



**UNIVERSIDAD DE OVIEDO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**LA DETERMINACIÓN DE AMINOÁCIDOS  
TOTALES EN TÉ**

**TRABAJO FIN DE GRADO EN QUÍMICA**

***Francisco Javier Pérez González***

**Oviedo, julio, 2024**

## **Índice**

<b>1. Resumen.....</b>	<b>3</b>
<b>2. Introducción .....</b>	<b>3</b>
<b>3. Objetivos .....</b>	<b>11</b>
<b>4. Metodología experimental.....</b>	<b>12</b>
<b>4.1 Reactivos .....</b>	<b>12</b>
<b>4.2 Equipo .....</b>	<b>12</b>
<b>4.3 Muestras que analizar.....</b>	<b>12</b>
<b>4.4 Preparación de disoluciones .....</b>	<b>12</b>
<b>4.5 Preparación de cada muestra. ....</b>	<b>13</b>
<b>4.6 Calibrado .....</b>	<b>13</b>
<b>4.7 Medida de la humedad en los téis .....</b>	<b>13</b>
<b>5. Resultados y discusión.....</b>	<b>14</b>
<b>5.1 Determinación de la humedad en las muestras. ....</b>	<b>14</b>
<b>5.2 Espectro vis-UV del producto.....</b>	<b>15</b>
<b>5.3 Obtención de la recta de calibrado.....</b>	<b>16</b>
<b>5.4 Contenido de aminoácidos en los téis. ....</b>	<b>17</b>
<b>6. Conclusiones.....</b>	<b>19</b>
<b>7. Bibliografía .....</b>	<b>20</b>
<b>8. Anexos .....</b>	<b>22</b>

## 1. Resumen

Los aminoácidos son moléculas muy importantes para la vida, ya que son los que componen las proteínas, estructuras muy importantes en nuestro organismo. En el caso de los seres humanos, nuestro organismo permite sintetizar parte de los aminoácidos que forman las proteínas, por ello es importante que los aminoácidos no sintetizables, que son los esenciales, sean ingeridos en la dieta. Por ello es importante asegurarse de que los alimentos que comemos tengan estos aminoácidos. Uno de estos alimentos es el té, que es una bebida muy popular en gran parte del mundo, especialmente en Asia. Esto hace que sea la segunda bebida más consumida en el mundo, solo por detrás del agua.

Por ello este trabajo se pretende determinar el contenido total en aminoácidos de cuatro té, siendo estos dos verdes y dos negros, y comparar entre ambos tipos de té y entre las dos opciones de cada tipo. Para ello se utilizará la espectrofotometría visible ultravioleta con derivatización con ninhidrina.

La derivatización con ninhidrina fue realizada con éxito. La recta de calibrado tiene una linealidad mejorable ya que su  $R^2$  es de 0,96. Por otro lado, el límite de detección es de  $1,26E-06$  M.

El contenido de aminoácidos para los té verdes es del 0,38 % para el té ecológico y 0,31 % para el té de hornimans. Para los té negros está en ambos en el 0,31% de media. En los cuatro casos el contenido en aminoácidos es bajo.

## 2. Introducción

Los aminoácidos son moléculas muy importantes para los seres vivos, ya que son los componentes más básicos de las proteínas. La estructura de los diferentes aminoácidos es similar, compuesta por un carbono quiral al que se le unen, un grupo carboxilo, un grupo amino, un hidrogeno, y una cadena lateral (R) que es diferente para cada aminoácido, y es lo que diferencia a unos aminoácidos de otros. Los aminoácidos existentes superan los 300, pero son solo 21 los que son importantes para los seres humanos. Estos 21 aminoácidos, en general  $\alpha$ -aminoácidos, son todos quirales menos

uno que es la glicina, en la que la cadena lateral es un hidrógeno. Todos los aminoácidos son L-aminoácidos, menos la glicina<sup>1</sup> y se pueden dividir en dos grupos según sean sintetizables por el cuerpo humano o no. Los no esenciales que pueden ser sintetizados por el cuerpo humano, y los esenciales que no pueden ser sintetizados por el ser humano y deben ser ingeridos en la dieta<sup>2</sup>. En la tabla 1, se pueden ver cuáles de los 21 aminoácidos son esenciales, y cuales son no esenciales.

