

RECYT

Año 17 / N° 23 / 2015 / 31–35

Evaluación de la autenticidad del té verde de diferentes marcas comerciales que se expende en San José, Costa Rica

Evaluation of the authenticity of different commercial Green tea brands sold at San José, Costa Rica

Jason Alvarez¹, Gabriel Zamora², José M. Chaverri-Fernández³,
María F. Méndez², María L. Arias-Echandi^{1,*}

1- Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales y Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica.

2- Centro de Investigaciones Apícolas Tropicales, Universidad Nacional.

3- Instituto de Investigaciones Farmacéuticas. Facultad de Farmacia, Universidad de Costa Rica.

* E-mail: maria.ariasechandi@ucr.ac.cr

Resumen

En la actualidad el consumo de té verde se ha popularizado a nivel mundial y Costa Rica no es la excepción. Este es un producto al que se le han atribuido múltiples efectos beneficiosos, los que van a depender en gran medida de su legitimidad y grado de pureza. El objetivo de este trabajo fue corroborar la autenticidad y calidad de 45 muestras de té verde comercializadas en el área metropolitana de San José, Costa Rica. Se prepararon extractos de las diversas marcas comerciales y de hojas frescas de té (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze) utilizando etanol, y posteriormente estos fueron disueltos en metanol a una concentración final de 1 mg/ml-1 de extracto. Estas soluciones se emplearon para la determinación del perfil de polifenoles, flavonoides, aminoácidos y alcaloides por cromatografía en capa fina de alto desempeño y sus respectivas derivatizaciones.

Los resultados obtenidos permiten concluir que el té verde comercializado en San José, Costa Rica, es veraz y no presenta adulteraciones en su composición. Además, la evaluación de los perfiles de flavonoides, alcaloides y aminoácidos permite asegurar la consistencia de los lotes, así como estabilidad de los principales constituyentes de la materia prima en el producto terminado y por ende la buena calidad del producto.

Palabras clave: Té verde; Autenticidad; Cromatografía de capa fina (CCF).

Abstract

Recently, green tea consumption has significantly increased worldwide, and Costa Rica is not an exception. Several health benefits have been attributed to it, nevertheless they depend on the legitimacy and purity of the product. The aim of this work was to corroborate the authenticity and quality of 45 green tea commercial samples sold at the metropolitan area of San José, Costa Rica. Extracts of the different commercial brands tested and of leaves (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze) were prepared using ethanol. These were dissolved in methanol to a final concentration of 1mg/ml-1 of extract. The solutions were used for the determination of the polyphenols, flavonoids, amino acids and alkaloids profiles using high performance thin layer chromatography and their respective derivatizations.

The results obtained allow the conclusion that the green tea sold in San José, Costa Rica, is genuine and does not present any adulterations in its composition. Also, the flavonoids, alkaloids and amino acids profiles allow ensuring the consistency of the lots, as well as the transfer of the principal constituents from raw material to finished product, demonstrating its good quality.

Keywords: Green tea; Authenticity; Thin layer chromatography (TLC).

Introducción

Durante siglos, las hojas de té (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze) han sido utilizadas para la elaboración de los tipos de té verde, negro y otros. Recientemente, el té verde se ha convertido también en materia prima para extractos

que se utilizan en diversas bebidas, alimentos naturales, suplementos dietéticos y artículos de cosmética (1).

Aparte de los usos mencionados, al té verde se le han atribuido efectos beneficiosos para la salud (2), y muchos de estos se deben a sus componentes antioxidantes (3) y antimicrobianos. También se le han atribuido propiedades

antiinflamatorias así como propiedades antimutagénicas (4).

La hoja de té fresco es rica en polifenoles, especialmente en catequinas (flavonoides), que pueden constituir hasta el 30% del peso de la hoja seca. Otros polifenoles incluyen los ácidos fenólicos como el ácido clorogénico, el ácido cumaroilquinico, y esteres gálicos de la glucosa como el ácido 3-galloilquinico, este último únicamente presente en las hojas verdes del té (5). Dentro de las principales catequinas se encuentran el Galato de epigalocatequina (EGCG) que representa aproximadamente el 59% del total de las catequinas, la Epigalocatequina (EGC), en una proporción próxima al 13,6% del total y la Epicatequina (EP), que representa el 6,4% del conjunto de catequinas (6).

