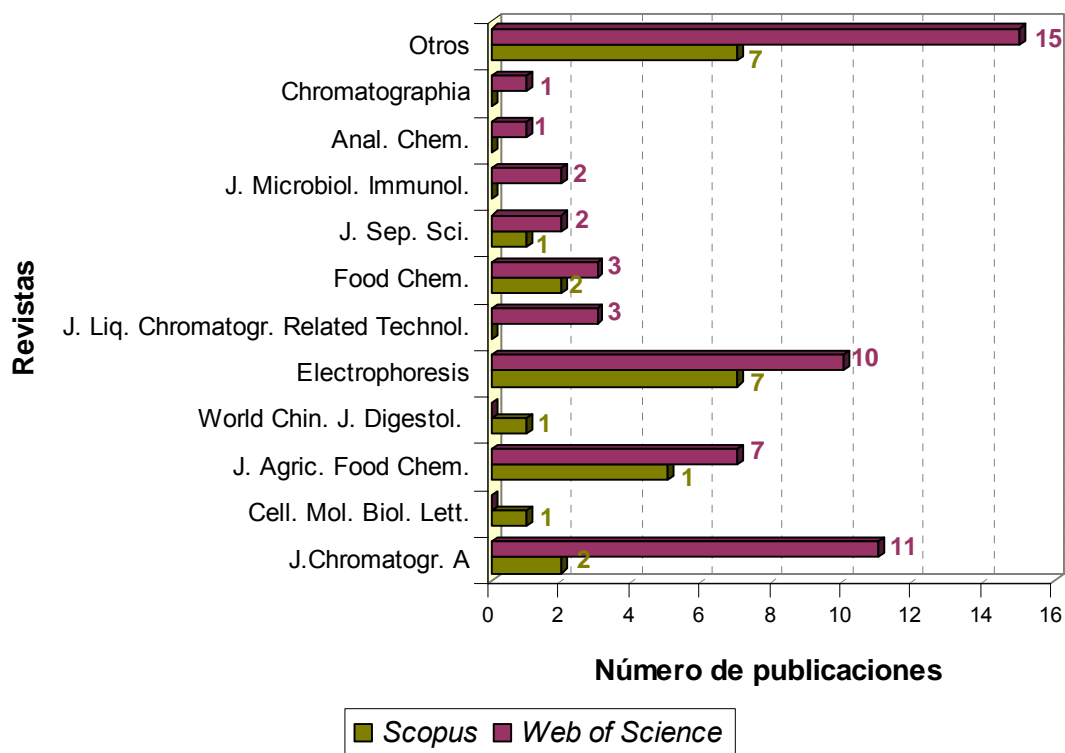
Fuente: *Scopus y Web of Science*. Periodo de observación: 2001 - 2007. Fecha de consulta: 11 de agosto de 2007. Ecuación de búsqueda: (TITLE-ABS-KEY(**catechins**) AND TITLE-ABS-KEY(electrophoresis))

Figura 19. Relación área – número de publicaciones sobre catequinas, analizadas por CE.



Fuente: *Scopus y Web of Science*. Periodo de observación: 2001 - 2007. Fecha de consulta: 11 de agosto de 2007. Ecuación de búsqueda: (TITLE-ABS-KEY(**catechins**) AND TITLE-ABS-KEY(electrophoresis))

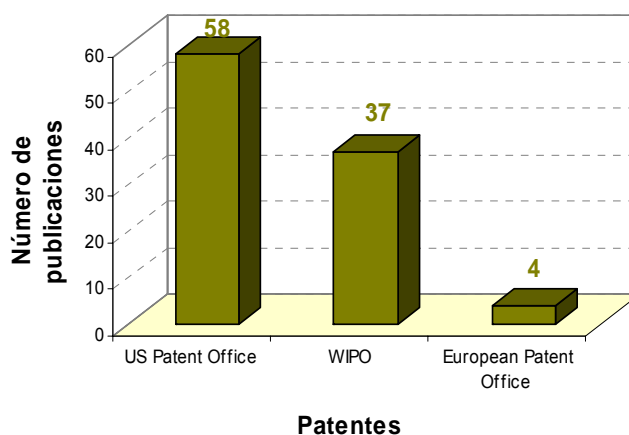
Figura 20. Relación tipo de revista – número de publicación sobre catequinas analizadas por CE.



Fuente: *Scopus* y *Web of Science*. Periodo de observación: 2001 - 2007. Fecha de consulta: 11 de agosto de 2007. Ecuación de búsqueda: (TITLE-ABS-KEY(**catechins**) AND TITLE-ABS-KEY(**electrophoresis**))

Para el estudio de catequinas, utilizando electroforesis capilar, se encuentran varias patentes, aunque en menor cantidad que las reportadas utilizando HPLC. La oficina de patentes de los Estados Unidos tiene el mayor número de patentes, seguida de la WIPO (**Figura 21**).

Figura 21. Relación patentes – número de publicaciones de catequinas analizadas por CE.



Fuente: *Scopus y Web of Science*. Periodo de observación: 2001 - 2007. Fecha de consulta: 11 de agosto de 2007. Ecuación de búsqueda: (TITLE-ABS-KEY(**catechins**) AND TITLE-ABS-KEY(electrophoresis))

En la **Tabla 2**, se muestra un resumen de los resultados obtenidos del estudio cuantitativo sobre catequinas analizadas por HPLC y CE. Se observa, que para ambos casos, las revistas con mayor número de publicaciones y las áreas de aplicación, están relacionadas con las ciencias de separación, alimentos y agricultura, lo cual significa que ambas técnicas han despertado el interés de la comunidad científica con fines similares. Además se encontró un número superior de publicaciones realizadas para catequinas analizadas por CE, lo cual puede sugerir que dicha técnica presenta determinadas ventajas sobre HPLC, por tanto, se hace necesario realizar un estudio comparativo sobre estas dos técnicas aplicadas a catequinas, con el objetivo fundamental de establecer bajo qué condiciones resultan éstas ser ventajosas.

Tabla 2. Resumen comparativo de los resultados obtenidos del estudio cuantitativo sobre catequinas analizadas por HPLC y CE.

Observable	HPLC		CE	
	Scopus	Web of Science	Scopus	Web of Science
Número de publicaciones	23	10	26	55
Áreas de aplicación	Agricultura Química Medicina	Química Ciencias de las plantas Bioquímica	Agricultura Bioquímica Química	Química Bioquímica Ciencias de alimentos
Revistas	<i>J. Agric. Food. Chem., J. Liq. Chromatogr. Related Technol., Food. Chem.</i>	<i>J. Agric. Food. Chem., J. Liq. Chromatogr. Related Technol., J. Chromatogr. A.</i>	<i>Electrophoresis, J. Agric. Food. Chem., J. Chromatogr. A.</i>	<i>J. Chromatogr. A., Electrophoresis, Food. Chem.</i>
Países	Japón EE.UU Brasil	Alemania EE.UU Brasil	Italia Japón China	EE.UU. Italia China
Oficinas de patentes				
USPTO	190		58	
WIPO	124		37	
EPO	21		4	
UKIPO	1		0	

3. DESARROLLO EXPERIMENTAL

3.1 MATERIALES Y REACTIVOS

3.1.1 Reactivos y solventes. Se emplearon los siguientes reactivos: ácido gálico (98%) (Madrid, España), reactivo de Folin–Ciocalteu (2N) (Buchs, Suecia) de *Aldrich Chemical Co. Inc.*; vitamina E (97%), Trolox[®] (97%), DPPH[°] (90%) (Milwaukee, WI, EE.UU.) de *Aldrich Chemical Co. Inc.*; etanol (99.8%), ácido acético (98%), *Riedel-de Haën*, de *Sigma-Aldrich* (Buchs, Suiza); agua, metanol, acetonitrilo grado HPLC y ácido clorhídrico (37% p/v) marca *J.T Baker* (México, D.F., México); ácido bórico (99.8%) de *Carlo Erba* (Milano, Italia) y carbonato de sodio, hidrógeno fosfato de sodio (99%), hidróxido de sodio (99%), dodecil sulfato de sodio (99%) de *Merck* (Darmstand, Alemania).

3.1.2 Material de referencia certificado. En la **Tabla 3** se reportan las especificaciones comerciales de los patrones de referencia, empleados en este estudio.

Tabla 3. Especificaciones del material de referencia certificado.

Sustancia	Pureza	Número de Lote*
(±)-Catequina	(99%)	116K2506
(-)-Epicatequina	(99%)	047K1193
(-)-Epigallocatequina	(99%)	126K1549
(-)-Epicatequina galato	(98%)	037K1445
(-)-Epigallocatequina galato	(95%)	047K1442

* Proveedor: *Sigma-Aldrich* (St. Louis, EE.UU.)

3.1.3 Material de laboratorio. Se utilizaron los siguientes materiales de laboratorio: balanza analítica AG 285 y pHmetro MPC227 de Mettler Toledo

(Schwerzenbach, Suiza), baño ultrasónico LC-20H de Ultrasonic (Darmstadt, Alemania), pipetas volumetricas de 2, 5, 10 mL, balones aforados de 2, 5, 10, 25, 50, 100, 200 mL, vasos de precipitado de 100, 150, 600 mL, embudo de decantación, Erlenmeyers de 50 mL y tubos de ensayos de Scott (Texas, EE.UU). Frascos plásticos esterilizables de 250 mL, micropipetas de 2-20, 25-250, 100-1000 μ L, puntas plásticas para micro pipetas, tubos cónicos de poli(propileno) de 1.5 mL de Brand (Wertheim, Alemania), jeringas plásticas, filtro de acetato de celulosa de 0.22 μ m de National Scientific (Oxfordshire, UK), filtros de membrana PVDF de 0.45 μ m de Millipore (Sao Pablo, Brasil) microjeringa para inyección de 50 μ L de Agilent (Melbourne, Australia.).

3.2 MATERIAL VEGETAL.

Las especies estudiadas fueron recolectadas de la región del Chicamocha (Santander) en una de las expediciones realizadas por Fundacofan (Cali), con el apoyo logístico y financiero de la Unión Temporal, CENIVAM; posteriormente, fueron identificadas en el Herbario Nacional de Colombia (HNC), Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá, donde reposan los pliegos testigos de cada especie (**Tabla 4**).

Tabla 4. Identificación taxonómica de las especies bajo estudio.

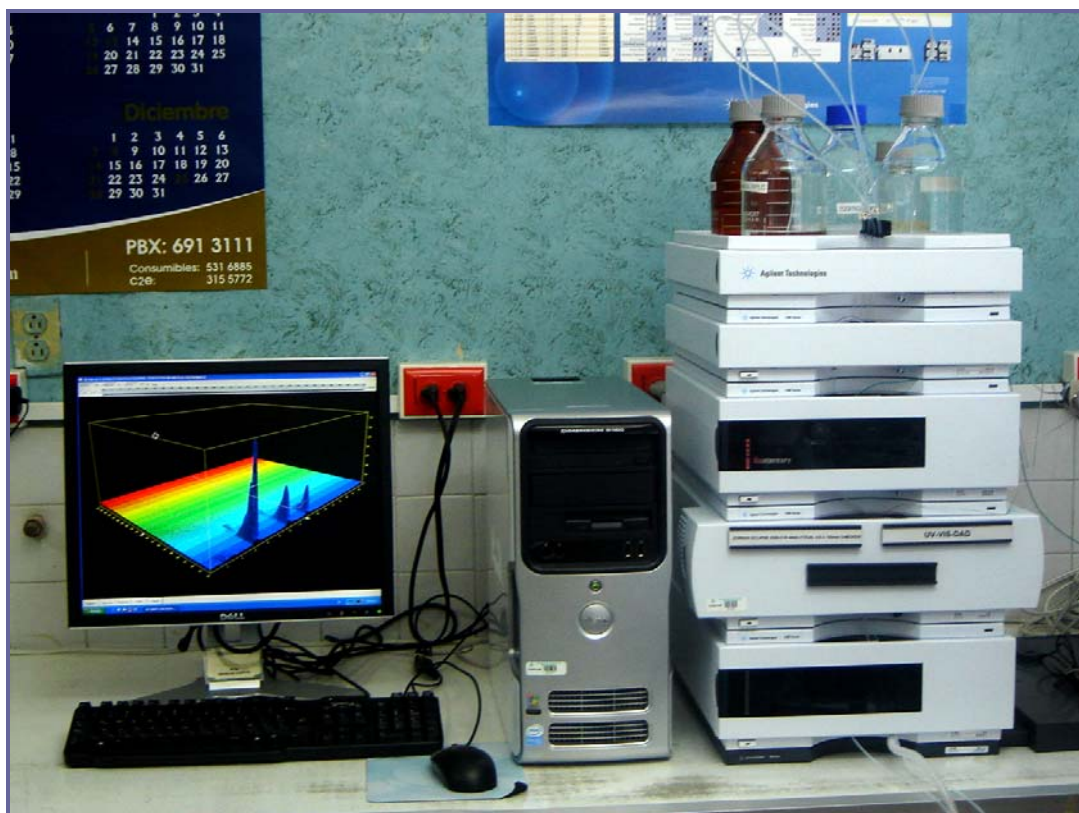
Especie	N° COL	Autor
<i>Salvia aratocensis</i>	N° Col 517740	Dr. José Luís Fernández

La muestra de Cacao (*Theobroma cacao*) estudiada, fue colectada en la vereda El Rincón, a 6 km, sobre la vía que comunica con el municipio del Socorro (Santander) y té verde (*Camellia sinensis*) fue adquirido en el mercado local.

3.3 IMPLEMENTACIÓN DE LA METODOLOGÍA DE ANÁLISIS DE CATEQUINAS POR HPLC.

El análisis cromatográfico se realizó usando un cromatógrafo *Agilent Technologies* 1200, que consta de una bomba cuaternaria *Agilent Technologies* G1354A, un inyector manual *Agilent Technologies Series* 1200 G1328B y un detector UV-Vis de arreglo de diodos G1315B, con una columna apolar ZORBAX Eclipse XDB-C18 (4,6 x 150 mm, 5 μ m). El procesamiento de los datos se realizó a través del sistema de datos *Agilent ChemStation LC* (Figura 22).

Figura 22. Cromatógrafo líquido de alta eficiencia *Agilent 1200 Series*.

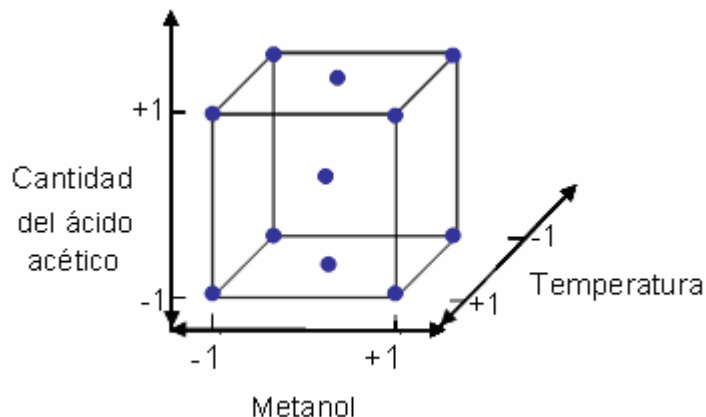


3.3.1 Pruebas preliminares para HPLC. Para el análisis simultáneo de las catequinas, (±)-C, (-)-EC, (-)-EGC, (-)-ECG y (-)-EGCG, se probaron diferentes condiciones, longitud de onda, composición de la fase móvil y temperatura.

- **Selección de la longitud de onda:** La longitud de onda de trabajo se seleccionó teniendo en cuenta la máxima absorbancia; para ello, se tomaron los espectros ultravioleta-visible de cada uno de los analitos, realizando un barrido en la región de 190 a 900 nm.
- **Selección de la fase móvil:** Se probaron diferentes mezclas de solventes, *i.e.* metanol:agua, metanol:acetonitrilo, metanol:agua:ácido acético, metanol:agua:ácido fosfórico y acetonitrilo:agua, a 40°C y flujo de 1 mL/min [78, 79, 80].
- **Selección de la temperatura de análisis:** Se evaluaron 3 temperaturas de trabajo, *i.e.* 30, 35 y 40°C, con el fin de observar el efecto de esta variable sobre la viscosidad de la fase móvil, la separación de los analitos y su tiempo de elución.

3.3.2 Diseño experimental para HPLC. Con el fin de establecer las mejores condiciones de análisis, se aplicó un diseño experimental central compuesto 3^3 (**Figura 23**), teniendo en cuenta los resultados obtenidos en las pruebas preliminares.

Figura 23. Diseño experimental central compuesto 3^3 .



Las siguientes fueron variables consideradas: porcentaje de metanol y ácido acético en la fase móvil y temperatura. Las variables con sus niveles máximos (simbolizado como +1) y mínimos (simbolizado como -1) se observan en la **Tabla 5**.

Tabla 5. Variables y niveles del diseño experimental central compuesto 3^3 .

VARIABLES	NIVELES		
Metanol, %	15	18	20
Temperatura, °C	30	35	40
Cantidad de ácido	0	0,1	0,3

El diseño experimental central compuesto 3^3 completo se observa en la **Tabla 6**. En este caso, se exploró con más detalle dos de las seis caras del cubo, es decir, las caras correspondientes a la cantidad del ácido acético, puesto que, en las pruebas preliminares, se observó que su cantidad afectaba notablemente la resolución de las señales 1 y 2 (**Figura 26**).

Tabla 6. Diseño experimental central compuesto 3³ completo.

N. de Experimento	Metanol, %	Temperatura, °C	Cantidad del ácido acético
1	20	40	0,3
2	20	40	0
3	20	30	0,3
4	20	30	0
5	15	40	0,3
6	15	40	0
7	15	30	0,3
8	15	30	0
9	18	35	0,1
10	18	35	0,1
11	18	35	0,1
12	18	35	0,1
13	18	35	0,1
14	18	40	0,1
15	18	30	0,1

El análisis del diseño experimental central compuesto 3³ se realizó usando el *Software* estadístico STATGRAPHICS 5.1.

3.3.3 Determinación de las figuras analíticas de mérito para HPLC. Se determinaron las figuras de mérito, tales como precisión (expresada como repetibilidad), límite de detección (LOD), límite de cuantificación (LQO), linealidad y sensibilidad, según lo recomendado por la Conferencia Internacional sobre Armonización de Requerimientos Técnicos para Registro de Fármacos para uso Humano (ICH) [81].

Para la determinación de estos parámetros, se realizó una curva de calibración por el método de estándar externo.

Solución stock: Se preparó 1 mL de solución *stock* de (\pm)-catequina, (-)-epicatequina, (-)-epigallocatequina, (-)-epicatequina galato y (-)-epigallocatequina galato en agua HPLC, de 500 ppm cada una.

Soluciones de trabajo: Se aforó a 1 mL un volumen determinado de solución *stock*, necesario para preparar soluciones con concentraciones de 0,5, 1, 2, 4, 8, 16, 32 y 64 ppm de cada una de las catequinas.

- **Evaluación de la repetibilidad del método para tiempos de retención (t_R) y áreas.** La repetibilidad del método se evaluó en términos del coeficiente de variación (CV) del t_R y del área, para un punto de la curva de calibración.
- **Determinación del porcentaje de recuperación.** Se determinó el porcentaje de recuperación de analito en el procedimiento de limpieza de la muestra, es decir, después de realizar las dos extracciones líquido-líquido, con cloroformo y acetato de etilo.
- **Evaluación de la linealidad y la sensibilidad del método.** La linealidad y sensibilidad del método se evaluaron empleando la curva de calibración realizada en el rango de 0,5 a 64 ppm. La linealidad se determinó evaluando el rango de concentraciones en que la respuesta del detector es lineal, y se reportó como el cuadrado del coeficiente de determinación. La sensibilidad se reportó como la pendiente de la curva a un nivel de confianza del 95%.

- **Determinación de los límites de detección y de cuantificación.**

Para la determinación del límite de detección, se encontró $3S_{y/x}$ usando las curvas de calibración de las catequinas en el rango de concentraciones de 0,5 – 64 mg/L. El límite de cuantificación se definió como el doble de la concentración del límite de detección, es decir, $6 S_{y/x}$.

3.4 IMPLEMENTACIÓN DE LA METODOLOGÍA DE ANÁLISIS DE CATEQUINAS POR CE.

Para el análisis y la cuantificación de las catequinas bajo estudio, se empleó un equipo de CE, CAPEL 105 Lumex (St. Petersburg, Russia), con detector UV (190 – 380 nm), un capilar de sílice fundida de 75 μm i.d., con largo total y efectivo de 60 y 50.5 cm, respectivamente, y una fuente de poder con polaridad positiva (**Figura 24**). Para el tratamiento de los datos obtenidos se utilizó el *Software Chromatography Data Station, Chrom&Spec*, Versión 1.5.

Figura 24. Equipo de electroforesis capilar CAPEL 105 Lumex.



Al inicio de cada jornada, se acondicionó la superficie interna del capilar ejecutando un programa de lavado: agua (3 min), metanol (3 min), agua (3 min), HCl (1 M, 5 min), agua (3 min), NaOH (1 M, 15 min), agua (3 min), SB (30 min).

Después de cada corrida electroforética, se lavó el capilar con SB durante 5 min con el fin de mejorar la reproducibilidad de los análisis según lo recomendado por Faller y Engelhardt [82].

3.4.1 Pruebas preliminares para CE. Debido al gran número de parámetros considerados en la técnica, se realizó una serie de pruebas preliminares con el fin de determinar las variables más significativas que afectaban en mayor grado el proceso de separación de las 5 catequinas bajo estudio y, de esta manera, plantear un diseño de experimentos.

- **Composición de la solución *buffer*:** Se probaron diferentes componentes de la solución *buffer*, el uso de un surfactante y modificadores orgánicos, para alcanzar la separación de las catequinas en estudio.
- **Longitud de onda del detector:** 210 nm de longitud de onda, a la cual se presenta la máxima absorbancia de la mayoría de catequinas, determinada experimentalmente (**Anexo 1**).
- **pH de la solución *buffer*:** Se emplearon diferentes valores de pH (7 - 11) con el fin de evaluar la separación de las catequinas en la solución *buffer*.
- **Voltaje de corrida:** Se empleó un voltaje tolerable para el equipo en el rango 15-20 kV, que permitiera un tiempo de análisis corto y un mínimo de resolución de 1.5.
- **Temperatura de corrida:** Se empleó una temperatura de 20°C, con el fin de evitar el calentamiento de Joule en el capilar.

3.4.2 Diseño experimental para CE. De acuerdo con los resultados, se determinó, que los principales parámetros a evaluar para el diseño de experimentos eran los correspondientes a la composición de la fase móvil. Se realizó un diseño factorial multinivel 3^2 (**Tabla 7**), en el cual las variables consideradas fueron las concentraciones de SDS y de H_3BO_3 (**Tabla 8**).

Tabla 7. Diseño experimental factorial multinivel 3^2 completo.

Experimento	[SDS], mM	[H_3BO_3], mM
1	60	25
2	60	35
3	100	25
4	60	45
5	100	45
6	80	35
7	80	45
8	80	25
9	100	35

Tabla 8. Variables y niveles del diseño experimental factorial multinivel 3^2 .

VARIABLES	NIVELES		
[SDS], mM	60	80	100
[H_3BO_3], mM	25	35	45

3.4.3 Determinación de las figuras analíticas de mérito para CE. La determinación de las figuras de mérito para electroforesis capilar se realizó de la misma manera, que para HPLC (**Sección 3.3.3**).

3.5 EXTRACCIÓN DE CATEQUINAS DE MATRICES VEGETALES.

Para evaluar el procedimiento de extracción de las catequinas, se realizaron pruebas preliminares con una matriz vegetal que contuviera este tipo de analitos. Según la revisión bibliográfica, *Camellia sinensis* es una de las plantas que contiene las cinco catequinas en estudio [13, 14]; por esto, té verde fue seleccionado para encontrar el procedimiento adecuado de extracción de catequinas.

A té verde, previamente picado y seco (100 mg), se adicionaron 10 mL de agua HPLC y se comenzó la extracción en ultrasonido por 15 min. Posteriormente, la mezcla se centrifugó a 3000 rpm durante 20 min. El extracto acuoso obtenido, fue sometido a dos extracciones líquido – líquido sucesivas, primera, con 10 mL de cloroformo y, luego, con 10 mL de acetato de etilo. De la segunda extracción fue conservada la fracción orgánica, la que fue llevada a sequedad con un flujo de nitrógeno. El extracto obtenido después de pesado, fue aforado a 1 mL con agua grado HPLC para su posterior inyección al HPLC [83].

3.5.1 Extracción exhaustiva de catequinas. Analizando, por HPLC cada uno de los extractos obtenidos, se repitió el procedimiento de extracción a la misma muestra hasta obtener resultados, cuando las sustancias se registraron por debajo del límite de detección. De este modo, se fijó el número de extracciones necesarias para recuperar el analito más exhaustivamente posible, bajo las condiciones de trabajo empleadas.