**Tabla 1 Aminoácidos no esenciales y esenciales**

Aminoácidos esenciales	Aminoácidos no esenciales
Arginina	Alanina
Fenilalanina	Asparagina
Histidina	Acido aspártico/ aspartato
Isoleucina	Cisteína
Leucina	Acido glutámico/glutamato
Lisina	Glutamina
Metionina	Glicina
Treonina	Prolina
Triptófano	Serina
Valina	Tirosina
	Selenocisteina

Por otro lado, los aminoácidos se unen entre si mediante un enlace entre el grupo carboxilo de un aminoácido y el grupo amino del siguiente que recibe el nombre de enlace peptídico, dando lugar a un péptido y los aminoácidos que lo forman pasan a llamarse residuos de aminoácidos. Los péptidos que tienen hasta 20 residuos se llaman oligopéptidos, entre 20 y 50 se llaman polipéptidos, y cuando a partir de los 50 residuos reciben el nombre de proteínas.<sup>3</sup> Hay péptidos con menos de 50 residuos con funciones importantes, como son la oxitocina o la vasopresina.

Los aminoácidos no esenciales tienen una gran importancia en diferentes procesos, como la regulación genética, la regulación del flujo sanguíneo, el transporte de nutrientes y el metabolismo de estos, la señalización celular o el desarrollo del microbiota interno, además de regular las respuestas antioxidantes y las respuestas del sistema inmune.<sup>2</sup>

La falta de los aminoácidos, sobre todo esenciales, puede generar diferentes problemas ya que, por un lado, algunos aminoácidos no esenciales son sintetizados a partir de aminoácidos esenciales, como es el caso de la tirosina a partir de la fenilalanina. Por otro, la falta de arginina genera que, en hombres, disminuya la cantidad y la calidad del semen producido hasta en un 90%<sup>2</sup>.

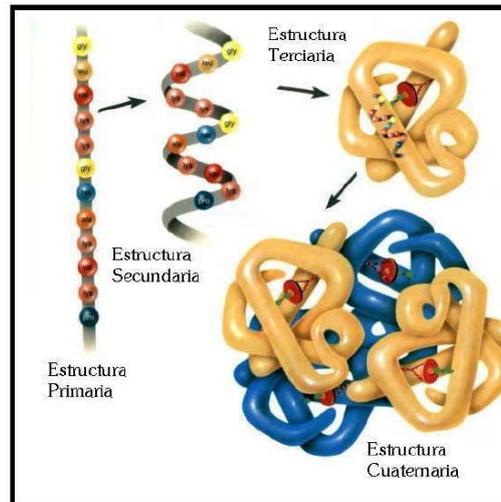
Las proteínas tienen cuatro niveles en su estructura, la estructura primaria es la formada por la secuencia lineal de aminoácidos, que se unen entre sí mediante el enlace peptídico ya mencionado.<sup>3</sup>

El siguiente nivel, es la estructura secundaria, que corresponde al plegamiento local, es decir al de los aminoácidos cercanos para poder formar diferentes estructuras, como la hélice alfa, las hojas beta, o los giros beta. La presencia de una estructura u otra depende de los aminoácidos que tenga en cada parte de la secuencia la proteína, ya que cada aminoácido, según su estructura tiene preferencia por un tipo de estructura secundaria u otra, un caso de esto son la glicina y la prolina que debido a sus estructuras suelen ser aminoácidos presentes en giros beta. Este nivel estructural, está estabilizado por puentes de hidrógeno entre los grupos carboxilo de un residuo y el grupo amino de un residuo cercano.<sup>3</sup>

