

**Universidad Católica de Santa María**  
**Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas Y Biotecnológicas**  
**Escuela Profesional de Farmacia Y Bioquímica**



**VALIDACIÓN DE UNA TÉCNICA ANALÍTICA PARA LA  
DETERMINACIÓN DE CATEQUINAS [(-)-Epicatequina, (-)-  
Epigallocatequina, (-)-Epicatequina galato, (-)-Epigallocatequina galato] POR  
CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA PERFORMANCE (HPLC) EN  
PRODUCTOS COMERCIALES DE *Camellia sinensis* “TÉ VERDE”**

**Tesis presentada por los bachilleres en Farmacia  
y Bioquímica:**

Ramos Zapana, Fabiola Alejandra

Rivera Flores, Orlando Noel

Para optar el Título Profesional de

Químico Farmacéutico

Asesor: Mgter. Julitza Paredes Fuentes

**AREQUIPA – PERÚ**

**2018**

UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARIA  
Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas  
y Biotecnológicas  
Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica

Expediente N°. 16024665  
N° Trámite en Fac. 1672-2016  
Fecha 14-06-2016

FORMATO DE TITULACION PROFESIONAL

DE: RAMOS ZAPANA, Fabiola Alejandra  
RIVERA FLORES, Orlando Noel

TITULO DEL PROYECTO DE TESIS:

"VALIDACION DE UNA TECNICA ANALITICA PARA LA DETERMINACION DE CATEQUINAS [(+)-EPICATEQUINA, (-)-EPIGALOCATEQUINA, (-)-EPICATEQUINA GALATO, (-)-EPIGALOCATEQUINA GALATO] POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA PERFORMANCE (HPLC) EN PRODUCTOS COMERCIALES DE *Camellia sinensis* "TE VERDE"

DICTAMINADORES: 1) Mgter. Angélica Corzo Salas 2) Q. F. Mocita De La Fuente Torres

DICTAMEN DE PLAN: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación, como Dictaminadores del Plan de Tesis presentado por la recurrente, se ha procedido a la revisión del trabajo de investigación y hechas las observaciones y sugerencias correspondientes, consideramos que se encuentra APTO para continuar con los trámites estipulados en el Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad

Atentamente

Firmas :



(Devolver antes de 8 días hábiles)

Fecha 10/1/2017

ASESOR: Mgter. Julitza Paredes Fuentes

DICTAMEN DE ASESOR: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación como Asesor en el presente Trabajo de Investigación, cumpro con informar que este se ha desarrollado de acuerdo a los objetivos trazados y se encuentra APTO para continuar con los trámites estipulados en el Reglamento de Grados y Títulos de nuestra Facultad.

Atentamente

Firma



Fecha 23/11/2017

DICTAMINADORES BORRADOR DE TESIS:

- 1) Dr. José Villanueva Salas  
2) Mgter Angélica Corzo Salas

3) Q. F. Mocita De La Fuente Torres

DICTAMEN DE BORRADOR:

Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación, hemos procedido a revisar el Borrador de Tesis presentado por los recurrente, y luego de haber verificado el cumplimiento de los objetivos, la redacción del informe, de los resultados, discusión y conclusiones correspondientes, consideramos se encuentra APTO para continuar con los trámites estipulados en el Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad.

Atentamente

Firma



(Devolver antes de 15 días hábiles) Fecha

JURADOS: Presidente  
Vocal  
Secretario

SUSTENTACIÓN DE TRABAJO:

Fecha: 11/01/18 Hora: 13.00 Local: C- 402 (SUM)



03/01/18

## DEDICATORIA

A Dios por guiarnos en toda esta etapa universitaria y permitir culminar nuestra tesis.

A mis padres Bertha y Mario, a mis hermanos Juan Carlos, Gabriela y Valeria por su incondicional apoyo en toda esta etapa.

A mi mamá Yanilde y a mi abuelita Beatriz, que desde el cielo me cuidan y son el más grande impulso que tengo para poder ser mejor.

A mi papá Orlando por apoyarme en los 5 años de universidad.

A todos mis demás familiares y amigos por aconsejarme y apoyarme.

**Fabiola y Orlando**

## INDÍCE

RESUMEN .....	I
ABSTRACT.....	III
INTRODUCCIÓN .....	V
OBJETIVOS .....	VI
OBJETIVO GENERAL .....	VI
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	VI
HIPÓTESIS.....	VII
CAPÍTULO I.....	1
MARCO TEÓRICO .....	1
1.-Té verde.....	1
1.1.- Clasificación Taxonómica.....	2
1.2.- Composición del Té Verde.....	2
1.3.- Biotransformación.....	5
1.4.- Farmacocinética.....	6
1.5.- Beneficios a la salud del té verde .....	7
1.5.2.- Actividad antiinflamatoria y protección de la piel: .....	7
1.5.3.- Actividad antiviral:.....	8
1.5.4.- Actividad antidiabética:.....	8
1.5.6.- Actividad antimicrobiana: .....	9
1.5.7.- Actividad antioxidante: .....	9
1.5.8.- Actividad antiobesidad:.....	10
1.5.9.- Actividad anticancerígena: .....	10
2.- CROMATOGRAFÍA .....	11
2.1.- Definición .....	11
2.2.-Modos de Separación Cromatográfica Líquida .....	11

2.3.-Los componentes básicos de un Cromatografo Líquido de Alta Resolución.....	13
2.3.1.- Recipientes de fase móvil y sistemas de tratamiento de disolventes.....	14
2.3.2.- Bombas .....	14
2.3.3.- Columnas .....	15
2.3.4.- Detectores .....	15
3.- MÉTODO ANALÍTICO .....	17
4.- VALIDACIÓN .....	17
4.1.- CARACTERÍSTICAS DE VALIDACIÓN .....	18
4.1.1.- Especificidad .....	18
4.1.3.- Precisión .....	19
4.1.4.- Linealidad .....	21
4.1.5.- Rango .....	21
4.1.6.- Límite de cuantificación y límite de detección .....	21
CAPÍTULO II .....	23
MATERIALES Y MÉTODOS .....	23
1. LUGAR DE INVESTIGACIÓN .....	23
2.2. EQUIPOS Y APARATOS .....	24
2.3. REACTIVOS.....	25
2.5. OTROS MATERIALES .....	25
3. METODOS .....	26
3.1.-RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA .....	26
3.2.-TRATAMIENTO DE LA MUESTRA .....	26
4.- ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN .....	26
4.1 FUNDAMENTO.....	26
4.2. PROCEDIMIENTO .....	27
5.- VALIDACIÓN .....	28
5.1.- LINEALIDAD.....	29
5.2.-PRECISIÓN:.....	31
5.3.- EXACTITUD: .....	31
6.- ANÁLISIS DE MUESTRAS .....	32
CAPÍTULO III .....	33

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	33
1.-TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS.....	33
2.-GRADIENTE CROMATOGRÁFICA.....	33
3.-PARÁMETROS PARA LA VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO.....	34
4.-ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS.....	44
CONCLUSIONES.....	81
SUGERENCIAS.....	82
BIBLIOGRAFIA.....	83
ANEXO 1: Certificado de Análisis y de Seguridad.....	87
ANEXO 2: Tablas de Regresión Lineal.....	93
ANEXO 3: Tablas ICH.....	97



## RESUMEN

El presente estudio tuvo como finalidad determinar el contenido de catequinas en productos de *Camelia sinensis* (té verde) por Cromatografía Líquida de Alta Resolución para ayudar a establecer la calidad de estos productos.

Para la evaluación del contenido total de catequinas se utilizaron productos expedidos de diferentes supermercados de la ciudad de Arequipa.

Se procedió a la determinación cuantitativa de éstas en 3 lotes de 6 diferentes marcas por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) previa validación del método analítico para asegurar que los resultados obtenidos sean reproducibles y confiables.

Los parámetros evaluados para la validación fueron: selectividad, linealidad, exactitud y precisión.

El primer parámetro que se evaluó fue la selectividad en donde no se evidenció interferencia de productos de degradación; la linealidad fue determinada mediante el coeficiente de correlación obteniendo valores de 0,9925 para la Epigalocatequina, 0,9935 para la Epicatequina, 0,9958 para la Epigalocatequina galato y 0,9964 para la Epicatequina galato; indicando una buena correlación entre la concentración y el área; la precisión se determinó por medio de la repetibilidad y la precisión intermedia obteniendo en promedio un CV de 1,43% y 1,34% respectivamente; la exactitud se evaluó mediante la recuperación del analito obteniendo un valor promedio cercano al 100%. Los resultados de estos parámetros de desempeño se encuentran dentro de los criterios de aceptación según la ICH demostrando así que el procedimiento analítico propuesto es selectivo, lineal, exacto y preciso.

Luego de validar el método se realizó la determinación del contenido total de catequinas, expresado en mg de catequinas por g de té verde.

Se uso una fase móvil en gradiente de buffer acetato de sodio y acetonitrilo a una longitud de onda de 210 nm.

Se encontró que el producto A tiene un valor de catequinas totales de 99,274 mg/g como promedio, el producto B presenta el nivel más alto con 148,144 mg/g como promedio seguido

por el producto C con 143,482 mg/g. Los 3 lotes del producto D promedian un total de 80,673 mg/g, el producto E tiene como promedio de sus lotes 93,673 mg/g y por último el producto F un valor promedio total de 99,202 mg/g. Estos resultados obtenidos fueron comparados con los hallados por Ji-Qiang Jin et al. y por Jankana B. et al. los cuales obtuvieron cantidades de catequinas totales de 152,9 mg/g para el trabajo realizado en China y valores entre 21,39 y 114,12 mg/g para el trabajo realizado en Tailandia, los cuales van de acorde con los hallados en el presente trabajo para cada una de las 6 marcas.

Palabras clave: catequinas, té verde, Cromatografía Líquida de Alta Resolución, validación.



## ABSTRACT

The purpose of this study was to determine the content of catechin in products of *Camellia sinensis* (green tea) by High Performance Liquid Chromatography to help establish the quality of these products.

Products issued from different supermarkets in the city of Arequipa were used for the evaluation of total catechin content.

It proceeded to the quantitative determination in 3 batches of 6 different brands by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) prior validation of the analytical method to ensure that the results obtained are reliable and reproducible.

The parameters tested for validation were: selectivity, linearity, accuracy and precision.

The first parameter evaluated was the selectivity where no showed interference from degradation products; linearity was determined by the correlation coefficient obtaining values of 0,9925 to the Epigallocatechin, 0,9935 for Epicatechin, 0,9958 for the Epigallocatechin gallate and 0,9964 for Epicatechin gallate; indicating a good correlation between concentration and area; the precision was determined by means of the repeatability and the intermediate precision yielding on average a CV of 1.43% and 1.34%, respectively; accuracy was assessed using the analyte recovery obtained an average value close to 100%. The results of these performance parameters are within the acceptance criteria according to the ICH demonstrating that the proposed analytical procedure is selective, linear, accurate and precise.

After validation of the method was the determination of the total content of catechins, expressed in mg of catechins per g of green tea.

Using a gradient mobile phase of buffer sodium acetate and acetonitrile at a wavelength of 210 nm.

Found that A product has a value of total catechins 99,274 mg/g on average, product B presents the highest level 148,144 mg/g on average, followed by the product C 143,482mg/g. The 3 lots of product D averaging a total of 80,673 mg/g, the product E has as their lots average 93,673 mg/g and finally the product F an average total of 99,202 mg/g. These results were compared with

those found by Jin Ji-Qiang et al. and B. Jankana et al. which obtained quantities of total catechins of 152.9 mg/g for the work done in China and values between 21.39 to 114,12 mg/g for the work done in Thailand, that are in accordance with those found in this study for each of the 6 brands.

Key words: catechins, green tea, High Performance Liquid Chromatography, validation.



## INTRODUCCIÓN

Cada año son producidos y consumidos 3000 millones de kg de té en el mundo aproximadamente, haciéndola la segunda bebida más consumida en el mundo.<sup>1</sup>

El té verde y sus constituyentes muestran una amplia gama de actividades biológicas. Los constituyentes del té verde más importantes son las catequinas, un grupo de polifenoles bioactivos. Estos incluyen epigalocatequina galato (EGCG), epicatequina galato (ECG), epigalocatequina (EGC), epicatequina (EC). La EGCG es uno de los principales componentes del té verde, y su farmacología ha sido intensamente estudiado.<sup>2</sup>

La composición de las catequinas, los ácidos fenólicos y la cafeína en los productos comerciales de té verde varía con las especies, la temporada, las condiciones hortícolas y, en particular, con el grado de fermentación durante el proceso de fabricación. Por lo tanto, es importante establecer un método analítico simple y fiable para la determinación simultánea de los niveles de estos compuestos en muestras de té en el desarrollo de productos de té de alta calidad.<sup>3</sup>

La investigación biomédica ha mostrado una fascinación renovada por las plantas y componentes vegetales (fitoquímicos) que poseen actividad biológica en humanos. Coincidiendo con la emergente evidencia científica de la actividad, ha habido un resurgimiento cultural del interés en las medicinas herbarias y otras prácticas médicas "alternativas" por el público en general. El amplio interés y uso de suplementos herbales y nutricionales ha ayudado a crear una industria multimillonaria. Muchas compañías nutracéuticas ahora comercializan productos herbales que afirman contener una cantidad mínima de uno o más fitoquímicos, lo que la investigación indica que puede mejorar o mantener la salud o tratar la enfermedad.<sup>4</sup>

Por todo esto es necesario contar con un control del producto terminado a través de una metodología confiable que permita cuantificar el principio activo principal del té verde, las catequinas.

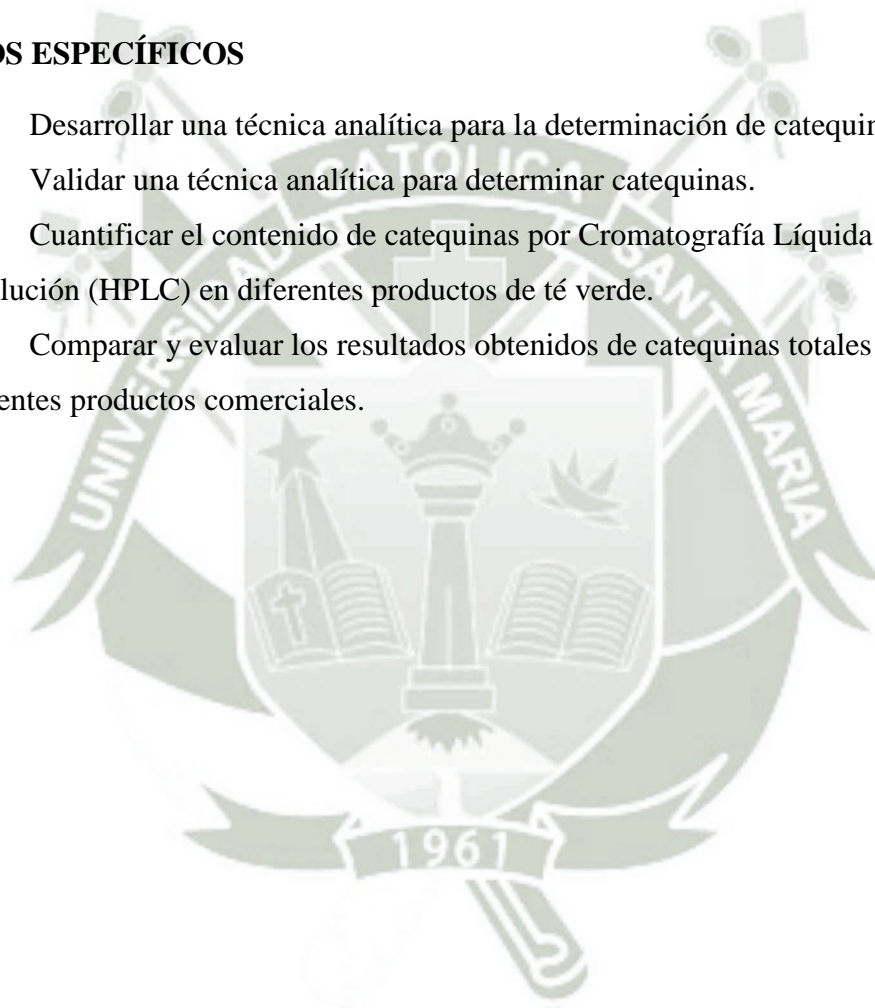
## OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

1. Determinar el contenido de catequinas [(-)-Epicatequina, (-)-Epigallocatequina, (-)-Epicatequina galato, (-)-Epigallocatequina galato] por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) en productos comerciales a base de *Camellia sinensis* (Te verde).

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Desarrollar una técnica analítica para la determinación de catequinas.
2. Validar una técnica analítica para determinar catequinas.
3. Cuantificar el contenido de catequinas por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) en diferentes productos de té verde.
4. Comparar y evaluar los resultados obtenidos de catequinas totales en los diferentes productos comerciales.



## HIPÓTESIS

Dado que la *Camelia sinensis* L. (Té verde) contiene en su composición catequinas: (-)-Epicatequina, (-)-Epigallocatequina, (-)-Epicatequina galato, (-)-Epigallocatequina galato, es probable que estas puedan ser determinadas y cuantificadas por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) en diferentes productos que se comercializan en la ciudad de Arequipa.



## CAPÍTULO I

### MARCO TEÓRICO

#### 1.-Té verde

El té se obtiene de diferentes variedades de una laureácea taxonómicamente clasificada como *Camellia sinensis*, un árbol que puede alcanzar varios metros de altura de la familia *camelliae*, que se produce en zonas de humedad alta y de temperaturas no extremas, pero independientemente de la altura a nivel del mar.<sup>5</sup> Hasta comienzos del siglo XIX, Asia era el único continente que producía té, pero posteriormente su producción se extendió a África, Oceanía, y América del Sur. Si las hojas del té recientemente cosechadas se inactivan por exposición al calor del vapor de agua para evitar la oxidación enzimática, se obtiene el té verde, que es la forma de mayor consumo en los países orientales. Si estas hojas se mantienen enrolladas y se permite su oxidación parcial por efecto de enzimas polifenol oxidasas presentes en las mismas hojas, se obtiene el oolong (o té rojo), una variedad de té que se consume principalmente en China, aunque también en Japón y la India. Si la oxidación se produce durante un período más prolongado, se obtiene el té negro, que es la forma de consumo más difundida en occidente. De esta forma, el té verde, el oolong y el té negro tienen el mismo origen pero diferente modalidad de procesamiento. El grado de oxidación (también llamado de fermentación) será determinante en el tipo de componentes activos del té y en la proporción en que estos se encuentren en el producto final. Aproximadamente un 76-78% del té que se consume en el mundo es negro, un 22% es té verde y menos de un 2% es oolong.<sup>6</sup>

**Morfología:** *Camellia sinensis*, un miembro de la familia *theaceae* es un arbusto o árbol de hoja perenne que alcanza una altura de 10-15 m en la naturaleza y de 0.6-1.5 m cuando se cultiva. Las hojas son de color verde claro, cortas aplanadas, coriáceas, alternas, lanceoladas, de margen dentado, glabras o pubescentes por debajo, con una longitud variable de 5 a 30 cm y unos 4 cm de ancho.<sup>23</sup>

Las hojas maduras son de color verde brillante, lisas y coriáceas, mientras que las hojas jóvenes son pubescentes. Las flores son blancas fragantes, de 2,5 a 4 cm de diámetro, se encuentran en

solitario o en racimos de dos o cuatro. Las flores llevan numerosos estambres con antera amarilla y producen cápsulas de color rojo parduzco. La fruta es una cápsula triangular aplanada, lisa, redondeada, con una semilla solitaria del tamaño de una tuerca pequeña en cada una.<sup>24,25</sup>



Figura 1: *Camellia sinensis*

### 1.1.- Clasificación Taxonómica

Reino: *Plantae*

Subreino: *Tracheobionta*

Infrareino: *Streptophyta*

Superdivisión: *Spermatophyta*

División: *Magneolophyta*

Clase: *Magnoliopsida*

Subclase: *Dilleniidae*

Orden: *Theales*

Familia: *Theaceae*

Género: *Camellia* L.

Especie: *Camellia sinensis* (L.) Kuntze<sup>7</sup>

### 1.2.- Composición del Té Verde

Las hojas frescas del árbol del té contienen una alta cantidad de flavanoles (derivados de los flavonoides) de estructura monomérica, conocidos como catequinas, y también podemos encontrar formas polimerizadas de estas.<sup>8</sup> Las principales catequinas presentes en el té verde son la epicatequina (EC), la epigalocatequina (EGC), la epicatequina galato (ECG), y la

epigallocatequina galato (EGCG), siendo esta última la catequina más abundante y la que tiene mayor interés e investigación.<sup>9</sup>

La composición química del té verde varía con el clima, la estación, las prácticas de horticultura y con la edad de la hoja. Los datos mostrados en la Tabla 1 muestran la composición de un té representativo pero las variaciones pueden ser considerables.<sup>10</sup>

Tabla 1: Composición de las hojas frescas del Té Verde<sup>10</sup>

Polifenoles	36	Carbohidratos	25
Metil xantinas	3.5	Proteínas	15
Aminoácidos	4	Lignina	6.5
Ácidos orgánicos	1.5	Lípidos	2
Carotenoides	<0.1	Clorofila	0.5
Compuestos volátiles	<0.1	Cenizas	5

Nota: Composición medida en % del peso seco

Seis de catequinas aparecen en cantidades considerables en las hojas frescas. Las estructuras simples de las catequinas son mostradas en la Fig. 2.

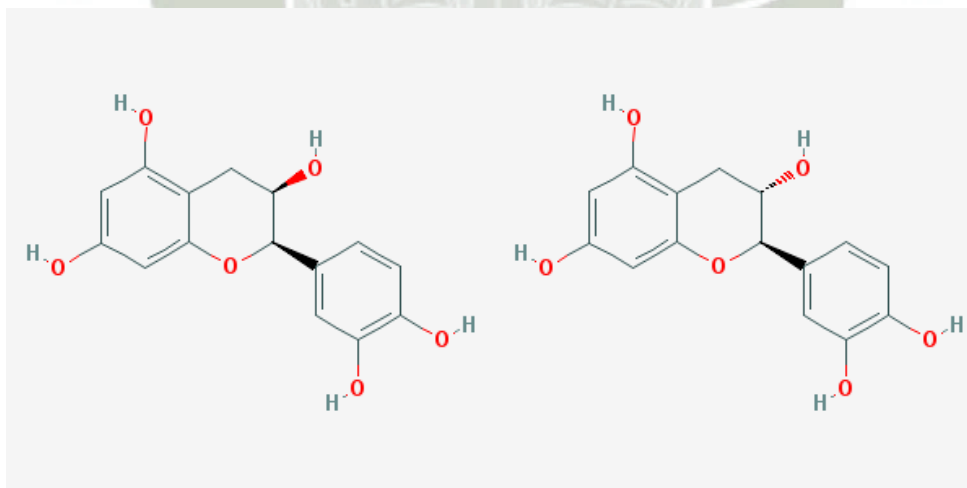


Figura 2: (-)-Catequina y (-)-Epicatequina

Como vemos en la Fig. 2, dos configuraciones son posibles pero el mayor porcentaje de catequinas está en la forma llamada "epi-". Cuando tres grupos hidroxilo están presentes en el anillo "B", las sustancias se conocen como galocatequinas como se muestra en la Fig. 3.