3.6 DETERMINACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE CATEQUINAS.

La determinación y la cuantificación, por HPLC y CE, de las catequinas (\pm)-C, (-)-EC, (-)-EGC, (-)-ECG y (-)-EGCG, presentes en los extractos de las

especies *Origanum vulgare* L. y *Salvia aratocensis*, se realizaron empleando el método de estándar externo.

3.6.1 Cuantificación con cromatografía líquida de alta eficiencia.

- **Determinación.** Se realizó comparando los tiempos de retención y los espectros ultravioleta de los picos cromatográficos correspondientes a cada una de las catequinas de referencia con los de los picos cromatográficos observados en los cromatogramas de los extractos de las especies en estudio. Además, se enriquecieron muestras de cada extracto con soluciones en concentraciones conocidas de cada catequina y, de esta manera, mediante la diferencia de áreas observadas en los cromatogramas, se determinó a cuál catequina correspondió cada pico cromatográfico.
- **Cuantificación.** Con la curva de calibración para cada catequina, se extrapolaron las concentraciones de analito de interés, presente en las muestras analizadas.

3.6.2 Cuantificación por electroforesis capilar.

- **Determinación.** Se llevó a cabo comparando los tiempos de migración de los picos electroforéticos de las catequinas de referencia con los tiempos de migración de los picos observados en los electroforegramas de los extractos de cada una de las especies en estudio. También se enriquecieron muestras de cada extracto con soluciones de cada catequina en concentraciones conocidas, con el fin de determinar a cuál catequina correspondía cada señal observada en los electroforegramas.
- **Cuantificación.** Con la curva de calibración para cada catequina, se extrapolaron las concentraciones de analito de interés, presente en las muestras analizadas.

Para la cuantificación de las catequinas, por electroforesis capilar, fue necesario construir las curvas de calibración con los datos de área corregida (**Ecuación A**), debido a que el área de cada pico tiene relación inversa con la velocidad efectiva de migración (V_{eff}) del analito que representa, es decir, cuanto más lento sea el movimiento del analito, mayor será su área:

$$\text{Área}_{\text{Corr}} = \frac{A_n}{t_{Mn}} \quad \text{Ecuación A.}$$

Donde:

$\text{Área}_{\text{Corr}}$, área corregida, mAU*s/min,

A_n , área del pico n – ésimo, mAU*s/min,

t_{Mn} , tiempo de migración del pico n – ésimo, min.

3.7 COMPARACIÓN ENTRE CE y HPLC PARA EL ANÁLISIS DE CATEQUINAS.

El estudio comparativo de las metodologías implementadas para el análisis de catequinas, utilizando HPLC y CE, se realizó teniendo en cuenta las figuras analíticas de mérito, el tiempo y el costo de análisis.

3.8 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.

La evaluación de la actividad antioxidante (AA) de las sustancias de referencia, las catequinas bajo estudio y los extractos de las sustancias estudiadas se realizó según el procedimiento descrito por Brad-Williams [84]. De esta manera, se tomó una alícuota de 2.5 mL de solución de DPPH[°] (63 μ M) y se adicionaron 0.5 mL de solución de cada una de las sustancias a evaluar, disuelta en etanol, en cinco concentraciones diferentes para cada sustancia. Para cada concentración se midió la absorbancia, cada minuto, en

un espectrofotómetro *VIS Jenway 6300*, a una longitud de onda de 514 nm (**Figura 25**), hasta alcanzar el estado estacionario de la reacción ($\Delta A=0.001 \text{ min}^{-1}$).

Figura 25. Espectrofotómetro *VIS Jenway 6300* (*Jenway Ltd.* Felsted, Dunmow, U.K.)



Posteriormente, los valores de absorbancia en el estado estacionario, fueron utilizados para determinar el porcentaje de DPPH° remanente, para cada una de las concentraciones efectivas adicionadas y se estableció la correlación entre el porcentaje remanente de DPPH° y las concentraciones efectivas de cada sustancia; a partir de allí, se interpoló el valor de EC correspondiente al 50% de DPPH° remanente (EC_{50}).

3.9 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO TOTAL DE FENOLES.

La determinación del contenido total de fenoles se realizó siguiendo el procedimiento descrito por Isaza, *et al.* [85]. Se tomaron 0.5 mL del reactivo Folin-Ciocalteu (2N) y se agregaron 0.1 mL de carbonato de calcio (20%) para alcanzar un pH igual a 11. A continuación, se agregó un determinado volumen de solución de cada una de las sustancias a evaluar y se completó con agua hasta alcanzar un volumen de 5 mL. Tras 90 min de calentamiento

a 60 °C, se procedió a medir la absorbancia de la solución resultante en un espectrofotómetro *VIS Jenway 6300* a una longitud de onda de 750 nm.

Para realizar la cuantificación de los fenoles totales, se empleó como sustancia de referencia el ácido gálico. Se construyó una curva de calibración siguiendo las indicaciones mencionadas, obteniendo los resultados mediante interpolación de la curva absorbancia Vs. concentración, expresados en mg equivalentes del ácido gálico.

4. ANÁLISIS DE RESULTADOS

4.1 METODOLOGÍA DE ANÁLISIS DE CATEQUINAS POR HPLC.

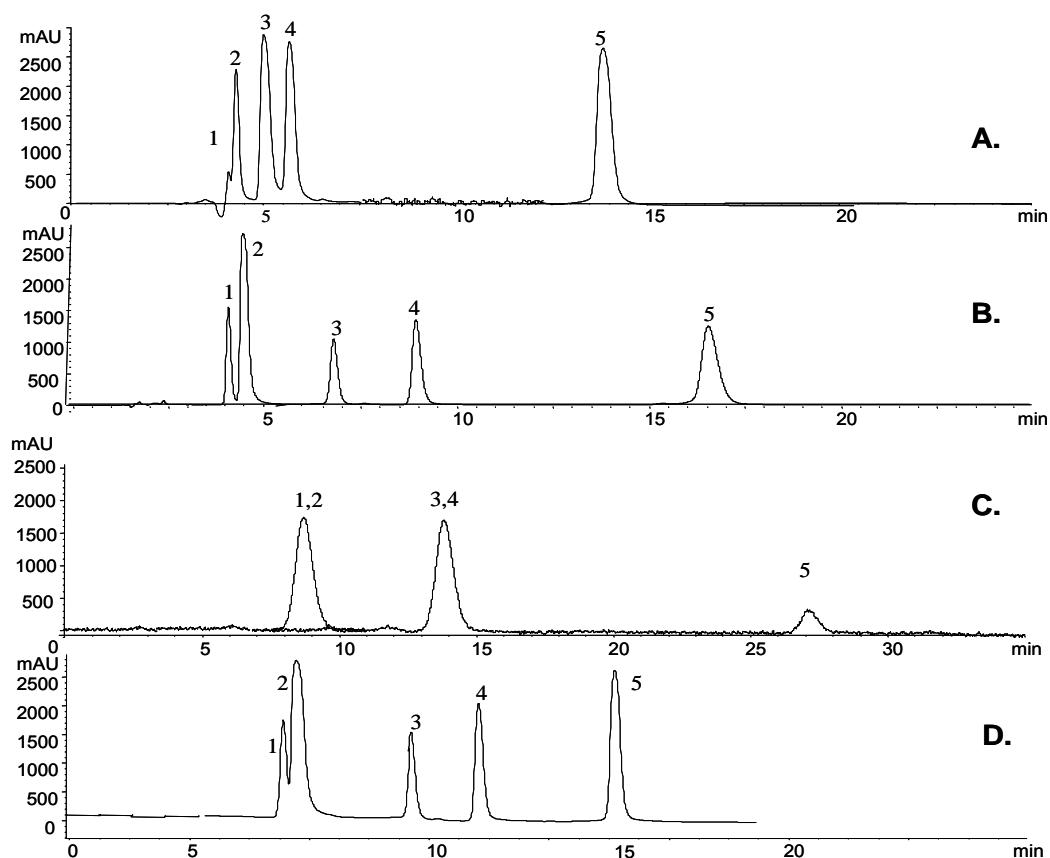
4.1.1 Selección de variables y niveles para HPLC. Para el análisis de las catequinas se realizaron varias pruebas preliminares, con las cuales se seleccionaron la longitud de onda de trabajo, la composición de la fase móvil y la temperatura de análisis. Además, con el propósito de realizar el diseño experimental para la implementación de la metodología de trabajo, se determinó cuáles variables afectaban notablemente la separación de las catequinas.

- **Selección de la longitud de onda:** En los espectros ultravioleta-visible tomados de 190 a 900 nm de cada una de las catequinas, se observaron dos longitudes de onda de absorción, *i.e.* 210 y 280 nm. Para los cinco analitos, (\pm)-catequina, (-)-epicatequina, (-)-epigallocatequina, (-)-epicatequina galato y (-)-epigallocatequina galato, la longitud de onda de máxima absorbancia correspondió a 210 nm, por tanto, ésta fue la longitud seleccionada, para realizar todos los análisis (**Anexo 1**).
- **Selección de la fase móvil:** Las pruebas se realizaron variando los solventes de menor a mayor fuerza de elución, es decir, agua, metanol y acetonitrilo. Se evaluaron diferentes mezclas de solventes, a saber: metanol:agua, metanol:acetonitrilo, metanol:agua:ácido acético, metanol:agua:ácido fosfórico y acetonitrilo:agua (**Figura 26**).

Al emplear fase móvil con mayor porcentaje de agua, se observó la separación de los cinco analitos, aunque el valor de resolución no fue completamente aceptable para los picos cromatográficos 1 y 2 (Véase **Figura 26**).

Con el propósito de reducir los tiempos de análisis, se evaluaron mezclas de solventes con menor retención, a saber: acetonitrilo:agua y acetonitrilo:metanol. No obstante, se lograron menores tiempos de análisis, pero la resolución disminuyó drásticamente, presentándose coelución de algunos picos.

Figura 26. Variación de la composición de la fase móvil para la separación de catequinas por HPLC.

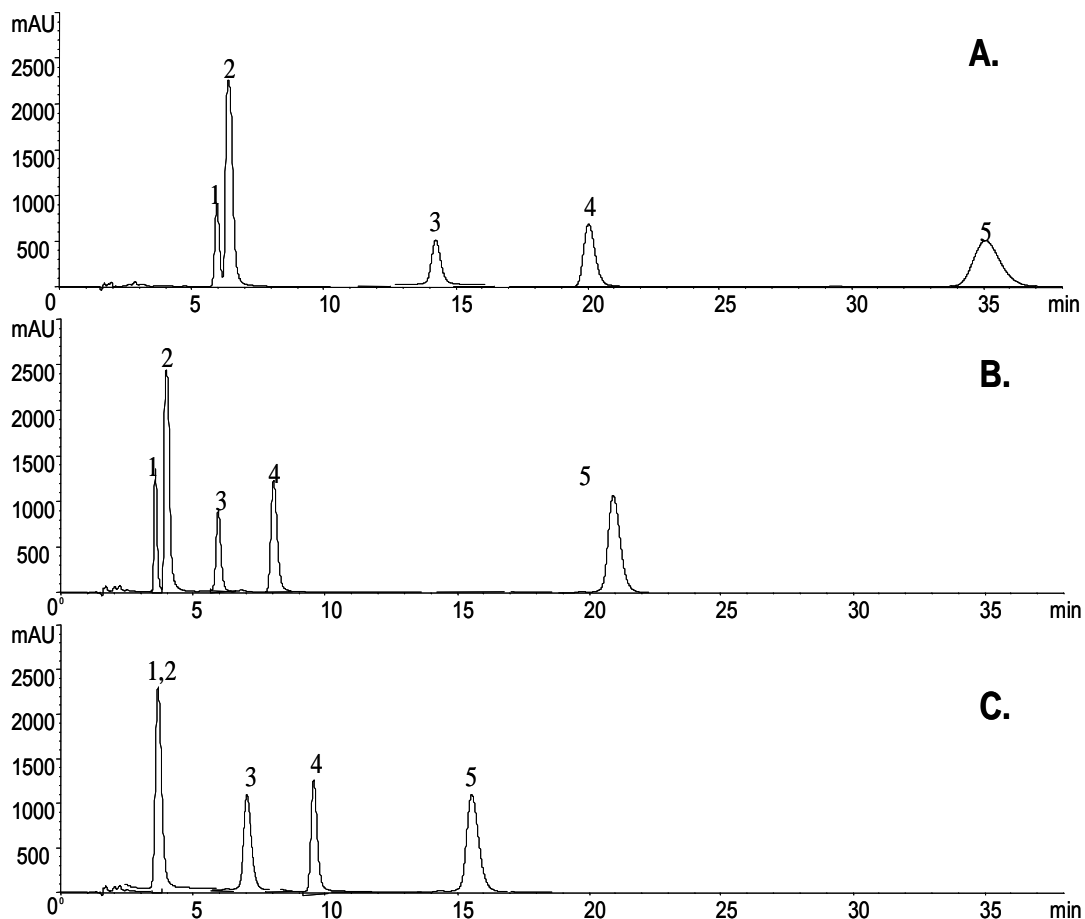


Cromatogramas típicos de catequinas patrón, analizadas por HPLC-DAD-UV-Vis, en la columna apolar ZORBAX Eclipse XDB-C18. **A.** Metanol, 20 %: acetonitrilo, 80 %, **B.** Metanol, 20 %: agua:ácido acético (100:0.1), 80%, **C.** Metanol, 20 %: agua:ácido fosfórico (100:0.1), 80 %, y **D.** Acetonitrilo, 20 % : agua:ácido acético (100:0.1), 80 %.

La fase móvil con la que se obtuvo la resolución más alta fue agua:metanol:ácido acético. Una vez establecida la mezcla de solventes a utilizar, se estudió el efecto del porcentaje de metanol, cantidad del ácido

acético y la temperatura del termostato. Al aumentar el porcentaje de metanol en la mezcla, disminuye el tiempo de análisis y la resolución de los picos 1 y 2 (**Figura 27**).

Figura 27. Efecto del porcentaje de metanol en la fase móvil, para el análisis por HPLC de catequinas.

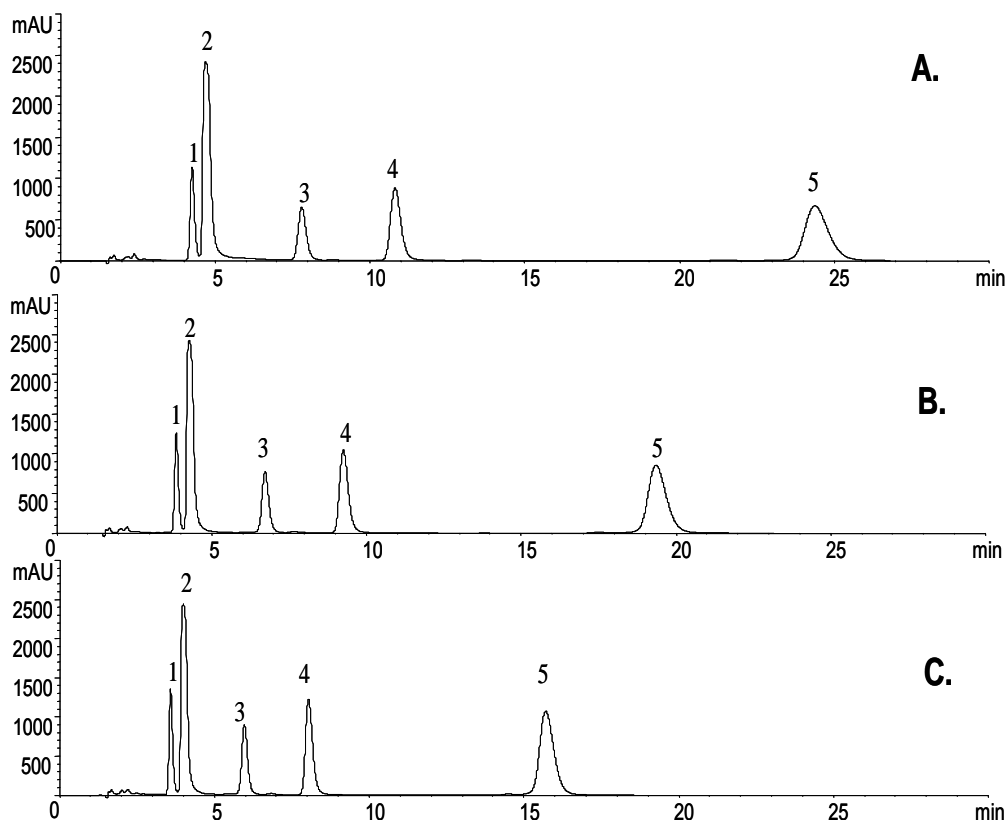


Cromatogramas típicos de catequinas patrón, analizadas por HPLC-DAD-UV-Vis, en la columna apolar ZORBAX Eclipse XDB-C18. Fase móvil: **A.** Metanol, 15 %: agua:ácido acético (100:0.1), 85%, **B.** Metanol, 20 %: agua:ácido acético (100:0.1), 80%, **C.** Metanol, 25 % : agua:ácido acético (100:0.1), 75 %.

De igual forma, con el incremento de la temperatura se observó un efecto similar en el tiempo de análisis, pero en este caso la resolución de las señales no se afectó (**Figura 28**). Un efecto favorable al aumentar la

temperatura de análisis es la disminución de la viscosidad de la mezcla de solventes; por consiguiente, se reduce notablemente la presión de la bomba de gradiente cuaternario, siendo ésta propicia para el cuidado del equipo de HPLC.

Figura 28. Efecto de la temperatura de análisis, para la separación de catequinas por HPLC.



Cromatogramas típicos de catequinas patrón, analizadas por HPLC-DAD-UV-Vis, en la columna apolar ZORBAX Eclipse XDB-C18. Fase móvil: Metanol, 20 %: agua:ácido acético (100:0.1), 80%. **A.** 30 °C, **B.** 35 °C, **C.** 40 °C.

Una vez analizados los resultados de las pruebas preliminares, se concluyó, que el porcentaje de metanol en la fase móvil, la cantidad del ácido acético y la temperatura fueron variables que afectaron significativamente la

separación de catequinas.

4.1.2 Implementación de la metodología. La variable de respuesta empleada para realizar el diseño experimental fue la resolución entre los picos cromatográficos 1 y 2 (**Figura 28**) puesto que éstos son las señales, que presentaron la resolución más baja.

Los resultados obtenidos en el diseño experimental central compuesto 3³ se encuentran en la **Tabla 9**.

Tabla 9. Resultados del diseño experimental para la separación de catequinas por HPLC.

Experimento	Metanol, %	Temperatura, °C	Cantidad de ácido acético, %	Rs, picos 1 y 2	Rs, picos 1 y 2 según el modelo
1	20	40	0,3	1,654	1,650
2	20	40	0	1,241	1,279
3	20	30	0,3	1,51	1,514
4	20	30	0	1,311	1,273
5	15	40	0,3	1,789	1,812
6	15	40	0	1,775	1,775
7	15	30	0,3	1,537	1,514
8	15	30	0	0	2,28x10 ⁻¹⁵
9	15	35	0,1	2,181	2,178
10	18	35	0,1	2,337	2,178
11	18	35	0,1	2,264	2,178
12	18	35	0,1	2,159	2,178
13	18	35	0,1	1,948	2,178
14	18	40	0,1	2,048	1,991
15	18	30	0,1	1,820	1,876

En la **Tabla 10** se observan los coeficientes de la ecuación de regresión del modelo generado para encontrar los mejores valores, para la resolución de los picos 1 y 2 (Véase **Figura 27**).

Tabla 10. Coeficientes de la ecuación de regresión del modelo.

Variable	Coeficiente
A: Metanol, %	-0,12415
B: Temperatura, °C	0,07584
C: Cantidad de ácido acético, %	0,06935
AA	-2,09458
BB	-0,2438
CC	1,7694
AB	-0,04025
AC	0,08364
BC	0,03269
Constante	2,12213

Por consiguiente, la ecuación del modelo ajustado es:

$$Rs = 2,12213 - 0,12415 A + 0,07584 B + 0,06935 C - 2,09458 A^2 - 0,04025 AB + 0,08364 AC - 0,2438 B^2 + 0,03269 BC + 1,7694 C^2.$$

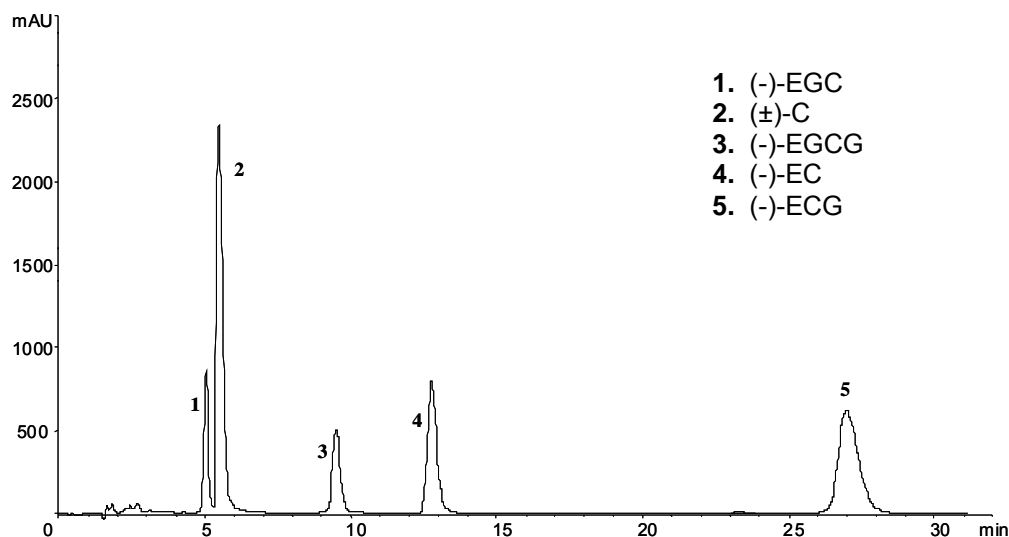
Con base en los resultados del diseño experimental, las condiciones bajo las cuales se obtiene la resolución más alta para los picos 1 y 2, se muestran en la **Tabla 11**.

Tabla 11. Parámetros cromatográficos propuestos para el análisis de catequinas por HPLC.

Parámetro	Especificaciones
Fase móvil	18 % metanol 82 % agua:ácido acético (100:0,1)
Temperatura	35 °C
Flujo	1 mL/min
Volumen de muestra	20 µL

A continuación, en la **Figura 29** se muestra un perfil cromatográfico de la mezcla del material de referencia de (±)-C, (-)-EC, (-)-EGC, (-)-ECG y (-)-EGCG, obtenido bajo las condiciones especificadas en la **Tabla 11**.

Figura 29. Perfil cromatográfico de las catequinas (±)-C, (-)-EC, (-)-EGC, (-)-EGCG y (-)-EGCG, obtenido por HPLC-DAD-UV-Vis en la columna apolar ZORBAX Eclipse XDB-C18 descritos en la **Tabla 10**.



Con la metodología implementada, se calcularon los valores de resolución para los picos 1 y 2 y el valor predicho por el modelo, *i.e.* 2,0241 y 2,1221, respectivamente, y se encontró, que el error entre los datos fue menor del 5 % (**Figura 29**).

Una vez determinada la metodología de trabajo, se inyectó cada una de las catequinas, para determinar su tiempo de retención (**Tabla 12**).

Tabla 12. Tiempos de retención de las catequinas, analizadas por HPLC.

Catequina	$t_R, \text{min} \pm S (n = 3)$
(-)-Epigallocatequina	4,74 \pm 0,04
(±)-Catequina	5,19 \pm 0,04
(-)-Epigallocatequina galato	8,86 \pm 0,08
(-)-Epicatequina	11,87 \pm 0,09
(-)-Epicatequina galato	25,9 \pm 0,2

En cromatografía líquida en fase reversa (RP-HPLC) el mecanismo de retención se rige por el carácter hidrofóbico del analito, es decir, la magnitud de la interacción será mayor al aumentar el número de grupos apolares. Aunque las interacciones hidrofóbicas gobiernen la retención, es necesario tener en cuenta los grupos funcionales polares del compuesto, debido a que, en cierto grado, éstos favorecen la interacción con la fase móvil constituida por solventes polares, y el tiempo de retención se disminuye.

Para las catequinas que contienen en su estructura un grupo galato, *i.e.* (-)-EGCG y (-)-ECG, será más retenida aquella que posee menor polaridad, es decir, la (-)-ECG. Para las demás catequinas, la retención es menor, porque la ausencia del grupo galato causa una disminución en las interacciones hidrofóbicas. En este caso, el orden de salida está condicionado por la diferencia de polaridad entre (-)-EGC, (±)-C y (-)-EC. Por consiguiente, la (-)-EGC es la catequina con menos repulsión hidrofóbica.