Por encima tenemos la estructura terciaria, que corresponde al plegamiento global, en esta estructura, están involucradas las cadenas laterales de los diferentes aminoácidos, que estabilizan la estructura por medio de diferentes interacciones como los puentes de hidrógeno, las interacciones electrostáticas, las interacciones hidrofóbicas o las fuerzas de Van der Waals, además de los puentes disulfuro, que se forman entre dos cisteínas. Por otro lado, también hay que decir que la estructura terciaria de una proteína depende de las partes hidrofílicas e hidrofóbicas que tenga esta, ya que las partes hidrofóbicas estarán hacia el interior y las partes hidrofílicas hacia el exterior.<sup>3</sup>

Respecto a la estructura cuaternaria, podemos hablar de los complejos proteicos que son grupos de dos o más proteínas que se unen por interacciones entre las proteínas, la estabilidad de estos complejos es definida por su función, algunos ejemplos de esta estructura son la hemoglobina o la ferritina. Estos complejos pueden ser o homoméricos, si las proteínas son iguales o heteroméricos si son diferentes. Los homoméricos, tienen todas estructuras simétricas que se diferencian por la operación de simetría que está presente en la estructura, según esto hay diferentes opciones como los complejos diméricos, los cíclicos, los dihédricos, los helicoidales y los que tienen estructura asimétrica. Los complejos heteroméricos también se rigen en su estructura por operaciones de simetría. Las ventajas de los complejos heteroméricos se ven en que el complejo pueda realizar varias funciones, y es más fácil formarlo a partir de varias proteínas que hacer una proteína con todas esas subunidades para cada función. Los homoméricos también tienen ventajas, ya que tienen una estructura más estable.

Además, permiten realizar funciones que tendría que realizar una proteína más grande, lo que permite un ahorro de material genético.<sup>4</sup>



**Figura 1 Niveles estructurales de las proteínas**

Las proteínas se dividen en dos tipos, las proteínas fibrosas y las proteínas globulares.

Por un lado, las proteínas fibrosas tienen una estructura alargada, una estructura secundaria única, y una estructura terciaria simple. Tienen funciones estructurales. Algunos ejemplos de estas proteínas son la queratina que forma parte de la piel, la fibroína que compone la seda, o el colágeno, que se encarga de dar rigidez a huesos y músculos.<sup>3</sup>

Por otro lado, las proteínas globulares tienen una estructura de glóbulo, en la misma proteína hay varios tipos de estructuras secundarias y esto hace que la estructura terciaria sea compleja. Entre sus funciones podemos encontrar la catálisis o el almacenamiento. Algunos ejemplos de estas son la mioglobina que se encarga de almacenar el oxígeno y la hemoglobina que se encarga de transportar el oxígeno.<sup>3</sup>

Hay diferentes alimentos que cubren estas necesidades, como pueden ser las carnes, los huevos y los pescados, pero también alimentos de origen vegetal como las legumbres, las patatas o los cereales<sup>5</sup>.

Entre estos alimentos está el té, que es la segunda bebida más consumida del mundo solo por detrás del agua. Su popularidad se centra en mayor medida en Asia, siendo el lugar de su origen el Sur de China y estableciéndose como bebida nacional durante la dinastía Tang a partir del cual se expandió llegando a otras partes del mundo, forjando una cultura del té no solo en Asia (China, Japón como ejemplos), sino también en zonas como

el Medio Oriente, Marruecos, Rusia o el Reino Unido, tras llegar a Europa durante las grandes expediciones de los siglos 15 y 16. Hablando de un hecho relacionado con el Reino Unido con respecto al té, se tiene que hablar del incidente del té de Boston en 1773, en el que varias personas, tiraron al mar, el contenido en té de tres barcos ingleses, como protesta a los impuestos que había impuesto el Reino Unido a las colonias americanas, este hecho es uno de los acontecimientos previos a la guerra de independencia estadounidense. Aunque durante el siglo 19 el té se mantuvo como la bebida preferida en el territorio estadounidense.<sup>6</sup>