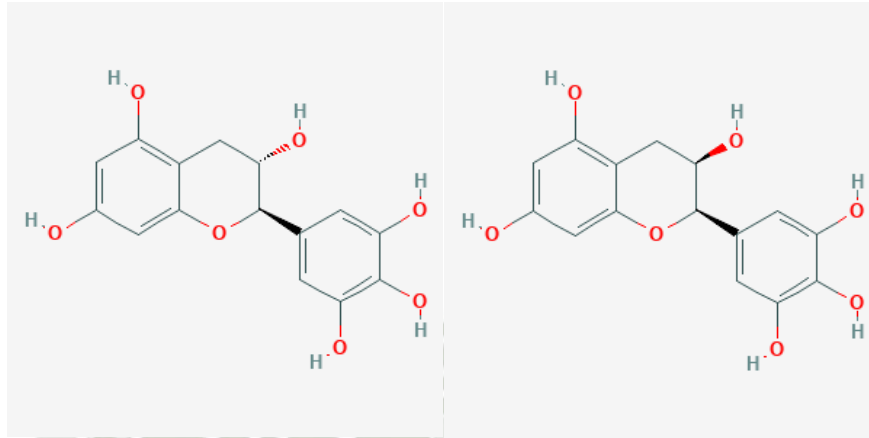


Figura 3: (+)-Galocatequina y (-)-Epigalocatequina

Otra variación resulta de la esterificación del grupo OH en el anillo de pirano con ácido gálico, estos son llamados galatos de catequina y se ilustran en la Fig. 4. Las principales catequinas están presentes a altas concentraciones en la hoja de té joven, como se muestra en la Tabla 2.<sup>10</sup>

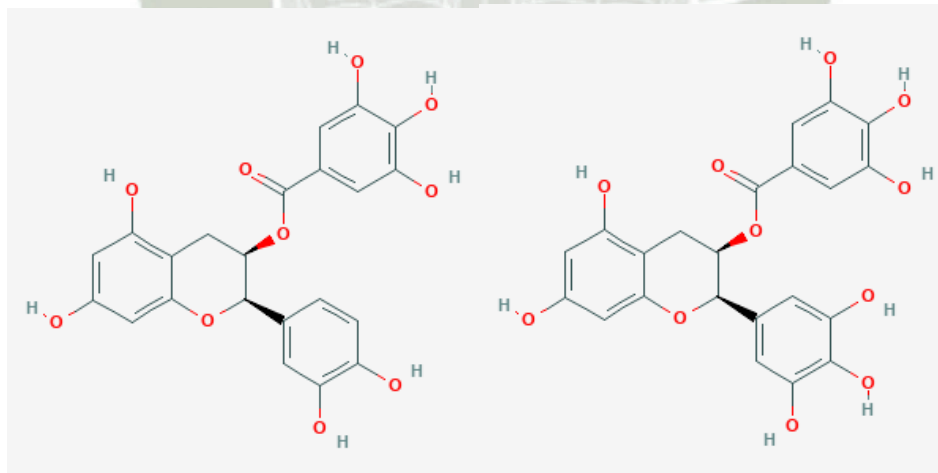


Figura 4: (-)-Epicatequina galato y (-)-Epigalocatequina galato

Tabla 2: Principales catequinas de las hojas frescas<sup>10</sup>

(+)-catequina	1-2	(+)-galocatequina	1-3
(-)-epicatequina	1-3	(-)-epigalocatequina	3-6
(-)-epicatequina galato	3-6	(-)-epigalocatequina galato	7-13

Nota: Catequinas fueron medidas en % peso seco

Las catequinas son compuestos incoloros, astringentes y solubles en agua. Son fácilmente oxidables, aunque sus potenciales de oxidación varían. Esta propiedad ha sido explotada a través de su uso como antioxidantes alimentarios. Retrasan la rancidez en grasas y aceites mediante la supresión de la actividad del radical libre peróxido provocada por la oxidación aeróbica.

Basándose en las concentraciones requeridas para una inhibición del 50% de la oxidación, el efecto inhibitorio de algunas catequinas de la hoja de té sobre la oxidación aeróbica del ácido linoleico es similar al del butilhidroxianisol.<sup>11</sup>

En sistemas biológicos el oxígeno es un aceptor importante de electrones, conduciendo a la formación de oxígeno activo y radicales libres de hidroxilo. Los efectos neutralizantes de los extractos de té verde y de las fracciones de polifenoles del té verde son superiores a los del ácido ascórbico (vitamina C) y tocoferol (vitamina E) con respecto a algunos radicales de oxígeno activos, pero son menos pronunciados con los radicales libres de hidroxilo.<sup>12</sup> Los efectos dependen del sistema de radicales libres en estudio. Las galocatequinas y los galatos de catequina presentan las propiedades de supresión radical más fuertes.<sup>13</sup>

### 1.3.- Biotransformación

Las catequinas esta sujetas a varias vías de biotransformación que incluyen la metilación, glucoronización, sulfatación y metabolismo de la fisión del anillo.<sup>14</sup>

Estudios recientes en la enzimología de metilación de EGC y EGCG (Lambert and Yang, 2003a) han mostrado que EGC es metilada a la forma de 4'-O-metil(-)-EGC y EGCG es metilada a la forma de 4'-O-metil(-)-EGCG y 4',4'-O-dimetil(-)-EGCG.<sup>15</sup>

También fue reportados estudios de glucoronización de EGCG y EGC (Lambert and Yang, 2003b) en los que EGCG-4"-O-glucurónido es el mayor metabolito formado en microsomas de humanos, ratones y ratas. La mejor eficiencia catalítica para la glucoronización está en los

microsomias intestinales de los ratones seguido en orden decreciente por el hígado del ratón, hígado humano, hígado de rata e intestino delgado de rata.<sup>16</sup>

Como se indica en un estudio (Vaidyanathan, and Walle, 2002), la EC se somete a sulfatación catalizada en el intestino de humanos y ratas, también en el citosol del hígado siendo el hígado del humano el más eficiente.<sup>17</sup>

Las catequinas del té se someten a metabolismo en el intestino para formar los productos de la fisión del anillo 5-(3',4',5-trihidroxifenil)- $\gamma$ -valerolactona, 5-(3',4'-dihidroxifenil)- $\gamma$ -valerolactona y 5-(3',5'-dihidroxifenil)- $\gamma$ -valerolactona. Estos metabolitos intermediarios son desglosados por la flora intestinal a ácidos fenilacéticos y fenilpropiónicos (Li et al., 2000).<sup>18</sup>

#### 1.4.- Farmacocinética

El efecto potencial sobre la salud de las catequinas depende de la cantidad consumida y de su biodisponibilidad. Después de la administración oral de las catequinas del té a ratas, las cuatro catequinas principales (EC, ECG, EGC y EGCG) fueron identificadas en la vena porta, indicando que las catequinas del te son absorbidas intestinalmente (Okushio et al., 1996).<sup>19</sup>

Las concentraciones plasmáticas de EGCG son muchas más bajas que las de EGC o EC en ratas a las que se les dio una solución al 0.6% de polifenoles del té verde (PTV) en el agua que beben en un periodo de 28 días, aunque la proporción de EGCG a EGC fue 5:1 en la solución de PTV. Los niveles plasmáticos de EGCG fueron muchos más altos que los de EGC y EC cuando la misma solución de PTV fue dada a ratones (Kim et al., 2000).<sup>20</sup>

En un estudio en humanos (Higdon and Frei, 2003) que comparo la farmacocinética de dosis equimolares de EGC, ECG, y EGCG en 10 voluntarios saludables, las concentraciones plasmáticas máximas promedio después de una sola dosis de 1.5 mmol fueron 5.0  $\mu\text{mol/L}$  para EGC, 3.1  $\mu\text{mol/L}$  para ECG, y 1.3  $\mu\text{mol/L}$  para EGCG. Después de 24 horas las concentraciones de EGC y EGCG en el plasma volvieron a sus niveles normales, pero la concentración de ECG se mantuvo elevada.<sup>21</sup>

Cantidades apreciables de EGC y EC fueron encontradas en el esófago, intestino grueso, riñón, vejiga, pulmón y próstata; las concentraciones de EGC y EC fueron relativamente bajas en hígado, bazo, corazón, y tiroides; los niveles de EGCG fueron altos en el esófago e intestino grueso, pero bajos en otros órganos, cuando se administró una solución al 0.6% de PTV a ratas por un periodo de 28 días (Kim et al., 2000).<sup>20</sup>

Estudios en ratas indican que la EGCG es excretada mayormente a través de la bilis, mientras que EGC y EC son excretados a través de la orina y bilis, lo que indica que las catequinas son metabolizadas rápida y ampliamente. Se ha demostrado un  $t_{max}$  de 1.5 a 2.5 h en el plasma después del consumo de té verde descafeinado (1.5, 3.0, 4.5 g). Estos niveles decrecen y no fueron detectables a las 24h. Aunque no se detectó EGCG en la orina, 90% del total de EC y EGC fueron excretados en la orina en 8 h. La biodisponibilidad de EGCG se encontró que era menor que la de EGC (Yang et al., 1998).<sup>22</sup>

## **1.5.- Beneficios a la salud del té verde**

### **1.5.1.- Actividad antifúngica:**

Se ha investigado la actividad antifúngica de las hojas de té verde en tres diferentes períodos de cosecha (mayo, julio y septiembre) contra varios hongos (*Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* y *Candida dubliensis*) (Aladaq et al., 2009). Además, los flavonoides basados en catequinas en hojas de té verde como epigalocatequina-3-galato (EGCG), epicatequina-3-galato (ECG), epigalocatequina (EGC) y epicatequina (EC). Todo el extracto de metanol de muestras de té verde mostró una actividad antifúngica de amplio espectro contra todas las especies de *Candida* en bioensayos de microdilución. Sin embargo, se observó una actividad máxima del extracto de metanol (> 17 mm de zona de inhibición) contra *Candida albicans* a la 3ª época de cosecha.<sup>26</sup>

### **1.5.2.- Actividad antiinflamatoria y protección de la piel:**

El tratamiento tópico o el consumo oral de polifenoles de té verde inhibe la tumorigénesis cutánea inducida por radiación química o carcinogénica en diferentes modelos animales. Los estudios han demostrado que el extracto de té verde también posee actividad antiinflamatoria. Estas propiedades antiinflamatorias y anticarcinógenas del té verde se deben a sus constituyentes polifenólicos presentes en el mismo. El componente principal y más quimiopreventivo del té verde responsable de estos efectos bioquímicos o farmacológicos es (-) epigalocatequina-3-galato (EGCG). Se ha demostrado que el tratamiento de los polifenoles del té verde sobre la piel modula las vías bioquímicas implicadas en las respuestas inflamatorias, la proliferación celular y las respuestas de los promotores de tumores químicos, así como los marcadores inflamatorios inducidos por luz ultravioleta (UV) de la inflamación de la piel. El tratamiento tópico con EGCG

en piel de ratón también da como resultado la prevención de la supresión inmune inducida por UVB y el estrés oxidativo.<sup>27</sup>

### **1.5.3.- Actividad antiviral:**

Las catequinas (-) - epigallocatequina galato (EGCG), (-) - epicatequina galato (ECG) y (-) - epigallocatequina (EGC) del té verde se evaluaron por su capacidad para inhibir la replicación del virus de la gripe en cultivo celular y para su potencial efecto virucida directo. Entre los compuestos de ensayo, se encontró que el EGCG y el ECG eran potentes inhibidores de la replicación del virus de la gripe en el cultivo de células MDCK (línea de células de riñón canino Madin-Darby) y este efecto se observó en todos los subtipos de virus de influenza ensayados incluyendo A / H1N1, A / H3N2 y virus B.<sup>28,29</sup>

### **1.5.4.- Actividad antidiabética:**

Se encontró que una solución acuosa de polifenoles de té verde (PTV) inhibía la peroxidación de lípidos, eliminaba los radicales hidroxilo y superóxido in vitro. La administración de PTV (500 mg / kg por peso) a ratas normales aumentó significativamente la tolerancia a la glucosa ( $P < 0,005$ ) a los 60 min. También se encontró que los PTV reducen el nivel de glucosa en suero en ratas diabéticas inducidas con aloxano significativamente a una dosis de 100 mg / kg peso vivo. La administración diaria continuada (15 días) del extracto 50, 100 mg / kg peso vivo produjo una reducción del 29 y 44% en el nivel elevado de glucosa en suero producido por la administración de aloxano. Las enzimas hepáticas y renales elevadas producidas por aloxano se encontraron reducidas ( $P < 0,001$ ) por los PTV. Los niveles séricos de la peroxidación lipídica que se incrementaron con aloxano y se redujeron significativamente ( $P < 0,001$ ) mediante la administración de 100 mg / kg peso vivo de PTV. La disminución del glucógeno hepático, después de la administración de aloxano, mostró un aumento significativo ( $P < 0,001$ ) después del tratamiento con los PTV. El grupo tratado con PTV mostró un potencial antioxidante incrementado como se observa a partir de mejoras en los niveles de superóxido dismutasa y glutatión. Sin embargo, los niveles de catalasa, peroxidación lipídica y glutatión peroxidasa se mantuvieron sin cambios. Estos resultados indican que las alteraciones en el sistema de utilización de glucosa y el estado de oxidación en ratas aumentadas por aloxano fueron parcialmente revertidas por la administración de la glutamato-piruvato transaminasa.<sup>30</sup>

### **1.5.5.- Actividad hepatoprotectora:**

Se realizó un estudio para examinar el efecto inhibitor del té verde sobre la actividad hepatoprotectora inducida por cloruro de cadmio en el hígado. En las ratas inyectadas con cloruro de cadmio, las actividades de glutamato-oxalacetato transaminasa sérica (GOTS), glutamato-piruvato transaminasa sérica (GPTS), lactato deshidrogenasa (LDH),  $\gamma$ -glutamyl transferasa (GGT) aumentaron significativamente ( $p < 0,05$ ) cuando fueron comparados con los valores de ratas control. Las ratas administradas con extracto de té verde y cloruro de cadmio mostraron niveles significativamente disminuidos ( $p < 0,05$ ) de GOTS, GPTS, LDH y GGT en suero.<sup>31</sup>

### **1.5.6.- Actividad antimicrobiana:**

Los extractos de hojas de la planta de té contienen componentes polifenólicos con actividad contra un amplio espectro de microbios. Los estudios realizados en los últimos 20 años han demostrado que las catequinas del té verde, en particular (-) epigallocatequina galato (EGCG) y (-) – epicatequina galato (ECG), pueden inhibir el crecimiento de una amplia gama de bacterias Gram-positivas y bacterias Gram-negativas con potencia moderada. Existe evidencia de que estas moléculas pueden ser útiles en el control de infecciones orales comunes, tales como caries dental y enfermedad periodontal. Las concentraciones subinhibitorias de EGCG y ECG pueden suprimir la expresión de factores de virulencia bacteriana y pueden revertir la resistencia del patógeno oportunista *Staphylococcus aureus* a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos. Por ejemplo, las concentraciones relativamente bajas de ECG pueden sensibilizar los aislamientos clínicos de *S. aureus* resistentes a la meticilina (SARM) a niveles de oxacilina que pueden alcanzarse fácilmente en la práctica clínica. Los galatos de catequina como el ECG se intercalan en bicapas fosfolipídicas y es probable que afecten tanto la virulencia como la resistencia a los antibióticos al perturbar la función de los procesos clave asociados con la membrana citoplasmática bacteriana.<sup>32</sup>

### **1.5.7.- Actividad antioxidante:**

La actividad antioxidante de los extractos de la planta y el estándar se evaluó sobre la base del efecto de barrido de radicales de la actividad de radicales libres de 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH) por el método modificado.<sup>33,34</sup> Las soluciones de trabajo diluidas de los extractos de ensayo se prepararon en metanol. Se utilizó ácido ascórbico de serie en una solución de 1-100  $\mu\text{g}$  / ml. Se preparó 0,002% de DPPH en metanol y se mezcló 1 ml de esta solución con 1 ml de

solución de muestra y solución estándar por separado. Estas mezclas de solución se mantuvieron en oscuridad durante 30 min y se midió la densidad óptica a 517 nm usando un espectrofotómetro. Se utilizó metanol (1 ml) con solución de DPPH (0,002%, 1 ml) como blanco. Los resultados indican que la actividad antioxidante del extracto crudo de té verde es superior a la del ácido ascórbico. La actividad antioxidante mostró que el porcentaje de inhibición de 10 µg/ml de té verde fue de 69,4%, que es comparable con la actividad antioxidante estándar del ácido ascórbico (55,8%).<sup>35,36</sup>

### **1.5.8.- Actividad antiobesidad:**

Las catequinas del té verde (CTV) son compuestos polifenólicos presentes en las hojas secas no fermentadas del té verde. Los resultados de una serie de ensayos aleatorizados de intervención controlada han demostrado que el consumo de CTV (270 mg a 1200 mg / día) puede reducir el peso corporal y la grasa. Existen varios mecanismos propuestos por los cuales las CTV puede influir en el peso corporal y la composición. La hipótesis predominante es que las CTV influye en la actividad del sistema nervioso simpático (SNS), aumentando el gasto energético y promoviendo la oxidación de la grasa. La cafeína, naturalmente presente en el té verde, también influye en la actividad del SNS, y puede actuar sinérgicamente con las CTV para aumentar el gasto energético y la oxidación de la grasa. Otros mecanismos potenciales incluyen modificaciones en el apetito, regulación positiva de las enzimas involucradas en la oxidación de la grasa hepática y disminución de la absorción de nutrientes.<sup>37</sup>

### **1.5.9.- Actividad anticancerígena:**

El aumento de la evidencia sugiere que la epigallocatequina galato, la principal catequina del té verde, es fundamental para suprimir el crecimiento de las células cancerosas en diversos modelos de tumores.<sup>38,39</sup> El cáncer de próstata es la neoplasia maligna más recientemente diagnosticada y la segunda causa de muerte relacionada con el cáncer, pero este cáncer también puede ser curado con el té verde.<sup>40,41</sup> Se sabe que los polifenoles del té exhiben citotoxicidad hacia diversas líneas celulares tumorales así como la inhibición del crecimiento que está acompañada por la detención del ciclo celular. Por lo tanto, los métodos que prometen realzar el potencial supresor del té verde tienen la relevancia clínica más alta.<sup>42</sup> Las células de cáncer de cuello uterino humano, HeLa, la primera línea celular continua de cáncer, representan un modelo principal en la investigación del cáncer. El té verde inhibió su crecimiento, mientras que su exposición a niveles moderados de luz

láser resultó en un efecto opuesto. Las células HeLa fueron suplementadas con té verde, irradiadas con luz láser moderadamente intensa (670 nm) durante 1 min, y se incubaron durante 52 h. Una extraordinaria inhibición de las células HeLa por una combinación de té verde y luz roja. Una inhibición del 1,460%, en comparación con las muestras no irradiadas. Este resultado recibe relevancia clínica de un estudio reciente en el que la epigallocatequina galato suprimió el crecimiento del melanoma in vivo.<sup>43</sup>

## **2.- CROMATOGRAFÍA**

### **2.1.- Definición**

La cromatografía es un proceso de separación en el que la mezcla de muestras se distribuye entre dos fases en el lecho cromatográfico (plana o en columna). Una fase es estacionaria mientras que la otra pasa a través del lecho cromatográfico. La fase estacionaria es un material sólido, poroso, tensioactivo en forma de pequeñas partículas o una fina película de líquido recubierta sobre un soporte sólido o una pared de columna. La fase móvil es un gas o un líquido. Si se utiliza un gas, el proceso se conoce como cromatografía de gases; La fase móvil es siempre líquida en todos los tipos de cromatografía líquida, incluyendo la variedad de capa fina.<sup>44</sup>

### **2.2.-Modos de Separación Cromatográfica Líquida<sup>44</sup>**

#### **Cromatografía de Adsorción**

Se conoce el principio de cromatografía de adsorción (cromatografía de fase normal) a partir de la columna clásica y de la cromatografía en capa fina. Como fase estacionaria se emplea un material relativamente polar con una elevada superficie específica, siendo la sílice la más popular, pero también se utilizan a menudo alúmina y óxido de magnesio. La fase móvil es relativamente no polar (heptano a tetrahidrofurano). Las diferentes extensiones a las que se adsorben los diversos tipos de moléculas de la mezcla en la fase estacionaria proporcionan el efecto de separación. Un disolvente no polar tal como hexano eluye más lentamente que un disolvente medio-polar tal como éter.

#### **Cromatografía en fase inversa**

Lo contrario de lo anterior se aplica:

- (A) La fase estacionaria es muy no polar.

- (B) La fase móvil es relativamente polar (agua a tetrahidrofurano).
- (C) Un disolvente polar tal como agua eluye más lentamente que un disolvente menos polar tal como acetonitrilo.

### **Cromatografía con Fases Adheridas Químicamente**

La fase estacionaria está unida covalentemente a su soporte por reacción química. Se puede producir un gran número de fases estacionarias mediante la elección cuidadosa de los reactantes adecuados. El método de fase inversa descrito anteriormente es el caso especial más importante de la cromatografía de fase enlazada químicamente.

### **Cromatografía de intercambio de iones**

La fase estacionaria contiene grupos iónicos (por ejemplo,  $\text{NR}_3^+$  o  $\text{SO}_3^-$ ) que interactúan con los grupos iónicos de las moléculas de la muestra. El método es adecuado para separar por ejemplo aminoácidos, productos metabólicos iónicos e iones orgánicos.

### **Cromatografía de pares de iones**

La cromatografía de pares de iones puede utilizarse también para la separación de compuestos iónicos y superar ciertos problemas inherentes al método de intercambio iónico. Las moléculas iónicas simples son "enmascaradas" por un contraión adecuado. Las principales ventajas son, en primer lugar, que se puede utilizar el sistema de fase inversa ampliamente disponible, por lo que no se necesita intercambiador de iones y, en segundo lugar, los ácidos, bases y productos neutros pueden ser analizados simultáneamente.

### **Cromatografía iónica**

La cromatografía iónica se desarrolló como un medio para separar los iones de ácidos y bases fuertes (por ejemplo,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ). Se trata de un caso especial de cromatografía de intercambio iónico, pero el equipo utilizado es diferente.

### **Cromatografía de exclusión de tamaños**

Este modo puede subdividirse en cromatografía de permeación de gel (con disolventes orgánicos) y cromatografía de filtración en gel (con soluciones acuosas). La cromatografía de exclusión de tamaño separa las moléculas por tamaño, es decir según la masa molecular. Las moléculas más grandes se eluyen primero y las moléculas más pequeñas duran. Este es el mejor método para elegir cuando una mezcla contiene compuestos con una diferencia de masa molecular de al menos 10%.

### Cromatografía de afinidad

En este caso, las interacciones bioquímicas altamente específicas proporcionan los medios de separación. La fase estacionaria contiene grupos específicos de moléculas que solo pueden adsorber la muestra si se satisfacen ciertas condiciones estéricas y relacionadas con la carga. La cromatografía de afinidad puede usarse para aislar proteínas (enzimas, así como también proteínas estructurales), lípidos, etc., a partir de mezclas complejas sin implicar grandes gastos.

### 2.3.-Los componentes básicos de un Cromatografo Líquido de Alta Resolución

Un instrumento HPLC requiere una bomba de alta presión y un suministro de fase móvil, una columna llena de una fase estacionaria de alta eficiencia, una unidad de inyección para introducir nuestras muestras en la columna, un detector en línea y algún método de visualización de la señal del detector. La figura 5 es un diagrama de bloques que muestra la forma en que estos diferentes componentes están dispuestos para formar un HPLC.<sup>45</sup>

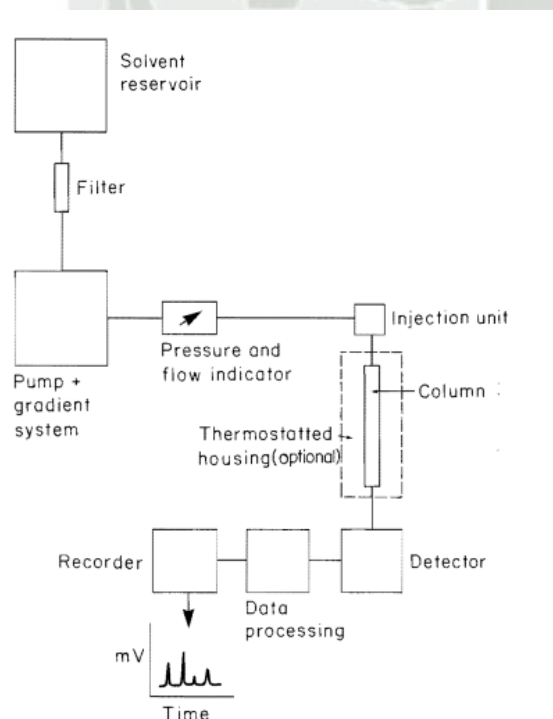


Figura 5: Diagrama de bloques de un HPLC<sup>45</sup>

Cualquier parte del sistema que esté en contacto con la fase móvil debe estar hecha de materiales que no sean atacados por ninguno de los disolventes que se vayan a utilizar. Las partes mojadas se hacen generalmente del acero inoxidable o de politetrafluoroetileno (PTFE) aunque otros materiales, tales como zafiro, rubí, o cerámica se utilicen a veces. Todo en el lado de alta presión, es decir, desde la salida de la bomba hasta el extremo de la columna, debe ser lo suficientemente fuerte para soportar las presiones implicadas.<sup>45</sup>

Otra consideración de diseño muy importante es que entre el punto en el que se introduce la muestra y el punto en el que se detecta, el volumen muerto en el equipo debe mantenerse al mínimo. Volumen muerto significa cualquier espacio vacío o volumen desocupado. La presencia de demasiado volumen muerto puede conducir a pérdidas desastrosas en la. Claramente habrá algún volumen muerto en la propia columna, que será el espacio que no está ocupado por las partículas de fase estacionaria.<sup>45</sup>

### **2.3.1.- Recipientes de fase móvil y sistemas de tratamiento de disolventes**<sup>46</sup>

Los aparatos de HPLC modernos están equipados con uno o más recipientes de vidrio, cada uno de los cuales contiene 500mL o más de disolvente. Frecuentemente incluyen accesorios para eliminar los gases disueltos y partículas en suspensión de los líquidos. De ellos, los primeros producen burbujas en la columna y pueden causar ensanchamiento de la banda; además, tanto las burbujas como las partículas interfieren en el rendimiento de muchos detectores.