Según la teoría, un caso particular presentaron la (±)-catequina y la (-)-epicatequina (Véase **Figura 2**), epímeros entre sí, para los cuales la polaridad de la molécula estará afectada por la disposición espacial del grupo hidroxilo sobre el carbono C-3 del anillo benzopirano. Una explicación, al parecer, de este fenómeno, se encuentra en la disposición diecuatorial, esto es, una configuración *cis*- de los grupos 2-fenilo- y 3-hidroxilo- en el anillo del benzopirano en la (-)-epicatequina, que ocasiona una considerable disminución de su polaridad, en comparación con su epímero, la (±)-catequina, que posee una configuración *trans*- de los grupos 2-fenilo y 3-hidroxilo, cuando ambos se encuentran del mismo lado del plano del anillo dihidrobenzopiránico en la (-)-epicatequina; interacción que no es significativa en la estereoquímica *trans*- de la (±)-catequina. En consecuencia, ello se refleja, como ya se mencionó, en una marcada diferencia entre los tiempos de retención para estos dos epímeros.

4.1.3 Figuras analíticas de mérito para HPLC.

- **Evaluación de la repetibilidad del método para tiempos de retención (t_R) y área.** Al inyectar seis veces 20 μ L de una solución de catequinas de 32 ppm (punto de la curva de calibración), se estimó la repetibilidad del método. Los resultados para la evaluación del método, en cuanto a los t_R y áreas de picos, se observan en las **Tablas 13 y 14**, respectivamente.

Se observó, que entre mediciones, el t_R y el área, no presentaron desviación considerable, entonces se puede concluir que el método implementado es preciso. Para los tiempos de retención los coeficientes de variación estuvieron entre 0,75 y 0,90 % y para las áreas, entre 0,64 y 2,5 %. En ambos casos, el CV no superó el 3%, indicando que el método es repetible.

Tabla 13. Repetibilidad de los t_R de las catequinas, analizadas por HPLC.

Catequina	Tiempo de retención, min			$\langle X \rangle$ (n = 6)	S	CV, %	r
(-)-EGC	4,79	4,76	4,75	4,74	0,04	0,77	0,13
	4,73	4,71	4,69				
(±)-C	5,25	5,22	5,21	5,19	0,04	0,76	0,14
	5,18	5,16	5,14				
(-)-EGCG	8,97	8,92	8,89	8,86	0,08	0,90	0,29
	8,84	8,80	8,76				
(-)-EC	11,94	11,97	11,93	11,87	0,09	0,75	0,32
	11,86	11,80	11,74				
(-)-ECG	26,06	26,11	26,01	25,9	0,2	0,75	0,69
	25,84	25,70	25,65				

Tabla 14. Repetibilidad de áreas de picos de las catequinas, analizadas por HPLC.

Catequina	Área, mAU*s			$\langle X \rangle$ (n = 6)	S	CV, %	r
(-)-EGC	3150	3140	3100	3130	20	0,64	72,69
	3130	3100	3140				
(±)-C	3700	3650	3620	3660	32	0,88	115,96
	3690	3620	3670				
(-)-EGCG	3880	3870	3890	3870	29	0,75	104,68
	3810	3870	3890				
(-)-EC	2450	2460	2410	2430	60	2,5	217,43
	2490	2320	2430				
(-)-ECG	2650	2640	2560	2600	38	1,5	139,13
	2600	2560	2620				

- **Determinación del porcentaje de recuperación.** Se evaluó el porcentaje de recuperación de las catequinas en las etapas de eliminación de interferencias, extracción líquido-líquido con cloroformo y acetato de etilo. El porcentaje de recuperación de cada una de las catequinas estudiadas estuvo entre 70 y 90 % (**Tabla 15**), rango aceptado por las Buenas Prácticas de Laboratorio.

Tabla 15. Porcentaje de recuperación de las catequinas en el procedimiento de limpieza de la muestra.

Catequina	Recuperación, %
(-)-Epigalocatequina	71,1
(±)-Catequina	77,7
(-)-Epigalocatequina galato	72,6
(-)-Epicatequina	77,9
(-)-Epicatequina galato	86,2

- **Evaluación de la linealidad y la sensibilidad del método.** Mediante la curva de calibración para cada una de las catequinas (**Anexo 2**), se evaluaron la linealidad y la sensibilidad del método. Los resultados obtenidos se reportan en la **Tabla 16**.

Tabla 16. Linealidad y sensibilidad del método por HPLC.

Catequina	Ecuación	R ²	b	Sb	b ± tSb
(-)-EGC	y = 96,5 x	0,9998	96,5	0,5	97 ± 1,3
(±)-C	y = 126,6 x	0,9998	126,6	0,7	127 ± 1,8
(-)-EGCG	y = 115,1 x	0,9998	115,1	0,7	117 ± 1,7
(-)-EC	y = 82,5 x	0,9997	82,5	0,6	83 ± 1,5
(-)-ECG	y = 101,0 x	0,9999	101,0	0,5	101 ± 1,3

En el rango de concentraciones evaluado de 0,5-64 ppm, se observó buena linealidad (coeficiente de determinación R²=0,9997-0,9999). Las pendientes de la curva de calibración (b= 83 - 127) muestran una alta sensibilidad del método y sus desviaciones estándar (0,5-0,7) la precisión de las curvas de calibración. Por consiguiente, se puede inferir que el método es aplicable bajo el nivel de concentraciones examinadas.

- **Determinación de los límites de detección (LOD) y de cuantificación (LQO).** Para la determinación de LOD y LQO se siguieron los criterios descritos en la **Sección 3.3.3**. En la **Tabla 17** se observan los LOD y LQO para cada una de las catequinas estudiadas.

Tabla 17. Límites de detección y cuantificación de (±)-C, (-)-EC, (-)-EGC, (-)-ECG y (-)-EGCG por HPLC.

Catequina	LOD, ppm	LOQ, ppm
(-)-Epigallocatequina	0,50	1,00
(±)-Catequina	0,46	0,92
(-)-Epigallocatequina galato	0,56	1,12
(-)-Epicatequina	0,48	0,96
(-)-Epicatequina galato	1,84	3,68

- Determinación de la reproducibilidad de t_R y áreas.** Para evaluar la reproducibilidad del método, se tomaron tres muestras representativas de té verde. A cada una de las muestras, se les realizó el proceso de extracción y análisis de catequinas. Los resultados obtenidos para t_R y áreas se muestran en las **Tablas 18 y 19**.

Tabla 18. Reproducibilidad de las áreas cromatográficas de catequinas por HPLC.

Analito	Área, mAU*s			<X> (n = 3)	S	CV, %	r
	M1	M2	M3				
(-)-EGC	9443	10253	9592	9763	431	4,4	2615
(±)-C	1763	1880	1979	1874	108	5,7	654
(-)-EGCG	51391	51042	52697	51710	873	5,3	5291
(-)-EC	7728	8229	8499	8152	391	4,8	2372
(-)-ECG	14599	15043	16326	15323	897	5,9	5437

Los coeficientes de variación para el caso de las áreas estuvieron entre 4,4- 5,9% y para los t_R no superaron el 1%. Estos valores son aceptados por las buenas prácticas de laboratorio y, por consiguiente, muestran que el método es reproducible.

Tabla 19. Reproducibilidad de los t_R por HPLC.

Analito	Tiempo de retención, min			<X>	S	CV, %	r
	M1	M2	M3				
(-)-EGC	5,08	5,11	5,12	5,10	0,03	0,48	0,15
(±)-C	5,58	5,60	5,62	5,60	0,02	0,30	0,10
(-)-EGCG	9,55	9,67	9,66	9,63	0,07	0,70	0,41
(-)-EC	12,94	13,00	13,08	13,01	0,07	0,53	0,42
(-)-ECG	28,77	28,93	28,85	28,85	0,08	0,28	0,49

4.2 METODOLOGÍA DE ANÁLISIS DE CATEQUINAS POR CE.

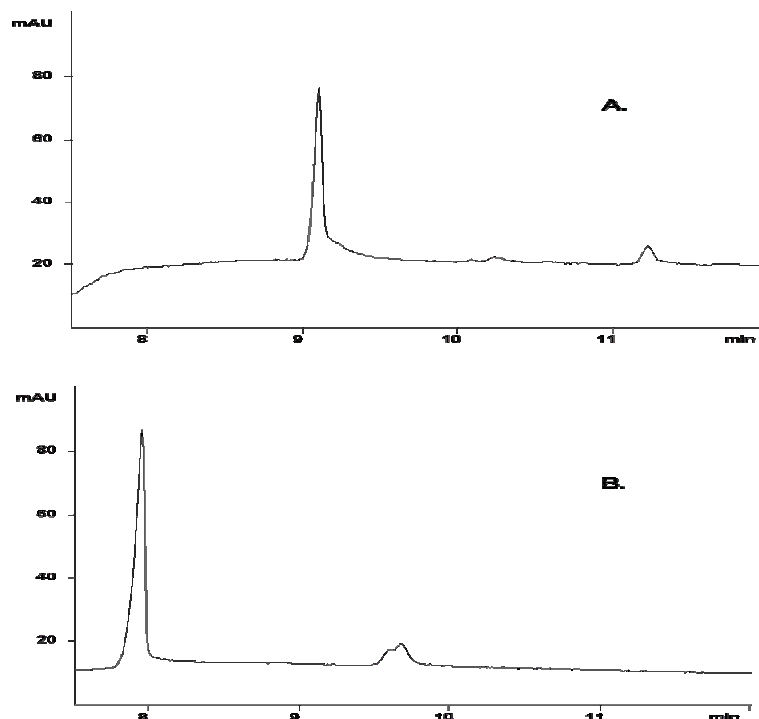
4.2.1 Selección de variables y niveles para CE.

- **Modalidad de electroforesis y efecto del pH.** Se probaron dos modos de electroforesis, a saber: electroforesis capilar en zona (CZE) y cromatografía cinética micelar (MEKC).

Para CZE fue necesario usar una solución *buffer* (SB) con un pH tal que garantizara que las catequinas se encuentren en forma iónica de ($pK_a \sim 8.2$). A $pH < 7$ no fue posible realizar el análisis, porque la corriente generada al aplicar el voltaje, fue mayor que la corriente de trabajo permitida por el equipo (200 μA). A pH mayor a 9 la separación de las catequinas fue nula (**Figura 30**).

En la modalidad MEKC, empleando como surfactante el dodecil sulfato de sodio (SDS), se probaron con diferentes sustancias, e.g. ácido bórico, tetraborato de sodio y dihidrógeno fosfato de sodio, en la solución *buffer*, y se observó la separación parcial de las cinco catequinas (**Figura 32**). En estas pruebas se utilizó una solución *buffer* con pH cercano o igual al pK_a de las catequinas, pues su forma neutra, favorece la separación al mejorar la interacción de los analitos con las micelas presentes en la solución *buffer*.

Figura 30. Electroforegramas de la mezcla de patrones de catequinas en modalidad de CZE.



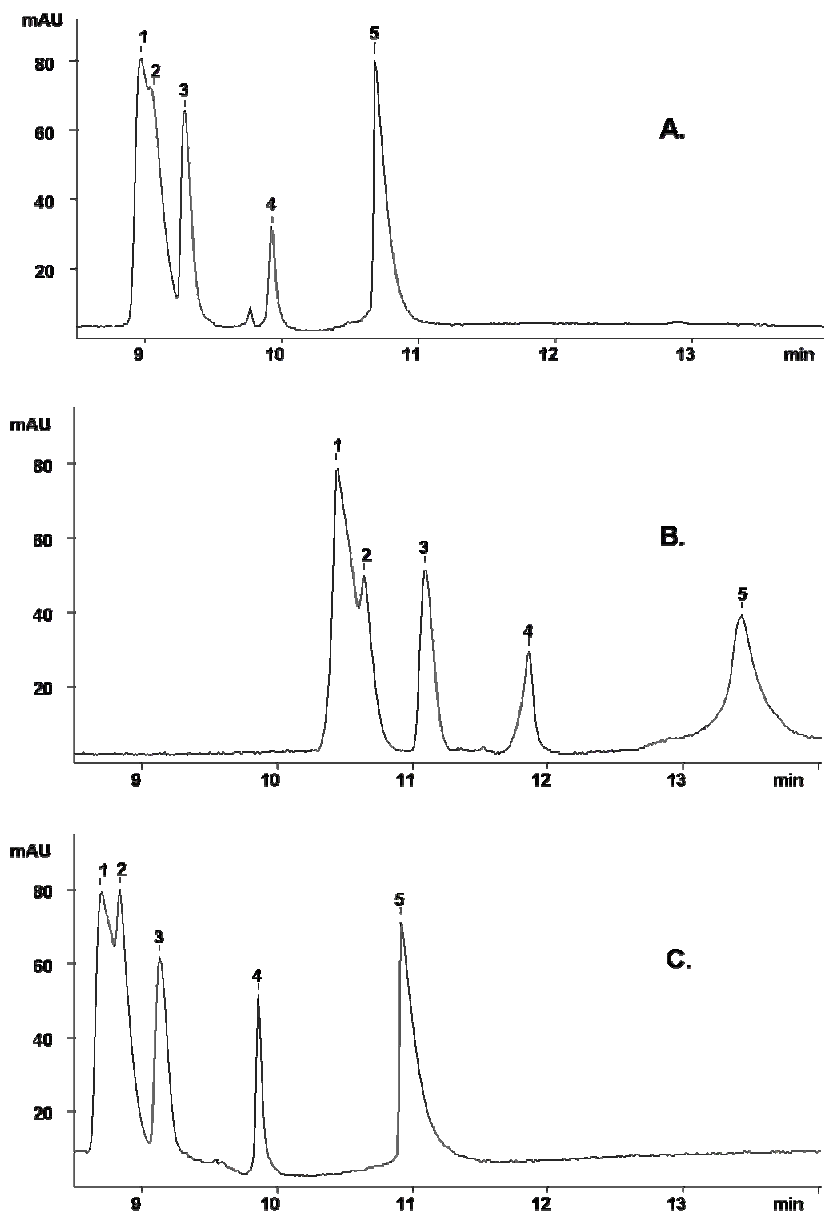
A. SB H_3BO_3 (100 mM), pH: 9.04 **B.** SB NaH_2PO_4 (100 mM), pH: 9.07.

- **Composición de la solución *buffer*.** Con base en la literatura [70,71], se probaron el tetraborato de sodio ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$), el dihidrogenofosfato de sodio (NaH_2PO_4) y el ácido bórico (H_3BO_3), junto con modificadores orgánicos (metanol y acetonitrilo), como componentes de la solución *buffer*.

Empleando cada una de las SB probadas, a igual valor de pH (8.24) y concentración de SDS, los electroforegramas presentan características diferentes. Así, como se observa en la **Figura 31**, la SB compuesta por tetraborato de sodio produce una resolución más baja entre los primeros picos registrados en el electroforegrama (1-2 y 2-3 de la **Figura 31**), mientras que en las dos SB, compuestas por NaH_2PO_4 y H_3BO_3 , respectivamente, mejoran la resolución entre los dos primeros picos (1-2) observados en la **Figura 31 B y 31 C**, y logran la separación completa entre las señales 2-3,

registradas en la **Figura 31**. Por tanto, se descartó el uso de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ en la preparación de la solución *buffer*.

Figura 31. Efecto de la composición de la solución *buffer* sobre la separación de catequinas por MEKC.

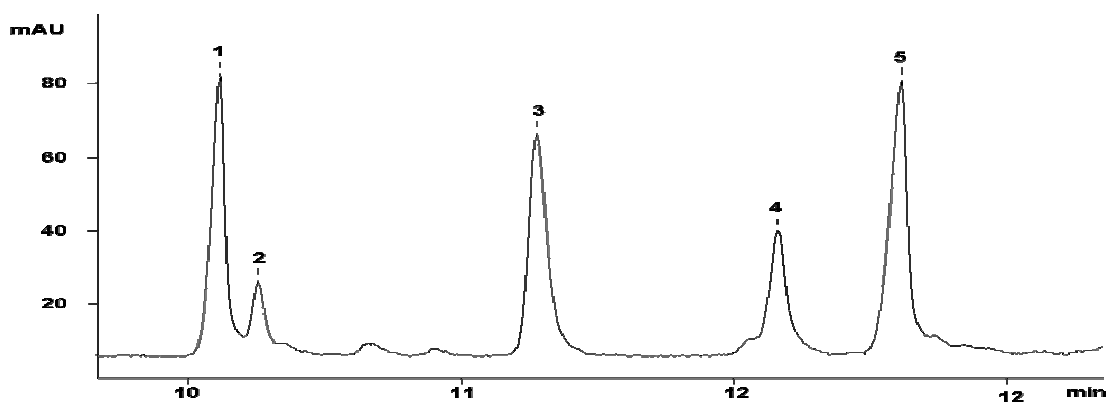


A. SB: $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ (25 mM), SDS (5 mM) pH: 8.24, **B.** SB: H_3BO_3 (25 mM), SDS (5 mM) pH: 8.24 y **C.** SB: NaH_2PO_4 (25 mM), SDS (5 mM) pH: 8.24.

Como se observa en la **Figura 31**, los electroforegramas a igual valor de pH (8.24) y concentración de SDS, empleando cada una de las SB probadas presentan características diferentes; así se observa que la SB compuesta por tetraborato de sodio presenta la menor resolución entre las señales 1-2 y 2-3, mientras que en las dos SB compuestas por NaH_2PO_4 y H_3BO_3 respectivamente, se observa mejor resolución entre las señales 1-2 y separación completa de los picos 2-3. También fue notable la disminución en los tiempos de análisis con la solución *buffer* compuesta por NaH_2PO_4 , en comparación con el H_3BO_3 .

Con los resultados obtenidos en las pruebas preliminares y el objetivo claro de lograr una adecuada separación de las catequinas bajo estudio, se procedió a evaluar una solución *buffer* compuesta por una mezcla de NaH_2PO_4 y H_3BO_3 . Como se observa en la **Figura 32**, el electroforegrama obtenido empleando esta mezcla, presentó para todos los picos, su resolución en menor tiempo de análisis. De tal forma, se decidió trabajar con una solución *buffer* compuesta por una mezcla de NaH_2PO_4 y H_3BO_3 .

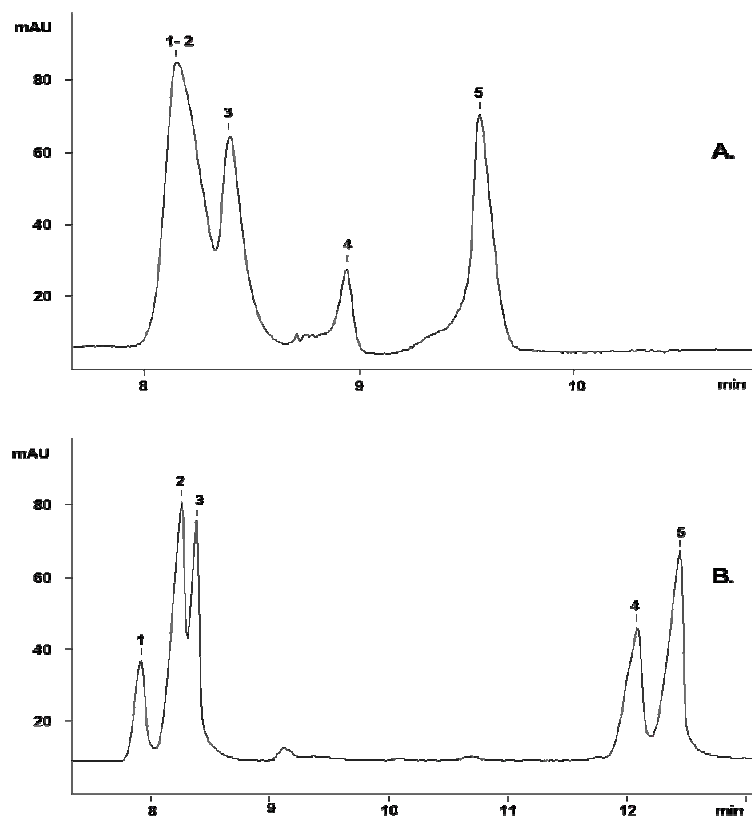
Figura 32. Electroforegrama de catequinas usando solución *buffer* con mezcla de NaH_2PO_4 (20 mM), H_3BO_3 (25 mM) y SDS (5 mM) pH: 8.23.



Por otra parte, la adición de modificadores orgánicos (metanol y acetonitrilo) a la mezcla de NaH_2PO_4 (20 mM), H_3BO_3 (25 mM) y SDS (5 mM) a pH 8.23,

aunque disminuyó el tiempo de análisis, generó una pérdida notable de la resolución; esto no se observa durante el análisis de la mezcla sin modificadores (Véase **Figura 33**). Por tanto, se descartó el uso de estas sustancias como modificadores.

Figura 33. Efecto de los modificadores orgánicos en la separación de catequinas por MEKC.



A. SB: NaH_2PO_4 (20 mM) H_3BO_3 (25 mM), SDS (5 mM) AcCN (5 %) pH: 8.23 y **B.** SB: NaH_2PO_4 (20 mM) H_3BO_3 (25 mM), SDS (5 mM) MeOH (5 %) pH: 8.23.

Teniendo en cuenta los resultados de las pruebas preliminares, se decidió evaluar el efecto de la concentración de SDS y H_3BO_3 , sobre la separación de las catequinas. De igual forma, se fijó la concentración mínima de NaH_2PO_4 , determinante para la separación de los analitos, con el fin de reducir la posible formación y precipitación de sales, entre el ión fosfato y el metanol dentro del capilar, que podrían obstruirlo.

4.2.2 Implementación de la metodología para CE. La variable de respuesta empleada para realizar el diseño de experimentos fue la resolución entre los picos 1 y 2 (**Figura 32**), debido a que éstos presentan menor resolución y son críticos para la evaluación del método. En la **Tabla 20** se muestran los resultados del diseño experimental factorial multinivel.

Tabla 20. Resultados del diseño experimental factorial multinivel para el análisis de catequinas, por CE.

Experimento	Variables (mM)		Rs 1 y 2	Rs 1 y 2 según el modelo
	[H ₃ BO ₃]	[SDS]		
1	45	100	0,67	0,7158
2	45	80	1,83	2,0333
3	35	100	2	1,7566
4	35	80	3,07	3,0668
5	45	60	0,65	0,4208
6	35	60	0,9	1,2466
7	25	60	0,77	0,6725
8	25	80	2,6	2,5000
9	25	100	1,2	1,3975

En la **Tabla 21** se observan los coeficientes de la ecuación de regresión del modelo generado.

Tabla 21. Coeficientes de la ecuación de regresión del modelo del diseño experimental para CE.

Variable	Coefficiente
	Picos 1 y 2
A: [SDS] mM	-0,23333
B: [H ₃ BO ₃] mM	0,2555
AA	0,07
BB	-1,465
AB	-0,1075
Constante	2,9666

Por consiguiente, la ecuación del modelo ajustado es:

$$Rs_{1-2} = 2,9666 - 0,23333A + 0,2555B + 0,07A^2 - 0,1075AB - 1,465 B^2$$

De acuerdo con los resultados del diseño experimental, las condiciones con las que se obtiene la resolución más alta se muestran en la **Tabla 22**.

Tabla 22. Metodología propuesta para el análisis y la cuantificación de catequinas por CE.

Parámetro	Especificaciones
Composición SB	H ₃ BO ₃ 35 mM
	NaH ₂ PO ₄ 20 mM
	SDS 80 mM
pH de la SB	8.24 ± 0.01
Voltaje de análisis	20 kV
Tiempo de inyección	10 s
Modo de inyección	Hidrodinámica, 30 mBar
Temperatura de análisis	20 °C
Tiempo de análisis	14 min
Longitud de onda del detector	210 nm

En la **Figura 34** se muestra un electroforegrama obtenido bajo las condiciones especificadas en la **Tabla 22** para la separación de las catequinas bajo estudio. Con la metodología implementada, se calculó el valor de resolución para los picos 1 y 2; y el valor predicho por el modelo, *i.e.* 3,0681 y 2,9666, respectivamente; se encontró, que el error entre estos valores fue menor del 3 % (**Figura 34**). Además, se procedió a determinar el tiempo de migración de cada una de las catequinas (**Tabla 23**).

Figura 34. Electroforegrama de las catequinas: (\pm)-C, (-)-EC, (-)-EGC, (-)-ECG y (-)-EGCG.

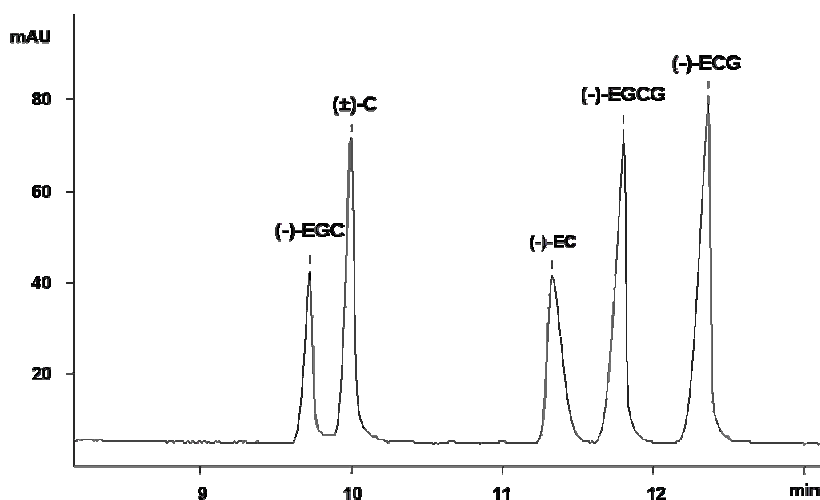


Tabla 23. Tiempo de migración de las catequinas, analizadas por CE.