Durante el procesamiento de las hojas de té, se dan diferentes reacciones enzimáticas según el tipo de té a obtener, (té negro, té oolong, té verde). Se ha demostrado, mediante técnicas de cromatografía de capa fina de alto desempeño, que el perfil de polifenoles (contenido relativo de galato de epigalocatequina, epigalocatequina, galato de epicatequina, epicatequina) varía según el tipo de té a obtener, presentando el té verde los cuatro polifenoles mencionados anteriormente y en donde el galato de epigalocatequina se encuentra en mayor proporción.

Lo anterior, basándose en el perfil de los polifenoles, flavonoides, alcaloides, y aminoácidos, permite que se pueda conocer la veracidad y calidad de la materia prima del té verde (1).

En la actualidad, el consumo de té verde, ya sea como una bebida caliente ó su consumo como bebida fría, se ha popularizado a nivel mundial y Costa Rica no es la excepción. No obstante, la autenticidad, así como la calidad del té verde consumido en el área metropolitana de Costa Rica son desconocidas. Dado lo anterior, este trabajo pretende evaluar una serie de muestras de té verde comercializadas en el país con el fin de validar la autenticidad de las mismas.

Materiales y métodos

Adquisición de las muestras de té verde

Se adquirieron al azar y a partir de diferentes supermercados, minisúper y tiendas de venta natural (Macrobióticas) ubicados en el Área Metropolitana de San José, Costa Rica, 5 lotes de cada una de las 9 marcas comerciales de té verde comercial nacional y extranjero (n=45), los cuales fueron transportadas a temperatura ambiente al Laboratorio de Microbiología de Alimentos, Facultad de Microbiología, para su posterior análisis.

Las hojas frescas de té, como control de comparación, fueron adquiridas de una finca llamada Arcas de las Hierbas ubicada en Santa Bárbara de Heredia.

Preparación de las muestras y material de referencia

Se prepararon extractos de las diversas marcas comerciales y de las hojas frescas de té. Para esto se pesaron 10 g de las muestras de té verde y de las hojas de la referencia botánica (*Camellia sinensis*), y se realizó la extracción con 100 ml de etanol. Se procedió a calentar a temperatura de ebullición por 2 horas el material vegetal con el solvente. Con el fin de evitar su evaporación, se utilizó el método de reflujo. Transcurridas las 2 horas se procedió a filtrar la muestra al vacío, luego se eliminó todo el solvente utilizando un rotavapor. Se raspó el balón para extraer el material seco el cual fue almacenado en viales estériles.

Posteriormente, los extractos de las muestras de té verde comercial y el extracto preparado a partir de las hojas de la planta de té, fueron disueltos en metanol a una concentración final de 1 mgml⁻¹. Seguidamente, cada solución fue centrifugada (1006 g 5m) y el sobrenadante se empleó para cada análisis. Estas soluciones se emplearon en la determinación de flavonoides, aminoácidos y alcaloides por cromatografía en capa fina de alto desempeño.

Para la determinación de polifenoles se preparó una solución a partir de 4 mg de cada extracto, los cuales se disolvieron en 1 ml de una solución de etanol: agua (8:2) facilitado por ultrasonido durante 5 minutos. Cada preparación fue centrifugada a 1006 g durante 5 minutos. El sobrenadante de cada solución de extracto se empleó para el análisis.

Preparación de fases móviles

El análisis por cromatografía en capa fina de alto desempeño se realizó utilizando las siguientes fases móviles:

Flavonoides: etil formato, tolueno, ácido fórmico, agua (30:1.5:4: 3)

Polifenoles: tolueno, acetona, ácido fórmico (9:9: 2)

Alcaloides: acetato de etilo, metanol, agua (20:2.7: 2)

Amino ácidos: 1 – butanol, acetona, ácido acético, agua (7:7:2: 4)

Fase estacionaria

Las cromatografías se realizaron en cromatofolios para cromatografía plana de alto desempeño (High Performance Thin Layer Chromatography, HPTLC) HPTLC silica gel 60 F₂₅₄ con dimensiones 20 cm X 10 cm.

Agentes derivatizantes

El análisis por cromatografía en capa fina de alto desempeño se realizó empleando los siguientes agentes derivatizantes:

Solución al 1% de 2 – aminoetil-difenilborinato en metanol y solución al 5% de polietilenglicol 4000 en

etanol para derivatizar flavonoides.

Solución al 5% de Fast Blue Salt B en agua destilada para derivatizar polifenoles.

Solución al 0.2% de ninhidrina en n – butanol y ácido acético para derivatizar aminoácidos.