### **2.3.2.- Bombas**<sup>46</sup>

Los requisitos de las bombas para cromatografía líquida incluyen: (1) capacidad para generar presiones de hasta 6000 psi; (2) salida libre de pulsos; (3) velocidades de flujo de 0.1-10mL/min; (4) reproducibilidad relativa de los flujos de 0.5% o mejor, y (5) resistencia a la corrosión por diversos disolventes.

Existen tres tipos de bombas: las de tipo de jeringa impulsada con tornillo, las bombas de vaivén y oscilantes y las bombas neumáticas o de presión constante. Las de tipo jeringa producen una salida no pulsada cuya velocidad de flujo se controla fácilmente; pero tienen una baja capacidad y no resultan apropiadas cuando se requieren cambios de disolventes. El tipo de bomba más

utilizado es el oscilante. Este dispositivo consiste en una pequeña cámara cilíndrica que se llena y se vacía con el movimiento oscilante del pistón. El movimiento de la bomba produce un flujo pulsado que debe atenuarse después. Entre las ventajas de las bombas oscilantes cabe mencionar un volumen interno pequeño, una presión de salida alta, su fácil adaptación a la elución en gradiente y una velocidad de flujo constante, que es en gran parte independiente de la compresión de la columna y la viscosidad del disolvente. Algunos instrumentos emplean la bomba neumática, cuya forma más sencilla consiste en un recipiente plegable que contiene un disolvente que puede presurizarse con un gas comprimido. Las bombas de este tipo son sencillas, de bajo costo y no generan pulsos, pero tienen una capacidad y una salida de presión limitadas, y su velocidad de bombeo depende de la viscosidad del disolvente. Además, no son adaptables a la elución en gradiente.

### 2.3.3.- Columnas <sup>46</sup>

Las columnas de cromatografía líquida usualmente se elaboran con tubos de acero inoxidable, si bien a veces se utilizan los tubos de vidrio o Tygon para aplicaciones de baja presión. La mayoría de las columnas tienen una longitud de 10-30 cm y diámetro interno de 2-5 mm. Los empaquetamientos de las columnas suelen ser de partículas de 3-10  $\mu\text{m}$ . Las columnas de este tipo proporcionan 40 000-60 000 platos por metro.

El empaquetamiento más común en la cromatografía líquida se prepara con partículas de sílice, que se sintetizan por aglomeración de partículas submicrónicas de sílice en condiciones que producen partículas más grandes y de diámetro muy uniforme. Las partículas resultantes suelen cubrirse con películas orgánicas finas, que se enlazan química o físicamente con la superficie. Otros materiales de empaquetamiento son las partículas de alúmina, partículas de polímeros porosos o resinas de intercambio iónico.

### 2.3.4.- Detectores <sup>45</sup>

La función del detector en HPLC es monitorear la fase móvil que emerge de la columna. La salida del detector es una señal eléctrica que es proporcional a alguna propiedad de la fase móvil y/o de los solutos. El índice de refracción, por ejemplo, es una propiedad tanto de los solutos como de la fase móvil. Un detector que mide una propiedad de este tipo se denomina detector de

propiedades en general. Alternativamente, si la propiedad está poseída esencialmente por el soluto, tal como absorción de radiación UV/visible o actividad electroquímica, el detector se denomina detector de propiedad de soluto. Un gran número de dispositivos, algunos de ellos bastante complicados, han sido utilizados como detectores de HPLC, pero sólo unos pocos se han vuelto generalmente útiles. Es útil tener una idea del tipo de características que se requieren de un detector.

Las características importantes son:

- (A) sensibilidad
- B) linealidad
- C) respuesta universal o selectiva
- (D) respuesta predecible, no afectada por cambios en las condiciones
- (E) bajo volumen muerto
- (f) no destructivo
- (g) barato, fiable y fácil de usar.

Ningún detector posee todos estos, y desafortunadamente las propiedades no son independientes entre sí, de modo que mejorar un detector en un aspecto puede empeorarlo en otro.

- **Detectores de Absorción UV**

Estos son, con mucho, los detectores más populares en HPLC. El principio es que la fase móvil de la columna se hace pasar a través de una celda de flujo pequeña retenida en el haz de radiación de un fotómetro u espectrofotómetro uv/visible. Estos detectores son selectivos en el sentido de que sólo detectarán los solutos que absorben la radiación UV (o visible). Tales solutos incluyen alquenos, compuestos aromáticos y compuestos que tienen enlaces múltiples entre C y O, N o S. La fase móvil que usamos, por otra parte, debe absorber poca o ninguna radiación.

La absorción de radiación por solutos en función de la concentración se describe por la ley de Beer-Lambert:

Se dispone de detectores fijos y variables de longitud de onda uv/visible. Los tipos variables utilizan una lámpara de deuterio y/o de tungsteno como fuente de radiación y pueden funcionar entre aproximadamente 190 y 700 nm. Tendrán un número de rangos de absorbancia. Los detectores fijos de longitud de onda pueden funcionar a 254 nm, 280 nm o en otras longitudes de onda.

En la detección de absorbancia en UV, a menudo es útil ser capaz de detectar diferentes picos en el cromatograma a diferentes longitudes de onda. Esto puede deberse a que ciertos solutos tienen sólo una pequeña absorptividad a la longitud de onda seleccionada. En otras ocasiones, se puede usar un cambio de longitud de onda para eliminar los picos no deseados. También es útil poder registrar el espectro de cada componente; Esto puede indicar la longitud de onda de detección óptima o la combinación de longitudes de onda y, en ocasiones, puede utilizarse para identificar los picos.

En un detector multicanal o de diodos, la radiación policromática se hace pasar a través de la célula de flujo y la radiación emergente es difractada por una rejilla de modo que cae sobre una serie de fotodiodos. Cada fotodiodo recibe una banda de longitud de onda estrecha diferente. La matriz completa de diodos es escaneada por un microprocesador muchas veces por segundo. Los espectros resultantes pueden visualizarse en la pantalla y/o almacenarse en el instrumento para su posterior transferencia a una copia impresa, por ejemplo, una impresora, al final de la operación cromatográfica.

### **3.- MÉTODO ANALÍTICO**

El Método analítico es aquel método de investigación que consiste en la desmembración de un todo, descomponiéndolo en sus partes o elementos para observar las causas, la naturaleza y los efectos. El análisis es la observación y examen de un hecho en particular. Es necesario conocer la naturaleza del fenómeno y objeto que se estudia para comprender su esencia. Este método nos permite conocer más del objeto de estudio, con lo cual se puede: explicar, hacer analogías, comprender mejor su comportamiento y establecer nuevas teorías.<sup>47</sup>

### **4.- VALIDACIÓN**

La validación es el proceso de recolección de evidencia documentada de que el método actúa de acuerdo con el propósito previsto. Las características de validación y los criterios de aceptación que deben aplicarse en la validación de los métodos de HPLC deben cumplir con las directrices internacionales sobre validación de métodos. "La validación es el proceso mediante el cual se establece, por estudios de laboratorio, que las características de rendimiento del método cumplen los requisitos para la aplicación prevista". La elección de las características a evaluar depende del propósito del método analítico y de la etapa de desarrollo del producto que el método analítico

está apoyando. Se reconoce que los métodos son a menudo evolutivos y que los métodos en el desarrollo temprano generalmente requerirán una validación menos extensa que los métodos en el desarrollo final. Para un buen desempeño, es importante que el método analítico documente claramente los detalles de la realización del análisis. Debe describir en detalle los pasos necesarios para realizar la prueba analítica. Esto puede incluir, entre otros, el principio del método de ensayo, la preparación de muestras, las normas de referencia y cualquier reactivo o solución, el uso y las especificaciones funcionales requeridas del aparato, la generación de la curva de calibración, pruebas de idoneidad del sistema (SSTs), y el uso de las fórmulas para los cálculos.<sup>48</sup>

#### **4.1.- CARACTERÍSTICAS DE VALIDACIÓN**

Seguidamente se definen las características de validación requeridas por las guías normativas vigentes a ser examinadas durante la validación. Cuando sea apropiado, se proporciona una discusión junto con los típicos criterios de aceptación para las diferentes características de validación.

##### **4.1.1.- Especificidad**

La especificidad es la capacidad de evaluar inequívocamente el analito en presencia de componentes, que se puede esperar que estén presentes. Típicamente, éstas pueden incluir impurezas, productos de degradación, matriz, etc. La falta de especificidad de un método analítico individual puede ser compensada por un método analítico adicional. Los criterios de aceptación de la especificidad comprenden muchos aspectos de calidad de la separación cromatográfica. Los picos en blanco están preferentemente ausentes o, si están presentes, no deben interferir con otros picos de interés.

Cuando no se cumplen los criterios de especificidad, esto indica a menudo que el método no está suficientemente desarrollado. Como consecuencia, es probable que los criterios de precisión, precisión y linealidad también no se cumplan.

##### **4.1.2.- Exactitud**

La exactitud de un método analítico expresa la proximidad de acuerdo entre el valor obtenido (por experimentos prácticos) y el valor que se acepta como un valor verdadero convencional o

como un valor de referencia aceptado. La exactitud se expresa como % de recuperación. Normalmente, se solicita que se prueben tres repeticiones por nivel a un mínimo de tres niveles de concentración a lo largo del intervalo experimental especificado. Los criterios de aceptación se fijan para el intervalo de ensayo del compuesto principal. Para el intervalo de ensayo de los métodos de la sustancia de la droga (DS) (80,0-120,0%), esto puede estar entre 98,5 y 101,5% para el valor de recuperación medio y entre 98,0 y 102,0% para cada valor de recuperación obtenido individualmente. Para el intervalo de ensayo de los métodos de el producto de la droga (DP) (80,0-120,0%), esto puede estar entre 98,0 y 102,0% para el valor de recuperación medio y entre 97,0 y 103,0% para cada valor de recuperación obtenido individualmente.

#### 4.1.3.- Precisión

La precisión de un método analítico expresa la proximidad de acuerdo entre una serie de mediciones obtenidas a partir de muestreos múltiples de la misma muestra homogénea en las condiciones prescritas en el método de ensayo. La precisión se determina generalmente a diferentes niveles: repetibilidad (repetibilidad del sistema, repetibilidad del análisis), precisión intermedia y reproducibilidad. El término precisión describe la distribución de los resultados individuales alrededor de su promedio. Con frecuencia, se confunde con el término exactitud, que se refiere a la diferencia entre la media de los resultados (por ejemplo, en experimentos de recuperación) y el valor "verdadero". La desviación estándar, la desviación estándar relativa (coeficiente de variación) y el intervalo de confianza deben ser reportados para cada tipo de precisión investigado además de los resultados individuales obtenidos y la media.

##### a) Repetibilidad

**-Repetibilidad del sistema:** La repetibilidad del sistema se mide mediante inyecciones múltiples de la misma solución de referencia y se expresa como la desviación estándar relativa en las áreas de los picos medidos. La precisión del sistema considera la menor variación del sistema analítico, mientras que la repetibilidad del análisis se relaciona con todos los aspectos del método de prueba incluyendo la preparación de la muestra. La información se proporciona como parte de los datos de validación y como SST. Una mejor precisión del método de ensayo da como resultado un mejor control de la sustancia de ensayo, ya que se puede confiar más en el resultado obtenido. La inclusión de la repetibilidad del sistema como SST en el método es una parte esencial del método

de prueba. Sin embargo, el criterio de aceptación debe estar relacionado con el límite de especificación del producto.

La RSD sobre las respuestas obtenidas para un compuesto seleccionado (usualmente el compuesto principal) se usa como medida y debería ser típicamente  $\leq 2,0\%$  para una respuesta al 100% de concentración.

### **b) Precisión intermedia**

La precisión intermedia expresa dentro de las variaciones de laboratorio (efectos de eventos aleatorios sobre la precisión del método analítico) por ejemplo diferentes días, analistas diferentes, equipos diferentes, etc. Si existen datos para apoyar la reproducibilidad, no es necesario realizar una evaluación de precisión intermedia. La forma de realizar la prueba puede ser muy diferente. Se recomienda un enfoque de diseño ANOVA, pero generalmente el análisis se realiza mediante análisis múltiples ( $n = 6$ ) de la misma muestra por dos analistas en dos días diferentes, utilizando reactivos preparados independientemente y preparaciones de muestras y preferentemente realizados en dos equipos diferentes. La RSD agrupada se calcula para los dos conjuntos de datos obtenidos por los analistas (por ejemplo,  $n - 6$  para cada uno). Los criterios de aceptación se establecen para la RSD agrupada (para varianzas comparables) en el resultado del ensayo promedio para el análisis del compuesto. Para el intervalo de ensayo (80,0-120,0%), esto puede ser  $\leq 2,0\%$  para los métodos DS y  $\leq 3,0\%$  para los métodos DP. Además, se calcula la diferencia absoluta en % entre los valores medios de ensayo de los analistas y debe estar dentro de  $\leq 2,0\%$  para DS y  $\leq 3,0\%$  para los métodos DP.

### **c) Reproducibilidad**

La reproducibilidad expresa la precisión entre los laboratorios. Si se dispone de datos que apoyen la reproducibilidad, no se requiere una evaluación de precisión intermedia. La reproducibilidad se suele probar durante la actividad de transferencia del método. Los criterios de aceptación para la reproducibilidad son implícitamente más amplios que para la precisión intermedia. Típicamente, se aplica un factor de 2 al criterio de precisión de análisis para obtener los criterios de aceptación para la reproducibilidad.

#### **4.1.4.- Linealidad**

La linealidad de un método analítico es su capacidad (dentro de un intervalo dado) para obtener resultados de prueba, que son directamente proporcionales a la concentración (cantidad) del analito en la muestra. En algunos casos, los datos de la prueba pueden tener que ser sometidos a una transformación matemática antes del análisis de regresión. Se requiere tener al menos cinco niveles de concentración (puntos de datos) para determinar la linealidad. Aunque científicamente mal aconsejados, los coeficientes de correlación se aplican generalmente como criterios para la linealidad, incluso en las directrices de la ICH. De acuerdo con los documentos de guía, el coeficiente de correlación, la intersección en el eje y, la pendiente de la recta de regresión y la suma residual de cuadrados deben presentarse junto a un gráfico de las curvas de linealidad. Las propuestas de posibles límites de coeficientes de correlación pueden ser para el compuesto principal en el intervalo de ensayo (80-120%)  $\geq 0,999$  y para el compuesto principal en todo el intervalo (umbral fijado (RT) hasta 120%)  $\geq 0,99$ . Los criterios más significativos son la RSD de los factores de respuesta y una comprobación visual de la línea de calibración. (El factor de respuesta es la relación entre la respuesta del detector y la concentración). Las propuestas de límites posibles para la RSD sobre los factores de respuesta pueden ser para el compuesto principal en el rango de ensayo (80-120 %)  $\leq 3,0\%$ , y para el compuesto principal en todo el intervalo (RT hasta 120%)  $\leq 10,0\%$ . El límite para la comprobación visual de la línea de calibración es que se demuestra claramente una relación lineal.

#### **4.1.5.- Rango**

El rango de un método analítico es el intervalo entre la concentración superior e inferior (cantidades) de analito en la muestra (incluyendo estas concentraciones) para los que se ha demostrado que el método analítico tiene un nivel adecuado de precisión, exactitud, y Linealidad. Cuando se cumplen los criterios de linealidad, exactitud y precisión en el rango de 80,0-120,0% para el componente principal, se confirma el rango de ensayo.

#### **4.1.6.- Límite de cuantificación y límite de detección**

El límite de cuantificación (QL) es la cantidad más baja de analito en una muestra, que puede determinarse cuantitativamente con un nivel adecuado de precisión y exactitud.

El límite de detección (DL) de un método analítico individual es la cantidad más baja de analito en una muestra que puede ser detectada pero no necesariamente cuantificada como un valor exacto.

El DL y QL se pueden calcular de varias maneras, De la relación señal/ruido. La varianza de la señal analítica aumenta con la disminución del nivel de concentración a determinar. Por lo general, la variación de la señal analítica cambia con el tiempo, la instrumentación, el analizador y las condiciones ambientales (por ejemplo, temperatura). Por lo tanto, es difícil establecer límites fijos para DL y QL, pero es una buena práctica de laboratorio Hacer una estimación aproximada del DL durante el desarrollo del método, por ejemplo, probando el rendimiento en diferentes instrumentos que se aplican típicamente en los diferentes laboratorios donde se transferirá el método.



## CAPÍTULO II MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. LUGAR DE INVESTIGACIÓN

El presente trabajo fue realizado en los laboratorios de la Universidad Católica de Santa María, en el pabellón H-103 y H-104.

### 2. MATERIALES

#### 2.1. MUESTRAS

Se seleccionó 6 diferentes productos de té verde en bolsas filtrantes comercializados en la ciudad de Arequipa que contengan *Camelia sinensis L.* a cada muestra se le asignó un código (A, B, C, D, E y F), con el objetivo de diferenciarlas, en la Tabla N° 3 muestra los 6 productos adquiridos. Se tomaron 3 lotes de cada muestra y se enumeraron del 1 al 3. Así tenemos por ejemplo para el producto A se codificaron los lotes A1, A2 y A3 como se muestra en la figura 6; esto se aplicó para los 6 productos para un total de 18 lotes.

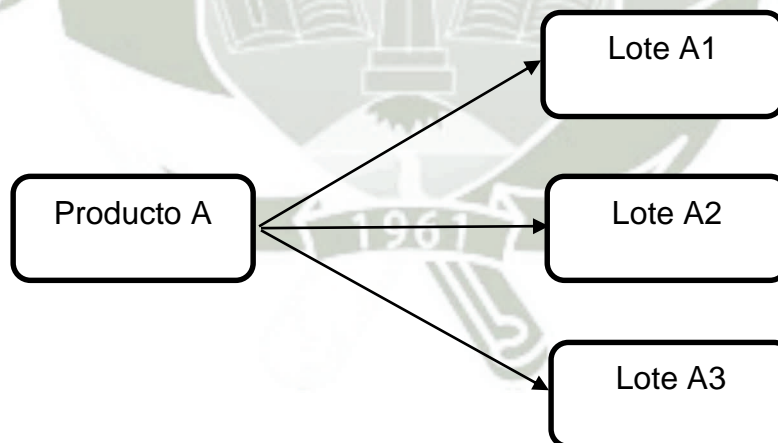


Figura 6: Codificación de lotes

Tabla N° 3: Muestras de Té Verde

Muestra	Marca	Lote
A1	Balanze	111113
A2	Balanze	134139
A3	Balanze	165119
B1	Schagreen	200116
B2	Schagreen	020115
B3	Schagreen	250615
C1	Sunka	254151
C2	Sunka	090161
C3	Sunka	308151
D1	Hornimans	030216
D2	Hornimans	170316
D3	Hornimans	030616
E1	Wawasana	181274
E2	Wawasana	111124
E3	Wawasana	132153
F1	Hoja selecta	260716
F2	Hoja selecta	031115
F3	Hoja selecta	150815

Fuente: Elaboración propia

## 2.2. EQUIPOS Y APARATOS

- Sistema de HPLC LaChrom
- Detector: MERCK HITACHI UV L-7400
- Bomba: MERCK HITACHI UV L-7100
- Interface: MERCK HITACHI UV L-7000
- Columna: Chromolith Performance RP 18 –(100X4.6mm)
- Software: EZChrom Elite
- Balanza analítica (Sartorius)
- Vortex

- Estufa (Thermo Scientific Cimarec)
- Potenciómetro (Titranto 808 Methohm)
- Baño de ultrasonido (J.P. Selecta)
- Purificador (EASYPURE II)

### 2.3. REACTIVOS

- Estándar de catequinas (epicatequinas, epicatequina galato, epigalocatequina y la epigalocatequina galato) Nacalai 83.4%
- Acetonitrilo grado HPLC (J T Baker)
- Metanol Merck
- Ácido acético glacial
- Acetato de sodio trihidratado Merck
- Agua calidad ultra pura

### 2.4. MATERIALES DE LABORATORIO

- Beakers de 50 mL, 100mL y 500mL
- Matraces de 100mL
- Equipo de filtración al vacío.
- Fiolas de 2 mL, 10 mL, 100 mL y 500 mL
- Probetas de 100 mL
- Bagetas
- Embudos

### 2.5. OTROS MATERIALES

- Filtros de jeringa de 100 mm 0.22  $\mu\text{m}$  ANOTOP
- Filtro de membrana de 0.45  $\mu\text{m}$  MILIPORE
- Jeringa de inyección de 100  $\mu\text{L}$  para HPLC HAMILTON
- Jeringas descartables de 3
- Micro pipeta automática de 20-200  $\mu\text{L}$  y 200 – 1000  $\mu\text{L}$ , BRAND

### 3. METODOS

#### 3.1.-RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA

Las muestras fueron adquiridas durante el periodo abril del 2016 a agosto del 2016 de diferentes supermercados en la ciudad de Arequipa; se utilizaron productos filtrantes a base de *Camelia Sinensis L.*

#### 3.2.-TRATAMIENTO DE LA MUESTRA

Como las catequinas son fotosensibles, la preparación de la muestra se llevó a cabo en un entorno de trabajo donde la iluminación fue tenue. Un peso exacto ( $0,25 \pm 0,01$  g) de la muestra de té verde se colocó individualmente en un volumen de 80 mL de agua a diferentes temperaturas y se incubó a diferentes tiempos.

Después de enfriar, cada solución de muestra fue filtrada a través de papel filtro medio (No. 1) y lento (No.5) respectivamente. Las soluciones de lavado, filtrado se transfirieron a un matraz aforado (100 ml). Inmediatamente, un volumen apropiado (10,0 ml) del extracto de agua de té se filtró a través de un 0,45  $\mu$ m filtro de membrana de celulosa desechable y se inyectó en la HPLC (en las condiciones operativas óptimas) a 210 nm del detector UV.

### 4.- ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN

El análisis cuantitativo de las muestras recolectadas se realizó por HPLC usando un sistema de gradiente en fase reversa, con detección UV.

#### 4.1 FUNDAMENTO

Cromatografía en fase reversa

La cromatografía de fase reversa es el término utilizado para describir el estado en el que la fase estacionaria es menos polar que la fase móvil. El octadecilsilano unido químicamente (ODS), un n-alcano con 18 átomos carbonos, es la fase de estacionaria más frecuentemente usada. C8 y cadenas alquilo más cortas y también grupos ciclohexilo y fenilo proporcionan otras alternativas. Los grupos fenilo son más polares que los grupos alquilo. El agua se describe a menudo como el

medio de elución más fuerte para la cromatografía, pero de hecho esto sólo es cierto para los procesos de adsorción. El agua puede interactuar fuertemente con los centros activos en sílice y alúmina, de modo que la adsorción de moléculas de muestra se vuelve altamente restringida y se eluye rápidamente como resultado. Exactamente lo contrario se aplica en sistemas de fase inversa: el agua no puede humedecer los grupos alquilo no polares (hidrofóbicos repelentes de agua) y no interactúa con ellos de ninguna manera. Por lo tanto, es la fase móvil más débil de todos y da la velocidad de elución de muestra más lenta. Cuanto mayor es la cantidad de agua en el eluyente, más largo es el tiempo de retención. Los compuestos de muestra son mejor retenidos por la superficie de fase inversa, son menos solubles en agua (es decir, más no polares). La retención disminuye en el orden siguiente: dipolos inducidos alifáticos (por ejemplo,  $\text{CCl}_4$ ) > dipolos permanentes (por ejemplo,  $\text{CHCl}_3$ ) > bases de Lewis débiles (éteres, aldehídos, cetonas) > bases de Lewis fuertes (aminas) > ácidos de Lewis débiles (alcoholes, > Ácidos de Lewis fuertes (ácidos carboxílicos). Además, el tiempo de retención aumenta a medida que aumenta el número de átomos de carbono. Como regla general, la retención aumenta con el aumento del área de contacto entre la molécula de muestra y la fase estacionaria, es decir, con un número creciente de moléculas de agua que se liberan durante la "adsorción" de un compuesto. Los compuestos de cadena ramificada se eluyen más rápidamente que sus isómeros normales correspondientes.<sup>44</sup>

## 4.2. PROCEDIMIENTO

Condiciones cromatográficas:

Equipo: Cromatógrafo líquido de alta resolución

Columna: Chromolith RP-18 (100 x 4.6 mm)

Sistema: Gradiente

Fase móvil: Acetonitrilo:Buffer acetato (1.0 mM Ácido Acético, 1.0 mM Acetato de Sodio en Agua, pH=4.5)

Detector: UV, 210 nm

Velocidad de flujo: 1.7 mL/minuto

Volumen de inyección: 20  $\mu\text{L}$

Tiempo de corrida: 14 minutos aproximadamente

Durante el análisis fue necesario realizar una serie de pruebas donde se probaron diferentes proporciones de disolventes, diferentes tiempos y diferente velocidad de flujo, para así optimizar la gradiente de forma que permita una buena separación de los compuestos. Se utilizó un sistema de gradiente con una fase móvil “A” (acetonitrilo) y fase móvil “B” (buffer acetato) a una velocidad de flujo de 1.7 mL/min.