Catequina	t_M (min)
(-)-Epigalocatequina	9,71 \pm 0.09
(\pm)-Catequina	10.0 \pm 0.2
(-)-Epicatequina	11,4 \pm 0.8
(-)-Epigalocatequina galato	11,7 \pm 0.8
(-)-Epicatequina galato	12,3 \pm 0.9

De acuerdo con los datos reportados en la **Tabla 23**, la movilidad electroforética de cada catequina es influenciada principalmente por dos factores, a saber, peso molecular e interacciones analito-micelas. Para las cinco catequinas bajo estudio, el peso molecular es el factor determinante en el orden de elución. A mayor peso molecular, menor movilidad de los analitos en el capilar y, por tanto, aumenta el tiempo necesario para su llegada al detector, hecho que explica por qué la (-)-ECG y la (-)-EGCG tienen los mayores tiempos de migración.

Sin embargo, este factor, por sí solo, no explica el orden de elución de todas las catequinas, motivo por el cual deben considerarse las interacciones analito-micelas. Los grupos hidroxilo favorecen la solubilidad en el agua, reduciendo la posibilidad de interacciones con las micelas. Al reducir las interacciones disminuye la velocidad electroforética de los analitos, de modo que, aquellas con mayor número de grupos hidroxilo tendrán tiempos de migración más cortos. La interacción de los grupos hidroxilo con las micelas afecta los tiempos de salida de (-)-EGC y (-)-EGCG en comparación con las (±)-C, y (-)-ECG, respectivamente. Para cada par de señales se observa que la primera en aparecer es aquella catequina con mayor número de grupos hidroxilo, (-)-EGC y (-)-EGCG.

Para el caso de la (±)-C y la (-)-EC, aunque no existe la diferencia de sus pesos moleculares y el número de grupos hidroxilo es el mismo, al ser estos epímeros por el grupo hidroxilo en posición 3, la disposición de este grupo en la molécula determina su grado de polaridad y, de esta manera, el orden de elución. La (-)-EC, por tener el grupo hidroxilo en configuración *cis*- respecto al anillo B, genera una interacción *orto*-, que ocasiona la disminución de polaridad de esta molécula; hecho que no ocurre con la (±)-C. Por tanto, la (±)-C tendrá mayor posibilidad de interactuar con el agua y así su tiempo de migración en el capilar se disminuye.

4.2.3 Figuras analíticas de mérito para CE.

- **Evaluación de la repetibilidad de tiempos de migración (t_M) y de áreas.** La repetibilidad del método se evaluó inyectando una mezcla de las catequinas bajo estudio, de concentración conocida (80 ppm), cinco veces. Los resultados para la evaluación del método, en cuanto a t_M y área corregida, se observan en las **Tablas 24** y **25**, respectivamente.

Tabla 24. Repetibilidad de t_M de las catequinas por CE.

Catequina	Tiempo de retención, min		<X>	S	CV, %	r	
(-)-EGC	9,72	9,64	9,72	9,71	0,09	0,97	0,37
	9,62	9,86					
(±)-C	10,0	10,0	9,9	10,0	0,2	1,9	0,7
	9,9	10,3					
(-)-EC	11,3	11,0	11,7	11,4	0,3	2,8	1,3
	11,3	11,8					
(-)-EGCG	11,6	11,7	11,4	11,7	0,3	2,1	1,0
	12,1	11,8					
(-)-ECG	12,2	12,2	12,3	12,3	0,3	2,0	1,0
	12,7	12,1					

Tabla 25. Repetibilidad de áreas de las catequinas por CE.

Catequina	Área, mAU*s		<X>	S	CV, %	r	
(-)-EGC	55	53	55	53	2	3,3	7,0
	51	53					
(±)-C	92,2	91,8	93,1	92,7	0,7	0,9	3,1
	82,4	93,8					
(-)-EC	77	75	77	80	2	2,4	8
	71	82					
(-)-EGCG	81	97	100	87	2	2,3	8
	87	86					
(-)-ECG	115	112	117	116	2	2,1	9,4
	107	100					

La precisión del método expresada como los coeficientes de variación calculados tanto para t_M como para las áreas corregidas de cada una de las catequinas, se encuentran dentro de los recomendados por las buenas prácticas de laboratorio: 2% para t_M y 10% para áreas.

- **Evaluación de la linealidad y la sensibilidad del método.** A continuación, en la **Tabla 26**, se muestran los resultados de la ecuación de la curva de calibración para cada una de las catequinas en estudio (**Anexo 3**).

Tabla 26. Linealidad y la sensibilidad del método por CE.

Catequina	Ecuación	R²	b	Sb	b ± tSb
(-)-EGC	$y = 0,972 x$	0,9993	0,972	0,006	$0,972 \pm 0,018$
(±)-C	$y = 1,14 x$	0,9987	1,14	0,01	$1,14 \pm 0,03$
(-)-EC	$y = 1,20 x$	0,9975	1,2	0,02	$1,20 \pm 0,04$
(-)-EGCG	$y = 0,693 x$	0,9991	0,693	0,005	$0,693 \pm 0,014$
(-)-ECG	$y = 1,47 x$	0,999	1,47	0,01	$1,47 \pm 0,033$

El coeficiente de determinación de las curvas de calibración para las catequinas estuvo entre 0,9975 y 0,9991, mostrando que bajo el rango de concentraciones evaluadas, es decir, 0,5 - 64 ppm, el método es lineal. Los valores de la desviación estándar de la pendiente entre 0,0066 y 0,012 indican la precisión del método. Por tanto, se puede concluir que el método es aplicable bajo el rango de concentraciones evaluado.

- **Determinación de los límites de detección y cuantificación de cada una de las catequinas en estudio.** Los límites de detección y cuantificación de cada catequina, empleando el método de análisis descrito en la **sección 4.2.2**, se reportan en la **Tabla 27**.

Tabla 27. Límites de detección y cuantificación por CE para (±)-C, (-)-EC, (-)-EGC, (-)-ECG y (-)-EGCG.

Catequina	Ecuación	R ²	b	Sy/x	LOD (ppm)	LOQ (ppm)
(-)-EGC	y = 0,972 x	0,9993	0,972	0,0066	1,37	2,75
(±)-C	y = 1,14 x	0,9987	1,14	0,010	1,81	3,62
(-)-EC	y = 1,20 x	0,9975	1,2	0,015	2,55	5,10
(-)-EGCG	y = 0,693 x	0,9991	0,693	0,0051	1,48	2,96
(-)-ECG	y = 1,47 x	0,999	1,47	0,012	2,96	3,22

- **Evaluación de la reproducibilidad de tiempos de migración (t_M) y áreas.** Para evaluar la reproducibilidad del método se tomaron cuatro muestras representativas de té verde. A cada una de las muestras se les realizó el proceso de extracción detallado en la **Sección 3.5**, y de análisis de catequinas, por CE. Los resultados obtenidos para t_M y áreas corregidas se muestran en las **Tablas 28 y 29**.

Los coeficientes de variación de las áreas corregidas y los tiempos de migración no superan el 5.6 y 1.2 %, respectivamente, valores aceptados por las Buenas Prácticas de Laboratorio y, por consiguiente, se puede concluir que el método CE es reproducible.

Tabla 28. Reproducibilidad del método para t_M de las catequinas extraídas de té verde, por CE.

Analito	Tiempo (min)				<X>	S	CV, %	r
	M1	M2	M3	M4				
(-)-EGC	10,3	10,3	10,1	10,4	10,3	0,1	1,1	0,43
(±)-C	10,7	10,5	10,7	10,5	10,6	0,1	1,1	0,46
(-)-EC	11,5	11,6	11,8	11,5	11,6	0,1	1,2	0,56
(-)-EGCG	11,8	11,9	11,9	11,8	11,90	0,06	0,46	0,22
(-)-ECG	12,2	12,1	12,0	12,1	12,10	0,08	0,65	0,31

Tabla 29. Reproducibilidad de áreas, por CE, de las catequinas extraídas de té verde.

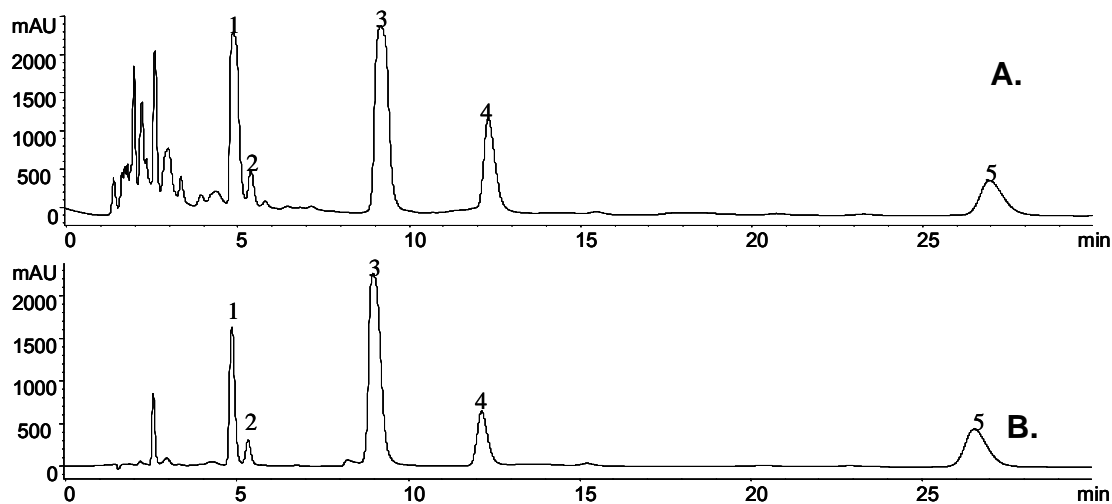
Analito	Áreas corregidas (mAU*s/min)				<X>	S	CV, %	r
	M1	M2	M3	M4				
(-)-EGC	91	94	99	97	95	3	3,7	13,7
(±)-C	7,9	6,9	7,3	7,4	7,4	0,4	5,6	1,6
(-)-EC	68	65	74	70	69	4	5,5	14,8
(-)-EGCG	221	228	232	241	230	8	3,6	32,7
(-)-ECG	101	105	109	103	105	4	3,6	14,8

Aunque los tiempos de migración para las cuatro muestras de té son reproducibles entre sí, éstos se encuentran desplazados con respecto a los estándares de catequinas. Por tanto, para la reproducibilidad y la cuantificación, fue necesario enriquecer la muestra con estándares de catequinas en cantidades conocidas y, por diferencia de áreas, asignar a cada señal su respectiva identidad.

4.3 EXTRACCIÓN DE CATEQUINAS.

En la extracción de catequinas en medio acuoso, además de estar presentes las cinco catequinas bajo estudio, se observaron impurezas que interfieren en su cuantificación (**Figura 35 a**). Por esta razón, para eliminar la presencia de cafeína y compuestos coloreados presentes en el extracto, se siguió la metodología de limpieza propuesta por Row y Jin [83], que utilizaron cloroformo y acetato de etilo (**Figura 35 b**).

Figura 35. Perfil cromatográfico de catequinas extraídas de té verde usando diferentes medios de extracción, obtenido por HPLC-DAD-UV-Vis columna apolar ZORBAX Eclipse XDB-C18.



Fase móvil: Metanol, 20 %: agua:ácido acético 100:0.1), 80%. **A.** Extracción con agua.

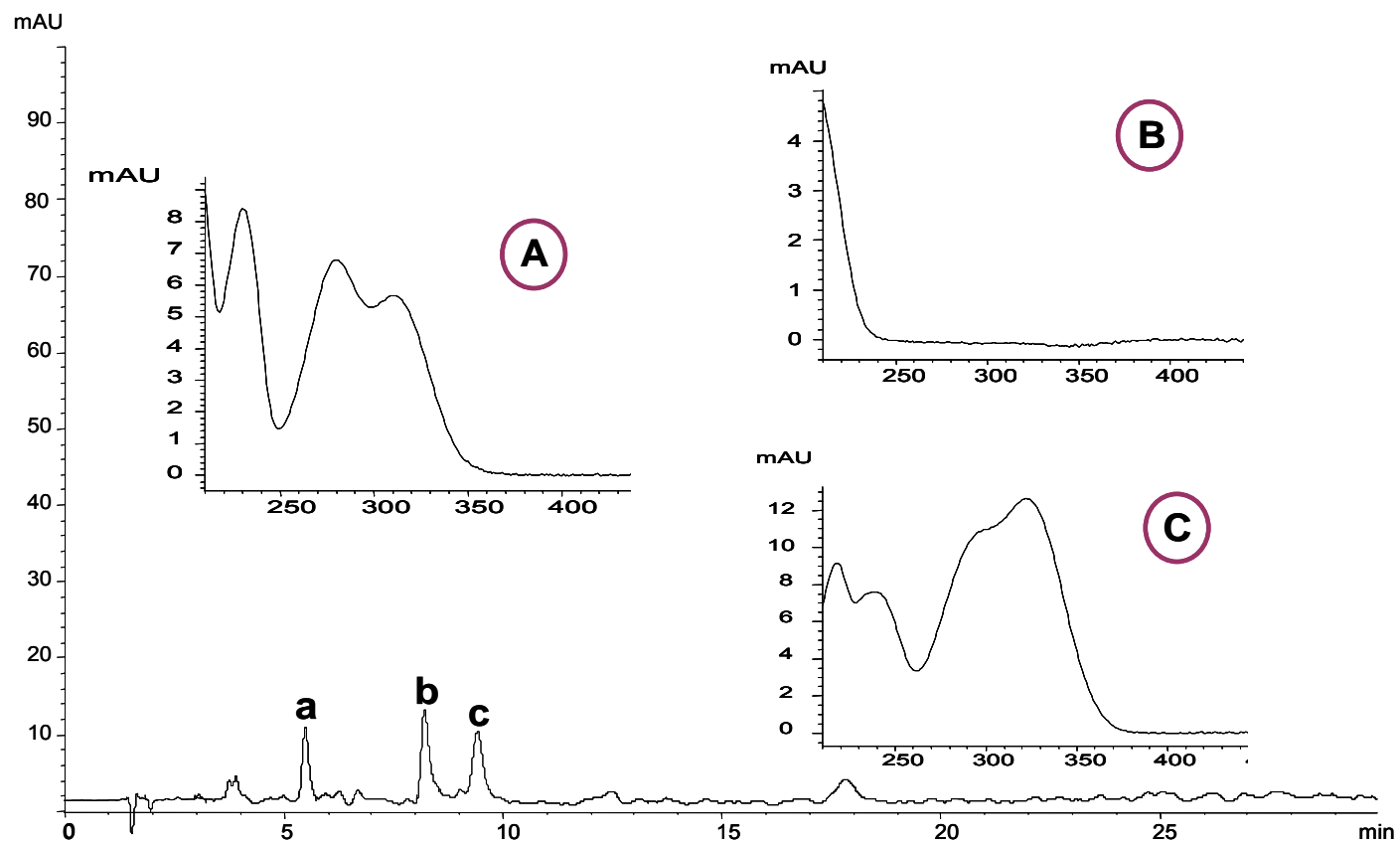
B. Extracción con agua, cloroformo y acetato de etilo. 1. (-)-EGC, 2. (±)-C, 3. (-)-EGCG, 4. (-)-EC y 5. (-)-ECG.

4.3.1 Extracción exhaustiva. Se repitió el procedimiento de extracción descrito en la **Sección 3.5**, analizando en el equipo HPLC cada uno de los extractos obtenidos, hasta lograr las cantidades de catequinas por debajo del límite de detección del método. Al observar los extractos obtenidos, se concluyó que para una muestra de 100 mg de té verde y cacao, es necesario hacer 5 y 3 extracciones, respectivamente, con porciones de agua de 10 mL. (**Anexos 4 y 5**).

4.4 CUANTIFICACIÓN DE CATEQUINAS.

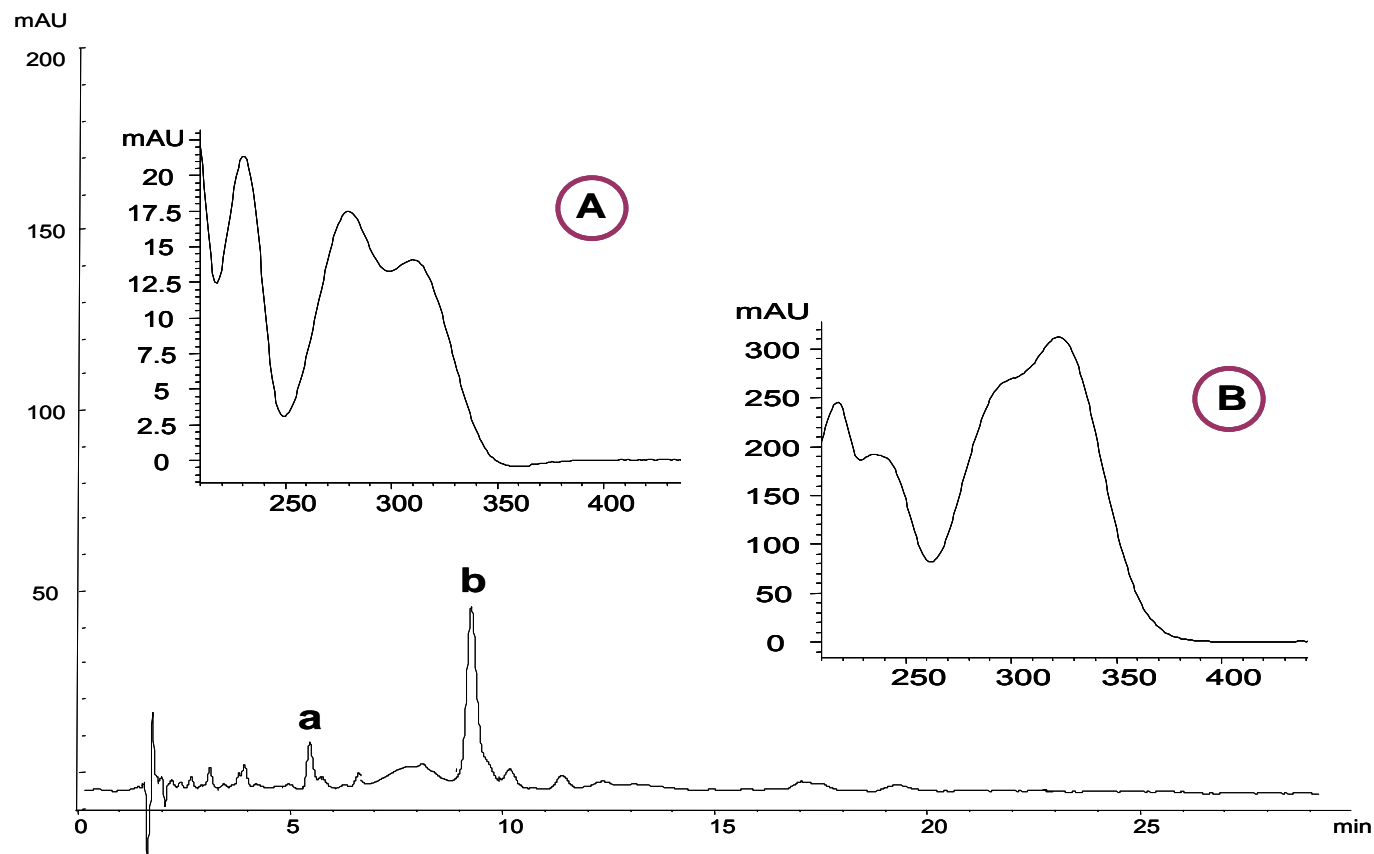
4.4.1 Cuantificación de catequinas empleando HPLC. Los perfiles cromatográficos para *Salvia aratocensis* y *Origanum vulgare* L. se muestran en las **Figuras 36 y 37**, respectivamente.

Figura 36. Perfil cromatográfico de catequinas extraídas de *Salvia aratocensis*, obtenido por HPLC-DAD-UV-Vis en la columna apolar ZORBAX Eclipse XDB-C18.



Fase móvil: Metanol, 18 %: agua:ácido acético (100:0.1), 82%. **A.** Espectro UV del pico cromatográfico a, **B.** Espectro UV del pico cromatográfico b, **C.** Espectro UV del pico cromatográfico c.

Figura 37. Perfil cromatográfico de catequinas extraídas de *Origanum vulgare* L., obtenido por HPLC-DAD-UV-Vis en la columna apolar ZORBAX Eclipse XDB-C18.



Fase móvil: Metanol, 18 %: agua:ácido acético (100:0.1), 82%. **A.** Espectro UV del pico cromatográfico a, **B.** Espectro UV del pico cromatográfico b.

En las **Figuras 36** y **37** se observaron dos señales que coinciden con los tiempos de retención de dos de las catequinas bajo estudio: (±)-catequina y (-)-epigallocatequina galato. Dado que el detector de arreglo de diodos permite obtener el espectro ultravioleta de cada una de la señales y la pureza del pico, se procedió a comparar, para cada planta, los espectros UV de las señales con los de los materiales de referencia certificados de (±)-C y (-)-EGCG (**Figuras 38** y **39**).

Se observó que los picos presentes en los cromatogramas de *Salvia aratocensis* y *Origanum vulgare* L., pueden corresponder a (±)-catequina y de (-)-epigallocatequina galato, puesto que tienen similares tiempos de retención (**Figuras 38** y **39**). Las dos señales analizadas tienen espectros ultravioleta característicos de los flavonoides, particularmente de ácidos fenólicos que exhiben señales de absorción a 230, 290 y 320 nm.

Figura 38. Espectros ultravioleta de las señales presentes en el perfil cromatográfico de extracto de *Salvia aratocensis* (**Figura 36**) y de los estándares de (±)-catequina y de (-)-epigallocatequina galato.

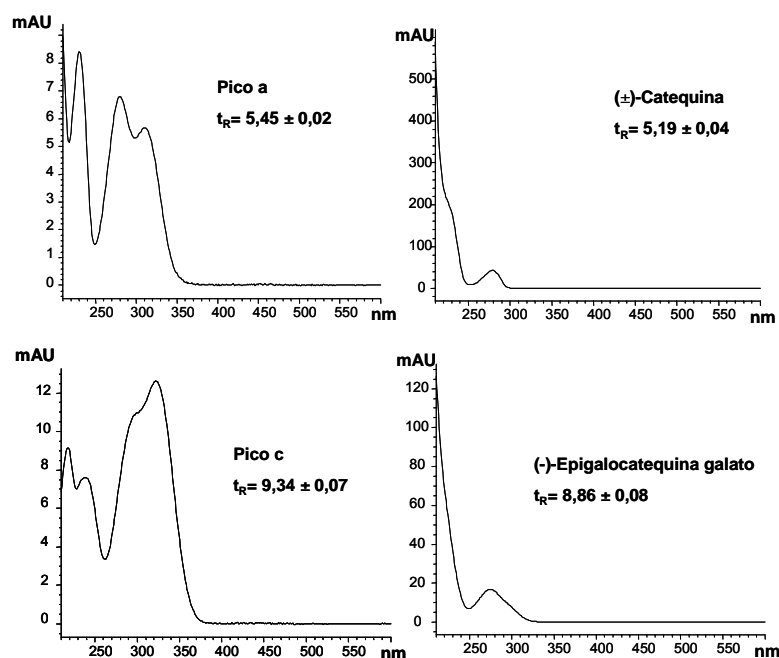
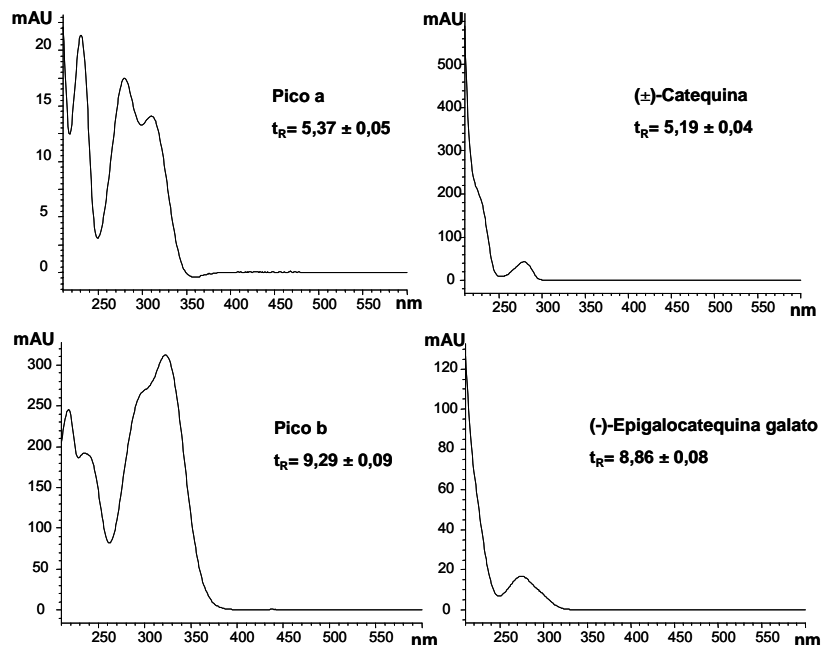


Figura 39. Espectros ultravioleta de las señales presentes en el perfil cromatográfico de extracto de *Origanum vulgare* L. (**Figura 37**) y de los estándares de (±)-catequina y de (-)-epigallocatequina galato.