Evaluación cualitativa de la autenticidad y la calidad del té verde

Para estos ensayos se siguieron los métodos descritos por Reich *et al.* (1); se realizaron cromatografías en capa fina de alto desempeño y derivatizaciones a fin de confirmar cualitativamente la naturaleza del té mediante su huella cromatográfica. Para el registro, procesamiento, análisis y reportes de datos a partir de las cromatografías se empleó el Visualizador de Cromatografía en Capa Fina de Alta Resolución (TLC Visualizer de CAMAG®).

Polifenoles

Para la determinación de polifenoles, una vez concluida esta cromatografía y evaporada la fase móvil, se procedió a capturar imágenes bajo radiación de 254 nm y 366 nm por medio del visualizador de cromatografía en capa fina de alta resolución Camag®, y su software de gestión WinCats® v.1.4.4 (esto como un control de calidad). Luego, los cromatogramas obtenidos fueron tratados con el reactivo de derivatización, para ello, se aplicó por medio de aerosol, aproximadamente 10 ml de una solución al 5% de Fast Blue Salt B en agua destilada a 15 cm de distancia de la placa. Al cabo de 10 minutos, se documentó la placa derivatizada bajo luz visible utilizando el visualizador de cromatografía en capa fina de Camag® y su software de gestión WinCats® v. 1. 4. 4.

Flavonoides

Para la determinación de flavonoides, la cromatografía se derivatizó mediante la aplicación en aerosol de aproximadamente 10 ml de una solución al 1% de 2 – aminoetil difenil borinato en metanol, posteriormente se aplicó por aerosol aproximadamente 8 ml de una solución al 5% polietilenglicol 4000 en etanol. La cromatografía derivatizada se dejó reposar por 10 minutos y posteriormente se registró el resultado al exponer el cromatograma a luz ultravioleta (a una longitud de onda de 366 nm) mediante el Visualizador de Cromatografía en Capa Fina de CAMAG® y su software de gestión WinCats® v. 1. 4. 4.

Alcaloides

Para la determinación de alcaloides, la cromatografía se reveló mediante la exposición del cromatofolio a luz ultravioleta (a una longitud de onda de 254 nm) mediante el Visualizador de Cromatografía en Capa Fina de Alta

Resolución de CAMAG® y su software de gestión WinCats® v. 1. 4. 4.

Aminoácidos

Para la determinación de aminoácidos, la cromatografía se derivatizó mediante la aplicación en aerosol de aproximadamente 10 ml de una solución de 30 mg de ninhidrina disuelta en 10 ml de n – butanol y 0.3 ml de ácido acético al 98%. La cromatografía derivatizada se calentó por 10 minutos en un plantilla de laboratorio a 110 °C y posteriormente, se registró el resultado al exponer el cromatograma a luz visible mediante el Visualizador de Cromatografía en Capa Fina de Alta Resolución de CAMAG® y su software de gestión WinCats® v. 1. 4. 4.

Resultados

En la figura 1, se presentan los resultados del perfil cromatográfico realizado a los lotes de la marca comercial A.

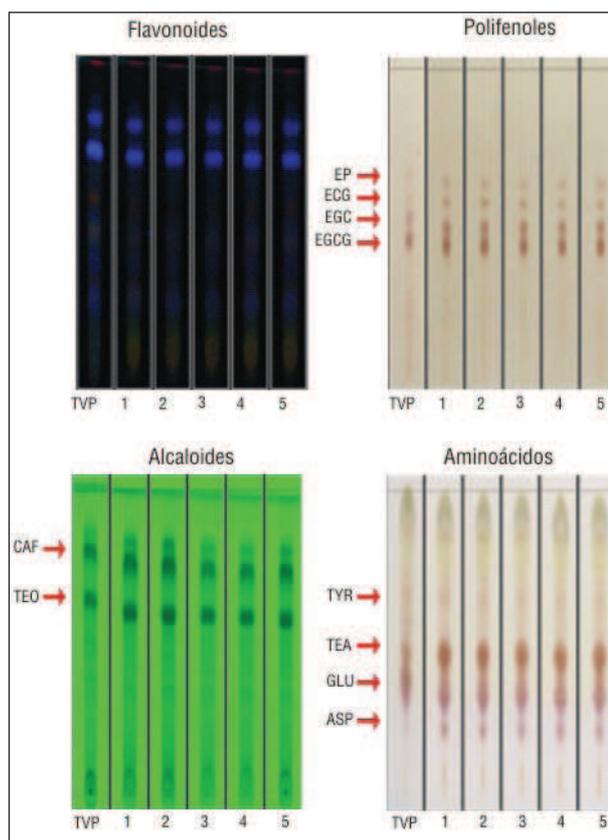


Figura 1: Vista de imágenes comparativas para perfil cromatográfico de muestras de té verde expendidas en Costa Rica y pertenecientes a la marca comercial A. Los números 1, 2, 3, 4, 5, corresponde a lotes diferentes.