### **Preparación de la fase móvil:**

Para preparar 1L de fase móvil se pesaron 46,67 mg de Acetato de Sodio Trihidratado se procedió agregar agua y luego de disolución se agregó 9,1mL de Ácido Acético Glacial luego de lo cual se procedió a enrazar.

Para el otro reservorio se desgasificó el acetonitrilo pasándolo primero por una bomba al vacío y luego dejándolo 10 minutos en el sonicador.

### **Preparación estándar**

La solución stock del estándar de las catequinas (epicatequina, epicatequina galato, epigalocatequina y epigalocatequina galato) fue preparada disolviendo la mezcla a la concentración de 1.0 mg/mL. La solución stock fue preparada en una mezcla de metanol-agua (50/50, v/v) y se conservó a -20°C.

## **5.- VALIDACIÓN**

De acuerdo con los criterios mencionados sobre los requerimientos de una validación, se evaluaron los siguientes parámetros: linealidad, precisión, exactitud; los criterios de aceptación según la ICH se muestran en resumen a continuación en la Tabla N°4.

**Tabla N°4: Parámetros evaluados en la validación**

	Criterios de aceptación
Linealidad	Coefficiente de correlación no menos de 0,99
Precisión	
-Repetibilidad	RSD no más de 2,0% para valoración de producto.
-Precisión Intermedia	RSD no más de 3,0% para valoración de producto.
Exactitud	Recuperación media de 98,0%-102,0% para valoración de producto.

Fuente: Elaboración Propia según ICH

### 5.1.- LINEALIDAD

La linealidad sirve para hallar la proporcionalidad entre la concentración de un analito y su respectiva respuesta medida en área.

Preparación de la curva de calibración

Se preparó una solución stock con el estándar con metanol:agua (50:50) hasta su completa disolución. A partir de esta solución se tomaron alícuotas de 20, 40, 80, 160 y 320  $\mu$ L, llevando cada una de ellas a fiolas de 10 mL, enrasándolas con agua ultrapura, obteniendo concentraciones de 1.67, 3.34, 6.67, 13.34 y 26.69 mg/L de catequinas totales respectivamente. Se pasó por filtros Anotop y se procedió a inyectar por triplicado.

Ecuación de la Recta:

$$y = bx + a$$

Donde:

x: Concentración de analito

y: Valor de la respuesta en área de pico cromatográfico

b: Valor de la pendiente de la recta

a: Valor del intercepto de la recta con el eje “y”

Fórmulas para hallar “b”

$$b = \frac{\sum xy - \frac{\sum x \sum y}{n}}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}$$

Fórmulas para hallar “a”

$$a = \frac{\sum y - b \sum x}{n}$$

Interpretación Estadística de la Regresión Lineal:

a. Coeficiente de correlación “r”: El coeficiente de correlación “r”, refleja el grado de relación o ligazón entre las variables x (concentración), e y (respuesta).

- Test de hipótesis para el coeficiente de correlación “r”:

Ho: r es diferente de 1

Criterio de aceptación: r no debe ser significativamente diferente de 1

Fórmulas para hallar “r”:

$$r = \frac{n \sum xy - (\sum x)(\sum y)}{\sqrt{n \sum x^2 - (\sum x)^2} \sqrt{n \sum y^2 - (\sum y)^2}}$$

- Coeficiente de determinación: Es el cuadrado del coeficiente de correlación “r”, e indica la proporción de la varianza total de “y”.

- Test de hipótesis para demostrar regresión en función del coeficiente de correlación “r”:

Ho = No hay correlación entre x e y

Criterio de aceptación: Si el valor “t” obtenido es mayor que el “t” de la tabla, calculado para (n – 2) grados de libertad y un nivel de significación del 95% (probabilidad, p = 0.05), entonces si hay correlación entre x e y. Fórmula para hallar “t”:

$$t = \frac{|r| \sqrt{(n - 2)}}{\sqrt{(1 - r^2)}}$$

## 5.2.-PRECISIÓN:

Este parámetro expresa la medida de dispersión alrededor de un valor medio, entre una serie de medidas múltiples de alícuotas a partir de una muestra.

La precisión de un método analítico se expresa generalmente como el coeficiente de variación (CV) o desviación estándar relativa (RSD) de una serie de medidas y se calcula matemáticamente de la siguiente manera:

$$CV = \frac{\sigma}{\bar{x}} * 100$$

- **Repetibilidad:** Se evaluaron 3 diferentes concentraciones del estándar por triplicado; este procedimiento se realizó por un mismo analista, día e instrumentó.
- **Precisión intermedia:** El objetivo de este parámetro es determinar la variabilidad del método, donde la preparación del estándar se desarrolló en condiciones diferentes (analista, día), siguiendo el mismo procedimiento.

Esta operación se realizó con la preparación de muestras en 3 días diferentes y se procedió a la determinación del coeficiente de variación o la desviación estándar relativa.

Criterios de Aceptación:

Desviación Estándar Relativa:

Repetibilidad  $RSD \leq 2\%$

Precisión intermedia  $RSD \leq 3\%$

**5.3.- EXACTITUD:** La exactitud es el parámetro que mide el grado de concordancia entre los valores obtenidos y el valor verdadero. La exactitud se expresa mediante el porcentaje de recuperación dada por la cantidad valorada con respecto a la cantidad conocida.

Preparación:

Para el desarrollo de este parámetro se procedió a elaborar tres tipos de soluciones las cuales independientemente cada una debe contener lo siguiente:

- **Preparación de la solución estándar:**

Preparar una solución equivalente a 6.67 ppm de catequinas totales a partir de la solución madre del estándar. Filtrar e inyectar al HPLC.

- **Preparación de la solución muestra:**

Pesar el equivalente a 250 mg de la muestra y desarrollar el procedimiento descrito anteriormente. Filtrar e inyectar al HPLC.

- **Preparación de la solución muestra enriquecida:**

Pesar el equivalente a 250 mg de la muestra, adicionar 80  $\mu$ L de la solución estándar madre para enriquecer y desarrollar el procedimiento descrito anteriormente. Filtrar e inyectar al HPLC.

## 6.- ANÁLISIS DE MUESTRAS

Luego que se validó el método y se observó que cumple con los parámetros establecidos se procedió a analizar las muestras, para esto se identificó las marcas y lotes y se tomaron muestras representativas. Se procedió a pesar aproximadamente 0,25 g de una mezcla homogénea de muestra y se hicieron las respectivas diluciones, mencionadas en el tratamiento de muestra, para poder inyectar al HPLC.

## CAPÍTULO III

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 1.-TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS

El tiempo de infusión utilizado en las muestras fue de 10 minutos con agua ultrapura a 80°C.

#### 2.-GRADIENTE CROMATOGRÁFICA

En la Tabla N° 5 se observa las diferentes proporciones por las cuales pasa nuestra gradiente; donde los compuestos más hidrofílicos eluirán a mayor concentración de agua, mientras que los compuestos más hidrofóbicos eluirán a concentraciones elevadas de acetonitrilo.

Tabla N° 5: Gradiente

Tiempo (min)	Acetonitrilo (%)	Buffer (%)	Flujo (mL/min)
0	12	88	0.7
9	21	79	0.7
14	60	40	0.7

Fuente: Elaboración propia

El presente trabajo tiene como finalidad proporcionar una técnica que permita evaluar el contenido de catequinas en productos comerciales de té verde, para la determinación cuantitativa de catequinas se propone validar un método analítico por HPLC.

La longitud de onda a la cual se trabajo fue de 210 nm, que resulto óptima para la detección de los analitos de interés<sup>49</sup>; se utilizó una fase estacionaria RP-18, octadecilsilano unido químicamente a micropartículas de sílice, diseñada para cromatografía en fase reversa y de las fases probadas se utilizó la que daba más resolución en gradiente antes mencionada.

### 3.-PARÁMETROS PARA LA VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO

Se evaluaron los siguientes parámetros: selectividad, linealidad, precisión y exactitud.

#### **Linealidad:**

La linealidad es la proporcionalidad entre la concentración de un analito y su respectiva respuesta.

Para el desarrollo de este parámetro fue necesario elaborar una curva de calibración para cada una de las 4 catequinas, para lo cual se prepararon 5 concentraciones de cada una y luego fueron procesadas por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) por triplicado, hallando los datos de las Tablas mostradas en anexos.

En la Tabla de la epigallocatequina se observan las áreas promedio correspondientes a las concentraciones de calibración, así mismo se obtuvieron coeficientes de variación porcentual para la epigallocatequina.

El valor  $r = 1$  indica una correlación lineal y  $r = 0$  la no correlación entre X e Y. En la práctica, r es generalmente mayor de 0,99 y los valores menores de 0,90 son raros.

En la Figura 7 se observa el gráfico de calibración correspondiente a los datos de la Tabla de la epigallocatequina, donde se presenta un coeficiente de correlación lineal  $r^2$  de 0.9925. Para que un método analítico sea considerado lineal el coeficiente de correlación  $r^2$  debe ser mayor a 0.99 según la ICH, en el presente trabajo se obtuvo un valor superior a los establecido concluyendo que existe una correlación lineal entre el analito y su respuesta. Para evaluar la linealidad se prepararon 5 soluciones de concentración de 0.26, 0.52, 1.04, 2.08, 4.16 mg/L (Figura 7). En la Tabla de la epigallocatequina figuran los resultados de 3 mediciones y el promedio de las correspondientes mediciones.

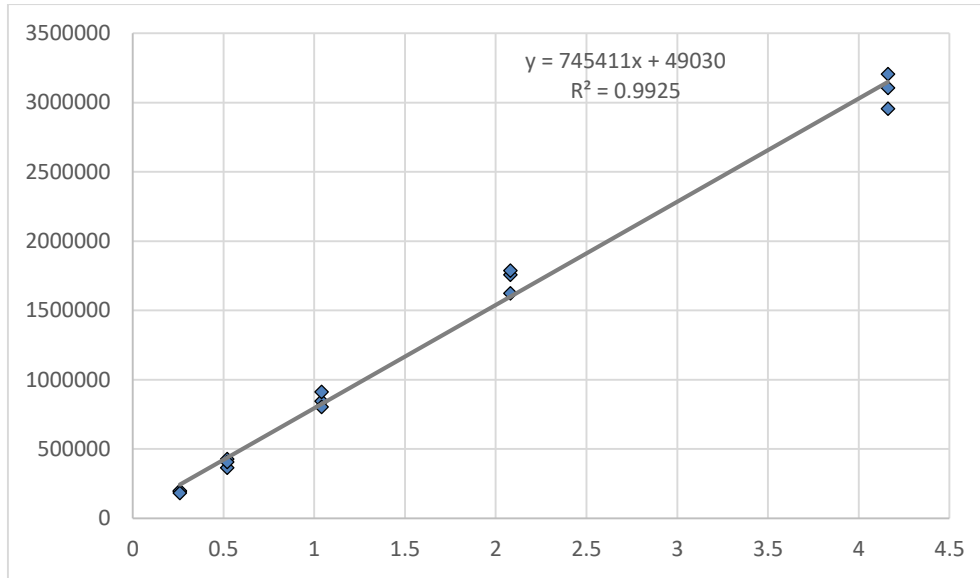


Figura 7: Curva de calibración de la epigallocatequina

Para evaluar la linealidad de la epicatequina se prepararon 5 soluciones de concentración de 0.24, 0.48, 0.96, 1.92, 3.84 mg/L (Figura 8). Los valores de las áreas, el promedio, la desviación estándar o varianza y coeficiente de variación porcentual se observan en la tabla de la epicatequina.

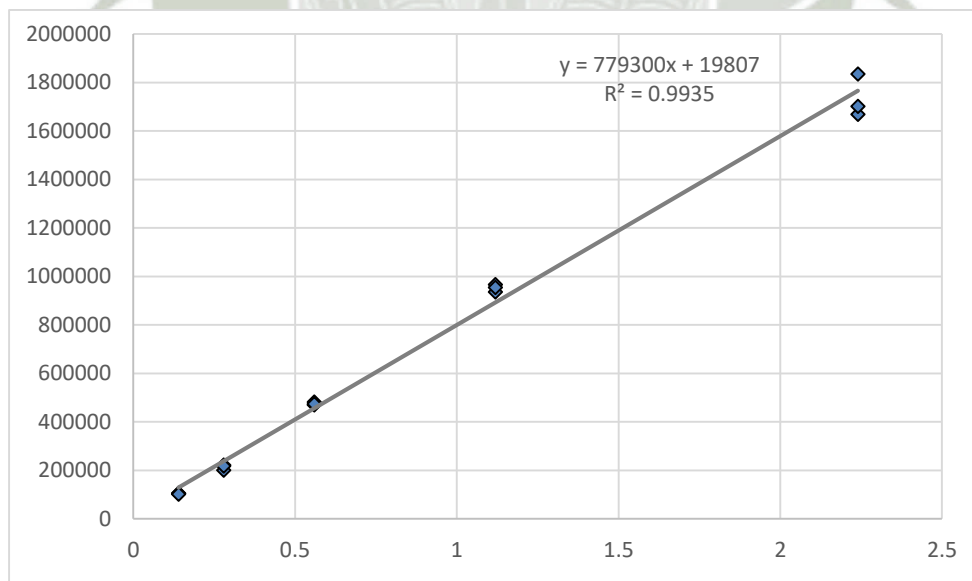


Figura 8: Curva de calibración de la epicatequina

En la tabla de la epigallocatequina galato se observan el promedio, la varianza y la variación porcentual de 5 concentraciones diferentes del estándar de epigallocatequina galato. En la figura 9 tenemos la curva de calibración que nos da un  $r^2$  de 0.9958.

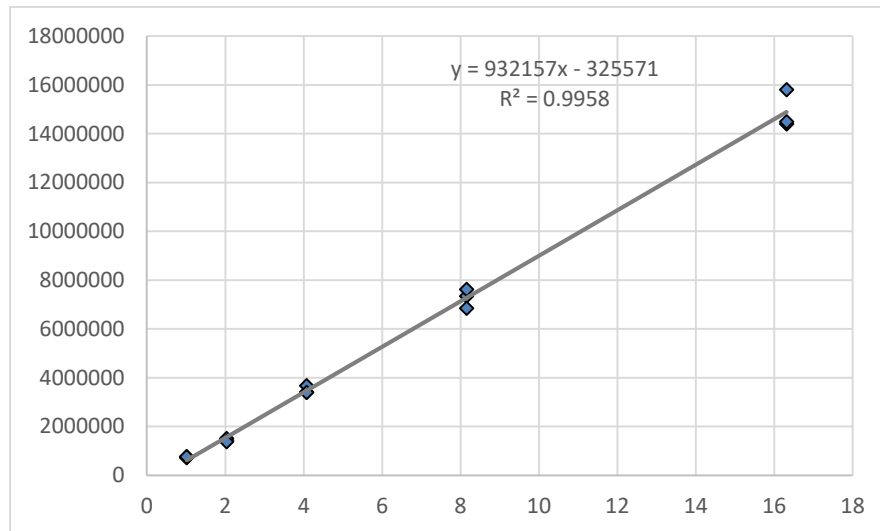


Figura 9: Curva de calibración de la epigallocatequina galato

Por último, tenemos la curva de calibración de la epicatequina galato (Figura 10) obtenida al analizar 5 concentraciones que se encuentran en la tabla de la epicatequina galato junto con todos los parámetros necesarios para calcular el coeficiente de correlación lineal.

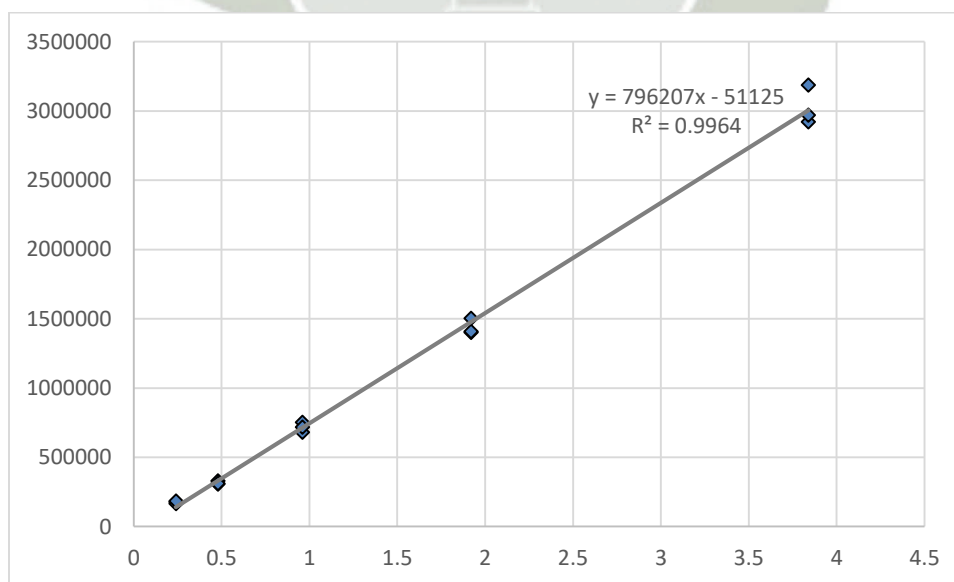


Figura 10: Curva de calibración de la epicatequina galato

### Precisión

Se expresa matemáticamente como la desviación estándar estimada analíticamente por  $s$  o más comúnmente como la desviación estándar relativa (RSD) o coeficiente de variación (CV). La precisión debe medirse en condiciones repetitivas (mismo analista, mismo día, mismo instrumento) y en condiciones reproducibles (diferente analista, diferente día, diferente instrumento).

### -Repetibilidad

Se realizó 3 medidas a partir de las preparaciones de estándares de 3 diferentes concentraciones para cada catequina, para así determinar el grado concordancia entre ellas.

En la Tabla 6, se puede observar el CV para las áreas menores de 2% los cuales son aceptados por la ICH, por lo que podemos afirmar que la precisión del sistema es adecuada.

Tabla 6: Repetibilidad de epigallocatequina

Repetición	Concentración	Área	promedio	SD	CV
1	0.52	235990	231486.333	4517.059	1.951
2	0.52	231513			
3	0.52	226956			
1	1.04	563634	567801	6612.952	1.165
2	1.04	575426			
3	1.04	564343			
1	2.08	1122819	1127220.67	3818.857	0.339
2	2.08	1129192			
3	2.08	1129651			

Fuente: Elaboración propia

En la Tabla 7, vemos también que los CV para las 3 diferentes concentraciones son menores de 2%, de acuerdo a lo aceptado por la ICH podemos decir que la precisión del sistema también es adecuada.

Tabla 7: Repetibilidad de epigalocatequina galato

Repetición	Concentración	Área	promedio	SD	CV
1	2.04	191286	189864	2925.795	1.541
2	2.04	186499			
3	2.04	191807			
1	4.08	419983	420853	3511.777	0.834
2	4.08	417858			
3	4.08	424718			
1	8.16	831637	844081.667	12219.119	1.448
2	8.16	844546			
3	8.16	856062			

Fuente: Elaboración propia

La repetibilidad de la epicatequina y la epicatequina galato se muestran en las tablas 8 y 9 respectivamente. Al ver el coeficiente de variación porcentual podemos ver que cumple con el parámetro de repetibilidad.

Tabla 8: Repetibilidad de epicatequina

Repetición	Concentración	Área	promedio	SD	CV
1	0.28	898628	892252.667	16596.309	1.860
2	0.28	873414			
3	0.28	904716			
1	0.56	2370837	2424121.67	46416.719	1.915
2	0.56	2445757			
3	0.56	2455771			
1	1.12	4939873	5034204.33	94965.733	1.886
2	1.12	5129792			
3	1.12	5032948			

Fuente: Elaboración propia

Tabla 9: Repetibilidad de epicatequina galato

Repetición	Concentración	Área	promedio	SD	CV
1	0.48	230169	232813.333	2407.114	1.034
2	0.48	234877			
3	0.48	233394			
1	0.96	597490	607918.333	9623.664	1.583
2	0.96	609808			
3	0.96	616457			
1	1.92	1271029	1293404	20925.266	1.618
2	1.92	1296693			
3	1.92	1312490			

Fuente: Elaboración propia

#### **-Precisión intermedia**

Se procedió a determinar la respuesta de 3 diferentes concentraciones en 3 días diferentes. Las Tablas 10, 11, 12 y 13 muestran los resultados para la precisión intermedia de epigalocatequina, epicatequina, epigalocatequina galato y epicatequina galato respectivamente.

El coeficiente de variación porcentual para las 4 catequinas cumple el criterio de aceptación (CV promedio de 1.135% para la epigalocatequina; CV promedio de 1.089% para la epicatequina; CV promedio de 1.795% para la epigalocatequina galato; y CV promedio de 1.356% para la epicatequina galato) por lo que podemos decir que nuestro método es preciso ya que todos los CV se encuentran por debajo de la especificación de 3%.

Tabla 10: Precision intermedia de epigalocatequina

Concentración	Área	Desviación estandar	Promedio	CV
0.52	532481	2469.709	535230.333	0.461
0.52	537261			
0.52	535949			
1.04	1096084	20106.406	1073815.000	1.872
1.04	1068367			
1.04	1056994			
2.08	2381205	25275.602	2355045.000	1.073
2.08	2330758			
2.08	2353172			

Fuente: Elaboración propia

Tabla 11: Precision intermedia de epicatequina

Concentración	Área	Desviación estandar	Promedio	CV
0.28	263397	4359.051	268258.333	1.625
0.28	269559			
0.28	271819			
0.56	543152	5347.920	549002.667	0.974
0.56	550217			
0.56	553639			
1.12	1160148	7783.045	1163087.333	0.669
1.12	1157202			
1.12	1171912			

Fuente: Elaboración propia

Tabla 12: Precision intermedia de epigalocatequina galato

Concentración	Área	Desviación estandar	Promedio	CV
2.04	1926691	37894.954	1964209.333	1.929
2.04	2002470			
2.04	1963467			
4.08	4304702	69472.641	4305253.333	1.614
4.08	4375000			
4.08	4236058			
8.16	10858349	196133.505	10646780.000	1.842
8.16	10471015			
8.16	10610976			

Fuente: Elaboración propia

Tabla 13: Precision intermedia de epicatequina galato

Concentración	Área	Desviación estandar	Promedio	CV
0.48	379181	6261.478	385822.333	1.623
0.48	386668			
0.48	391618			
0.96	799971	13529.761	812258.667	1.666
0.96	826758			
0.96	810047			
1.92	1931542	14933.850	1918152.333	0.779
1.92	1902047			
1.92	1920868			

Fuente: Elaboración propia

### Exactitud

La exactitud es el parámetro que indica, que tan próximo se encuentra el valor medido al valor verdadero, este parámetro se expresa mediante el porcentaje de recuperación.

Para la determinación de este parámetro se preparó un total de 9 soluciones a analizar (solución estándar (St), muestra (M) y muestra enriquecida (ME)) para cada una de las catequinas, los resultados se muestran en las Tablas 14, 15, 16 y 17, además se expresa la exactitud como porcentaje de recuperación (%REC)

Tabla 14: Porcentaje de recuperación de epigalocatequina

EGC	Estandar	Muestra	Muestra + Estandar	%REC
1	656484	1671613	2320734	98.878
2	670200	1674323	2334523	98.508
3	679618	1678425	2356899	99.832
prom	668767.333	1674787	2337385.333	99.073
desv st	11633.352	3429.622	18251.617	0.683
DSR	1.740	0.205	0.781	0.689

Fuente: Elaboración propia

De los resultados obtenidos en la Tabla 14 para la epigalocatequina podemos ver que se cumple con la especificación de la ICH tanto para cada valor individual como para el promedio del porcentaje de recuperación.

En la Tabla 15 se puede ver que los valores de porcentaje de recuperación para la epicatequina están por debajo del especificado, por lo que sugiere trabajar en este caso con un estándar individual para obtener mejores valores de recuperación y así poder cumplir con las especificaciones de exactitud.