En las **Figuras 38** y **39** se aprecia la diferencia de los espectros UV, lo que significa que las señales presentes no corresponden a las catequinas bajo estudio. Además, se verificó la pureza del pico utilizando la opción *Purity Peak* del *Software Agilent ChemStation LC 3D*, la cual reportó que los espectros de las señales analizadas presentaban una pureza aceptable, descartando así una posible coelución.

En vista de que no se detectó (±)-C, (-)-EC, (-)-EGC, (-)-ECG y (-)-EGCG, por encima del límite de detección, en las plantas bajo estudio y con el propósito de cumplir a cabalidad los objetivos de la investigación, se decidió realizar la cuantificación de las catequinas en matrices previamente estudiadas, a saber, *Camellia sinensis* y *Theobroma cacao*.

Los perfiles cromatográficos para *Camellia sinensis* y *Theobroma cacao* se observan en las **Figuras 40** y **41**, respectivamente.

Figura 40. Perfil cromatográfico de catequinas extraídas de té verde, obtenido por HPLC-DAD-UV-Vis en la columna apolar ZORBAX Eclipse XDB-C18 y los espectros UV de cada compuesto.

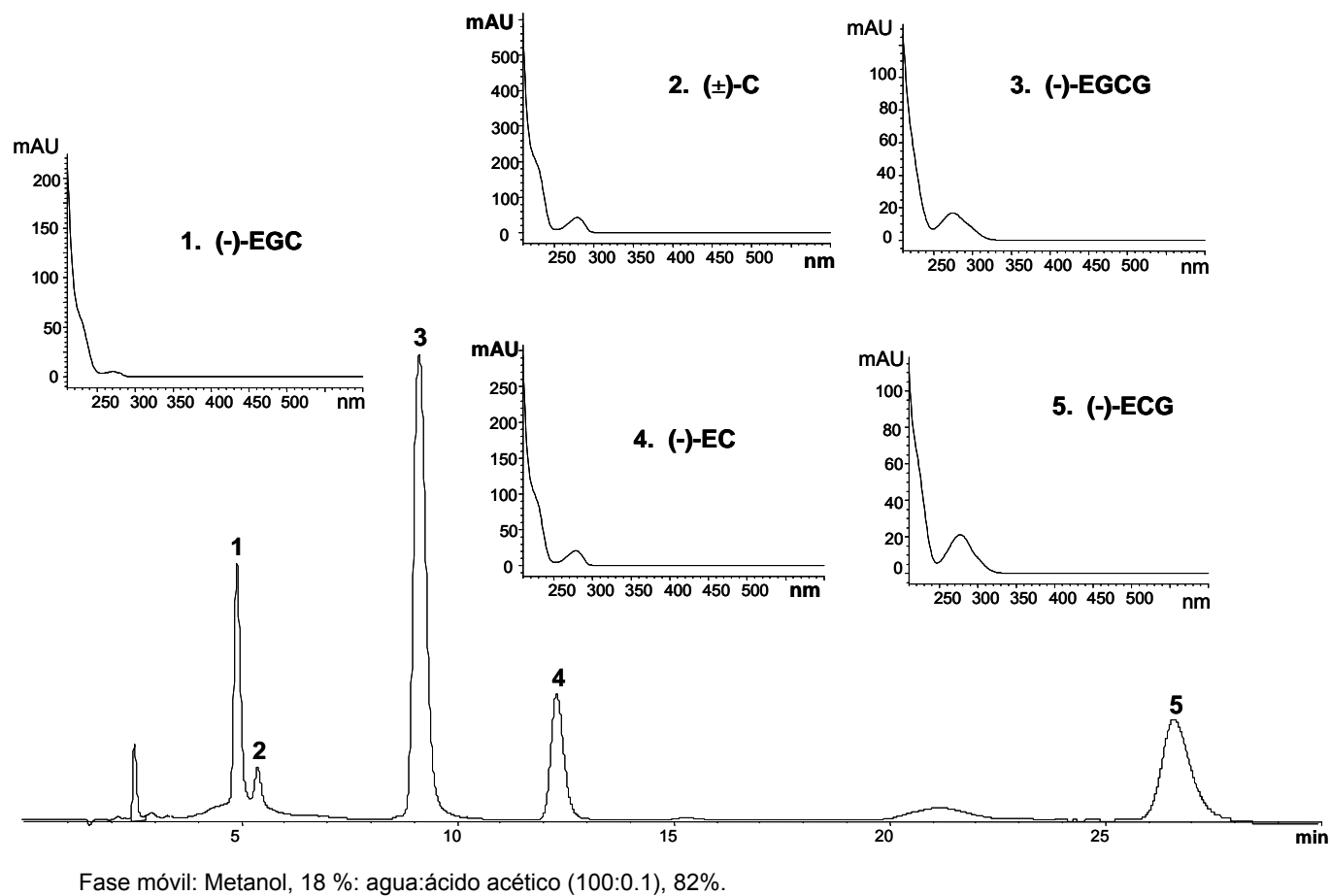
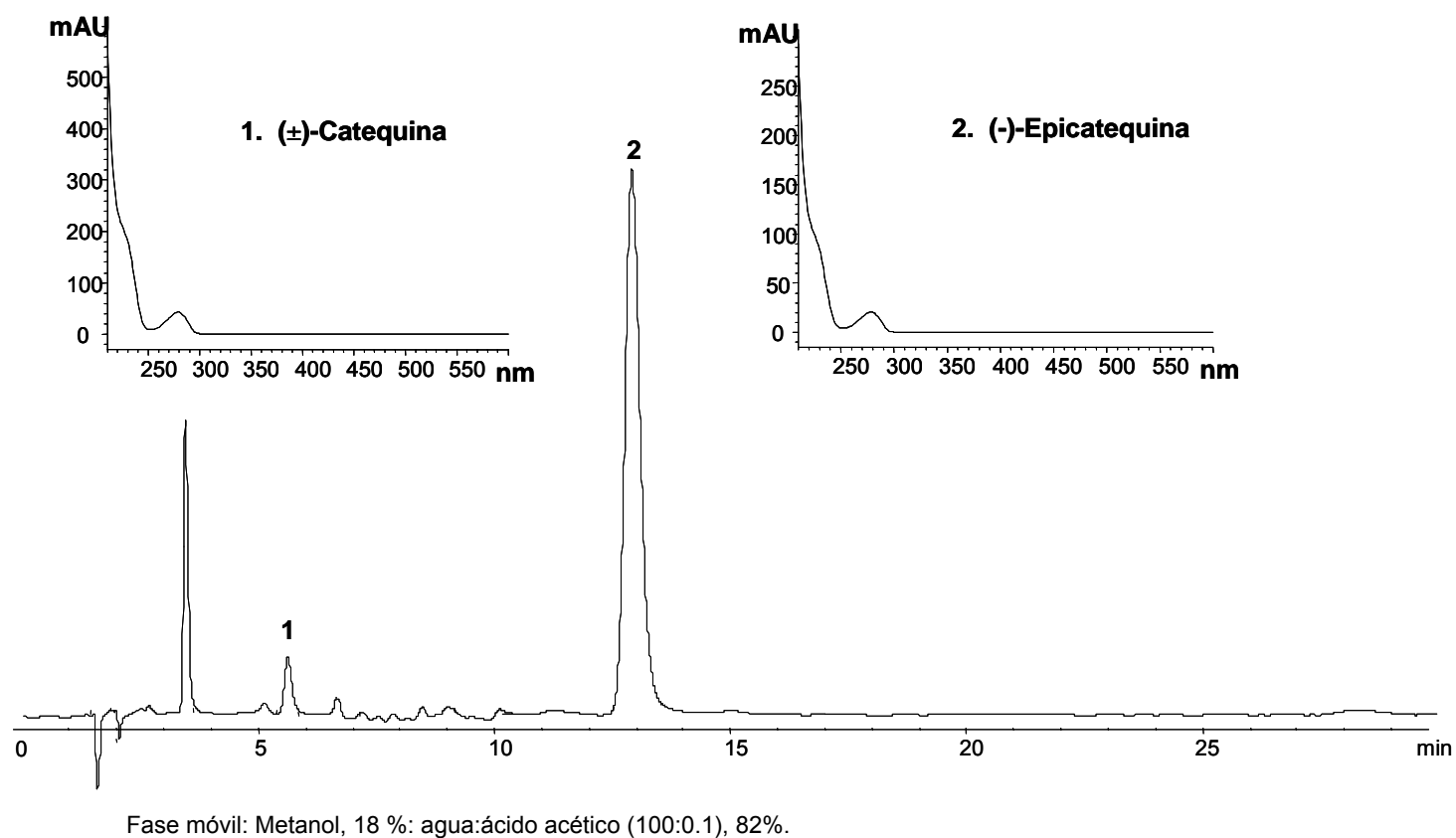


Figura 41. Perfil cromatográfico de catequinas extraídas de cacao, obtenido por HPLC-DAD-UV-Vis en la columna apolar ZORBAX Eclipse XDB-C18 y los espectros UV de cada compuesto.



Los resultados obtenidos para *Camellia sinensis* y *Theobroma cacao* se muestran en la **Tabla 30**.

Tabla 30. Cuantificación de (±)-C, (-)-EC, (-)-EGC, (-)-ECG y (-)-EGCG en los extractos de té verde y cacao, por HPLC.

CATEQUINA	Contenido de catequinas, mg de Catequina/g de planta	
	Té verde	Cacao
(-)-EGC	16,4 ± 0,2	ND ^a
(±)-C	1,01 ± 0,03	4,370 ± 0,005
(-)-EGCG	34 ± 2	ND
(-)-EC	6,86 ± 0,06	7,23 ± 0,08
(-)-ECG	7,54 ± 0,08	ND

^a ND: No detectado.

En el extracto de té verde analizado se detectaron en orden descendente de su cantidad, las cinco catequinas bajo estudio, a saber, (-)-EGCG > (-)-EGC > (-)-ECG > (-)-EC > (±)-C. En general, la mayoría de las publicaciones que contienen la cuantificación de catequinas en té verde, reportan este mismo orden de elusión y contenido de catequinas de diversos tipos de té verde. Las diferencias entre las publicaciones se observan en los mg de analito/g de planta, hecho que está influenciado por el tipo de té verde y los procesos de manufactura a los que se somete éste antes de su comercialización [13, 86, 87, 88, 89].

En la variedad de cacao estudiado, se encontró en mayor cantidad (-)-EC, seguida de (±)-C. En el caso de *Theobroma cacao*, los autores reportan la presencia de (±)-catequina y (-)-epicatequina. En gran parte de las publicaciones, el mayor porcentaje corresponde a la (-)-epicatequina, aunque en algunos casos, la (±)-catequina es la que se encuentra en mayor

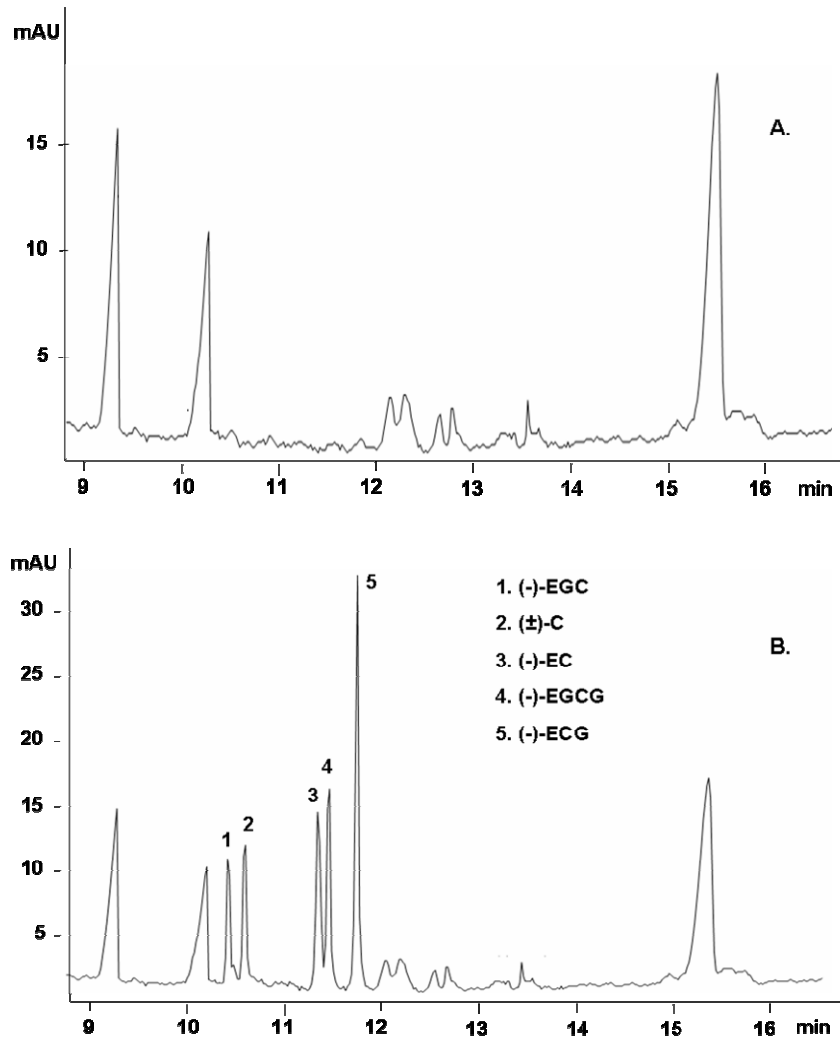
proporción [89]. Las cantidades de catequina en el cacao difieren significativamente como consecuencia de los periodos de fermentación a los cuales es sometido: a mayor tiempo de fermentación, menor es la cantidad de catequinas presentes.

4.4.2 Cuantificación de catequinas empleando CE. Aplicando la metodología desarrollada para CE (**Sección 4.2.2**) y la metodología de extracción descrita en la **Sección 4.3**, se procedió a la cuantificación de las catequinas: (\pm)-catequina, (-)-epicatequina, (-)-epigallocatequina, (-)-epigallocatequina y (-)-epigallocatequina galato en las muestras de *Origanum vulgare* L. y *Salvia aratocensis*, mediante la técnica de patrón externo.

En los electroforegramas de los extractos de *Origanum vulgare* L. y *Salvia aratocensis*, se observó la presencia de picos que no correspondían a los tiempos de migración de los patrones certificados de catequinas. Dado que el detector UV empleado sólo permite tener como criterio de identificación la comparación de tiempos de migración con el material de referencia certificado, para corroborar la identidad de cada catequina en las muestras, se procedió a enriquecer cada una con patrón en concentraciones conocidas de cada catequina y, mediante la diferencia de áreas observadas, realizar la respectiva identificación (**Figuras 42 y 43**).

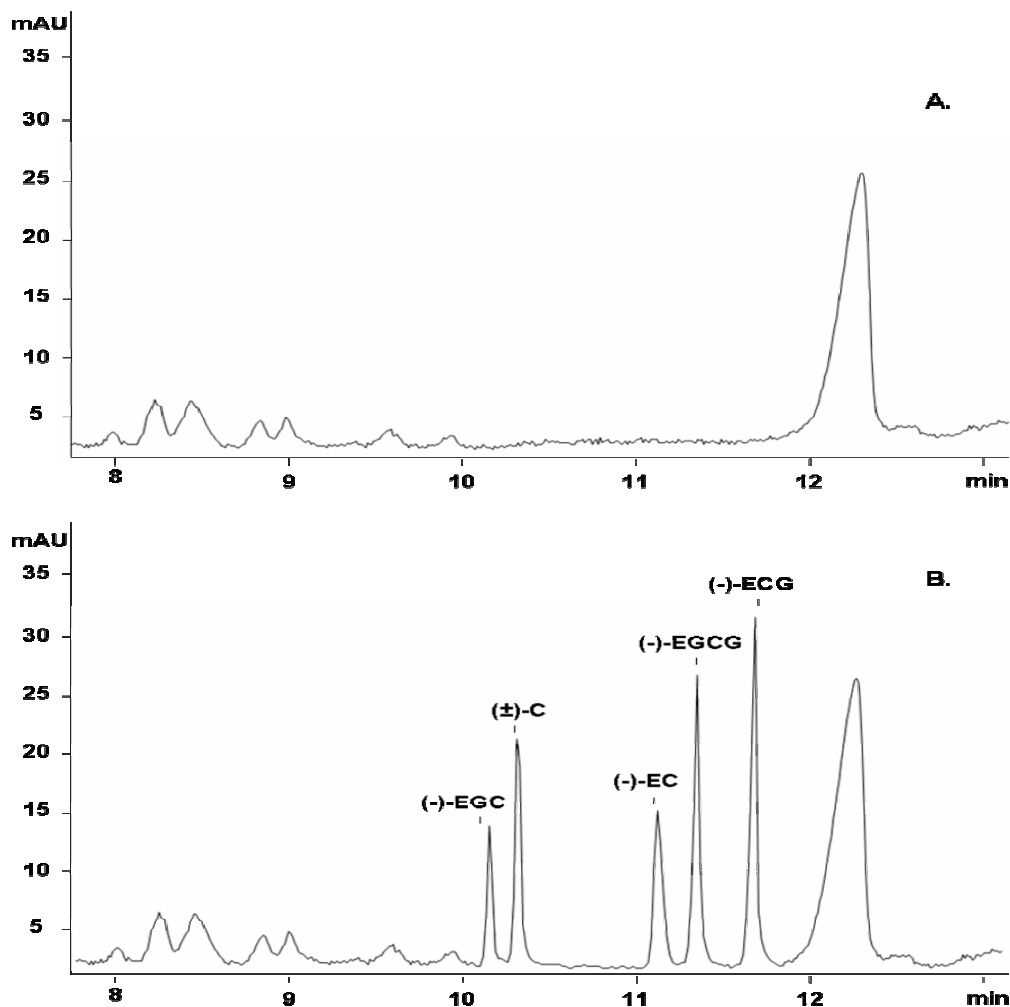
Mediante el enriquecimiento de las muestras con (\pm)-C, (-)-EC, (-)-EGC, (-)-ECG y (-)-EGCG, bajo las condiciones de trabajo reportadas, se pudo descartar la presencia de dichas sustancias en las especies estudiadas de la familia Labiaceae, lo que coincidió con los resultados obtenidos por HPLC.

Figura 42. Electroforegramas de los extractos de *Salvia aratocensis* y del extracto enriquecido.



A. Extracto de *Salvia aratocensis*. **B.** Extracto de *Salvia aratocensis* enriquecido con catequinas patrón en concentración determinada.

Figura 43. Electroforegramas del extracto de *Origanum vulgare* L. y del extracto enriquecido.



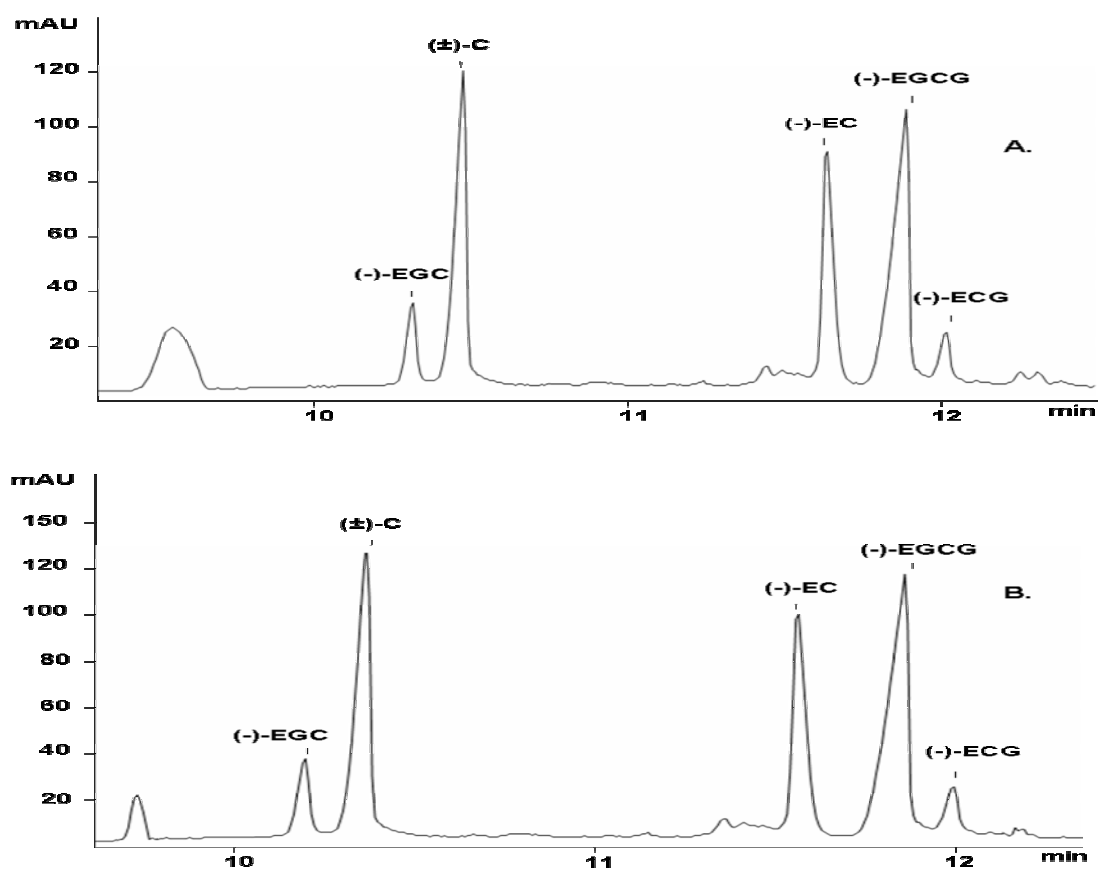
A. Extracto de *Origanum vulgare*. **B.** Extracto de *Origanum vulgare* enriquecida con catequinas patrón en concentraciones determinadas.

Aunque ninguna de las catequinas bajo estudio fue detectada por encima del límite de detección, en los extractos acuosos de *Origanum vulgare* L. y de *Salvia aratocensis*, el tipo de extracción empleado y la naturaleza de las catequinas analizadas permiten suponer que las señales observadas en los electroforegramas de las dos especies de plantas pueden corresponder a flavonoides y/o compuestos fenólicos en general; se puede sugerir que la

metodología implementada por CE podría ser útil para el análisis de otros compuestos de propiedades fisicoquímicas similares a las catequinas presentes en matrices vegetales.