TVP: té verde puro (estándar de comparación), EGCG: Galato de epigallocatequina, EGC: epigallocatequina, ECG: galato de epicatequina, EP: epicatequina, TEO: teobromina, CAF: cafeína, ASP: ácido aspártico, GLU: ácido glutámico, TEA: teanina, TYR: tirosina.

Análisis de polifenoles

Las cromatografías realizadas evidenciaron un perfil de polifenoles compatible con el perfil del extracto de las hojas de extracto las hojas de té control. Tanto en el cromatograma del té verde puro como en el de las muestras analizadas presentaron las bandas propias de galato de epigallocatequina, epigallocatequina, galato de epicatequina y epicatequina.

Análisis de flavonoides

Los cromatogramas evidenciaron un perfil de flavonoides compatible con el perfil del extracto de las hojas de té control. La única excepción se presentó en las tres muestras provenientes de una de las marcas comerciales evaluadas, que presentaron una zona verde en el segundo tercio del cromatograma.

Análisis de alcaloides

Los cromatogramas evidenciaron un perfil de alcaloides compatible con el perfil del extracto de hojas de té control para todas las marcas comerciales analizadas. Tanto en la cromatografía del té verde puro como en las de las muestras se observaron las bandas propias de teobromina y cafeína.

Análisis de aminoácidos

Los cromatogramas realizados evidenciaron un perfil de aminoácidos compatible con el perfil del extracto de las hojas de *Camellia sinensis* (té verde puro) para todas las marcas comerciales analizadas. Tanto en el cromatograma del té verde puro como en los de las muestras se observaron las bandas propias de ácido aspártico, ácido glutámico, teanina y tirosina, siendo la de teanina la más prominente.

Discusión

El té verde es una bebida a la cual se le han atribuido gran cantidad de beneficios para la salud humana. No obstante, la obtención de estos va a depender de la autenticidad y calidad del té verde a consumir.

Las hojas de té son ricas en polifenoles, flavonoides, y en epigallocatequina-3-galato (EGCG), según se ha demostrado por cromatografía de capa fina de alta resolución. El perfil de catequinas (epicatequina, galato de epicatequina, epigallocatequina, galato de epigallocatequina) es específico según el tipo de té, por lo cual puede ser utilizado para dilucidar si una muestra es con certeza té verde de calidad, té verde adulterado o de mala calidad (1).

Las hojas de té producen una huella digital o perfil de flavonoides característico. De hecho Reich *et al.* (1) aseguran que el patrón de flavonoides se puede utilizar

convenientemente por un fabricante para comparar lotes de té verde con el fin de garantizar la coherencia de materia prima y, posiblemente, incluso la procedencia.

Los resultados obtenidos a partir de la cromatografía para flavonoides también evidenciaron coincidencia con el perfil obtenido a partir del extracto de hojas de *Camellia sinensis*. No obstante, tres muestras provenientes de una de las marcas comerciales evaluadas presentaron una zona verde en el segundo tercio del cromatograma. Al respecto, Reich *et al.* (1) también han documentado la aparición de esta zona a partir de muestras de té verde, la que puede deberse a diversos factores, incluyendo la edad y partes de la planta empleadas durante la manufactura, condiciones de almacenamiento y hasta la calidad de la cosecha del té.

Según Hernández y Ruiz (7), la calidad del té es tanto mayor cuanto más jóvenes son las hojas y disminuye al descender su posición por el brote apical. La recolecta que aporta la mejor calidad y elevado rendimiento es aquella en que sólo se incluye el brote terminal antes de abrir y las dos o tres primeras hojas, situadas debajo de éste. También influyen en la calidad factores como el clima, suelo, condiciones de cultivo, momento óptimo de la recolección. Todas estas variables pueden contribuir a la formación de bandas adicionales como sucedió en las tres muestras mencionadas anteriormente.

La presencia de alcaloides es otro perfil que puede ser utilizado para evaluar los componentes del té verde (1). Esto, a sabiendas de que las hojas de té verde contienen bases xánticas (alcaloides) como cafeína en un porcentaje que varía entre el 2 al 5% del extracto seco, y en menor cuantía contiene teobromina (7).