Tabla 15: Porcentaje de recuperación de epicatequina

EC	Estandar	Muestra	Muestra + estandar	%REC
1	355328	442542	781374	95.358
2	357508	447384	786892	94.965
3	357307	444772	785000	95.220
Prom	356714.333	444899.333	784422	95.181
desv st	1204.799	2423.510	2804.041	0.199
DSR	0.338	0.545	0.357	0.209

Fuente: Elaboración propia

En la Tabla 16 tenemos valores de porcentaje de recuperación para la epigalocatequina galato por encima del 100% pero siguen estando en el margen de aceptación según la ICH.

Tabla 16: Porcentaje de recuperación de epigalocatequina galato

EGCG	Estandar	Muestra	Muestra + estandar	%REC
1	2535684	2379676	4953597	101.508
2	2519329	2362436	4921765	101.588
3	2487414	2349423	4869080	101.296
prom	2514142.333	2363845	4914814	101.464
desv st	24549.427	15175.637	42685.104	0.151
DSR	0.976	0.642	0.868	0.148

Fuente: Elaboración propia

Por último tenemos expresados en porcentaje los valores de recuperación de la epicatequina galato en la Tabla 17. Estos valores cumplen con las especificaciones dadas por la ICH por que podemos decir que el método es exacto.

Tabla 17: Porcentaje de recuperación de epicatequina galato

ECG	Estandar	Muestra	Muestra + estandar	%REC
1	451644	543431	993842	99.727
2	456178	543641	999719	99.978
3	458827	542922	994232	98.362
Prom	455549.667	543331.333	995931	99.356
desv st	3632.489	369.717	3286.295	0.870
DSR	0.797	0.068	0.330	0.875

Fuente: Elaboración propia

#### 4.-ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS

Los resultados de la concentración de catequinas de los diferentes productos son detallados en las tablas que se presentaran a continuación, el cálculo de las concentraciones fue realizado tomando como relación la concentración de estándar conocida y el área del pico de cada muestra.

En la Tabla 48 se muestra los resultados de Epigalocatequina (EGC) de las 6 marcas analizadas; con los siguientes datos; pesos tomados, tiempos de retención y áreas correspondientes. De cada marca se pudo obtener 3 diferentes lotes, a los que se analizó 3 veces, con un total de 9 inyecciones.

Tabla N° 18: Resultado mg/g de epigalocatequina

	Muestra	Peso (g)	Área	tR	Concentración	Promedio	DS	CV
Lote A1	1	0.2503	1025209	4.13	52.32	52.10	0.26	0.50
	2	0.2502	1021904	4.02	52.16			
	3	0.2499	1014112	3.99	51.81			
Lote A2	1	0.2504	1045377	3.96	53.38	52.02	1.26	2.42

Continua

	2	0.2501	1014015	3.98	51.76			
	3	0.2498	996918	3.97	50.91			
Lote A3	1	0.2501	617576	3.95	30.50	38.30	7.74	20.21
	2	0.2504	907228	4.06	45.98			
	3	0.2502	765856	3.99	38.44			
Lote B1	1	0.2506	1779028	4	92.61	91.92	0.61	0.66
	2	0.2504	1760881	3.88	91.71			
	3	0.2503	1755194	3.91	91.45			
Lote B2	1	0.2507	2066993	3.9	107.98	106.11	1.73	1.63
	2	0.2505	2001445	3.92	104.56			
	3	0.2506	2025313	3.86	105.80			
Lote B3	1	0.2503	1880078	3.86	98.14	100.25	1.84	1.83
	2	0.2505	1943643	3.87	101.47			
	3	0.2502	1935566	3.93	101.15			
Lote C1	1	0.2502	1917128	3.95	100.17	101.61	1.72	1.69
	2	0.2505	1981835	4.04	103.51			
	3	0.2503	1936196	3.99	101.15			
Lote C2	1	0.2505	1923514	4.02	100.39	101.12	3.15	3.12
	2	0.2504	1885567	3.93	98.39			
	3	0.2508	2004038	3.92	104.57			
Lote C3	1	0.2503	1723828	3.88	89.76	92.30	4.57	4.95
	2	0.2504	1870178	3.91	97.57			
	3	0.2503	1720037	3.94	89.56			
Lote D1	1	0.2505	822771	3.87	41.44	41.64	0.43	1.03
	2	0.2504	835324	3.94	42.13			
	3	0.2502	820066	3.92	41.34			
Lote D2	1	0.2504	1326078	3.84	68.42	61.27	6.81	11.12
	2	0.2500	1071236	4.11	54.85			
	3	0.2502	1178317	4.12	60.55			
Lote D3	1	0.2503	733992	3.89	36.71	30.36	5.99	19.73

	2	0.2504	512194	3.97	24.81			
	3	0.2502	600130	3.92	29.55			
Lote E1	1	0.2502	861258	4.09	43.55	43.91	0.89	2.04
	2	0.2504	856348	3.95	43.25			
	3	0.2505	887966	3.94	44.93			
Lote E2	1	0.2505	847142	3.92	42.74	47.00	4.01	8.53
	2	0.2506	996104	3.93	50.70			
	3	0.2505	936900	3.93	47.55			
Lote E3	1	0.2500	1053934	3.92	53.92	55.27	1.30	2.36
	2	0.2504	1104096	3.91	56.53			
	3	0.2503	1081887	3.9	55.36			
Lote F1	1	0.2501	940536	3.98	47.82	49.29	1.97	4.00
	2	0.2503	1010430	3.98	51.53			
	3	0.2500	953041	3.98	48.51			
Lote F2	1	0.2502	803436	3.88	40.45	38.95	1.37	3.52
	2	0.2505	754086	3.84	37.76			
	3	0.2501	769352	3.91	38.64			
Lote F3	1	0.2502	1746136	4	91.00	93.87	2.49	2.65
	2	0.2503	1829075	4.03	95.41			
	3	0.2503	1825276	4.05	95.20			

Fuente: Elaboración Propia

Una vez obtenido el resultado del contenido de epigalocatequina se procedió a evaluar estadísticamente; uno de los criterios a evaluar fue la RSD, obteniendo para los lotes del producto A; lote A1, A2 y A3 un RSD de 0.50, 2.42 y 20.21% respectivamente, estos valores muestran que no hay homogeneidad en el grupo debido a que el criterio de aceptación es mayor al 2%, seguidamente se opta por realizar un ANOVA.

La Tabla 19 muestra la prueba F de Fisher donde se obtiene un F calculado de 9.215 mayor al F tablas indicando que existe diferencia significativa, corroborado por el test de probabilidad 0.015 menor a 0.05.

Tabla 19: ANOVA para producto A

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>
Entre grupos	378.315722	2	189.157861	9.21483486	0.01481498
Dentro de los grupos	123.16522	6	20.5275367		
Total	501.480942	8			

Fuente: Elaboración propia

En la Figura 11 se muestra gráficamente la dispersión de los datos para cada lote, el valor mínimo para este producto fue de 30.497 mg/cap. y el valor máximo fue de 53.380 mg/cap., no hay semejanza con relación a los tres lotes A1, A2 y A3.

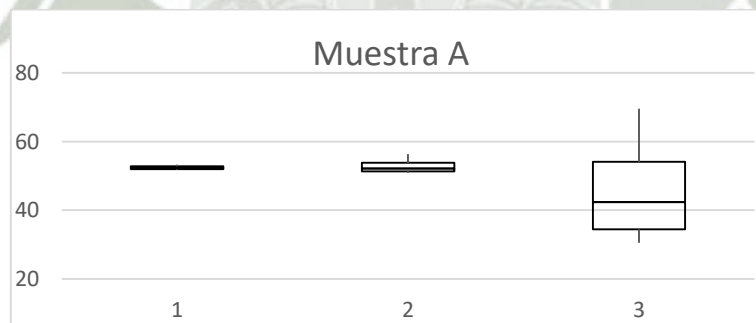


Figura 11: Diagrama de cajas y bigotes del producto A

En la Tabla 20 se observa el análisis ANOVA para el producto B, para este producto en la prueba F de Fisher se obtuvo un F calculado de 67.753 mayor al F tablas indicando así la diferencia existente en este producto, estadísticamente este resultado se comprobó en el test de probabilidad obteniendo un valor menor a 0.05 concluyendo así la diferencia estadísticamente significativa en este producto.

Tabla 20: ANOVA para producto B

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>
Entre grupos	305.079942	2	152.539971	67.7534853	7.6229E-05
Dentro de los grupos	13.50838	6	2.25139667		
Total	318.588322	8			

Fuente: Elaboración propia

En la Figura 12 se detalla gráficamente el resultado promedio de los lotes B1, B2 y B3 teniendo como valor mínimo de este producto la concentración de 91.446 mg/g y valor máximo hallado la concentración de 107.945 mg/g.



Figura 12: Diagrama de cajas y bigotes del producto B

En la Tabla 21 se observa el análisis ANOVA para el producto C, para este producto en la prueba F de Fisher se obtuvo un F calculado de 7.318 mayor al F tablas indicando así la diferencia existente en este producto, estadísticamente este resultado se comprobó en el test de probabilidad obteniendo un valor menor a 0.05 concluyendo así la diferencia estadísticamente significativa en este producto.

Tabla 21: ANOVA para producto C

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>
Entre grupos	164.685633	2	82.3428167	7.31826138	0.02457787
Dentro de los grupos	67.5101468	6	11.2516911		
Total	232.19578	8			

Fuente: Elaboración propia

En la Figura 13 gráficamente se observa, que en el lote C1 no hay una dispersión significativa con relación a su mediana obtenida en el análisis, el lote C2 y C3 muestra alguna variabilidad, al observar los datos obtenidos de los tres grupos de estudio se infiere que no hay relación entre estos lotes.

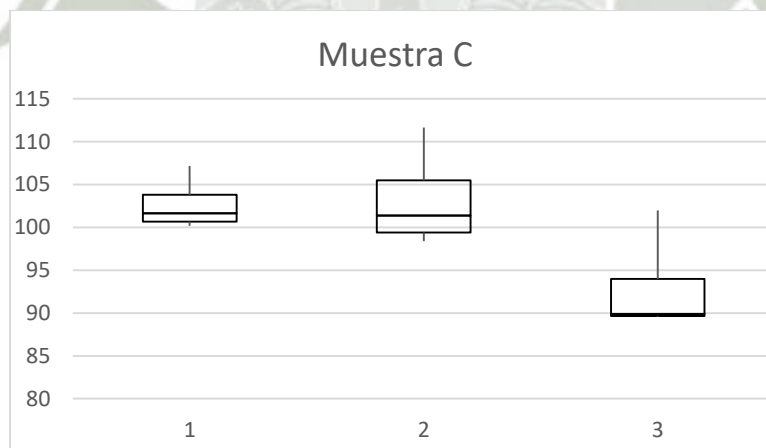


Figura 13: Diagrama de cajas y bigotes del producto C

La Figura 14 muestra gráficamente, la dispersión de datos y la relación existente de los tres lotes. La dispersión del lote D1 es baja en comparación con la de los otros 2 lotes.

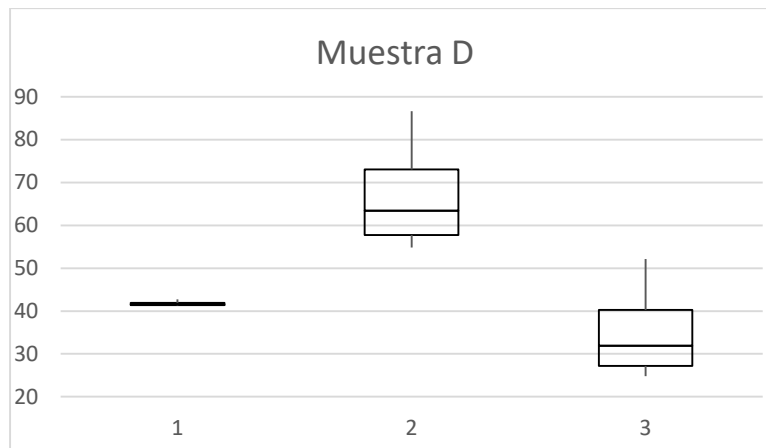


Figura 14: Diagrama de cajas y bigotes del producto D

En la Tabla 22 se observa el análisis ANOVA para el producto D, para este producto en la prueba F de Fisher se obtuvo un F calculado de 26.714 mayor al F tablas indicando así que existe una diferencia en este producto, estadísticamente este resultado se comprobó en el test de probabilidad se obtuvo un valor de 0.001 concluyendo así que existe una diferencia estadísticamente significativa en este producto.

Tabla 22: ANOVA para producto D

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>
Entre grupos	1468.64662	2	734.323311	26.7145148	0.0010291
Dentro de los grupos	164.926816	6	27.4878027		
Total	1633.57344	8			

Fuente: Elaboración propia

En la Tabla 23 se observa el análisis ANOVA para el producto E, para este producto en la prueba F de Fisher, se obtuvo un F calculado de 16.732 mayor al F tablas indicando así que existe una diferencia en este producto, estadísticamente este resultado se comprobó en el test de

probabilidad obteniendo un valor menor a 0.05 concluyendo así que no existe una diferencia estadísticamente significativa en este producto.

Tabla 23: ANOVA para producto E

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>
Entre grupos	206.987943	2	103.493972	16.7324276	0.00351417
Dentro de los grupos	37.111401	6	6.1852335		
Total	244.099344	8			

Fuente: Elaboración propia

En la Figura 15 se muestra el gráfico de caja y bigotes del producto E, se observa que no hay relación entre los lotes, la mediana obtenida en el lote E1 fue de 43.551 mg/g, para el lote E2 fue de 47.549 mg/g, mientras que el del lote E3 fue de 55.358 mg/g existiendo una gran variabilidad entre ambos lotes.

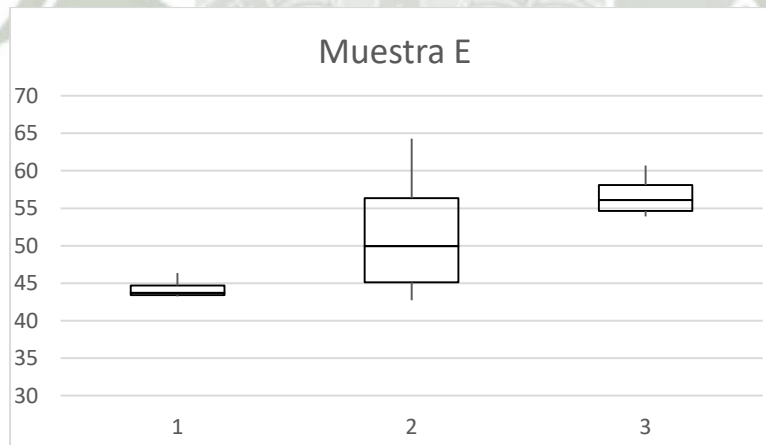


Figura 15: Diagrama de cajas y bigotes del producto E

En la Tabla 24 se observa el análisis ANOVA para el producto F, para este producto en la prueba F de Fisher, se obtuvo un F calculado de 640.613 mayor al F tablas indicando así que existe una diferencia en este producto, estadísticamente este resultado se comprobó en el test de

probabilidad obteniendo un valor menor a 0.05 concluyendo así que existe una diferencia estadísticamente significativa en este producto.

Tabla 24: ANOVA para producto F

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>
Entre grupos	5110.47648	2	2555.23824	640.61276	1.0127E-07
Dentro de los grupos	23.9324447	6	3.98874078		
Total	5134.40892	8			

Fuente: Elaboración propia

En la Figura 16 se representa gráficamente el resultado del análisis del producto F, se puede observar la dispersión de los datos, así como la variabilidad existente del lote F3 frente a los lotes F1 y F2.

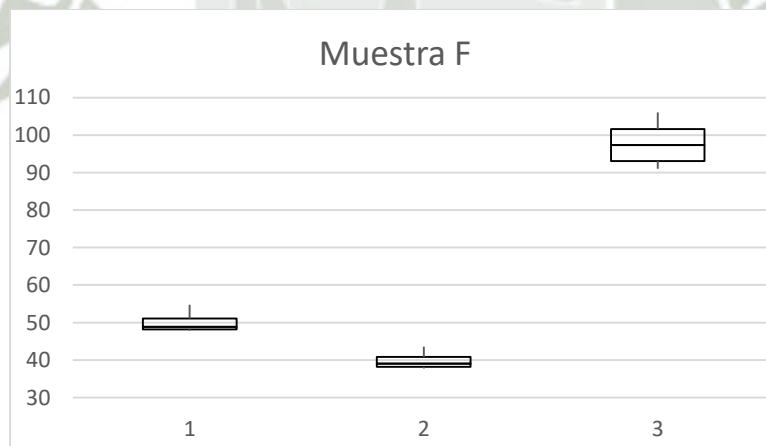


Figura 16: Diagrama de cajas y bigotes del producto F

Luego se procedió a hacer una comparación entre todas las marcas de té verde analizadas para así poder estadísticamente saber si existe diferencia entre los valores de catequinas en cada una de ellas.

En la figura 17 podemos ver gráficamente el valor de epigalocatequina para cada uno de los lotes.

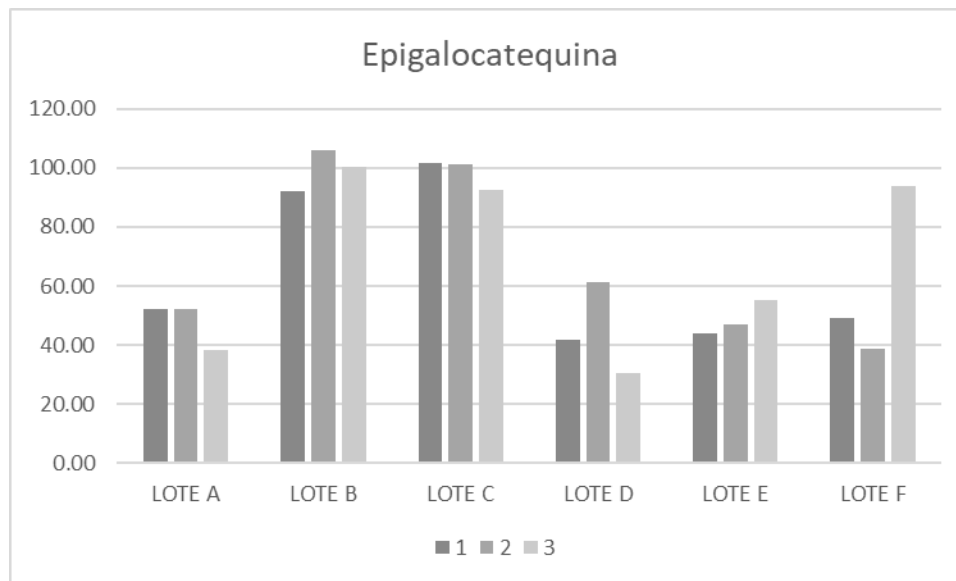


Figura 17: Cantidad de Epigalocatequina en las muestras

El análisis de varianza realizado nos da valores del estadístico F de 9.33, el cual es mucho mayor al valor de F crítico por que podemos decir que hay una diferencia significativa lo que comprobamos con el valor de probabilidad que podemos observar en la Tabla 25.

Tabla 25: ANOVA entre lotes de Epigalocatequina

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>
Entre grupos	9891.84528	5	1978.36906	9.32924963	0.00080612
Dentro de los grupos	2544.73078	12	212.060898		
Total	12436.5761	17			

Fuente: Elaboración Propia

En la Tabla 26 se presentan los resultados de las áreas de epicatequina (EC) obtenidos de las corridas cromatográficas realizadas para los lotes de las 6 marcas obtenidas, cada lote por 3 veces con un total de 9 análisis por marca, además se presentan los respectivos pesos tomados para cada análisis, tiempos de retención, resultado promedio y desviación estándar.

Tabla 26: Resultado en mg/g de epicatequina

	Muestra	Peso (g)	Área	tR	Concentración	Promedio	DS	CV
Lote A1	1	0.2503	326644	7.6	15.73	15.06	0.73	4.86
	2	0.2502	298202	7.46	14.28			
	3	0.2499	314990	7.43	15.16			
Lote A2	1	0.2504	321191	7.36	15.44	14.55	0.87	5.98
	2	0.2501	286931	7.36	13.71			
	3	0.2498	302270	7.31	14.51			
Lote A3	1	0.2501	308460	7.31	14.81	13.78	1.10	8.00
	2	0.2504	265981	7.45	12.62			
	3	0.2502	290847	7.43	13.90			
Lote B1	1	0.2506	338621	7.39	16.32	15.69	0.55	3.50
	2	0.2504	321150	7.17	15.44			
	3	0.2503	318550	7.25	15.32			
Lote B2	1	0.2507	390654	7.21	18.98	18.14	0.73	4.04
	2	0.2505	364442	7.22	17.65			
	3	0.2506	367007	7.13	17.78			
Lote B3	1	0.2503	344258	7.17	16.63	16.99	0.31	1.84
	2	0.2505	354031	7.23	17.12			
	3	0.2502	355458	7.22	17.21			
Lote C1	1	0.2502	373587	7.37	18.14	18.26	0.12	0.64
	2	0.2505	378579	7.52	18.38			
	3	0.2503	375727	7.43	18.25			
Lote C2	1	0.2505	352004	7.33	17.02	17.03	0.23	1.37
	2	0.2504	347710	7.29	16.80			
	3	0.2508	357322	7.28	17.27			
Lote C3	1	0.2503	309294	7.19	14.84	15.28	0.88	5.76
	2	0.2504	337772	7.25	16.29			
	3	0.2503	306651	7.27	14.71			
Lote D1	1	0.2505	267562	7.21	12.69	13.07	0.43	3.31

Continua

	2	0.2504	284018	7.28	13.54			
	3	0.2502	272598	7.26	12.96			
Lote D2	1	0.2504	367104	7.13	17.80	18.51	0.84	4.52
	2	0.2500	376589	7.6	18.31			
	3	0.2502	398720	7.63	19.43			
Lote D3	1	0.2503	391577	7.22	19.06	19.01	0.07	0.37
	2	0.2504	391413	7.31	19.04			
	3	0.2502	388914	7.21	18.93			
Lote E1	1	0.2502	261767	7.54	12.41	11.81	0.92	7.81
	2	0.2504	259452	7.31	12.28			
	3	0.2505	229699	7.31	10.75			
Lote E2	1	0.2505	260347	7.21	12.32	12.47	0.13	1.05
	2	0.2506	264944	7.28	12.55			
	3	0.2505	264691	7.26	12.54			
Lote E3	1	0.2500	269267	7.19	12.80	12.91	0.12	0.94
	2	0.2504	274337	7.2	13.04			
	3	0.2503	271305	7.24	12.89			
Lote F1	1	0.2501	187763	7.34	8.62	9.04	0.39	4.30
	2	0.2503	202818	7.32	9.38			
	3	0.2500	197533	7.34	9.12			
Lote F2	1	0.2502	264182	7.24	12.53	12.60	0.22	1.74
	2	0.2505	262181	7.16	12.42			
	3	0.2501	270065	7.24	12.84			
Lote F3	1	0.2502	358809	7.43	17.39	17.61	0.21	1.17
	2	0.2503	364141	7.42	17.65			
	3	0.2503	366885	7.48	17.79			

Fuente: Elaboración Propia

Podemos observar en la Figura 18, mediante el esquema de caja y bigotes, que no existe mucha dispersión de los tres lotes de la muestra A.

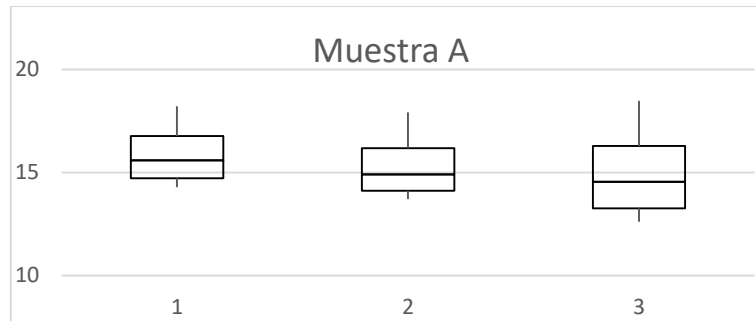


Figura 18: Diagrama de cajas y bigotes del producto A

En la Tabla 27 se muestra el análisis de varianza donde el valor F hallado es menor que el valor crítico por lo que podemos decir que no existe diferencia significativa entre los tres lotes de la muestra A.

Tabla 27: ANOVA para el producto A

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>
Entre grupos	2.49493062	2	1.24746531	1.49173477	0.29793495
Dentro de los grupos	5.01750848	6	0.83625141		
Total	7.5124391	8			

Fuente: Elaboración propia

La Figura 19 muestra gráficamente, la dispersión de datos y la relación existente de los tres lotes; además podemos notar la variabilidad que existe ente los 3 lotes lo que luego se comprueba con el test de ANOVA mostrado en la tabla 28 en la que podemos ver que el valor de F es mayor al F crítico.