Las diferentes variedades del té se deben a que, tras la recolección de las hojas, estas pueden ser procesadas de diferentes maneras.<sup>7</sup>

Según esto podemos hablar en primer lugar del té verde, que es quemado para evitar la oxidación. En este proceso las hojas son calentadas a alta temperatura, desnaturalizando las enzimas que provocan la oxidación e impidiéndola. Se caracteriza por un sabor a hierbas y algo ácido. Este tipo de té es el más popular en China y en Japón.<sup>7</sup>

En segundo lugar, hablamos del té negro, en el cual las hojas de té son oxidadas. En este caso las enzimas presentes en las hojas de té sí que provocan la oxidación. Tiene un sabor fuerte y amargo. Este tipo de té es popular en el Reino Unido y en aquellos países que son antiguas colonias británicas.<sup>7</sup>

El té oolong, también conocido como té azul por el color azulado de las hojas, es un té que en términos de oxidación está entre el verde y el negro. Según la oxidación y los diferentes tipos sus sabores son muy variados. Es popular en Taiwán.<sup>7</sup>

El té blanco, es un tipo de té en el que el procesamiento es mínimo, ya que el único tratamiento realizado es el secado de las hojas. El sabor de este tipo de té depende del grado de oxidación, teniendo un sabor más afrutado y a hierbas cuando la oxidación es menor, mientras que cuando la oxidación es mayor tiende más a un sabor parecido al de una nuez o de la madera.<sup>7</sup>

Por último, podríamos hablar del té Puer, procedente de la región de Yunnan en China, de este té, podemos distinguir dos tipos. El de tipo sheng, que no es oxidado y cuyo procesamiento termina con un secado al aire. Esto hace que según los años que tenga el té, su sabor cambie. En el caso de un té con pocos años, su sabor recuerda al de los frutos rojos, mientras que el que es más viejo, tiene un sabor terrenal y rústico. Por otro

lado, está el de tipo shu, que la diferencia es que el proceso que en el té de tipo sheng tarda años, en este té ocurre en semanas, esto le da un sabor terrenal y suave.<sup>7</sup>

El té puede ser analizado tanto en polvo como en infusión. Por un lado, el té en polvo tiene un gran contenido de proteínas, mientras que por el otro lado en el té e infusión lo más abundante son los aminoácidos libres. El número de aminoácidos diferentes que tiene el té alcanza los 19, siendo importantes dos, el ácido glutámico y la teanina.<sup>8</sup> La teanina es un aminoácido especial y es el que le da al té su capacidad relajante.<sup>9</sup> Además los aminoácidos procedentes del té, pueden tener la capacidad de aliviar la fatiga neuronal, mejorar la memoria, proteger los vasos sanguíneos del cerebro y tener capacidad neuroprotectora potencial frente al daño de las neurotoxinas relacionadas con el Parkinson y el Alzheimer.<sup>10</sup>

Se necesita un método capaz de analizar, la concentración de los aminoácidos totales en tés, de forma exacta, con precisión y rapidez, además de ser sensible.

Uno de los posibles métodos es la espectrofotometría de fluorescencia con derivatización previa con o-ftalaldehido o la espectrofotometría visible-UV con derivatización previa con ninhidrina.<sup>11</sup> En cuanto a las características analíticas se puede decir que es un método con una buena precisión y exactitud, además de una buena sensibilidad.

Otro de los posibles métodos es la cromatografía líquida de alto rendimiento en fase reversa. En este método, los analitos se separan por la diferente interacción que tienen con la fase móvil y la fase estacionaria. En un primer lugar las proteínas serían precipitadas con ácido tricloroacético<sup>12</sup>. La ruptura de la proteína se produce por hidrólisis con HCl 6M que se efectuaría a 110°C durante 24 horas.<sup>13</sup> Se necesita una derivatización previa antes de la separación en columna. En este caso la derivatización se puede realizar con compuestos como el isotiocianato de fenilo<sup>14,15</sup> o el cloruro de dansilo<sup>16</sup>.