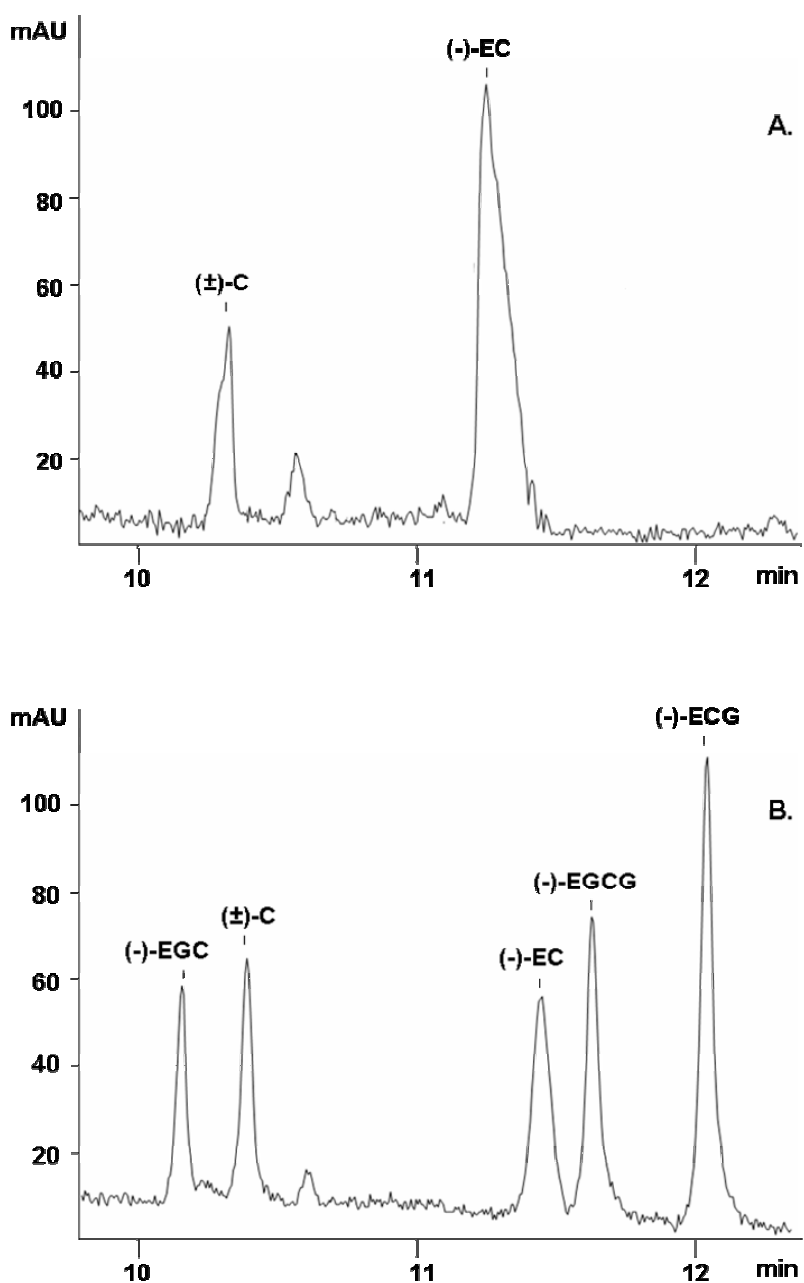
De igual forma, que para HPLC, se llevó a cabo la cuantificación de catequinas en té verde comercial (*Camellia sinensis*) y *Theobroma cacao*. En las **Figuras 44** y **45**, se muestran los electroforeogramas de los extractos acuosos de estas plantas.

Figura 44. Electroforeogramas de extracto de té verde comercial (*Camellia sinensis*).



A. Extracto de té verde. **B.** Extracto de té verde enriquecido catequinas patrón en concentraciones determinadas.

Figura 45. Electroforegramas de extracto de *Theobroma cacao*.



A. Extracto de *Theobroma cacao*. B. Extracto de *Theobroma cacao* enriquecido con catequinas en determinadas concentraciones.

Los resultados obtenidos para té verde y *Theobroma cacao* se muestran en la **Tabla 31**.

Tabla 31. Cuantificación de (±)-C, (-)-EC, (-)-EGC, (-)-ECG y (-)-EGCG en extractos de té verde (*Camellia sinensis*) y *Theobroma cacao*, por CE.

CATEQUINA	Contenido de catequinas (mg de Catequina/g de planta)	
	Té verde	Cacao
(-)-EGC	17,1 ± 0,29	N.D. ^a
(±)-C	0,64 ± 0,065	3,907± 0,002
(-)-EC	5,7 ± 0,3	6,2 ± 0,35
(-)-EGCG	33,6 ± 0,3	N.D.
(-)-ECG	6,29 ± 0,021	N.D.

^a ND: No detectado.

Al igual que en HPLC, se detectaron en el té verde las cinco catequinas bajo estudio, a saber, (-)-EGCG > (-)-EGC > (-)-ECG > (-)-EC > (±)-C. Para el caso del cacao, se reportó la presencia de (-)-EC y (±)-C, conservando también la misma proporción hallada por cromatografía líquida. Estos resultados son favorables debido a la similitud con los resultados de cuantificación para té verde y cacao por CE y HPLC, hecho que se esperaba al analizar la misma muestra.

4.5 ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS METODOLOGÍAS DE ANÁLISIS DE CATEQUINAS POR HPLC Y CE.

Entre las técnicas empleadas para el análisis de catequinas en diferentes matrices se destacan HPLC y CE. Aunque ambas técnicas son efectivas, existen marcadas diferencias debido a la instrumentación empleada y los principios que rigen la separación [65, 67]. La comparación entre estas técnicas, en cuanto a su sensibilidad, la disponibilidad de recursos y el tiempo, resulta útil para establecer ventajas y desventajas en el análisis de catequinas. Las diferencias halladas entre HPLC y CE para determinar catequinas en matrices vegetales, se analizaron con base en las figuras

analíticas de mérito. A continuación, se hace el respectivo análisis de cada una de las figuras analíticas de mérito, determinadas para cada uno de los métodos.

4.5.1 Figuras analíticas de mérito.

- Límites de detección y cuantificación.** Los límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) fueron más bajos para HPLC (**Tabla 32**), excepto para la (-)-ECG; 1,84 mg/L y 3,68 mg/L, respectivamente. El menor LOD (1,37 mg/L) y LOQ por CE, fue para (-)-EGC, mientras en HPLC fue para (±)-C (LOD 0,46 mg/L). En general, por CE tanto el LOD como el LOQ obtenidos, son más del doble de los encontrados para HPLC, lo cual coincide con lo reportado por Vanhoenacker *et al.* [74], para el análisis de catequinas en té. No obstante, autores como Pelillo *et al.* [76], reportan límites de detección hasta 20 veces mayores, obtenidos por CE. Estos resultados dejan en evidencia las grandes variaciones que pueden presentarse en el análisis, según la metodología y el equipo empleado.

Tabla 32. Límites de detección y cuantificación de HPLC y CE de las catequinas analizadas.

Límites de detección y cuantificación, mg/L				
Catequina	LOD		LOQ	
	HPLC	CE	HPLC	CE
(-)-EGC	0,50	1.37	1,00	2.75
(±)-C	0,46	1.81	0,92	3,6
(-)-EGCG	0,56	1.48	1,12	2.96
(-)-EC	0,48	2.55	0,96	5,1
(-)-ECG	1,84	1.61	3,68	3,2

- Linealidad y sensibilidad del método.** Los mejores valores de linealidad y sensibilidad, para la metodología implementada, se obtuvieron con HPLC (**Tabla 33**). Esto indica, que la linealidad del método en el rango de 0,5 a 64 mg/L, asociado con la respuesta lineal del detector, es mayor para todas las catequinas en el DAD del equipo de HPLC. La metodología con HPLC resulta más sensible, pues genera respuestas elevadas, comparadas con los resultados obtenidos con CE. Esto puede observarse, comparando los valores de respuesta del detector (áreas), obtenidos por ambas metodologías de análisis, para una misma concentración de analito (**Tabla 34**).

Tabla 33. Linealidad y sensibilidad de los métodos HPLC y CE.

Catequina	Linealidad y sensibilidad			
	R ²		b ± tSb	
	HPLC	CE	HPLC	CE
(-)-EGC	0,9998	0,9993	96,5 ± 0,5	0,97 ± 0,02
(±)-C	0,9998	0,9987	126,6 ± 0,7	1,14 ± 0,03
(-)-EGCG	0,9998	0,9991	115,1 ± 0,7	0,69 ± 0,01
(-)-EC	0,9997	0,9975	82,5 ± 0,6	1,20 ± 0,04
(-)-ECG	0,9999	0,9990	101,0 ± 0,5	1,47 ± 0,03

Tabla 34. Respuesta del detector (área) para catequina en 2 mg/L.

Catequina	Área (mAu*s)	
	HPLC	CE
(-)-EGC	170 ± 7	22.2 ± 0.6
(±)-C	200 ± 1	24.9 ± 0.4
(-)-EGCG	225 ± 6	14.4 ± 0.3
(-)-EC	222 ± 3	30.6 ± 0.7
(-)-ECG	177 ± 3	36.6 ± 0.8

- **Repetibilidad.** Los valores máximos del CV, recomendados para áreas y tiempos de retención son, 10 y 2% respectivamente. Según estos valores, la repetibilidad de los métodos implementados es alta. La **Tabla 35** muestra que, para HPLC el máximo CV para las áreas fue 2,5% ((-)-EC) y para los tiempos de retención fue 0,9% [(-)-EGCG]. Mientras en CE, el máximo CV para las áreas fue 3,3% [(-)-EGC] y para el tiempo de migración fue 2,8% [(-)-EGCG y (-)-EC]. Lo anterior indica que, en el análisis de catequinas bajo las condiciones establecidas, la mayor repetibilidad se alcanza con el HPLC, hecho que coincide con lo reportado en la literatura [17, 88].

Tabla 35. Repetibilidad de los métodos de CE y HPLC en el análisis de catequinas.

Catequina	Repetibilidad, CV, %			
	Área, mAU*s		Tiempo, min	
	HPLC	CE	HPLC	CE
(-)-EGC	0,64	3,3	0,77	1,0
(±)-C	0,88	0,9	0,76	1,9
(-)-EGCG	0,75	2,3	0,90	2,8
(-)-EC	2,50	2,4	0,75	2,8
(-)-EGC	1,50	2,1	0,75	2,0

- **Reproducibilidad.** El método de HPLC fue más reproducible en cuanto a tiempos de retención, de acuerdo con los CV reportados en la **Tabla 36**. Para las áreas, la reproducibilidad fue similar para las dos técnicas implementadas. Entonces, se puede concluir, que en el análisis de catequinas en té, los dos métodos analíticos se encuentran dentro de los rangos permitidos por las Buenas Prácticas de Laboratorio y, por tanto,

ambos métodos pueden emplearse en el laboratorio para la cuantificación rutinaria de (±)-catequina, (-)-epicatequina, (-)-epigallocatequina, (-)-epicatequina galato y (-)-epigallocatequina galato, siguiendo la presente metodología.

Tabla 36. Reproducibilidad de los métodos de CE y HPLC para el análisis de catequinas.

Catequina	Reproducibilidad, CV, %			
	Área, mAU*s		Tiempo, min	
	HPLC	CE	HPLC	CE
(-)-EGC	4,4	3,7	0,5	1,1
(±)-C	5,8	5,6	0,3	1,1
(-)-EGCG	5,3	5,5	0,7	0,5
(-)-EC	4,8	3,6	0,5	1,2
(-)-ECG	5,8	3,6	0,3	0,7

4.5.2 Tiempo de análisis. En la **Tabla 37** se comparan los tiempos de retención y migración, obtenidas por HPLC y CE, tanto para la mezcla de patrones certificados, como para el extracto de té verde. Aunque ambos métodos son eficientes para el análisis de: (±)-catequina, (-)-epicatequina, (-)-epigallocatequina, (-)-epicatequina galato y (-)-epigallocatequina galato, se observa, que el tiempo de migración de la corrida electroforética, para todas ellas, fue más rápido (ca. 12 min), que el tiempo de retención (ca. 11 min), por HPLC, de las primeras cuatro catequinas estudiadas. Es evidente, que el aumento en el tiempo de análisis para HPLC fue dado por el tiempo de retención que presentó la (-)-ECG (ca. 26 min). De acuerdo con el tiempo de

análisis, la selección entre las dos técnicas empleadas, estará determinada por el o los analitos que se requieran analizar.

Tabla 37. Tiempos de análisis de cada catequina obtenidos por HPLC y CE.

Catequina	HPLC (t_R , min)		CE (t_M , min)	
	Patrones	Té verde	Patrones	Té verde
(-)-EGC	4,74 ± 0,04	5,15 ± 0,03	9,71 ± 0,09	10,3 ± 0,1
(±)-C	5,19 ± 0,04	5,60 ± 0,02	10,0 ± 0,2	10,6 ± 0,1
(-)-EGCG	8,86 ± 0,08	9,63 ± 0,07	11,4 ± 0,8	11,6 ± 0,1
(-)-EC	11,87 ± 0,09	13,01 ± 0,07	11,7 ± 0,8	11,86 ± 0,06
(-)-ECG	25,9 ± 0,2	28,85 ± 0,08	12,3 ± 0,9	12,09 ± 0,08

4.5.3 Costo de análisis. El costo de análisis de (±)-catequina, (-)-epicatequina, (-)-epigallocatequina, (-)-epicatequina galato y (-)-epigallocatequina galato, en una muestra vegetal, analizada por HPLC o CE, se detalla en la **Tabla 38**. En HPLC, se emplean hasta 60 veces los volúmenes de solventes que en CE, siendo una gran desventaja desde el punto de vista económico y ambiental, dados los altos costos de los solventes grado HPLC y los problemas inherentes al manejo de residuos químicos. Otro aspecto importante, es el costo generado por consumibles (filtros, fritas, jeringas), siendo éste mayor para CE, debido a la necesidad de filtros con tamaños de poro más pequeños y cambio diario de tubos cónicos, donde van depositadas las soluciones necesarias para el acondicionamiento del capilar, análisis y apagado del equipo.

Aunque la diferencia en términos de costo no pueda apreciarse en el cálculo por análisis de una sola muestra, haciendo las debidas proyecciones, para un número de muestras mayor y teniendo en cuenta los gastos técnicos, CE se convierte en una técnica ventajosa desde el punto de vista económico.

Tabla 38. Valores de análisis de una muestra por HPLC y CE empleando la metodología de análisis implementada en este estudio.

DETALLE	HPLC*		CE	
	Cantidad	Valor, pesos colombianos	Cantidad	Valor, pesos colombianos
Uso del equipo		90000		75000
Subtotal		90000		75000
Acondicionamiento y apagado del equipo				
Metanol*	20.4 mL	489,6	1 mL	21,6
Ácido acético*	24.6 µL	0,59		
Agua*	24.6 mL	645,75		
Ácido Clorhídrico			0.083 mL	0,1
Hidroxido de sodio			0.02 mL	1,98
Subtotal		1135,94		23,68
Análisis				
Fase móvil				
Metanol*	5.4 mL	129,6		
Ácido acético*	24.6 µL	0,59		
Agua*	24.6 mL	645,75		
Solución <i>Buffer</i>				
Ácido bórico			3 mL	
Dihidrogeno fosfato de sodio			6.5 mg	0,59
Dodecil sulfato de sodio			8.6 mg	0,86
			70 g	4,54
Subtotal		775,94		5,99
Consumibles				
Filtros para solventes	2	3,19		
Filtros para muestras	1	1342	1	4000
Jeringas	1	250	1	250
Tubos cónicos			10	2500
Subtotal		4782		6750
TOTAL		96.693,88		81.779,67

* Todos los solventes empleados deben ser grado HPLC.

Aunque la metodología implementada por CE resultó ser bastante reproducible, repetible y sensible, no supera en estos tres aspectos al HPLC. No obstante, HPLC resultó ser menos ventajosa en cuanto a tiempos de análisis y costos se refiere, por tanto, se puede establecer que la decisión para escoger entre estas dos técnicas para el análisis de (\pm)-catequina, (-)-epicatequina, (-)-epigallocatequina, (-)-epicatequina galato y (-)-epigallocatequina galato, depende fundamentalmente de la disponibilidad de muestra, tiempo, reactivos con que se cuenten, y obviamente el equipo.

4.6 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE PATRONES DE CATEQUINAS Y EXTRACTOS.

Las catequinas, siendo compuestos fenólicos, presentan en su estructura un número considerable de grupos hidroxilo, susceptibles a donador hidrógenos a los radicales, por lo cual se conocen como agentes antirradicalarios efectivos [90]. Esto pudo comprobarse experimentalmente, sometiendo a las catequinas (\pm)-C, (-)-EC, (-)-EGC, (-)-ECG y (-)-EGCG al ensayo de DPPH[°], cuyo procedimiento se describe en la **Sección 3.8**. Para establecer la efectividad de cada catequina como agente atrapador de radicales se empleó el valor de EC₅₀, definido como la relación entre la concentración efectiva de sustancia necesaria para reducir en un 50% la concentración inicial de DPPH[°] como valor de comparación con sustancias de referencia (**Tabla 39** y **Anexo 6**).

El valor de EC₅₀ es inversamente proporcional a la capacidad de atrapar radicales; es decir, a menor valor de EC₅₀ para una sustancia, mayor será su capacidad para atrapar radicales. De acuerdo con la **Tabla 39** se observa cómo las catequinas resultan ser hasta tres veces más efectivas como agentes antirradicalarios que los antioxidantes de referencia empleados, *i.e.* Vitamina E y Trolox[®], como agentes antioxidantes por excelencia, en la industrias alimenticia y cosmética [91].

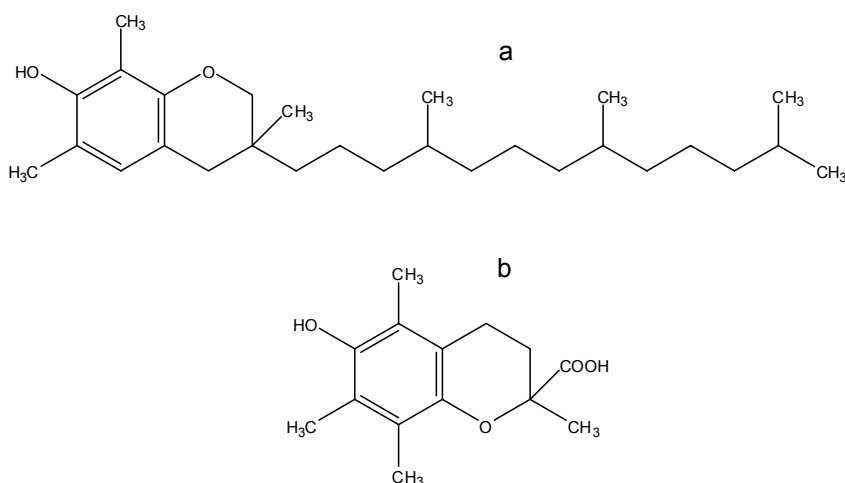
Tabla 39. Capacidad de atrapamiento de radicales de los patrones de catequinas y antioxidantes las sustancias de referencia.

Sustancia	EC ₅₀ *	
	(mg Sustancia/ mg DPPH°)	(mM Sustancia/ mM DPPH°)
(±)-C	0,089 ± 0,003	0,12 ± 0,004
(-)-EC	0,092 ± 0,002	0,082 ± 0,001
(-)-EGC	0,082 ± 0,001	0,070 ± 0,001
(-)-ECG	0,072 ± 0,001	0,092 ± 0,001
(-)-EGCG	0,067 ± 0,003	0,091 ± 0,004
Trolox®	0,155 ± 0,001	0,254 ± 0,002
Vitamina E	0,279 ± 0,001	0,255 ± 0,001

A partir del valor de EC₅₀ (mM Sustancia / mM DPPH°) se observa cómo éste disminuye conforme aumenta el número de grupos hidroxilo en las catequinas; es decir, conforme aumentan los hidroxilos disponibles para donar hidrógenos y formar moléculas de DPPH₂, disminuye la concentración del radical DPPH° y, por tanto, aumenta la actividad antiradicalaria. Este hecho también podría explicar por qué las catequinas resultan ser más efectivas comparadas con sustancias como la vitamina E y el Trolox®, que cuentan en sus estructuras con un sólo grupo hidroxilo (Figura 46).

Para el caso de las especies vegetales estudiadas, los valores del EC₅₀ de los extractos acuosos se reportan en la **Tabla 40**. Adicionalmente, se sometieron al ensayo de DPPH° los extractos acuosos de té verde y cacao, que sirven como referencia para el análisis de los extractos de *Origanum vulgare L.* y *Salvia aratocensis*.

Figura 46. Antioxidantes de referencia empleados para medir la actividad antioxidante de los extractos vegetales.



A. Vitamina E (α-Tocoferol). **B.** Trolox[®]

Tabla 40. Valores del EC₅₀ de extractos acuosos de las plantas bajo estudio.

Extracto	EC ₅₀
	mg Extracto/ mg DPPH [°]
<i>Origanum vulgare</i> L.	0.230 ± 0.002
<i>Salvia aratocensis</i>	0.12 ± 0,03
Té verde	0.042 ± 0.003
Cacao	0,187 ± 0,003

De acuerdo con los valores obtenidos de EC₅₀ (mg Extracto/mg DPPH[°]) para los extractos acuosos de las especies *Origanum vulgare* L. y *Salvia aratocensis* y teniendo en cuenta los valores reportados para las sustancias de referencia, e.g. vitamina E y Trolox[®], puede considerarse que estos extractos resultan ser efectivos agentes radicalarios, puesto que presentan valores de EC₅₀ menores que los agentes antioxidantes como la vitamina E y el Trolox[®]. Esto indica, que dentro de la composición de los extractos acuosos de estas especies se podrían encontrar uno o más compuestos con propiedades antiradicalarias, que podrían corresponder a compuestos fenólicos como flavonoides, de acuerdo también con los picos observados

tanto en el cromatograma, obtenido por HPLC como en el electroforegrama obtenido por CE.

En el caso particular del té verde, su valor de EC₅₀ puede explicarse teniendo en cuenta el alto contenido de catequinas identificadas en su extracto acuoso, reconocido mediante las técnicas HPLC y CE. El efecto sinérgico de las catequinas genera un altísimo poder antirradicalario, siendo necesaria una menor cantidad de extracto acuoso de té para disminuir en un 50% la concentración inicial de DPPH con respecto a los demás extractos evaluados.

4.7 CONTENIDO TOTAL DE FENOLES DE CATEQUINAS PATRÓN Y EXTRACTOS.

Se determinó el contenido total de fenoles (CTF) para la solución de las cinco catequinas en estudio y de las dos sustancias de referencia, vitamina E y Trolox[®], según lo descrito en la **Sección 3.9 (Anexo 7)**. Los resultados obtenidos se reportan en la **Tabla 41**.

Tabla 41. Contenido total de fenoles de los patrones de catequinas y patrones de antioxidantes.

Sustancia	CTF (mg Fenoles/ mg sustancia)
(±)-C	0.47 ± 0.01
(-)-EC	0,43 ± 0.01
(-)-EGC	0.47 ± 0.003
(-)-ECG	0.49 ± 0.02
(-)-EGCG	0.51 ± 0.01
Trolox [®]	0.24 ± 0.01
Vitamina E	0.127 ± 0.009

^a Miliequivalentes de ácido gálico.

De acuerdo con los valores reportados en la **Tabla 41**, se observa que conforme aumenta el número de grupos hidroxilo en las moléculas, aumenta también el contenido total de fenoles. Sin embargo, no podría considerarse como una relación estrictamente proporcional, teniendo en cuenta las similitudes entre los valores hallados para (±)-C y (-)-EGC. De acuerdo con las desviaciones estándar de cada medición, se puede estimar que la diferencia en el CTF observada no es significativa, lo cual indica que además del número de hidroxilos en la estructura, la reacción con el reactivo de Folin-Ciocalteu también está afectada por otros factores tales como la disposición de los grupos hidroxilo en la molécula.

Por lo tanto, al tener el grupo hidroxilo en la posición 3 en configuración *trans*-, con el anillo B, los hidroxilos de la (±)-catequina tendrán menor impedimento estérico para la interacción con los iones de molibdato y tungstato, responsables de la oxidación de éstos, formando, probablemente, con mayor facilidad, las especies cromógenas que permiten la cuantificación de los grupos hidroxilo.

Se evaluó igualmente el CTF de los extractos acuosos de las especies *Origanum vulgare* L. y *Salvia aratocensis* y de los extractos de té y cacao. Los resultados se reportan en la **Tabla 42**.

Tabla 42. Contenido total de fenoles de diferentes extractos acuosos de muestras vegetales.

Extracto	CTF (mq Fenoles ^a / mg Extracto)
<i>Origanum vulgare</i> L.	0.295 ± 0.006
<i>Salvia aratocensis</i>	0.211 ± 0.001
Té	0.247 ± 0.003
Cacao	0.162 ± 0.003

^a Miliequivalentes de ácido gálico.

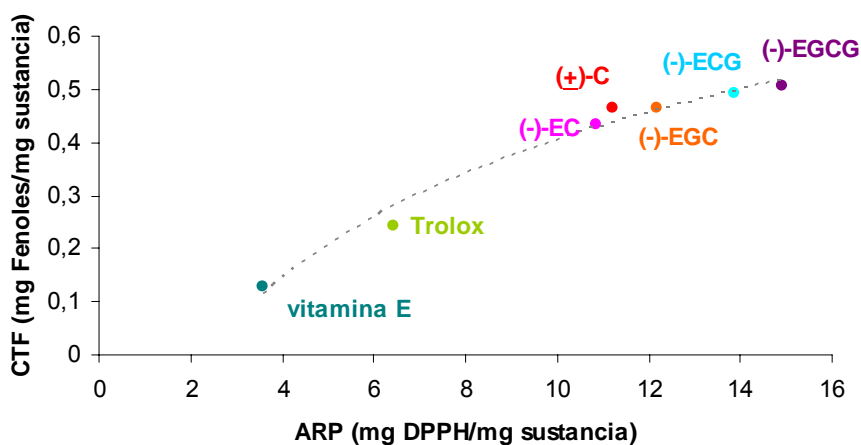
Los resultados obtenidos muestran que el extracto acuoso de las especies *Origanum vulgare* L. y *Salvia aratocensis* tienen un CTF comparable con el del extracto de té verde. Esto, puede indicar que en los extractos de dichas especies están presentes compuestos fenólicos capaces de reaccionar con el Folin-Ciocalteu, hecho que puede ser respaldado con la notable actividad antioxidante observada en sus extractos, características propias de este tipo de compuestos.