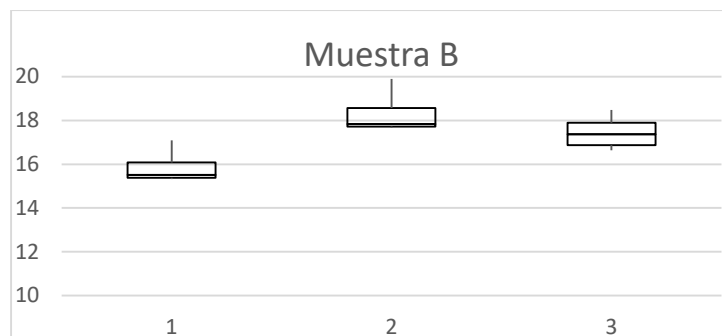


Figura 19: Diagrama de cajas y bigotes del producto B

Tabla 28: ANOVA para el producto B

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>
Entre grupos	8.96852169	2	4.48426084	14.3542913	0.00516587
Dentro de los grupos	1.87439174	6	0.31239862		
Total	10.8429134	8			

Fuente: Elaboración propia

En la Figura 20 gráficamente se observa, que en el lote C1 no hay una dispersión significativa con relación a su mediana obtenida en el análisis, el lote C2 y C3 muestra alguna variabilidad, al observar los datos obtenidos de los tres grupos de estudio se infiere que no hay relación entre estos lotes.

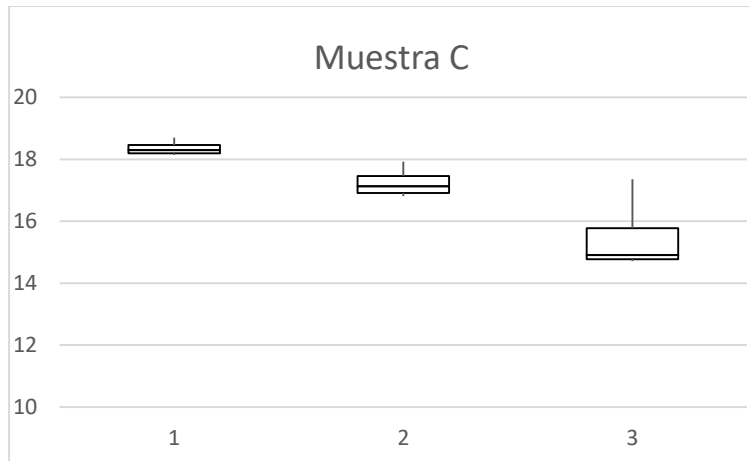


Figura 20: Diagrama de cajas y bigotes del producto C

En la Tabla 29 se muestra el valor de F para el producto C con el cual se puede comprobar la variabilidad respecto a los 3 lotes de este producto.

Tabla 29: ANOVA para el producto C

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>
Entre grupos	13.4229915	2	6.71149576	23.8592895	0.00139341
Dentro de los grupos	1.68776922	6	0.28129487		
Total	15.1107607	8			

Fuente: Elaboración propia

En la Figura 22 se puede observar que el lote D3 presenta una variabilidad baja para los resultados obtenidos en 3 lecturas, lo que no se muestra en los otros 2 lotes. La variabilidad entre lotes es alta lo que se puede corroborar con el test de ANOVA mostrado en la Tabla 30 en el que el valor de F hallado es mucho mayor al F crítico.

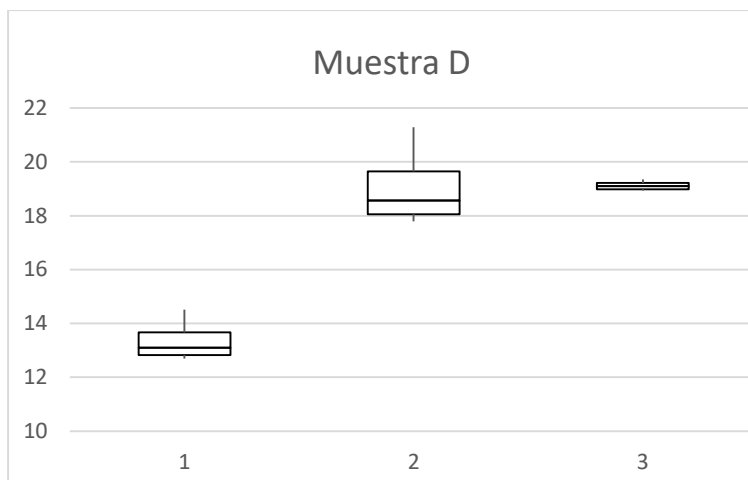


Figura 21: Diagrama de cajas y bigotes del producto D

Tabla 30: ANOVA para el producto D

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>
Entre grupos	65.2920964	2	32.6460482	109.814822	1.8805E-05
Dentro de los grupos	1.78369628	6	0.29728271		
Total	67.0757926	8			

Fuente: Elaboración propia

Podemos ver en la Figura 22 la gran variabilidad en el lote E1 que contrasta la pequeña variabilidad en los lotes E2 y E3, a pesar de esto el valor promedio es similar en los 3 lotes por que se puede decir que no existe variabilidad entre lotes.

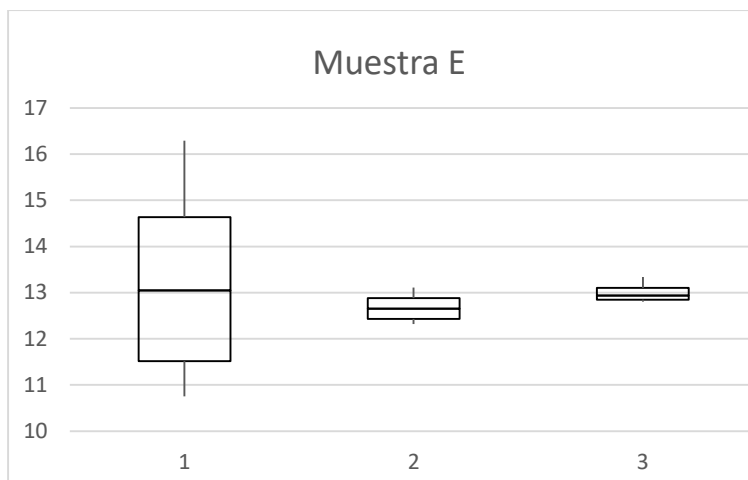


Figura 22: Diagrama de cajas y bigotes del producto E

En la Tabla 31 se muestra el análisis estadístico para el producto E donde el valor F obtenido es menor al F crítico por lo que se puede decir que no existe variabilidad desde el punto de vista estadístico.

Tabla 31: ANOVA para el producto E

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>
Entre grupos	1.83791726	2	0.91895863	3.12543909	0.11747679
Dentro de los grupos	1.76415269	6	0.29402545		
Total	3.60206995	8			

Fuente: Elaboración propia

Tanto en la Figura 23 como en el resultado del análisis mostrado en la Tabla 32 se puede comprobar la variabilidad entre los lotes del producto F.

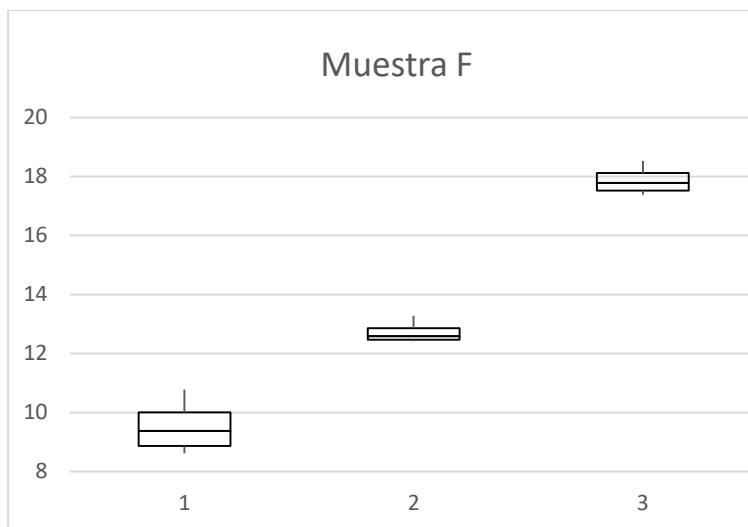


Figura 23: Diagrama de cajas y bigotes del producto F

El valor de F hallado en el test de ANOVA es muchísimo mayor al F crítico por lo que puede decir que existe mucha variabilidad en este producto.

Tabla 32: ANOVA para el producto F

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>
Entre grupos	111.237055	2	55.6185273	689.386795	8.1342E-08
Dentro de los grupos	0.48406956	6	0.08067826		
Total	111.721124	8			

Fuente: Elaboración propia

En la Figura 24 observamos una representación grafica de la cantidad de epicatequina encontrada en cada uno de los lotes de los 6 productos analizados.

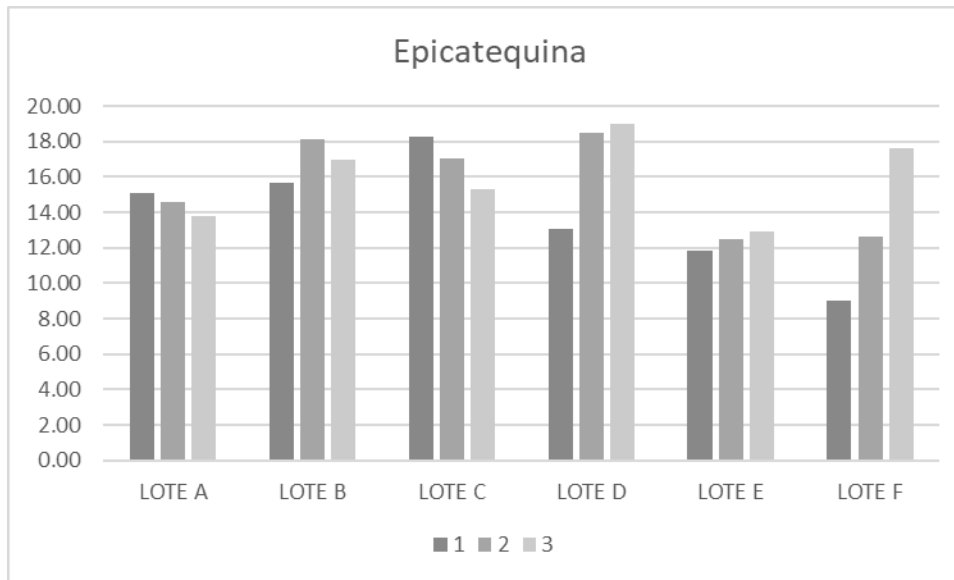


Figura 24: Cantidad de Epicatequina en las muestras

Se procedió a realizar el análisis estadístico, los resultados se muestran en la Tabla 33 que nos indican que la diferencia entre las muestras no es realmente significativa que que el valor de F de 2.268 es menor al F crítico y el valor de la probabilidad esta ligeramente por encima de 0.05.

Tabla 33: ANOVA entre los lotes de Epicatequina

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>
Entre grupos	64.0410118	5	12.8082024	2.26857229	0.11375901
Dentro de los grupos	67.7511707	12	5.64593089		
Total	131.792182	17			

Fuente: Elaboración Propia

Continuando con el análisis de las catequinas contenidas en el te verde en la Tabla 34 se muestra los resultados de Epigalocatequina (EGC) de las 6 marcas analizadas.

Tabla 34: Resultado en mg/g de epigallocatequina galato

	Muestra	Peso (g)	Área	tR	Concentración	Promedio	DS	CV
Lote A1	1	0.2503	1051580	8.14	31.12	32.87	2.21	6.73
	2	0.2502	1150166	8.005	35.36			
	3	0.2499	1074428	7.97	32.15			
Lote A2	1	0.2504	1168179	7.89	36.10	31.11	5.43	17.47
	2	0.2501	1069658	7.89	31.92			
	3	0.2498	915144	7.86	25.32			
Lote A3	1	0.2501	692799	7.85	15.75	19.88	3.57	17.98
	2	0.2504	839784	7.99	22.03			
	3	0.2502	835221	7.98	21.85			
Lote B1	1	0.2506	1006076	7.93	29.13	27.77	2.27	8.17
	2	0.2504	912621	7.71	25.15			
	3	0.2503	1002922	7.78	29.03			
Lote B2	1	0.2507	1065265	7.76	31.65	30.58	2.58	8.44
	2	0.2505	970888	7.75	27.64			
	3	0.2506	1083616	7.66	32.45			
Lote B3	1	0.2503	771726	7.71	19.12	20.35	2.26	11.11
	2	0.2505	768335	7.76	18.96			
	3	0.2502	860902	7.74	22.95			
Lote C1	1	0.2502	844801	7.9	22.26	20.58	2.45	11.89
	2	0.2505	832094	8.06	21.69			
	3	0.2503	740186	7.97	17.77			
Lote C2	1	0.2505	916801	7.87	25.32	27.32	3.66	13.39
	2	0.2504	911225	7.83	25.09			
	3	0.2508	1062815	7.82	31.54			
Lote C3	1	0.2503	896228	7.75	24.46	26.26	4.50	17.13
	2	0.2504	1058068	7.79	31.38			
	3	0.2503	860879	7.81	22.94			
Lote D1	1	0.2505	548008	7.72	9.53	9.36	0.16	1.69

Continua

	2	0.2504	543303	7.805	9.33			
	3	0.2502	540472	7.78	9.21			
Lote D2	1	0.2504	791864	7.66	19.98	23.48	4.33	18.46
	2	0.2500	841297	8.12	22.13			
	3	0.2502	986211	8.165	28.33			
Lote D3	1	0.2503	566525	7.74	10.33	8.03	1.99	24.79
	2	0.2504	484750	7.815	6.82			
	3	0.2502	487497	7.73	6.94			
Lote E1	1	0.2502	822430	8.068	21.30	22.73	1.23	5.43
	2	0.2504	873174	7.83	23.46			
	3	0.2505	872412	7.83	23.42			
Lote E2	1	0.2505	832668	7.73	21.72	29.12	6.97	23.92
	2	0.2506	1155952	7.805	35.55			
	3	0.2505	1028314	7.77	30.10			
Lote E3	1	0.2500	969256	7.71	27.62	28.24	0.59	2.08
	2	0.2504	997527	7.73	28.79			
	3	0.2503	986450	7.76	28.33			
Lote F1	1	0.2501	577671	7.85	10.81	11.18	1.36	12.14
	2	0.2503	621610	7.84	12.69			
	3	0.2500	559752	7.86	10.05			
Lote F2	1	0.2502	520192	7.77	8.34	7.30	0.93	12.68
	2	0.2505	488590	7.69	6.98			
	3	0.2501	478925	7.75	6.58			
Lote F3	1	0.2502	1213828	7.97	38.09	41.06	2.59	6.30
	2	0.2503	1324284	7.94	42.80			
	3	0.2503	1312217	8	42.29			

Fuente: Elaboración Propia

En la Figura 25 se muestra el análisis de caja y bigotes donde se pueden observar valores máximos, promedio y mínimos de los 3 lotes del producto A con el fin de observar la variabilidad.

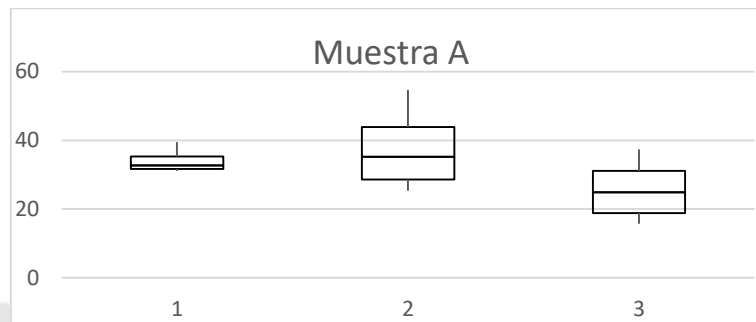


Figura 25: Diagrama de cajas y bigotes del producto A

En la Tabla 35 se muestra los resultados del ANOVA realizado al producto A con el fin de compara los resultados del estadístico F, dando como resultado un F mayor al crítico por lo que se puede decir que existe variabilidad.

Tabla 35: ANOVA para el producto A

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>
Entre grupos	298.177078	2	149.088539	9.47514077	0.01390681
Dentro de los grupos	94.4082264	6	15.7347044		
Total	392.585305	8			

Fuente: Elaboración propia

Se puede observar en la Figura 26 que tanto el lote B1 y B2 presentan variabilidad.

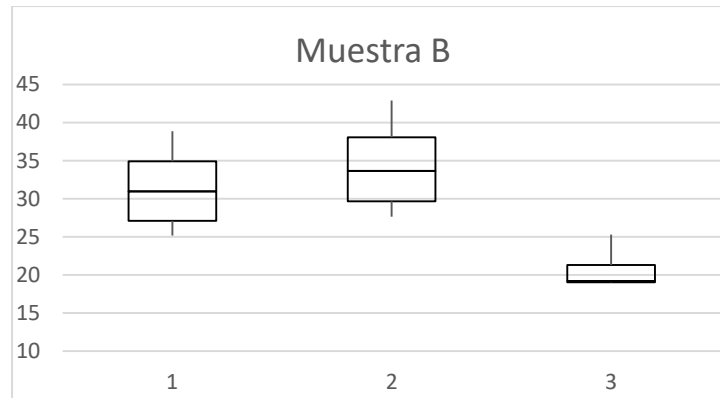


Figura 26: Diagrama de cajas y bigotes del producto B

En la Tabla 36 se ve que el valor F obtenido en el ANOVA es mayor al crítico por lo que podemos decir que existe variabilidad en los 3 lotes del producto B.

Tabla 36: ANOVA para el producto B

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>
Entre grupos	167.762229	2	83.8811144	14.875384	0.00472713
Dentro de los grupos	33.8335256	6	5.63892094		
Total	201.595754	8			

Fuente: Elaboración propia

En la Figura 27 se detalla gráficamente el resultado promedio de los lotes B1, B2 y B3 teniendo como valor mínimo de este producto la concentración de 17.770 mg/g y valor máximo hallado la concentración de 31.535 mg/g.

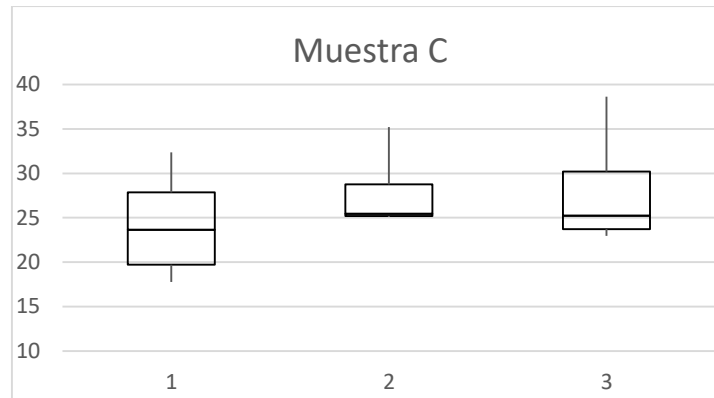


Figura 27: Diagrama de cajas y bigotes del producto C

En la Tabla 37 se observa el análisis ANOVA para el producto C, para este producto en la prueba F de Fisher se obtuvo un F calculado de 2.988, menor al F tablas indicando así que no existe diferencia significativa en este producto, estadísticamente este resultado se comprobó en el test de probabilidad obteniendo un valor mayor a 0.05 concluyendo así estadísticamente que la diferencia no es significativa.

Tabla 37: ANOVA para el producto C

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>
Entre grupos	78.8718137	2	39.4359069	2.98816963	0.12574232
Dentro de los grupos	79.1840728	6	13.1973455		
Total	158.055887	8			

Fuente: Elaboración propia

En la Figura 28 se muestra el grafico de caja y bigotes del producto D, se observa que no hay relación entre los lotes, la mediana obtenida en el lote E1 fue de 9.328 mg/g, para el lote E2 fue de 22.130 mg/g, mientras que el del lote E3 fue de 6.943 mg/g existiendo una gran variabilidad entre ambos lotes.

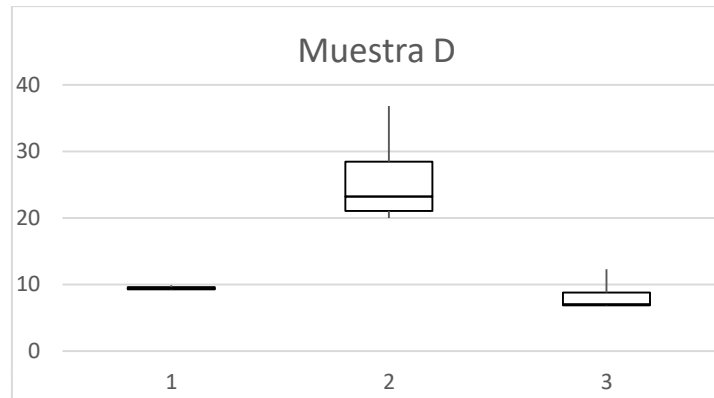


Figura 28: Diagrama de cajas y bigotes del producto C

La Tabla 38 muestra la prueba F de Fisher donde se obtiene un F calculado de 28.967 mayor al F tablas indicando que existe diferencia significativa, corroborado por el test de probabilidad 0.0008 menor a 0.05.

Tabla 38: ANOVA para el producto D

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>
Entre grupos	439.825742	2	219.912871	28.9675372	0.00082649
Dentro de los grupos	45.5502039	6	7.59170065		
Total	485.375946	8			

Fuente: Elaboración propia

En la Figura 29 se observa una variabilidad en el lote E2 pero los valores promedios de los 3 lotes muestran poca variabilidad lo que se comprueba con el ANOVA realizado a este producto.

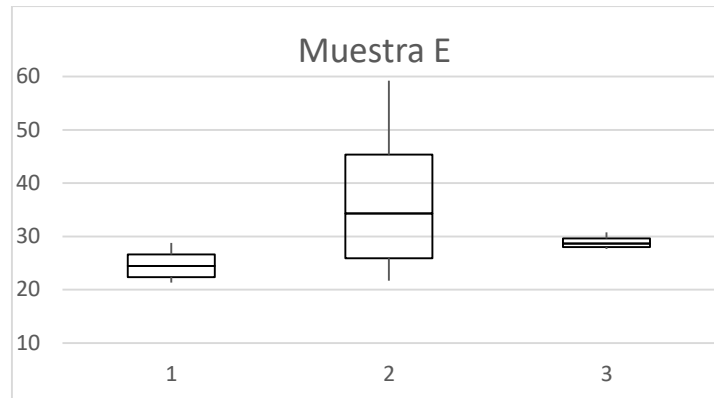


Figura 29: Diagrama de cajas y bigotes del producto E

En la Tabla 39 se muestran los resultados del ANOVA en el que podemos ver que el valor del estadístico F hallado es menor al crítico entonces se dice que la variabilidad entre lotes no es significativa.

Tabla 39: ANOVA para el producto E

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>
Entre grupos	72.0626194	2	36.0313097	2.14463609	0.19828953
Dentro de los grupos	100.803982	6	16.8006637		
Total	172.866602	8			

Fuente: Elaboración propia

Tanto en la Figura 30 como en los resultados mostrados en la Tabla 40 se puede observar la gran variabilidad entre los 3 lotes del producto F, el valor de F obtenido esta muy por encima del F crítico.

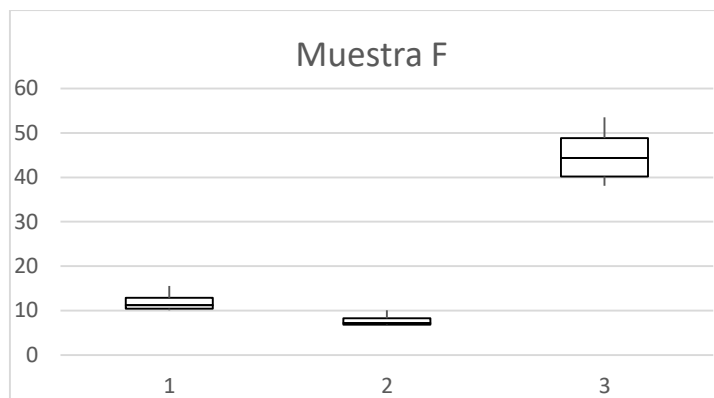


Figura 30: Diagrama de cajas y bigotes del producto F

Tabla 40: ANOVA para el producto F

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>
Entre grupos	2047.22379	2	1023.6119	326.702775	7.5335E-07
Dentro de los grupos	18.7989569	6	3.13315948		
Total	2066.02275	8			

Fuente: Elaboración propia

En la Figura 31 podemos ver la cantidad de epigalocatequina galato presente en cada uno de los 3 lotes de cada una de las 6 muestras usadas para su determinación cuantitativa. Podemos ver en algunas muestras alguna variación entre sus lotes como es el caso de las muestras D y F, sin embargo en las demás no existe mucha variación lo que se corrobora con el análisis estadístico.