Los resultados obtenidos de las HPTLC para la evaluación de alcaloides muestran un patrón compatible entre las muestras analizadas de todas las marcas comerciales con respecto al estándar de oro (*Camellia sinensis*) lo cual demuestra no sólo veracidad del producto sino también su alta calidad.

El análisis de aminoácidos, evidenció un perfil compatible con el extracto de las hojas de té control para todas las marcas comerciales analizadas, observándose las bandas propias de ácido aspártico, ácido glutámico, teanina y tirosina. En particular, la zona de teanina es la más prominente en las cromatografías realizadas. Esto concuerda con lo expuesto por Hernandez & Ruiz (7), donde menciona que la hoja de *Camellia sinensis* dentro de sus componentes bioquímicos contiene aminoácidos libres, los cuales constituyen del 1 al 4% del extracto seco, y que de estos aminoácidos libres el 50% es la teanina (5-N-etilglutamina, únicamente presente en el té), el cual cumple un papel importante en el sabor del té verde.

El análisis integral de los resultados obtenidos permite concluir que el té verde comercializado en San José, Costa Rica, es auténtico y no presenta adulteraciones en su composición. Además, la evaluación de los perfiles de flavonoides, alcaloides y aminoácidos permite asegurar la

consistencia de los lotes de materia prima utilizados, así como la estabilidad de los principales constituyentes de la materia prima en el producto terminado y por ende la buena calidad del producto (1).

Estos hallazgos permiten a los consumidores costarricenses gozar de los múltiples beneficios asociados al té verde incluyendo los efectos anticancerígenos (8), antioxidantes (9) y hasta anti angiogénicos (10), descritos en los últimos años a partir de diversos estudios científicos.

El presente trabajo demuestra que las marcas de té verde expendidas en Costa Rica y evaluadas son auténticas, tienen una buena calidad y los constituyentes de la materia prima utilizada son estables, por lo que la población consumidora recibe los beneficios asociados a este tipo de producto.

Referencias

1. Reich, E; Schibli, A; Widmer, V; Jorns, R & Wolfram, E. *HPTLC Methods for Identification of Green Tea and Green Tea Extract*. J Liquid Chromatog & Rel Technol. 29: 2141-2151. 2006.
2. Sakanaka, S; Juneja, L & Taniguchi, M. *Antimicrobial effects of green tea polyphenols on thermophilic spore-forming bacteria*. J Biosci Bioeng . 90: 81-85.2000.
3. Rubio, J M; P, Vidal; Zafrilla, P & Morillas, J. *A new antioxidant beverage produced with green tea and apple*. Int J Food Sci Nut .2014.
4. Gaur, S & Agnihotri, R. *Green tea: A novel functional food for the oral health of older adults*. Geriatrics Gerontol Int. 14: 238-250. 2013.
- 5.
6. Graham, H. *Green tea composition, consumption, and polyphenol chemistry*. Preventive Med 21: 334-350.1992.
7. Saito, S; Welzel, A; Suyenaga, E & Bueno, F. *A method for fast determination of epigallocatechin gallate (EGCG), epicatechin (EC), catechin (C) and caffeine (CAF) in green tea using HPLC*. Food Sci Technol.26: 394-400. 2006.
8. Hernández, A & Ruiz, M. *Tratado de Nutrición: composición y calidad nutritiva de los alimentos*. Medica Panamericana. España, Madrid 337-366. 2010.
9. Chen, C; Hsieh, D; Huang, K; Chan, Y & Hong, P. *Improving anticancer efficacy of (-)-epigallocatechin-3-gallate gold nanoparticles in murine B16F10 melanoma cells*. Drug Design, Development and Therapy . 8: 459-474.2014.
10. Ho, C; Choi, S; Siu, P & Benzie, I. *Effects of single dose and regular intake of green tea (Camellia sinensis) on DNA damage, DNA repair, and heme oxygenase-1 expression in a randomized controlled human supplementation study*. Molec Nut Food Res. 58: 1379-1383.2014.
11. Cai, J; Jing, D; Shi, M; Liu, Y; Lin, T & Xie, Z. *Epigallocatechin gallate (EGCG) attenuates infrasound-induced neuronal impairment by inhibiting microglia-mediated inflammation*. J Nut Bioch. 25: 716-725.2014.

Recibido: 22/09/2014.

Aprobado: 28/11/2014.