4.8 RELACIÓN ENTRE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y EL CONTENIDO TOTAL DE FENOLES.

La relación estructural de los compuestos fenólicos con su capacidad antioxidante, ha sido ampliamente estudiada en matrices vegetales. Una forma experimental de observar esta relación es mediante la comparación entre los valores de actividad antioxidante con el contenido total de fenoles. En general, se ha establecido una relación lineal entre estos dos valores, y se demostró, que a mayor número de grupos hidroxilo, es decir, mayor contenido total de fenoles, mayor será la capacidad antioxidante de la sustancia estudiada [92].

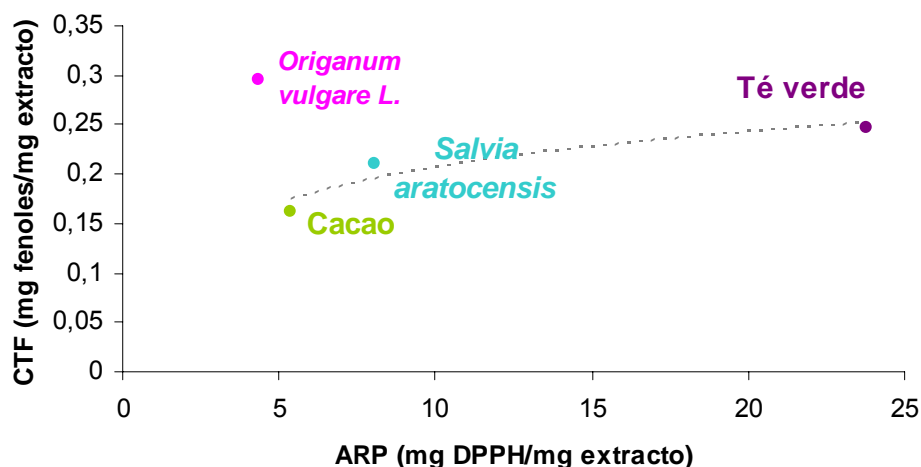
Con el fin de establecer la relación entre la AA expresada y el CTF de las sustancias y extractos evaluados con los datos obtenidos para ambos ensayos, se procedió a construir una curva que permitiera observar el tipo de relación entre estos valores (**Figura 47**). Se observa cómo la relación AA-CTF, empleando los valores de AA como la relación de ARP_{50} (mg DPPH[•]/mg sustancia) y el CTF expresado como mg de fenoles por mg de sustancia, resulta ser una relación directa, es decir, a mayor contenido total de fenoles se observa actividad antioxidante más alta.

Figura 47. Relación entre la actividad antioxidante y el contenido total de fenoles de las sustancias puras.



Para el caso de los extractos acuosos (**Figura 48**), se observa la tendencia logarítmica entre el CTF y la AA para los extractos, excepto para *Origanum vulgare* L. Entonces, puede ser que los compuestos presentes en este extracto tengan hidroxilos fenólicos que reaccionen con el Folin-Ciocalteu, pero sus hidrógenos sean menos reactivos para reaccionar con el DPPH°.

Figura 48. Relación entre la actividad antioxidante y el contenido total de fenoles de los extractos acuosos de *Origanum vulgare* L., *Salvia aratocensis*, té verde y cacao.



5. CONCLUSIONES

- Las metodologías implementadas para el análisis simultáneo de (±)-catequina, (-)-epicatequina, (-)-epigallocatequina, (-)-epicatequina galato y (-)-epigallocatequina galato, por las técnicas analíticas HPLC y CE, cumplen con los requerimientos establecidos por las Buenas Prácticas de Laboratorio, y aseguran, de esta manera, la calidad y la confianza de los resultados y, por ende, su aplicabilidad para el análisis de catequinas en matrices vegetales, bajo las condiciones de trabajo establecidas.
- El estudio comparativo de las dos técnicas, HPLC y CE, tuvo en cuenta las figuras analíticas de mérito, el costo y el tiempo de análisis. La técnica HPLC fue más repetible, reproducible y sensible que CE, mientras que la última fue más rápida, menos costosa y contaminante, dado el exiguo volumen de solventes requerido en CE. El uso de cada técnica dependerá del propósito: HPLC es más útil para el análisis de muestras con una baja concentración de catequinas, e.g. fluidos biológicos, o para muestras cuyo análisis requiere más precisión, e.g. los fármacos; mientras que CE se recomienda para análisis de rutina, rápidos, de bajo costo y sencillos, tipo *screening* o prospección.
- Las siguientes son las variables que más incidencia tuvieron sobre la separación y resolución de las catequinas, por HPLC: temperatura, porcentajes de metanol y del ácido acético, y se fijaron así: 35°C, 18% (metanol) y 0,1% (ácido acético), respectivamente. Para CE, operando en modo MEKC, los factores que más afectaron los electroforegramas fueron las concentraciones de ácido bórico (H_3BO_3), dihidrógeno fosfato de sodio (NaH_2PO_4) y dodecil sulfato de sodio (SDS), fijados en 0,25 mMol, 20 mMol y 80 mMol, respectivamente.

- En los extractos acuosos de las plantas de *Origanum vulgare* L. y *Salvia aratocensis* (familia Labiaceae), no se detectaron por HPLC, ni por CE, (\pm)-catequina, (-)-epicatequina, (-)-epigallocatequina, (-)-epicatequina galato y (-)-epigallocatequina galato, por encima de los niveles mínimos de detección de los métodos. No obstante, tanto los espectros UV-Vis de las señales observadas en los electroforegramas, como en los cromatogramas obtenidos de HPLC, sumado al alto contenido total de fenoles y la capacidad antirradicalaria comparable con la evaluada para la vitamina E y el Trolox[®], permiten vislumbrar la presencia de compuestos tipo flavonoide diferentes en los extractos acuosos de las especies *Origanum vulgare* L. y *Salvia aratocensis*, diferentes a las catequinas patrón.
- El procedimiento de limpieza con cloroformo (CH₃Cl) realizado a las matrices vegetales mejoró notablemente el aspecto y resolución de picos en los cromatogramas y electroforegramas obtenidos, al remover algunas impurezas, e.g. cafeína y compuestos coloreados. Así mismo, aunque las catequinas son muy solubles en agua, y esta última compatible con la fase móvil y la solución electrolítica en los equipos de HPLC y CE, la extracción con acetato de etilo aumentó la extracción y la concentración de catequinas en la muestra a inyectar.
- Se comprobó la capacidad antioxidante de patrones de catequinas, usando el ensayo de descoloramiento del radical DPPH[°]. Se estableció el contenido de fenoles, empleando el reactivo de Folin-Ciocalteu. Los resultados evidenciaron, que el contenido total de fenoles y la actividad antioxidante de las catequinas aumentaban con el número de grupos hidroxilo presentes en la estructura. La actividad antioxidante de las catequinas, fue 2-5 veces más alta, que la determinada para Trolox[®] y Vitamina E, antioxidantes de referencia.

- De acuerdo con los valores reportados, existe una relación directa entre el contenido total de fenoles y la actividad antioxidante de la mayoría de los extractos acuosos de muestras vegetales analizadas. Sin embargo, los resultados obtenidos para el extracto de *Origanum vulgare* L., hacen pensar que éste contiene moléculas que reaccionan con el reactivo de Folin-Ciocalteu, pero exhiben poca actividad con el radical DPPH°.

6. RECOMENDACIONES

Partiendo del método de extracción, limpieza y concentración de catequinas de matrices vegetales, se recomienda optimizar este procedimiento, aumentando los porcentajes de recuperación de catequinas.

Emplear las metodologías de análisis implementadas por HPLC y CE en la búsqueda de nuevas especies promisorias en cuanto a su contenido de catequinas, pues su notable actividad antioxidante, las hace importantes en el mercado.

Evaluar la metodología establecida para el análisis de catequinas por HPLC, empleando un detector de fluorescencia, FLD, ya que éste es más sensible y selectivo frente a estos analitos, que el DAD.

Realizar un estudio que relacione la estructura de la (\pm)-catequina y la (-)-epicatequina con su actividad antioxidante y el contenido total de fenoles, haciendo énfasis en el hidrógeno en la posición 3 del benzopirano y 2' del sustituyente fenólico del carbono en la posición 2.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. HARBONE, J.B; MABRY, T.J.; The flavonoids; Ed. Chapman and Hall; London; **1975**. 236 p.
2. HASLAM, E.; Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action, *J. Nat. Prod.*, **1996**, 59, pp. 205-215.
3. BRAVO, L.; Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr. Rev.*, **1998**, 56, pp. 317 – 333.
4. GROTEWOLD, E.; The science of flavonoids;. Ed. Springer, Ohio, **2006**, pp. 1- 4.
5. TAIZ, L.; ZEIGER, E.; Plant physiology. Ed. Sinauer Associates, **1998**, Massachusetts, 3 ra ed., pp. 290.
6. AUGER, C.; AL-AWWADI, N.; BORNET, A.; ROUANET, J.; GASE, F.; CROS, G.; TEISSEDRE, P.; Catechins and procyanidins in mediterranean diets; *Food. Res. Inter.*, **2004**, 37, pp. 233 – 245.
7. ZAVERI, N.; Green tea and its polyphenolic catechins: medicinal uses in cancer and noncancer applications, *Life Sci.* **2006**, 78, pp. 2073–2080.
8. YILMAZ, Y.; Novel uses of catechins in foods, *Trends Food. Sci. Tech.*, **2006**, 17, pp 64 – 71.
9. GRAMZA, A.; KORCZAK, J.; Tea constituents (*Camellia sinensis L.*) as antioxidants in lipid systems, *Trends Food Sci. Technol.* **2005**, 16, pp. 351–358.

10. NIEMENAK, N.; ROHSIUS, C.; ELWERS, S.; Comparative study of different cocoa (*Theobroma cacao* L.) clones in terms of their phenolics and anthocyanins contents, *J. Food. Compos. Anal.*, **2006**, 19, pp. 612–619.
11. GOTTI, R.; FURLANETTO, S.; PINZAUTI, S.; CAVRINI, V.; Analysis of catechins in *Theobroma cacao* beans by cyclodextrin-modified micellar electrokinetic chromatography, *J. Chromatogr. A*, **2006**, 1112, pp. 345–352.
12. KARTSOVA, L.; GANZHA, O.; Electrophoretic separation of tea flavanoids in the modes of capillary zone electrophoresis and micellar electrokinetic chromatography, *J. Appl. Chem.*, **2006**, 79(7), pp. 1110 – 1114.
13. WANG, H.; HELLIWELL, K.; YOU, X.; Isocratic elution system for the determination of catechins, caffeine and gallic acid in green tea using HPLC, *Food. Chem.* **2000**, 68, pp. 115 – 121.
14. JIN, YINZHE.; JIN, CHUN.; ROW, KYUNG.; Separation of catechin compounds from different teas, *J. Biotechnol.* **2006**, 1, pp. 209–213.
15. STEWART, A.; MULLEN, M.; CROZIER, A.; On-line high-performance liquid chromatography analysis of the antioxidant activity of phenolic compounds in green and black tea. *Mol. Nutr. Food Res.* **2005**, 49, pp. 52–60.
16. BAILEY, R.; NURSTEN, H.; The chemical oxidation of catechins and other phenolics: a study of the formation of black tea pigments, *J. Sci Food. Agric.* **1993**, 63, pp. 455-464.

17. ILJA, A.; PUTTE, B.; HOLLMAN, P.; Catechin contents of foods commonly consumed in the Netherlands. 2. Tea, Wine, Fruit Juices, and Chocolate Milk, *J. Agric. Food Chem.* **2000**, 48, pp. 1752 – 1757.
18. DA SILVA, J.; Separation and quantitative determination of grape and wine procyanidins by high performance reversed phase liquid chromatography, *J. Sci. Food Agric.* **1990**, 53, pp. 85-92.
19. ANDRADE, P.; OLIVEIRA, B.; SEABRA, R.; FERREIRA, M.; FERRERES, F.; GARCÍA-VIGUERA, C.; Analysis of phenolic compounds in Spanish Albariño and Portuguese Alvarinho and Loureiro wines by capillary zone electrophoresis and high-performance liquid chromatography, *Electrophoresis*, **2001**, 22, pp. 1568–1572
20. FANG, F.; LI, J.; PAN, Q.; HUANG, W.; Determination of red wine flavonoids by HPLC and effect of aging, *Food Chem.* **2007**, 101, pp. 428–433.
21. MAKRIS, D.; KALLITHRAKA, S.; KEFALAS, P.; Flavonols in grapes, grape products and wines: Burden, profile and influential parameters. *J. Food Compos. Anal.* **2006**, 19, pp. 396–404.
22. WILSON, E.; High-pressure liquid chromatography of apple juice phenolic compounds, *J. Sci. Food Agric.* **1981**, 32, pp. 257-264.
23. KAHLE, K.; KRAUS, M.; RICHLING, E.; Polyphenol profiles of apple juices, *Mol. Nutr. Food Res.* **2005**, 49, pp. 797 – 806.
24. CIFUENTES, A.; BARTOLOMÉ, B.; GÓMEZ-CORDOVÉS, C.; Fast determination of procyanidins and other phenolic compounds in food samples

by micellar electrokinetic chromatography using acidic buffers (Lentils). *Electrophoresis*, **2001**, 22, pp. 1561–1567.

25. RAMIREZ-MARTINEZ, J.; Phenolic compounds in coffee pulp: quantitative determination by HPLC, *J. Sci. Food Agric.* **1988**, 43, pp. 135–144.

26. TSANOVA-SAVOVA, S.; RIBAROVA, F.; GEROVA, M.; (+)-Catechin and (-)-epicatechin in Bulgarian fruits, *J. Food. Compos. Anal.*, **2005**, 18, pp. 691–698.

27. SUBAGIO, A.; SARI, P.; MORITA, N.; Simultaneous determination of (+)-catechin and (-)-epicatechin in cacao and its products by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection, *Phytochem. Anal.*, **2001**, 12, pp. 271–276.

28. PROESTOS, C.; BOZIARIS, I.; B, NYCHAS, G. KOMAITIS, M. Analysis of flavonoids and phenolic acids in greek aromatic plants: investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. *Food Chem.* **2006**, 95, pp. 664–671.

29. RIZZO, M.; VENTRICE, D.; VARONE, M.; SIDARI, R.; CARIDI, A. HPLC determination of phenolics adsorbed on yeasts, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2006**, 42, pp. 46–55

30. TONIN, F.; JAGER, A.; MICKE, G.; FARAH, J.; TAVARES, M.; Optimization of the separation of flavonoids using solvent-modified micellar electrokinetic chromatography, *Electrophoresis*, **2005**, 26, pp. 3387–3396.

31. HAVSTEEN, B.; Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. *Biochem. Pharmacol.*, **1993**, 32(7), 1141–1148.
32. COOK, N.; SAMMAN, S.; Flavonoids chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources, *Nutritional Biochem.*, **1996**, 7, pp. 66-76.
33. [On–line]:http://es01.kompass.com/busqueda.php?_Choix=PS&_Region=&_Lang=e&_Version=&_Kprov=ES001&_Language=eses&_Keyword=%22green+tea+extract%22&_Zone=WW&x=74&y=15. [Consultado: enero 28 de 2008].
34. [On–line]:<http://e-worldtrade.com/sub/tradeleads/index.php>. [Consultado: enero 26 de 2008].
35. [On–line]:<http://www.fda.gov/ohrms/dockets/dailys/07/july07/072407/072407.htm>. [Consultado: enero 30 de 2008].
36. [Online]: http://www.fao.org/es/esc/en/15/286/highlight_288.html. [Consultado: febrero 14 de 2007].
37. [On–line]:ftp://ftp.fao.org/codex/ccfl32/fl04_11e.pdf. [Consultado: febrero 14 de 2008].
38. SANG, S.; CHENG, X.; STARK, R.; ROSEN, R.; YANG, C.; HO, C.; Chemical studies on antioxidant mechanism of tea catechins: analysis of radical reaction products of catechin and epicatechin with 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, *Bioorg. Med. Chem*, **2002**, 10, pp. 2233–2237.
39. ZHU, N.; WANG, M.; WEI, G.; LIN, J.; YANG, C.; HO, C.; Identification of reaction products of (-)-epigallocatechin, (-)-epigallocatechin gallate and

pyrogallol with 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical, *Food Chem*, **2001**, 73, pp. 345-349.

40. NANJO, F.; GOTO, K.; SETO, R.; SUZUKI, M.; SAKAI, M.; HARA, Y.; Scavenging effects of tea catechins and their derivatives on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical, *Free Radical Biol. Med.*, **1996**, 21(6), pp. 895-902,

41. FONT QUER, P. Plantas medicinales, Ed. Labor S.A., Madrid, **1983**, pp. 639 – 715.

42. ARIAS ALZATE, Eugenio. El libro de las plantas medicinales. 1ª Ed. Colombia. Ed. Oveja Negra. **1991**. 389p.

43. MUÑOZ, Fernando. Plantas medicinales y aromáticas. 1a edición. España. Ed. Mundi-Prensa. **1986**. 365p.

44. CERVATO, G; CARABELLI, M; GERVASIO, S.; CITTERA, A.; CAZZOLA, R.; CESTARO, B.; Antioxidant properties of extracts of oregano (*Origanum vulgare* L.) leaf extracts; *J. Food. Biochem.*, **2000**, 24, pp 453.

45. KIKUZAKI, H.; NAKATANI, N.; Structure of a new antioxidative phenolic acid from oregano (*Origanum vulgare* L.), *Agric. Biol. Chem.*, **1998**, 53; pp. 519-524.

46. CAPECKA, E.; MARECZEK, A.; Leja, M.; Antioxidant activity of fresh and dry herbs of some Lamiaceae species, *Food. Chem.*, **2005**, 93; pp. 223–226.

47. DORMAN, H.J.D., PELTOKETO, A.; HILTUNEN, R., TIKKANEN, M.J.; Characterisation of the antioxidant properties of de-odourised aqueous extracts from selected Lamiaceae herbs, *Food. Chem.*, **2003**, 83, pp. 255–262.

48. ZHENG, W.; WANG, S.; Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs, *J. Agric. Food. Chem.*, **2001**, 49, pp. 5165-5170.
49. CHUN, S.; VATTEM, D.A.; LIN, Y.T.; SHETTY, K.; Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare* L.) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*, *Process Biochem.*, **2005**, 40, pp. 809–816.
50. PUERTAS-MEJIA, M; HILLEBRAND, S; STASHENKO, E; WINTERHALTER, P.; *In vitro* radical scavenging activity of essential oils from Columbian plants and fractions from oregano (*Origanum vulgare* L.) essential oil, *J. Flavour Frag.*, **2005**, 17, pp 380 - 385.
51. SKAL TSA, H.; HARVALA, Z.; Contribution a liyetude chimique d'Origanum dictamnus L.-2nd communication (Glucosides des feuilles), *Plantes Medicinales et Phytotherapie*, **1987**, 21(1), pp. 56.
52. EL-ANSARI, M.A.; EL-NEGOUMY, S.L; EL-DESOKY, S.K.; Flavonoid constituents of *Origanum syriacum* L. (Labiatae), in proceedings of polyphenols communications, Bordeaux, *Food. Chem.*, **1996**; pp. 85-91.
53. BOHM, A.B.; The Flavonoids. Advances in Research Sci, Editorial. Chapman and Hall, New York, **1988**, 194 p.
54. CAVERO, S.; GARCÍA-RISCO, M., MARÍN, F.; JAIME, L., SANTOYO, S.; SEÑORÁNS, J.; REGLERO, G.; IBÁÑEZ, E.; Supercritical fluid extraction of antioxidant compounds from oregano. Chemical and functional characterization via LC–MS and *in vitro* assays, *J. Supercrit. Fluids*; **2006**; 38; pp. 62–69.

55. ALBESIANO, S.; FERNÁNDEZ-ALONSO, J.L.; Catalogue of the vascular plants from the Chicamocha river canyon (tropical zone), Boyacá-Santander, Colombia. *Caldasia*, **2006**, 28(1), pp. 23-44.
56. STASHENKO, E.E.; MARTÍNEZ, J.R.; TAFURT, G.; VÁSQUEZ, A.; CALA, M.; MIRANDA, I.; Actividad antioxidante y contenido total de fenoles de los extractos etanólicos de *Salvia aratocensis*, *Salvia sochensis*, *Bidens reptans* y *Montanoa ovalifolia*, *Scientia et Técnica*, **2007**, 13(33), pp 205 – 208.
57. FERNÁNDEZ-ALONSO, J. L.; Studies in Colombian Labiatae IV. Novelties in *Salvia* and synopsis of sections *Angulatae* and *Purpureae*; *Caldasia*, **2003**, 25(2); pp. 17 - 19.
58. LU, Y.; FOO, L.Y.; Polyphenolics of *Salvia*—a review, *Phytochem.*, **2002**, 59, pp. 117–140.
59. PROKONENKO, S.A.; CHUSHENKO, I.V; Flavonoids of *Salvia pratensis*, *Chem. Nat. Compd.*, **1986**, 22(2), pp. 226 -227
60. ULUBELEN, A.; TUZLACI, E; Flavonoids and triterpenoids from *Salvia euphratica* and *Salvia longipedicellata*, *Phitoterapy*, **1990**, 61, pp. 185.
61. ASEN, S.; Antocyanins in flowers of *Salvia splendens* cultivar violet Flame, *Proc. Ame. Soc. Sci.*, **1961**, 78, pp. 586-592.
62. MURKO, D.; BALDASAR, Z.; Effect of climatic factors and height above sea level on the content of tannic acid in the leaves of *Salvia officinalis* L. ; *Arhiv za Farmmciju*, **1977**, 27, pp. 99-102.

63. DELGADO, C.; TOMÁS-BARBERFIN, F.; TALOU, T.; GASET, A.; Capillary electrophoresis as an alternative to HPLC for determination of honey flavonoids, *Chromatographia*, **1994**, 38(1), pp. 71 – 79.
64. RUBINSON, J.; RUBINSON, K.; Análisis Instrumental, Ed. Prentice Hall, Madrid, **2001**, pp. 636 – 674.
65. QUATTROCCHI, O.; ABELAIRA, S.; LABA, F.; Introducción a la HPLC, aplicación y práctica. Ed. Artes Gráficas Farro S.A., Buenos Aires, **1992**. 407 p.
66. HIERMANN, A.; RADL, B.; Analysis of aromatic plant acids by capillary zone electrophoresis, *J. Chromatogr. A*, **1998**, 803, pp. 311–314.
67. BAKER, D.; Capillary electrophoresis, Ed. John Wiley & Sons, INC., New York, **1995**, 244 p.
68. KUHN, R. And HOFFSTETTER-KUHN. S., Capillary electrophoresis: principles and practice, Ed. Springer, Germany, **1993**, 374p.
69. BECKERS, J.; BOCEK, P.; The preparation of background electrolytes in capillary zone electrophoresis: Golden rules and pitfalls, *Electrophoresis*, **2003**, 24, pp. 518–535.
70. MORINA, P.; ARCHAMBAULTB, J.; ANDRE, P.; DREUXA, M.; GAYDOUC, E.; Separation of hydroxylated and methoxylated flavonoids by micellar electrokinetic capillary chromatography, *J. Chromatogr. A*, **1997**, 791, pp. 289–297.
71. AUCAMP, J.; HARA, Y.; APOSTOLIDES, Z.; Simultaneous analysis of tea catechins, caffeine, gallic acid, theanine and ascorbic acid by micellar

electrokinetic capillary chromatography, *J. Chromatogr. A*, **2000**, 876, pp. 235–242.

72. LEE, B.L.; ONG, C.N; Comparative analysis of tea catechins and theaflavins by highperformance liquid chromatography and capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A*, **2000**; 881; pp. 439–447.

73. WANG, S.; HUANG, K.; Determination of flavonoids by high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A*, **2004**, 1032, pp. 273 – 279.

74. VANHOENACKER, G.; DE VILLIERS, A.; LAZOU, K.; DE KEUKELEIRE, D.; SANDRA, R. Comparison of high-performance liquid chromatography-mass spectroscopy and capillary electrophoresis-mass spectroscopy for the analysis of phenolic compounds in diethyl ether extracts of red wines, *J. Chromatogr. A*. **2001**, 54, pp. 309-315.

75. DALLUGE, J.; NELSON, B.; Determination of tea catechins, *J. Chromatogr. A.*, **2000**, 880, pp. 411 – 424.

76. PELILLO, M.; BONOLI, M.; BIGUZZI, B.; BENDINI, A.; TOSCHI, G.; LERCKER, G.; An investigation in the use of HPLC with UV and MS-electrospray detection for the quantification of tea catechins, *Analytical, Nutritional and Clinical Methods, Food Chem.*, **2004**, 87, pp. 465–470.