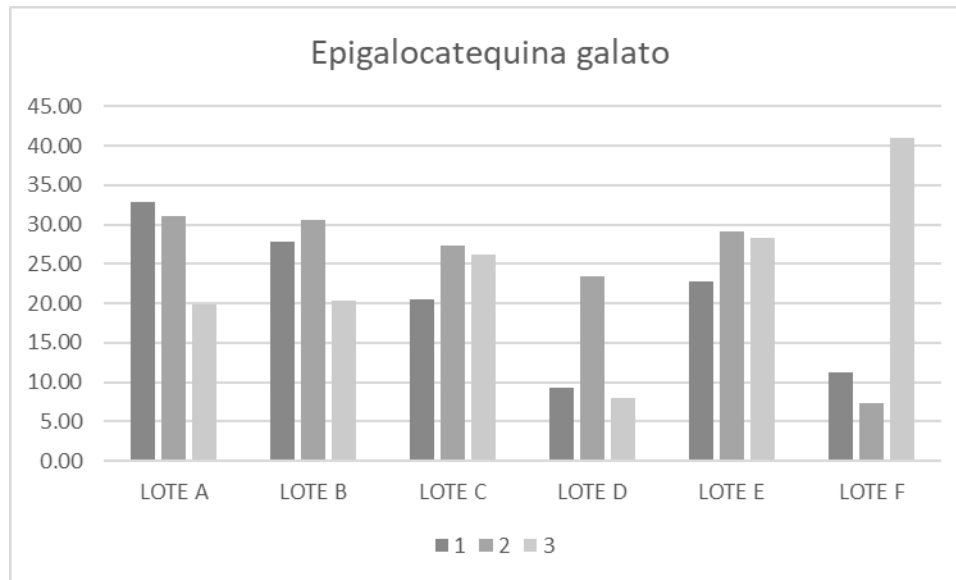


Figura 31: Cantidad de Epigalocatequina galato en las muestras

En la Tabla 41 podemos ver el valor hallado de F luego del análisis estadístico respectivo el cual nos da un valor de 1.04 el cual es mucho menor al F crítico que es de 3.11 lo que nos indica que no hay diferencia significativa entre las 6 muestras.

Tabla 41: ANOVA entre los lotes de Epigalocatequina galato

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>
Entre grupos	447.950958	5	89.5901916	1.03908718	0.43862779
Dentro de los grupos	1034.64109	12	86.220091		
Total	1482.59205	17			

Fuente: Elaboración Propia

En la Tabla 42 se presentan los resultados de las áreas de epicatequina galato (ECG) obtenidos en el análisis cromatográfico realizado para los lotes de las 6 marcas obtenidas, cada lote fue corrido 3 veces con un total de 9 análisis por marca, además se presentan los respectivos pesos tomados para cada análisis, tiempos de retención, resultado promedio y desviación estándar.

Tabla 42: Resultado en mg/g de epicatequina galato

	Muestra	Peso (g)	Área	tR	Concentración	Promedio	DS	CV
Lote A1	1	0.2503	231370	12.56	9.04	10.19	1.11	10.92
	2	0.2502	275560	12.455	11.27			
	3	0.2499	255187	12.4	10.26			
Lote A2	1	0.2504	255661	12.35	10.26	9.45	1.53	16.17
	2	0.2501	258218	12.29	10.40			
	3	0.2498	203998	12.35	7.69			
Lote A3	1	0.2501	228492	12.325	8.91	8.52	1.57	18.46
	2	0.2504	186465	12.445	6.79			
	3	0.2502	247545	12.397	9.86			
Lote B1	1	0.2506	197417	12.35	7.33	7.48	0.21	2.83
	2	0.2504	198380	12.18	7.39			
	3	0.2503	205016	12.22	7.72			
Lote B2	1	0.2507	163862	12.2	5.65	5.61	0.09	1.57
	2	0.2505	161025	12.205	5.51			
	3	0.2506	164337	12.2	5.67			
Lote B3	1	0.2503	120781	12.165	3.50	3.53	0.15	4.25
	2	0.2505	118976	12.2	3.40			
	3	0.2502	124751	12.235	3.70			
Lote C1	1	0.2502	123026	12.34	3.61	3.32	0.52	15.73
	2	0.2505	123601	12.48	3.63			
	3	0.2503	105276	12.437	2.72			
Lote C2	1	0.2505	120864	12.31	3.50	3.79	0.33	8.74
	2	0.2504	125144	12.26	3.71			
	3	0.2508	133913	12.265	4.15			
Lote C3	1	0.2503	119450	12.25	3.43	3.60	0.29	8.16
	2	0.2504	129617	12.27	3.94			
	3	0.2503	119443	12.26	3.43			
Lote D1	1	0.2505	116494	12.19	3.28	3.31	0.08	2.30

	2	0.2504	116113	12.26	3.26			
	3	0.2502	118844	12.24	3.40			
Lote D2	1	0.2504	128381	12.12	3.88	6.75	2.60	38.54
	2	0.2500	199346	12.525	7.45			
	3	0.2502	229242	12.59	8.94			
Lote D3	1	0.2503	196651	12.28	7.30	7.23	0.44	6.03
	2	0.2504	185903	12.28	6.76			
	3	0.2502	202963	12.23	7.62			
Lote E1	1	0.2502	133694	12.5	4.14	4.71	0.61	12.86
	2	0.2504	157752	12.24	5.35			
	3	0.2505	143468	12.245	4.63			
Lote E2	1	0.2505	209589	12.2	7.95	7.39	0.64	8.72
	2	0.2506	201843	12.25	7.55			
	3	0.2505	184462	12.2	6.69			
Lote E3	1	0.2500	156038	12.16	5.27	5.44	0.15	2.78
	2	0.2504	161565	12.18	5.54			
	3	0.2503	161228	12.21	5.52			
Lote F1	1	0.2501	105237	12.285	2.72	2.61	0.13	5.10
	2	0.2503	100228	12.27	2.46			
	3	0.2500	104122	12.31	2.66			
Lote F2	1	0.2502	135929	12.21	4.26	4.14	0.14	3.34
	2	0.2505	130697	12.215	3.99			
	3	0.2501	134464	12.23	4.19			
Lote F3	1	0.2502	238628	12.41	9.41	9.95	0.52	5.20
	2	0.2503	259252	12.36	10.44			
	3	0.2503	250441	12.44	10.00			

Fuente: Elaboración propia

Gracias a lo observado en la Figura 32 y al F hallado en la Tabla 43, se puede concluir que no existe diferencia significativa entre los 3 lotes del producto A para la epicatequina galato.

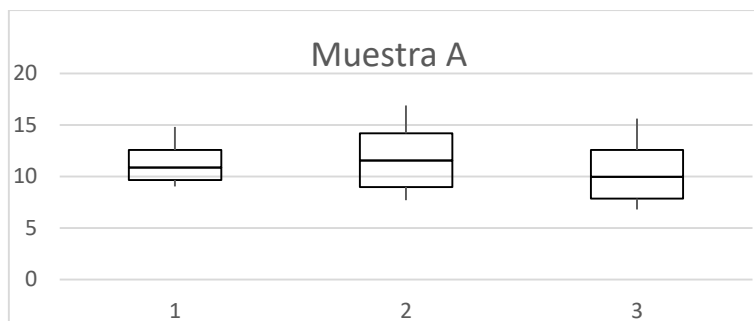


Figura 32: Diagrama de cajas y bigotes del producto A

Tabla 43: ANOVA para el producto A

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>
Entre grupos	4.20302639	2	2.1015132	1.0432396	0.40848426
Dentro de los grupos	12.0864653	6	2.01441088		
Total	16.2894916	8			

Fuente: Elaboración propia

Podemos ver gráficamente en la Figura 33 la variabilidad entre los lotes del producto B.

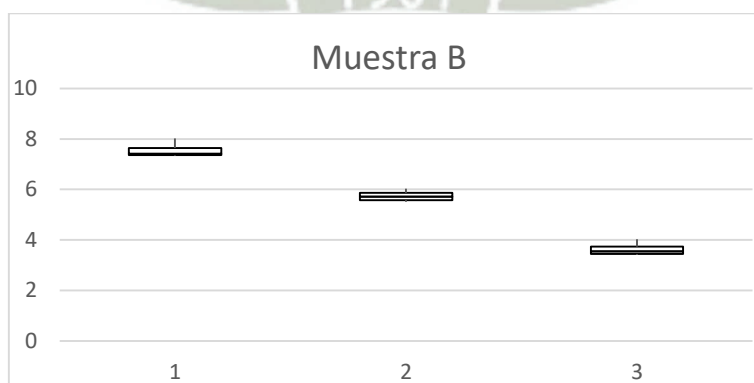


Figura 33: Diagrama de cajas y bigotes del producto B

En la Tabla 44 se observa el análisis ANOVA para el producto B, para este producto en la prueba F de Fisher se obtuvo un F calculado de 468.446 mayor al F tablas indicando así que existe una diferencia en este producto, estadísticamente este resultado se comprobó en el test de probabilidad concluyendo así que existe una diferencia estadísticamente significativa en este producto.

Tabla 44: ANOVA para el producto B

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>
Entre grupos	23.413287	2	11.7066435	468.445614	2.5767E-07
Dentro de los grupos	0.1499424	6	0.0249904		
Total	23.5632294	8			

Fuente: Elaboración propia

En el digrama de la Figura 34 se puede observar que la concentración calculada para los 3 lotes es parecida y no debería ser significativa. Lo que se comprueba con los resultados obtenidos en la Tabla 45, el valor de F hallado es de 1.051 es menor al critico por lo que estadísticamente no hay diferencia significativa.



Figura 34: Diagrama de cajas y bigotes del producto C

Tabla 45: ANOVA para el producto C

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>
Entre grupos	0.32833762	2	0.16416881	1.05153144	0.40598139
Dentro de los grupos	0.93674123	6	0.15612354		
Total	1.26507885	8			

Fuente: Elaboración propia

El diagrama de caja y bigotes de la Figura 35 muestra cierta variabilidad en el lote D2 y también entre lotes lo que se necesitará comprobar estadísticamente mediante el análisis de varianza de un factor.



Figura 35: Diagrama de cajas y bigotes del producto D

El valor de F de la Tabla 46 es algo mayor al crítico por que estadísticamente la diferencia existente entre los 3 lotes es significativa. Además el valor de probabilidad hallado es de 0.03, menor al aceptado que es de 0.10.

Tabla 46: ANOVA para el producto D

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>
Entre grupos	27.4066834	2	13.7033417	5.89702848	0.03833794
Dentro de los grupos	13.9426239	6	2.32377064		
Total	41.3493072	8			

Fuente: Elaboración propia

En la Figura 36 gráficamente se observa, que en el lote E3 no hay una dispersión significativa con relación a su mediana obtenida en el análisis, el lote E1 y E2 muestra alguna variabilidad, al observar los datos obtenidos de los tres grupos de estudio se infiere que no hay relación entre estos lotes.



Figura 36: Diagrama de cajas y bigotes del producto E

En la Tabla 47 se muestra un valor de F hallado de 21.546, el cual es mayor al F crítico por lo que se infiere que existe diferencia significativa entre los lotes del producto E.

Tabla 47: ANOVA para el producto E

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>
Entre grupos	11.5651398	2	5.78256989	21.5457334	0.00182573
Dentro de los grupos	1.61031508	6	0.26838585		
Total	13.1754549	8			

Fuente: Elaboración propia

Por último, podemos observar que tanto la Figura 37 y la Tabla 48 muestran evidencia para decir que el producto F del análisis estadístico para la Epicatequina galato, tiene diferencia significativa entre sus lotes.

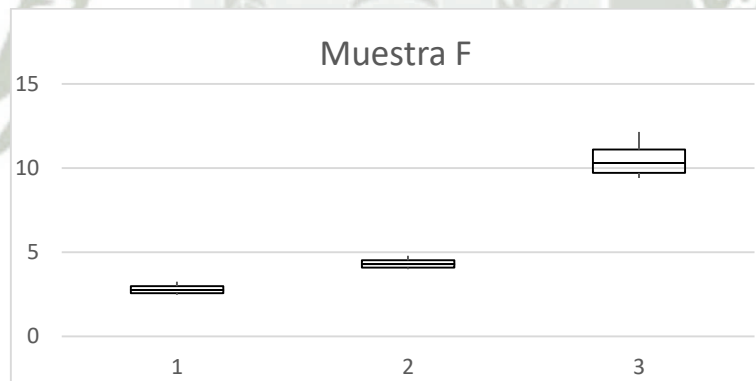


Figura 37: Diagrama de cajas y bigotes del producto F

El valor de F mostrado en la Tabla 49 nos indica que hay una variabilidad considerable entre los 3 lotes del producto F; el valor de 442.90 es mucho mayor a F crítico, corroborado por el valor de probabilidad.

Tabla 49: ANOVA para el producto F

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>
Entre grupos	89.9187524	2	44.9593762	442.89886	3.0455E-07
Dentro de los grupos	0.60906966	6	0.10151161		
Total	90.527822	8			

Fuente: Elaboración propia

En la Figura 38 se muestra gráficamente en barras los valores hallados luego de la determinación cuantitativa de epicatequina galato en las muestras de té verde.

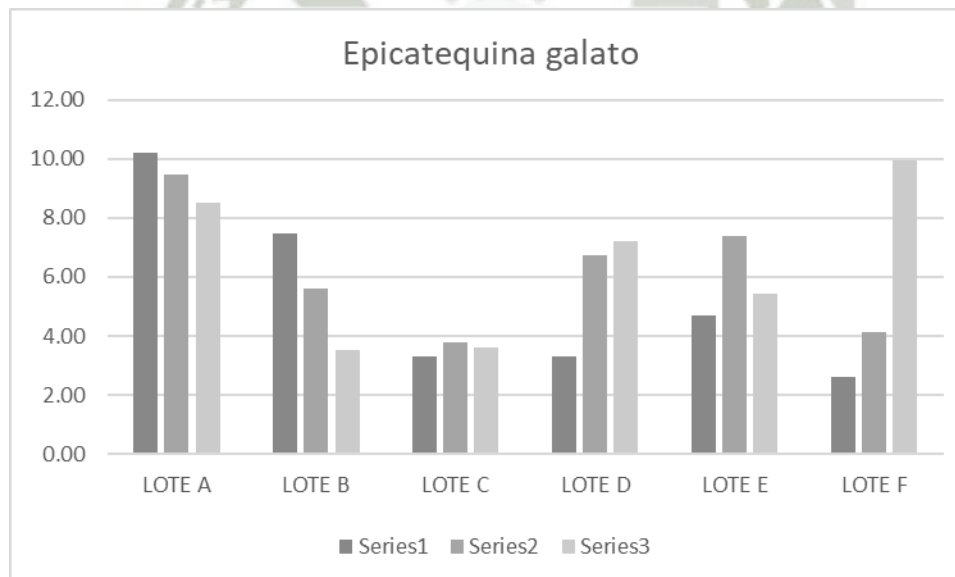


Figura 38: Cantidad de Epicatequina galato en los lotes

Los valores mostrados gráficamente fueron sometidos a un análisis estadístico para poder ver si existe diferencia significativa entre muestras. El resultado obtenido fue que no hay diferencia significativa ya que el valor de F obtenido es menor al F crítico.

Tabla 50: ANOVA entre muestras de Epicatequina galato

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>
Entre grupos	53.497368	5	10.6994736	2.45596004	0.09390403
Dentro de los grupos	52.2784089	12	4.35653407		
Total	105.775777	17			

Un estudio realizado en china por Ji-Qiang Jin et al. (2014) da como resultados para catequinas totales de la variedad *sinensis* 152.9 mg/g de te verde con un coeficiente de variación de 11.7%, resultados que van de acorde a lo calculado en nuestro trabajo.<sup>50</sup>

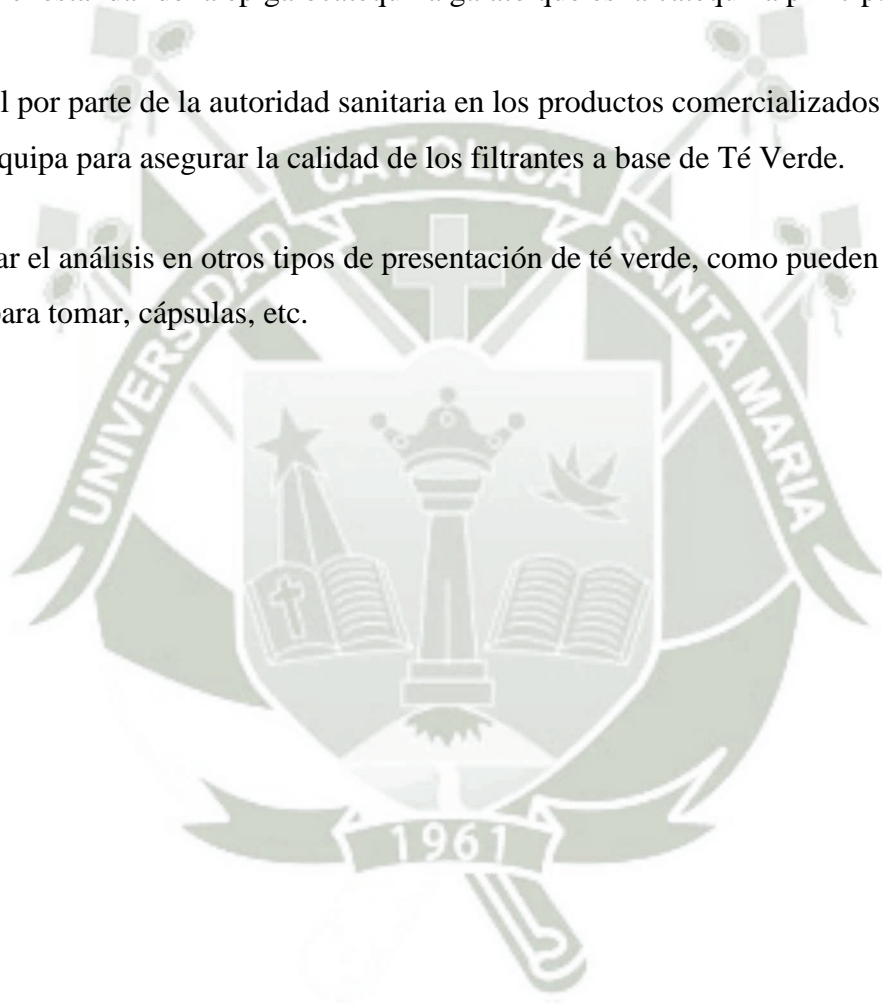
Otro estudio realizado en Tailandia por Jankana B. et al. (2012) para muestras de te verde de Tailandia, Japon y China dan valores de catequinas totales desde 21,39 mg/g hasta 114,12 mg/g de te verde.<sup>51</sup>

## CONCLUSIONES

- Primera: Las cuatro catequinas principales del té verde se pudieron determinar mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución en fase reversa, con un sistema cromatográfico en gradiente a una velocidad de flujo de 1,7 mL/min, fase móvil “A” (Acetonitrilo) y fase móvil “B” (Buffer Acetato), a una longitud de onda de 210 nm, tiempo de retención de 14 min aproximadamente.
- Segunda: El método propuesto es lineal debido a que se obtuvo como resultado un coeficiente de correlación muy cercano a 1, el método es exacto ya que el grado de concordancia entre el valor obtenido y el valor esperado cumple con los criterios establecidos y es preciso puesto que al determinar la media de dispersión alrededor de un valor medio fue <2%.
- Tercera: Se logró cuantificar el contenido total de catequinas para cada uno de los productos comerciales de té verde encontrando valores dentro de un rango de 80,673 – 148,144 (mg/g).
- Cuarta: La comparación de los resultados en los diferentes lotes de los productos analizados muestra la variación existente entre productos y también entre lotes de cada uno de ellos obteniendo como resultado promedio para el producto A- 99,274 mg/g, producto B- 148,144 mg/g, producto C- 143,482 mg/cap., producto D- 80,673 mg/cap., producto E- 93,673 mg/cap. y producto F- 99,202 mg/cap.

## SUGERENCIAS

- Realizar una validación del método usando cada estándar por separado o solamente usando el estándar de la epigalocatequina galato que es la catequina principal.
- Control por parte de la autoridad sanitaria en los productos comercializados en la ciudad de Arequipa para asegurar la calidad de los filtrantes a base de Té Verde.
- Efectuar el análisis en otros tipos de presentación de té verde, como pueden ser: bebidas listas para tomar, cápsulas, etc.



## BIBLIOGRAFIA

- 1 Viuda-Martos, M., Pérez-Álvarez, J., & Fernández-López, J. (2013). Food Oxidant and Antioxidant: Chemical, Biological, and Functional Properties, 489 -528.
- 2 Abbas, S., & Wink, M. (2014). Green Tea Extract Induces the Resistance of *Caenorhabditis elegans* against Oxidative Stress. *Antioxidants*, 3(1), 129–143.
- 3 Yuegang Zuo, Hao Chen, Yiwei Deng, Simultaneous determination of catechins, caffeine and gallic acids in green, Oolong, black and pu-erh teas using HPLC with a photodiode array detector, *Talanta*, Volume 57, Issue 2, 2002, Pages 307-316.
- 4 Manning, J., & Roberts, J. C. (2003). Analysis of Catechin Content of Commercial Green Tea Products. *Journal of Herbal Pharmacotherapy*, 3(3), 19-32.
- 5 Dufresne CJ, Farnworth ER. A review of latest research finding on the health promotion properties of tea. *J Nutr Biochem* 2001;12 : 404-421
- 6 McKay DL, Blumberg JB. The role of tea in human health: an update. *J Am Coll Nutr* 2002; 21: 1-13.
- 7 Anand Jigisha, R. N., Kumar Navin, Gautam Pankaj. (2012). Green tea: a magical herb with miraculous outcomes. *International Research Journal of Pharmacy*, 3(5), 139-148.
- 8 Vinson J, Dabbagh Y, Serry M, Jang J. Plant flavonoids, especially tea flavonols, are powerful antioxidants using an in vitro oxidation model for heart disease. *J Agric Food Sci* 1995; 43: 2800-2802.
- 9 Graham HN. Green tea composition, consumption, and polyphenol chemistry. *Prev Med* 1992; 21: 334-350.
- 10 Lunder T. Tannings of green and black tea: Nutritional value, physiological properties and determination. *Farm Tijdschr Belg* 1989; 66:34-42
- 11 Tanizawa H, Toda S, Sazuka Y, Taniyama T, Hayashi T, Arichi S, Takino Y. Natural antioxidants. I. Antioxidative components of tea leaf (*Thea. sinensis*). *Chem Pharm Bull* 1984; 32:201 1-2014
- 12 Zhao B, Li X, He R, Cheng S, Wenjuan X. Scavenging effect of extracts of green tea and natural antioxidants on active oxygen radicals. *Cell Biophys* 1989; 14:175-185

- 13 Uchida S, Edamatsu R, Hiramatsu M, Mori A, Nonaka G, Nishioka I, Niwa M, Ozaki M. Condensed tannins scavenge oxygen free radicals. *Med Sci Res* 1987; 15:831-832
- 14 Khan, N., & Mukhtar, H. (2007). Tea polyphenols for health promotion. *Life Sciences*, 81(7), 519-533.
- 15 Lambert, J.D., Yang, C.S., 2003a. Cancer chemopreventive activity and bioavailability of tea and tea polyphenols. *Mutation Research* 523–524, 201–208.
- 16 Lambert, J.D., Yang, C.S., 2003b. Mechanisms of cancer prevention by tea constituents. *Journal of Nutrition* 133 (10), 3262S–3267S
- 17 Vaidyanathan, J.B., Walle, T., 2002. Glucuronidation and sulfation of the tea flavonoid (–)-epicatechin by the human and rat enzymes. *Drug Metabolism and Disposition* 30 (8), 897–903.
- 18 Li, C., Lee, M.J., Sheng, S., Meng, X., Prabhu, S., Winnik, B., Huang, B., Chung, J.Y., Yan, S., Ho, C.T., Yang, C.S., 2000. Structural identification of two metabolites of catechins and their kinetics in human urine and blood after tea ingestion. *Chemical Research in Toxicology* 13 (3), 177–184
- 19 Okushio, K., Matsumoto, N., Kohri, T., Suzuki, M., Nanjo, F., Hara, Y., 1996. Absorption of tea catechins into rat portal vein. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 19 (2), 326–329
- 20 Kim, S., Lee, M.J., Hong, J., 2000. Plasma and tissue levels of tea catechins in rats and mice during chronic consumption of green tea polyphenols. *Nutrition and Cancer* 37 (1), 41–48
- 21 Higdon, J.V., Frei, B., 2003. Tea catechins and polyphenols: health effects, metabolism, and antioxidant functions. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 43 (1), 89–143
- 22 Yang, C.S., Chen, L., Lee, M.J., Balentine, D., Kuo, M., Schantz, S.P., 1998. Blood and urine levels of tea catechins after ingestion of different amounts of green tea by human volunteers. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 7 (4), 351–354
- 23 Akhtar N, Khan BA, Mahmood T: The morphology characteristics and medicinal properties of *Camellia sinensis*. *Journal of Medicinal Plant Research* 2010; 4:2028-2033
- 24 Gruber S, Otto F, Perva U, Skerget M, Weinreich B. Extraction of active ingredient from green tea. *Food Chemistry* 2006; 96; 597-605.
- 25 Biswas KP: Description of tea plant, in encyclopedia of medicine. *Journal of Science of Food and Agriculture* 2006; 6:121.
- 26 Aladaq H, Ercisli S, Gormez A, Yesil D.Z, Yesil M: Antifungal activity of green tea leaves (*Camellia sinensis*). *Research Article* 2009; 5: 437-440.

- 27 Elmets CA, Katiyar SK: Green tea polyphenolic antioxidant and skin protection. *International journal of oncology* 2001; 18:1307-1313.
- 28 Lee KH, Seong BL, Song JM: Antiviral effect of catechins in green tea on influenza virus. *Antiviral Research* 2005; 68: 66-74.
- 29 Ray AB, Sarma BK, Singh UP: Medicinal properties of green tea: antibacterial, antifungal, antiviral a diversity. *The Journal of Tropical Biology* 2004;6: 126-130.
- 30 Sabu MC, Smitha K, Ramadasan K: Antidiabetic activity of Green tea polyphenols and their role in reducing oxidative stress in experimental diabetes. *Journal of Ethnopharmacology* 2002; 83: 109-116.
- 31 Kumar G, Kumar V, Kumar S, Pricy A: Hepatoprotective effect of green tea (*Camellia sinensis*) on cadmium chloride induced toxicity in rats. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research* 2010; 2:125-128.
- 32 Debiao LU, Mbata TJ, Saiker A: Antibacterial activity of crude extract of chinese green tea. *African Journal of Biotechnology* 2008; 7: 1571-15573.
- 33 Glucin I: The antioxidant and radical scavenging activities of green tea and black pepper seed, *International Journal of Food Science and Nutrition* 2005;56: 491-499.
- 34 Goto K, Hara Y, Nanjo F, Sakai M, Seto R, Suzuki M: Scavenging effect of tea catechin and their derivatives on 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Free Radical Biology Medicines* 1996; 21; 895-902.
- 35 Nooman A, Farah H, KA, Othman A.A, Zaha EA: Antioxidant activity of common plant. *Turkish Journal of Biology* 2007; 32; 51-55.
- 36 Ferro-Luzzi A, Ghiselli A, Serfini M: In vivo and in vitro antioxidant effect of green and black tea in man. *European Journal of Clinical Nutrition* 1998; 50: 28-32.
- 37 Agarwal S, Maki KC, Rains TM: Antiobesity effect of green tea catechins: a mechanistic review. *Journal of Nutritional Biochemistry* 2010; 22: 1-7.
- 38 Agarwal R, Ahmad N, Feyes DK, Mukhtar H, Nieminen AL: Green tea constituent epigallocatechin3-gallate and induction of apoptosis and cell cycle arrest in human carcinoma cells. *Journal of the National Cancer Institute* 1997; 89: 1881-1886.
- 39 Chen KY, Chen ZP, Ho CT, Schell JB: Green tea epigallocatechin gallate shows pronounced effect on cancerous cell but not on their normal counterparts. *Cancer Letters* 1998; 129: 173-179.

- 40 Ahmad N, Mukhtar H; Green tea in prevention of cancer. *Toxicology Science* 1999; 52: 111-117.
- 41 D.M P, Freddrie B, Ferlay J, Pisani.P: Estimation world cancer burden globocan. *International Journal of Cancer* 2001; 94: 153-156.
- 42 Ahmad I, Aqil F, Mehmood Z: Antioxidant and free radical scavenging properties of twelve traditionally used Indian medicinal plants. *Turkish Journal Biology* 2006;30: 177-183.
- 43 Sommer A.P, Scharnweker T, Zhu D: Extraordinary anticancer effect of green tea and red light. *Photomed Laser Surgery* 2010; 28: 429-430.
- 44 Meyer, V. R. (2010). *Practical High-Performance Liquid Chromatography*: John Wiley & Sons, Ltd.
- 45 Lindsay, S., & Kealey, D. (1987). *High performance liquid chromatography*. United States: John Wiley and Sons, New York, NY.
- 46 Skoog, D. A., West, D. M., & Holler, F. J. (1996). *Fundamentos de química analítica*: Reverté.
- 47 Limón, R. R. *Historia y evolución del pensamiento científico*: Juan Carlos Martínez Coll.
- 48 Ahuja, S., & Rasmussen, H. (2011). *HPLC Method Development for Pharmaceuticals*: Elsevier Science.
- 49 Sharma, V., Gulati, A., Ravindranath, S. D., & Kumar, V. (2005). A simple and convenient method for analysis of tea biochemicals by reverse phase HPLC. *Journal of Food Composition and Analysis*, 18(6), 583-594
- 50 Ji-Qiang J., Jian-Qiang M., Chun-Lei M., Ming-Zhe Y., and Liang C. (2014). Determination of Catechin Content in Representative Chinese Tea Germplasms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(39), 9436-9441
- 51 Burana-osot, J., & Yanpaisan, W. (2012). Catechins and caffeine contents of green tea commercialized in Thailand

## ANEXO 1: Certificado de Análisis y de Seguridad

05158-81 1g

### Certificate of Analysis

Product Name : Catechin Mixture

{(-)-Epicatechin , (-)-Epigallocatechin , (-)-Epicatechin gallate ,  
(-)-Epigallocatechin gallate} , from Green tea  $\geq$  Total 80%(HPLC)

Code No. : NH025104

Lot No. : 0012 (V6A7662)

	Test	Results
1	Appearance	Light yellowish green powder
2	TLC	Spots of 4 Catechins and some very weak spots
3	Purity(HPLC)	83.4%

**Nagara Science Co., Ltd.**

840 Furuichiba, Gifu 501-1121, JAPAN

Phone : +81-58-234-4257, Fax : +81-58-234-4724

E-mail:nagara@nsgifu.jp, <http://www.nsgifu.jp>

*Emi Matsumoto*

Catechin Mixture, NACALAI TESQUE, INC., GHS-05158E-1, 06/02/2016

1/5

Date of issue : 06/02/2016  
Revised by : -

### Safety Data Sheet

#### 1. Identification of the substance or mixture and of the supplier

Product name : Catechin Mixture  
Name of supplier : NACALAI TESQUE, INC.  
Address : 498 Higashitamaya-cho, Nijo Karasuma, Nakagyo-ku, Kyoto 604-0855 Japan  
Division : Production Control Department  
Phone : 075 932 1755  
F A X : 075 932 4872  
Emergency phone No. : +81 75 251 1730 (International)  
Recommended use of the chemical(s) : Reagent, intermediate raw material of a/the chemistry article  
Product No. (SDS No.) : GHS-05158E-1

#### 2. Hazards identification

##### GHS hazard class and category

PHYSICAL HAZARDS	EXPLOSIVES	-
	FLAMMABLE GASES	-
	AEROSOLS	-
	OXIDIZING GASES	-
	GASES UNDER PRESSURE	-
	FLAMMABLE LIQUIDS	-
	FLAMMABLE SOLIDS	-
	SELF-REACTIVE SUBSTANCES AND MIXTURES	-
	PYROPHORIC LIQUIDS	-
	PYROPHORIC SOLIDS	-
	SELF-HEATING SUBSTANCES AND MIXTURES	-
	SUBSTANCES AND MIXTURES WHICH, IN CONTACT WITH WATER, EMIT FLAMMABLE	-
	OXIDIZING LIQUIDS	-
	OXIDIZING SOLIDS	-
	ORGANIC PEROXIDES	-
HEALTH HAZARDS	CORROSIVE TO METALS	-
	ACUTE TOXICITY - ORAL	-
	ACUTE TOXICITY - DERMAL	-
	ACUTE TOXICITY - INHALATION (GASES)	-
	ACUTE TOXICITY - INHALATION (VAPOURS)	-
	ACUTE TOXICITY - INHALATION (DUSTS AND MISTS)	-
	SKIN CORROSION/IRRITATION	-
	SERIOUS EYE DAMAGE/EYE IRRITATION	-
	RESPIRATORY SENSITIZATION	-
	SKIN SENSITIZATION	-
	GERM CELL MUTAGENICITY	-
	CARCINOGENICITY	-
	REPRODUCTIVE TOXICITY	-
	SPECIFIC TARGET ORGAN TOXICITY	-
	- SINGLE EXPOSURE	-
	SPECIFIC TARGET ORGAN TOXICITY	-
	- REPEATED EXPOSURE	-
ENVIRONMENTAL HAZARDS	ASPIRATION HAZARD	-
	HAZARDOUS TO THE AQUATIC ENVIRONMENT	-
	- ACUTE HAZARD	-
	HAZARDOUS TO THE AQUATIC ENVIRONMENT	-
	- CHRONIC HAZARD	-
	HAZARDOUS TO THE OZONE LAYER	-

- : Off the subject/not possible to classify

Catechin Mixture, NACALAI TESQUE, INC., GHS-05158E-1, 06/02/2016

2/5

SYMBOL -  
SIGNAL WORD -  
HAZARD STATEMENTS -  
PREVENTION -  
RESPONSE -  
STORAGE -  
DISPOSAL -

Other hazard statements      Wear suitable protective clothing, gloves and eye/face protection.  
Avoid contact with skin and eyes.  
In case of contact with eyes, rinse immediately with plenty of water and seek medical advice.  
In case of accident or if you feel unwell, seek medical advice immediately (show label where possible).

### 3. Composition/information on ingredients

Substance/mixture : Mixture

Chemical identity (or ingredient name) : Catechin

Chemical formula : [(-)-Epicatechin] C15H14O6  
[(-)-Epigallocatechin] C15H14O7  
[(-)-Epicatechin Gallate] C22H18O10  
[(-)-Epigallocatechin Gallate] C22H18O11

CAS No. : [(-)-Epicatechin] 490-46-0  
[(-)-Epigallocatechin] 970-74-1  
[(-)-Epicatechin Gallate] 1257-08-5  
[(-)-Epigallocatechin Gallate] 989-51-5

Concentration or concentration range (or composition) (%)  
: min. 80 (Total)

Chemical No, Japan : -

Impurities and stabilizing additives which are themselves classified and which contribute to the classification of the substance : None

### 4. First-aid measures

General description of necessary first aid measures :

In case of accident or if you feel unwell, seek medical advice immediately (show the label where possible).

Inhalation :

In case of accident by inhalation: remove casualty to fresh air and keep at rest.  
If breathing is weak, irregular or has stopped, open his airway, loosen his collar and belt and administer artificial respiration.

Skin contact :

Take off immediately all contaminated clothing.  
After contact with skin, wash immediately with plenty of water.

Eye contact :

Gently rinse the affected eyes with clean water for at least 15 minutes. Arrange for transport to the nearest medical facility for examination and treatment by a physician as soon as possible.

Ingestion :

If swallowed, seek medical advice immediately and show this container or label.  
If swallowed, rinse mouth with water (only if the person is conscious).  
Do not make an unconscious person vomit.

Precaution for first-aid persons :

Protect yourself by wearing rubber gloves and air-tight safety goggles.

### 5. Fire-fighting measures

Extinguishing media :

In case of fire, use water mist, foam/water resistant foam, powder, CO2, dry sand.  
Use extinguishing media appropriate to surrounding fire conditions.

Catechin Mixture, NACALAI TESQUE, INC., GHS-05158E-1, 06/02/2016

3/5

Incompatible extinguishing media :

Nothing particular

Specific hazards arising from the chemical (and with regard to fire-fighting measures) :

Toxic gases will form upon combustion of : carbon monoxide

Specific fire-fighting measures :

Move containers from fire area if it can be done without risk, if not possible, apply water from a safe distance to cool and protect surrounding area. Dry chemical powder or dry sand should be used for small fires.

Special protective equipment and precautions for fire-fighters :

Fire-fighters should wear proper protective equipment.

#### 6. Accidental release measures

Personal precautions, protective equipment and emergency procedures :

Evacuate non-essential personnel.

Wear appropriate protective clothing.

Environmental precautions :

Attention should be given not to cause damage to the environment by flowing of spillage to rivers.

Methods and materials for containment and clean up :

Sweep up, place in a bag and hold for waste disposal.

Avoid raising dust.

Appropriate containment techniques/clean up procedures :

Shut off the leakage source and stop leak if you can do it without risk.

#### 7. Handling and storage

Precautions for safe handling :

Countermeasure technique(s) :

(Exposure control for handling personnel)

Wear proper equipment and take measures according to [8. Exposure control/personal protection].

Local exhaust ventilation system/general ventilation :

Ventilate according to [8. Exposure control/personal protection].

Preventive measures :

Handle not to generate aerosol or dust.

Incompatible contact(s) :

See [10. Stability and reactivity].

Safety measures/incompatibility :

Do not shock, overturn, drop, or drag containers.

Conditions for safe storage, including any incompatibilities :

Countermeasure technique(s) :

Tightly closed in a well-ventilated place.

Incompatibilities :

See [10. Stability and reactivity].

Storage :

(Recommendation for storage)

Keep tightly closed in cold place.

(Incompatible storage condition)

See [10. Stability and Reactivity].

Recommended container and packaging materials :

Glass, polyethylene, polypropylene, etc.

#### 8. Exposure control/personal protection

Appropriate engineering controls :

Keep source tightly closed or install local exhaust ventilation. Provide shower and vanity unit nearby and make clear the location of these.

Control value :

Japan control value

Not established.

Adopted value :

[JSOH]

Not established.

[ACGIH]

Not established.

Individual protection measures, such as personal protective equipment (PPE) :

Eye/face protection :

Wear protective eyeglasses or chemical safety goggles.

Wear face protection.

Hand protection :

Wear impervious glove made from chloroprene, as appropriate.

Skin and body protection :

To prevent any contact, wear impervious clothing such as apron, boots, or whole-body suits made from chloroprene, as appropriate.

Respiratory protection :

Wear positive pressure self-contained breathing apparatus (SCBA).

Dust mask

#### 9. Physical and chemical properties

Appearance (physical state, color, etc.) : Light yellowish green powder

Odor : Not available

pH : Not available

Melting point/freezing point : Not available

Initial boiling point and boiling range : Not available

Flash point : Not available

Density/relative density : Not available

Solubility(ies) :

Solubility in water ; Not available

#### 10. Stability and reactivity

Chemical stability :

This product is considered a stable material under normal and anticipated storage and handling conditions.

Possibility of hazardous reactions :

May react with oxidizing agents.

Conditions to avoid :

Sunlight, heat, contact with incompatible materials

Incompatible materials :

Strong oxidants

Hazardous decomposition products (except for carbon monoxide, carbon dioxide and water) :

Not available

#### 11. Toxicological information

(Insufficient data are available on the effect of this substance on human health, therefore utmost care must be taken.)

Acute toxicity :

Not available

Irritant properties :

May irritate the eyes and skin.

Allergenic and sensitizing effects :

Not available

Specific target organ systemic toxicity (single exposure, repeated exposure) :

Not available

Carcinogenic effects :

Not available

Mutagenic effects :

Not available

Catechin Mixture, NACALAI TESQUE, INC., GHS-05158E-1, 06/02/2016

5/5

Toxicity for reproduction :  
Not available

12. Ecological information  
(Insufficient data are available on the effect of this substance on the environment, therefore utmost care must be taken.)

Ecotoxicity :

Not available

Biotransportability :

Not available

Persistence and degradability :

Not available

Bioaccumulative potential :

Not available

13. Disposal considerations

Contact a licensed professional waste disposal service to dispose of this material. Comply with all country, national and local regulations. Do not dump this product into sewers, on the ground or into any body of water.

14. Transport information

Basic classification information for the transporting/shipment :

Sea ; Not controlled under IMDG's regulations.

Air ; Not controlled under IATA's regulations.

Special precautions which a user needs to be aware of or needs to comply with in connection with transport or conveyance either within or outside their premises :

Protect from direct sun light in transportation, and confirm the container does not leak. Carefully load it onto a transporter without dropping, overturning or damaging so that it will stably stays on the transporter.

15. Regulatory information

Comply with all countries, national and local regulations.

16. Other information

DISCLAIMER

For R&D use only. Not for drug, household or other uses.

WARRANTY

The above information is believed to be correct but does not purport to be all inclusive and shall be used only as a guide. The information in this document is based on the present state of our knowledge and is applicable to the product with regard to appropriate safety precautions. It does not represent any guarantee of the properties of the product.

## ANEXO 2: Tablas de Regresión Lineal

Tabla de Regresión lineal de Epigalocatequina

Repetición	Concentración	Área	x*y	x <sup>2</sup>	y <sup>2</sup>	y/x	varianza	promedio	CV
1	0.26	191802	49868.52	0.07	36788007204	737700.00	31187.17	730962.82	4.27
2	0.26	197140	51256.4	0.07	38864179600	758230.77			
3	0.26	181209	47114.34	0.07	32836701681	696957.69			
1	0.52	427257	222173.64	0.27	182548544049	821648.08	62616.36	766626.92	8.17
2	0.52	363216	188872.32	0.27	131925862656	698492.31			
3	0.52	405465	210841.8	0.27	164401866225	779740.38			
1	1.04	843491	877230.64	1.08	711477067081	811049.04	53290.32	819958.01	6.50
2	1.04	912227	948716.08	1.08	832158099529	877141.35			
3	1.04	802551	834653.04	1.08	644088107601	771683.65			
1	2.08	1757230	3655038.4	4.33	3087857272900	844822.12	42125.09	827985.58	5.09
2	2.08	1786904	3716760.32	4.33	3193025905216	859088.46			
3	2.08	1622496	3374791.68	4.33	2632493270016	780046.15			
1	4.16	3205736	13335861.8	17.3	10276743301696	770609.62	30235.36	742668.99	4.07
2	4.16	2955969	12296831	17.3	8737752728961	710569.47			
3	4.16	3106804	12924304.6	17.3	9652231094416	746827.88			
Sumatoria	24.18	18759497	52734314.6	69.2	40355192008831	11664606.97			

Fuente: Elaboración propia

Tabla de Regresión lineal de Epicatequina

Repetición	Concentración	Área	x*y	x <sup>2</sup>	y <sup>2</sup>	y/x	varianza	promedio	CV
1	0.14	105158	14722.12	0.02	11058204964	751128.57	16761.50	746921.43	2.24
2	0.14	106565	14919.1	0.02	11356099225	761178.57			
3	0.14	101984	14277.76	0.02	10400736256	728457.14			
1	0.28	221851	62118.28	0.08	49217866201	792325.00	39614.35	762245.24	5.20
2	0.28	200861	56241.08	0.08	40345141321	717360.71			
3	0.28	217574	60920.72	0.08	47338445476	777050.00			
1	0.56	469873	263128.88	0.31	220780636129	839058.93	10806.86	848645.83	1.27
2	0.56	481800	269808	0.31	232131240000	860357.14			
3	0.56	474052	265469.12	0.31	224725298704	846521.43			
1	1.12	936017	1048339	1.25	876127824289	835729.46	13994.55	850659.82	1.65
2	1.12	967096	1083147.5	1.25	935274673216	863478.57			
3	1.12	955104	1069716.5	1.25	912223650816	852771.43			
1	2.24	1835649	4111853.8	5.02	3369607251201	819486.16	39528.72	774651.19	5.10
2	2.24	1668408	3737233.9	5.02	2783585254464	744825.00			
3	2.24	1701599	3811581.8	5.02	2895439156801	759642.41			
Sumatoria	13.02	10443591	15883478	20.05	12619611479063	11949370.54			

Fuente: Elaboración propia

Tabla de Regresión lineal de Epigallocatequina galato

Repetición	Concentración	Área	x*y	x <sup>2</sup>	y <sup>2</sup>	y/x	varianza	promedio	CV
1	1.02	722537	736987.74	1.04	522059716369	708369.61	21001.90	732507.19	2.87
2	1.02	761536	776766.72	1.04	579937079296	746603.92			
3	1.02	757399	772546.98	1.04	573653245201	742548.04			
1	2.04	1425276	2907563.04	4.16	2031411676176	698664.71	33996.84	704246.08	4.83
2	2.04	1511004	3082448.16	4.16	2283133088016	740688.24			
3	2.04	1373706	2802360.24	4.16	1887068174436	673385.29			
1	4.08	3411560	13919164.8	16.6	11638741633600	836166.67	38030.37	856259.23	4.44
2	4.08	3672496	14983783.7	16.6	13487226870016	900121.57			
3	4.08	3396557	13857952.6	16.6	11536599454249	832489.46			
1	8.16	7345761	59941409.8	66.6	53960204669121	900215.81	47926.62	891206.41	5.38
2	8.16	7621350	62190216	66.6	58084975822500	933988.97			
3	8.16	6849622	55892915.5	66.6	46917321542884	839414.46			
1	16.32	15804358	257927123	266	249777731792164	968404.29	48195.53	912827.49	5.28
2	16.32	14403123	235058967	266	207449952153129	882544.30			
3	16.32	14484553	236387905	266	209802275609809	887533.88			
sumatoria	94.86	83540838	961238110	1064	870532292526966	12291139.22			

Fuente: Elaboración propia

Tabla de Regresión lineal de Epicatequina galato

Repetición	Concentración	Área	x*y	x <sup>2</sup>	y <sup>2</sup>	y/x	varianza	promedio	CV
1	0.24	177519	42604.56	0.06	31512995361	739662.50	38449.18	728066.67	5.28
2	0.24	164437	39464.88	0.06	27039526969	685154.17			
3	0.24	182252	43740.48	0.06	33215791504	759383.33			
1	0.48	304985	146392.8	0.23	93015850225	635385.42	26488.91	655855.56	4.04
2	0.48	329171	158002.08	0.23	108353547241	685772.92			
3	0.48	310276	148932.48	0.23	96271196176	646408.33			
1	0.96	678992	651832.32	0.92	461030136064	707283.33	38106.81	745509.38	5.11
2	0.96	752156	722069.76	0.92	565738648336	783495.83			
3	0.96	715919	687282.24	0.92	512540014561	745748.96			
1	1.92	1400889	2689706.9	3.69	1962489990321	729629.69	29372.53	748509.03	3.92
2	1.92	1502112	2884055	3.69	2256340460544	782350.00			
3	1.92	1408411	2704149.1	3.69	1983621544921	733547.40			
1	3.84	3185718	12233157	14.75	10148799175524	829614.06	36617.90	787963.37	4.65
2	3.84	2921589	11218902	14.75	8535682284921	760830.47			
3	3.84	2970031	11404919	14.75	8821084140961	773445.57			
sumatoria	22.32	17004457	45775211	58.92	35636735303629	10997711.98			

Fuente: Elaboración propia

### ANEXO 3: Tablas ICH

#### ICH ELEMENTS REQUIRED FOR VALIDATION

Analytical performance parameters	identification	Impurity testing		Assay
		Quantitative	Limit tests	
Accuracy	No	Yes	No	Yes
Precision				
Repeatability	No	Yes	No	Yes
Intermediate precision	No	Yes	No	Yes
Specificity	Yes	Yes	Yes	Yes
LOD	No	Yes	Yes	No
LOQ	No	Yes	No	No
Linearity	Yes	Yes	No	Yes
Range	Yes	Yes	No	Yes

#### COMPARISON OF ANALYTICAL PARAMETERS REQUIRED FOR VALIDATION

USP General chapter <1225>	ICH Q2A Guidelines	FDA Reviewer Guidance
Accuracy	Accuracy	Accuracy
Precision	Precision	Precision
No	Repeatability	Repeatability Injection analysis
No	Intermediate precision	Intermediate precision
No	No	Reproducibility
Specificity	Specificity	Specificity/selectivity
Detection limit	Detection limit	Detection limit
Quantiation limit	Quantiation limit	Quantiation limit
Linearity	Linearity	Linearity
Ruggedness	No	No
Robustness	Robustness	Robustness
System suitability (discussed separately in USP 23 general chapter <621>	System suitability	System suitability Sample solution stability