77. [On–line]: http://bvs.sld.cu/revistas/aci/vol10_4_02/aci040402.htm
[Consultado: Julio 26 de 2007].

78. JIN, Y.; JIN, C.H.; ROW, K.H.; Separation of catechin compounds from different teas, *Biotechnol. J.*, **2006**, 1(2), pp. 209-213.

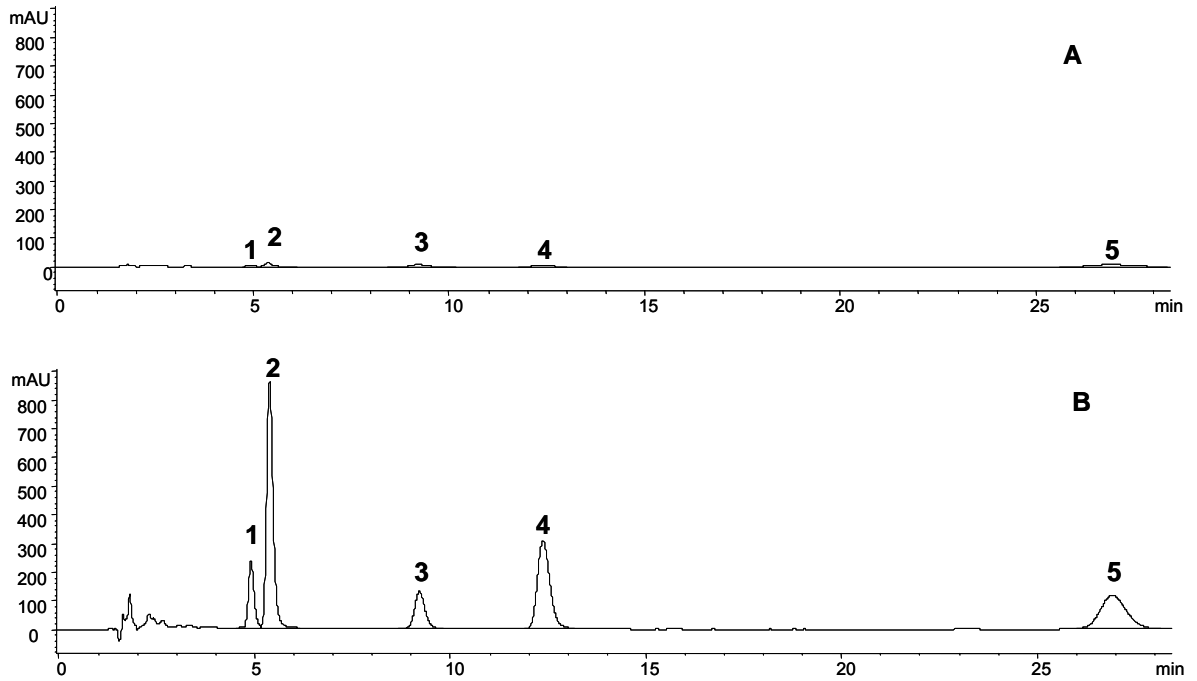
79. NEILSON, A.; GREEN, R.; WOOD, K.; FERRUZZI, M.; High-throughput analysis of catechins and theaflavins by high performance liquid chromatography with diode array detection. *J. Chromatogr. A.*, **2006**, 1132, pp. 132–140
80. NISHITANI, E.; SAGESAKA, Y.; Simultaneous determination of catechins, caffeine and other phenolics compounds in tea using new HPLC method. *J. Food. Comp. Anal.*, **2004**, 17, pp. 675 – 685.
81. SWART, M.; KRULL, I.; Analytical method development and validation. Ed. Marcel Dekker, New York, **1997**. 92 p.
82. FALLER, T.; ENGELHARDT, H.; How to achieve higher repeatability and reproducibility in capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A.*, **1999**, 853, pp. 83 – 94.
83. ROW, H. R.; JIN, Y.; Recovery of catechin compounds from Korean tea by solvent extraction, *Bioresour. Technol.*, **2006**, 97, pp. 790-793.
84. BRAD-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C.; Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, *Lebens. Wiss. U.Technol.*, **1995**, 28, pp. 25 – 30.
85. ISAZA, J.; VELOZA, L.; GUEVARA, C.; ÁVILA, P.; DÍAZ, O.; A spectrometric approach to the phenol totals in species of *Melastomataceae* family. *Actual. Biol.*, **2005**, 27, pp. 75-79.
86. WANG, H.; PROVAN, G.; HELLIWELL, K.; Tea Flavonoids: their functions, utilisation and análisis, *Trends Food Sci. Technol.*, **2000**, 11, pp. 152-160.

87. LIANG, Y.; LU, J.; ZHANG, L.; WU, S.; WU, Y.; Estimation of black tea quality by analysis of chemical composition and colour difference of tea infusions, *Food Chem.*, **2003**, 80, pp. 283–290.
88. PELILLO, M.; BIGUZZI, B.; BENDINI, A.; TOSCHI, G.;VANZINI, G.; LERCKER, Preliminary investigation into development of HPLC with UV and MS-electrospray detection for the analysis of tea catechins, *Food Chem.*, **2002**, 78, pp. 369–374.
89. BONOLI, M.; PELILLO, M.; TOSCHI, T.; LERCKER, G.; Analysis of green tea catechins: comparative study between HPLC and CE, *Food. Chem.*, **2003**, 81, pp. 631–638.
90. MOLYNEUX, P.; The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity, *J. Sci. Technol.*, **2004**, 26(2), pp. 211 – 219.
91. VILLAÑO, D.; FERNÁNDEZ, M.; MOYÁ, M.; TRONCOSO, A.; GARCÍA, M.; Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH Free radical, *Talanta*, **2007**, 71, pp. 230 – 235.
92. SURVESWARAN, S.; CAI, Y.; CORKE, H.; SUN, M.; Systematic evaluation of natural phenolic antioxidants from 133 Indian medicinal plants, *Food. Chem.*, **2007**, 102(3), pp. 938-953.

ANEXOS

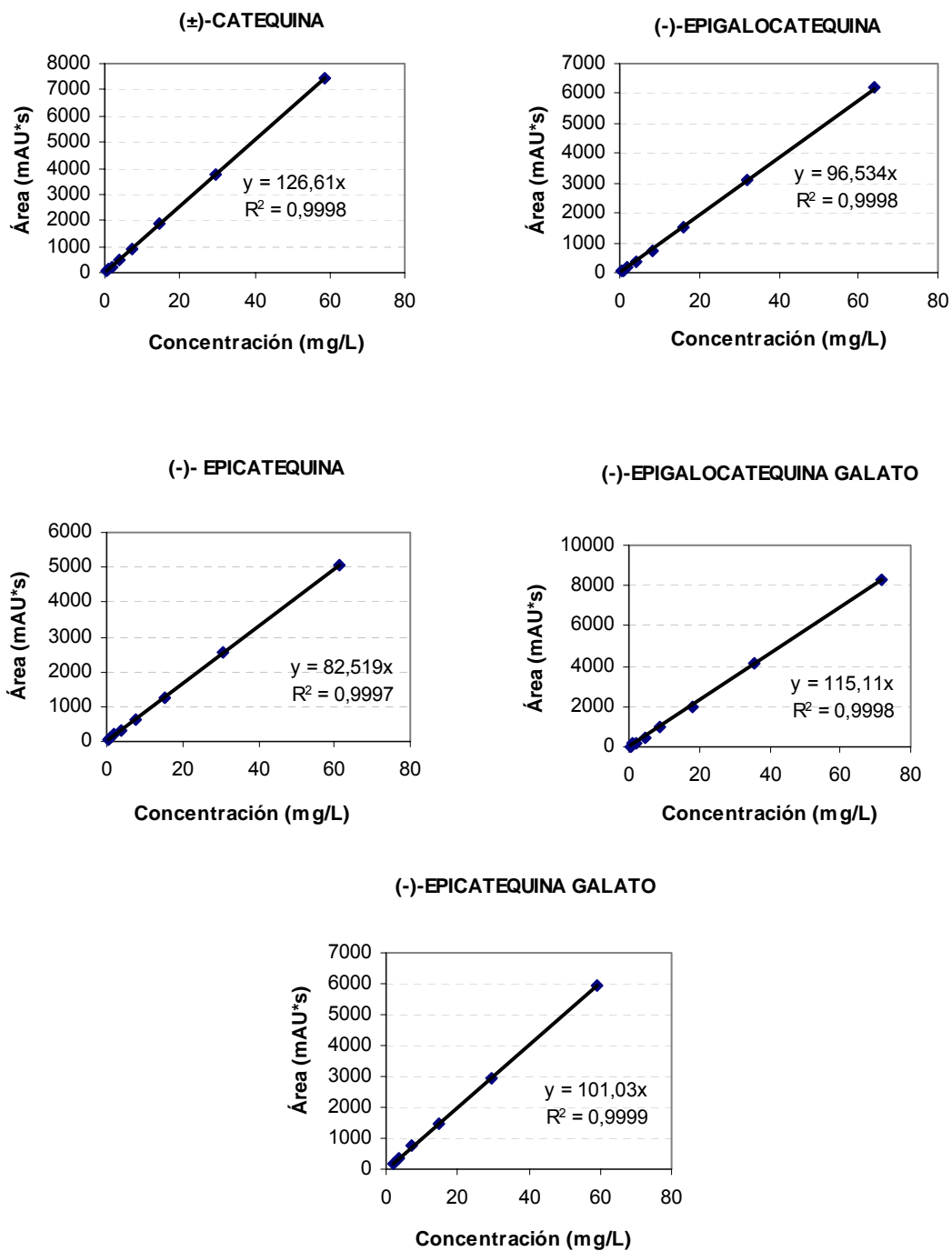
ANEXO 1. Perfiles cromatográficos de (±)-C, (-)-EC, (-)-EGC, (-)-ECG y (-)-EGCG. A. 280 nm; B. 210 nm.

Figura 1-1. Perfiles cromatográficos de 1. (-)-EGC, 2. (±)-C, 3. (-)-EGCC, 4. (-)-EC, 5. (-)-ECG. A. 280 nm; B. 210 nm.



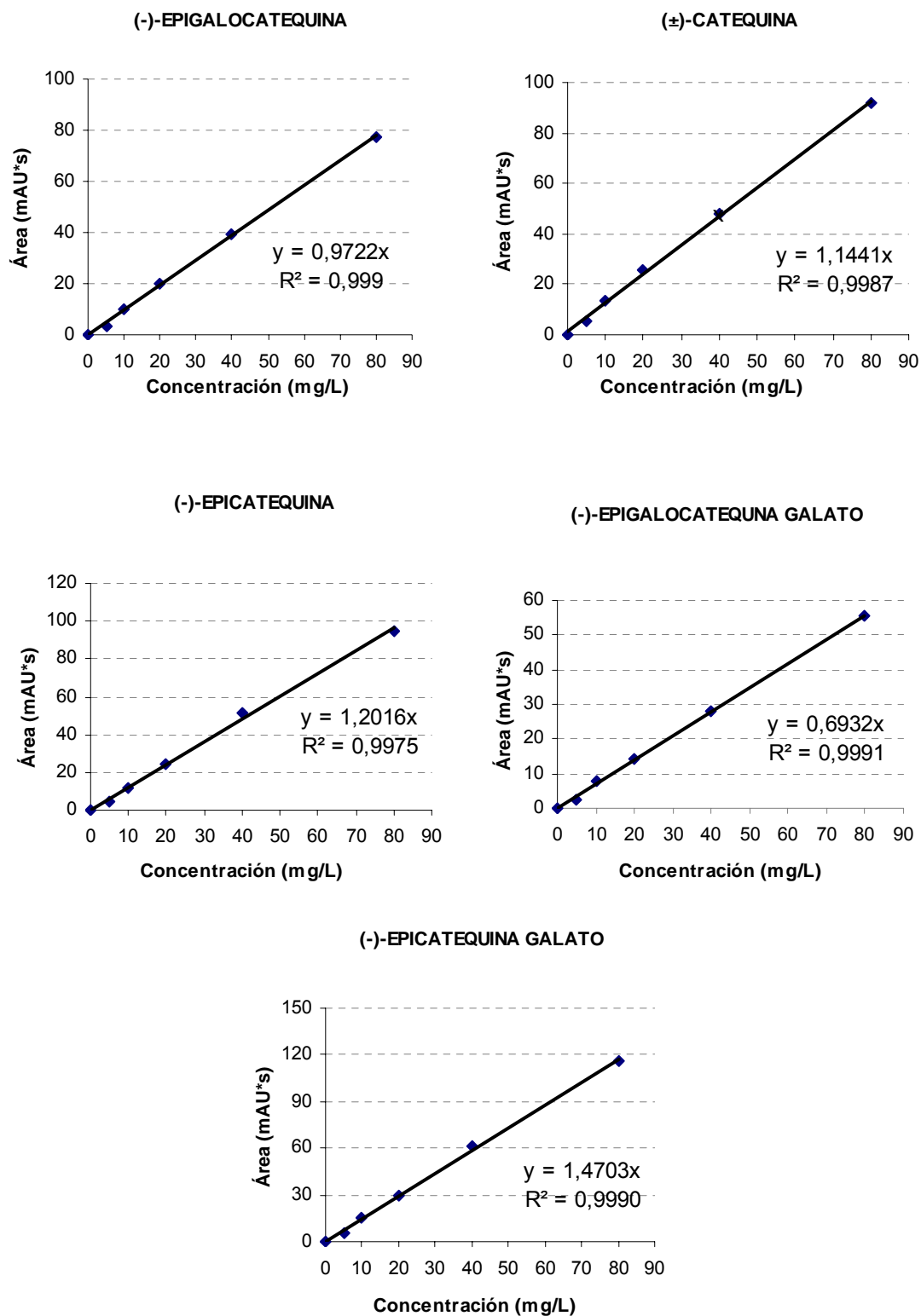
ANEXO 2. Curvas de calibración de (±)-C, (-)-EC, (-)-EGC, (-)-ECG y (-)-EGCG, por HPLC.

Figura 2-1. Curvas de calibración en el rango de 0,5-64 mg/L de (±)-C, (-)-EC, (-)-EGC, (-)-ECG y (-)-EGCG, por HPLC.



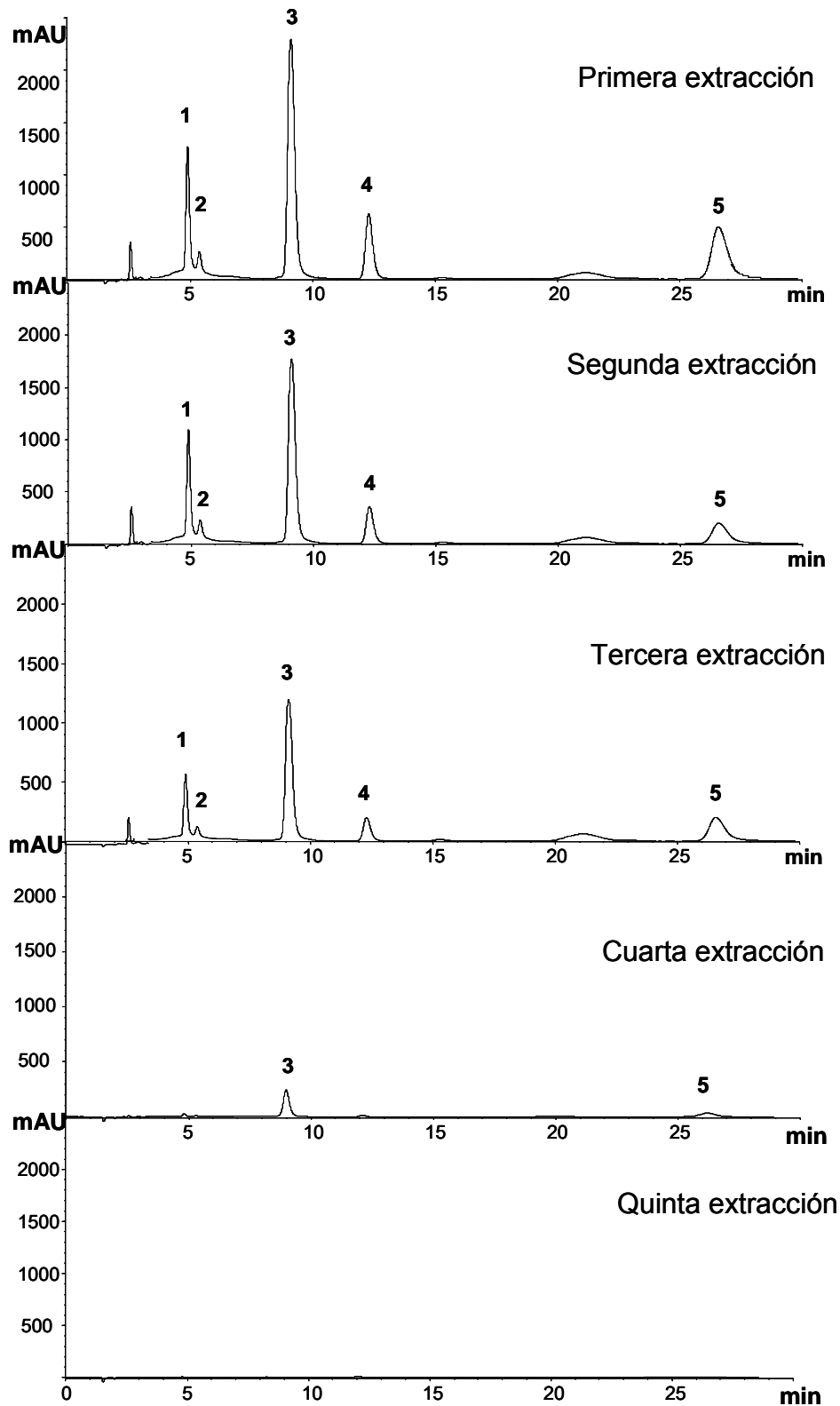
ANEXO 3. Curva de calibración de (\pm) -C, (-)-EC, (-)-EGC, (-)-ECG y (-)-EGCG, por CE.

Figura 3-1. Curvas de calibración en el rango de 0,5 a 64 mg/L de (±)-C, (-)-EC, (-)-EGC, (-)-ECG y (-)-EGCG, por CE.



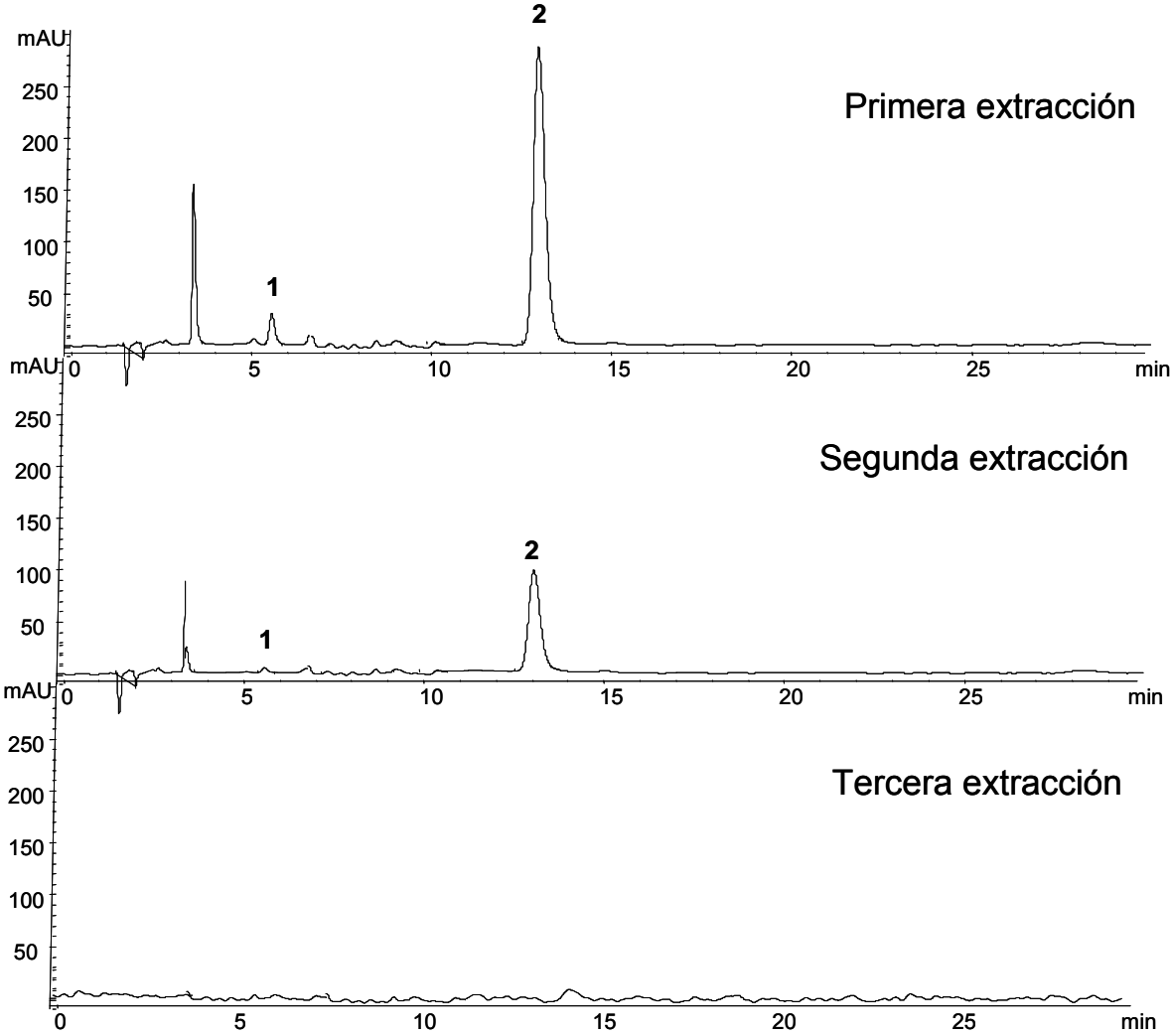
ANEXO 4. Perfiles cromatográficos de los extractos de té verde. 1. (-)-EGC,
2. (±)-C, 3. (-)-EGCG, 4. (-)-EC y 5. (-)-ECG.

Figura 4-1. Perfil cromatográfico de los extractos de té verde. 1. (-)-EGC, 2. (±)-C, 3. (-)-EGCG, 4. (-)-EC y 5. (-)-ECG.



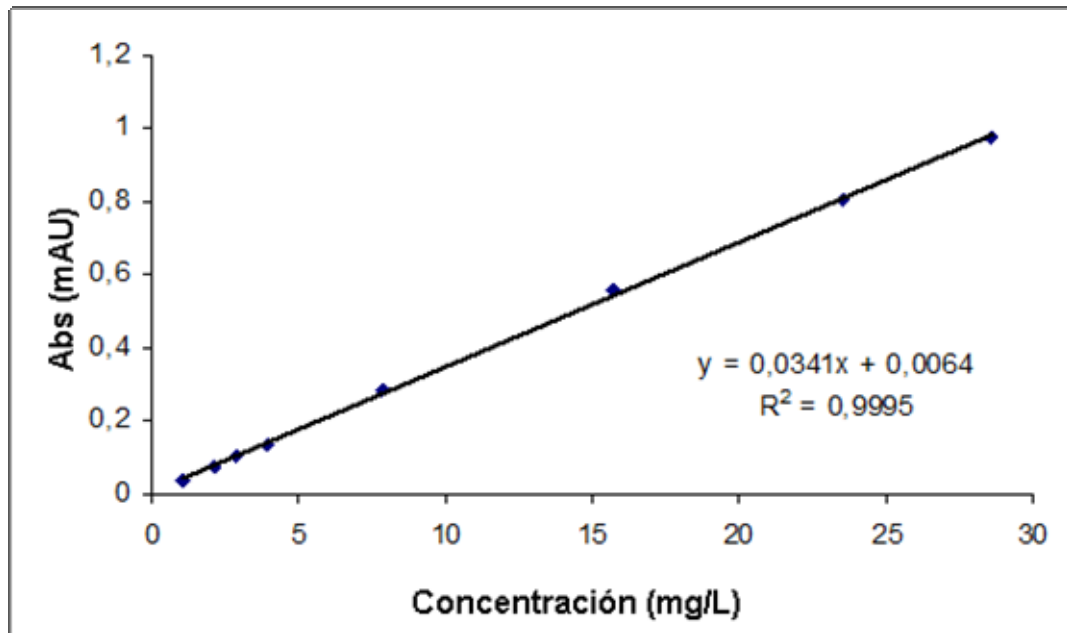
ANEXO 5. Perfiles cromatográficos de los extractos de cacao. 1. (±)-C,
2.(-)-EC.

Figura 5-1. Perfil cromatográfico de los extractos de cacao. 1. (±)-C, 2.(-)-EC.



ANEXO 6. Curva de calibración del DPPH°.

Figura 6-1. Curva de calibración del DPPH°.



ANEXO 7. Curva de calibración del ácido gálico.

Figura 7-1. Curva de calibración del ácido gálico.