En el caso de la derivatización con isotiocianato de fenilo (PITC), esta se realizaría a temperatura ambiente durante 10-20 min y el producto que se forma es un derivado que se detectaría a 254 nm por detección UV tras la separación cromatográfica. Esta derivatización tiene como puntos fuertes, su rapidez, su sensibilidad, su estabilidad y que el exceso de reactivo no genera problemas en el análisis. Por otro lado, como puntos débiles están ciertos efectos de matriz, y una sensibilidad baja comparada con los compuestos fluorescentes, su límite de detección es 50 picomoles.<sup>17</sup>

La derivatización con cloruro de dansilo se realizaría a una temperatura de 40°C y tendría una duración de 60 min para luego estar 60 min a oscuras<sup>16</sup>, tras la separación cromatográfica el producto que se forma sería un derivado del dansilo y se detectaría a 250 nm por detección UV o por detección fluorimétrica. Como puntos fuertes están, una buena sensibilidad ya que es capaz de detectar picomoles y femtomoles y que es estable frente a la hidrólisis. Por otro lado, la derivación es lenta, el producto es sensible a la luz, y hay problemas en la detección de histidina.<sup>15</sup>

Otra posibilidad, es la cromatografía de intercambio iónica, las proteínas serían precipitadas con ácido tricloroacético<sup>12</sup>, y la ruptura de la proteína se produce por hidrólisis con HCl 6M<sup>13</sup>. Se necesita una derivatización posterior a la separación en columna que se efectúa con ninhidrina.<sup>18</sup>

La derivatización con ninhidrina se realizaría a 110°C y durante 10 min, y forma un producto coloreado (púrpura de Ruhemann) que absorbe a 570 nm por lo que se puede detectar por espectrofotometría vis-UV.<sup>19</sup>

Este método ofrece una buena selectividad, pero tiene altos límites de detección y el tiempo de elución es elevado (más de 60 min). Además, la ninhidrina provoca interferencias de matriz además de ser sensible a la luz, a los cambios de temperatura al oxígeno y al pH.<sup>17</sup>

Otra posibilidad para el análisis es la cromatografía de gases con espectrometría de masas como detector, en este caso, los aminoácidos serían separados por cromatografía de gases y detectados por el espectrómetro de masas. Como los aminoácidos no son especies muy volátiles, se necesitaría de una derivatización previa para poder llevar a cabo la separación, que se podría realizar con especies como el trimetilsililo y sus derivados, o realizar una alquilación de los aminoácidos, siendo esta mejor que la reacción con trimetilsililo, ya que tiene mejor resolución. Como características buenas de este método se puede comentar que tiene la mejor resolución y los mejores tiempos de retención de los diferentes métodos cromatográficos que se pueden utilizar para analizar los aminoácidos.<sup>20</sup>

Otra posible opción para el análisis de los aminoácidos es la electroforesis capilar con detector de masas. La base de este método es la separación de los diferentes aminoácidos presentes debido a su diferente carga a un determinado pH que hace que se muevan con mayor o menor velocidad y se separen. La electroforesis capilar es un

método que en los últimos años se ha vuelto más fiable, debido a detectores de masas más sensibles o al uso de la derivatización.<sup>20</sup>

El método elegido, sería la espectrofotometría previa derivatización de los aminoácidos con ninhidrina, ya que es un método que tiene buenos límites de detección. Por otro lado, es más rápida que la cromatografía de gases, la cromatografía líquida, tanto en fase reversa como iónica y la electroforesis capilar, lo cual viene bien debido al poco tiempo que hay en el laboratorio. Otro punto a favor es que el objetivo final es analizar el total de aminoácidos, no cuales hay, por lo que solo se necesitaría hacer una recta de calibrado con un aminoácido, mientras que en la cromatografía se necesitaría hacer calibrados para todos. Al haber menos reactivos implicados en el análisis es una opción más barata que la cromatografía, ya que en la espectrofotometría solo necesitamos una especie para el calibrado, y en la cromatografía son necesarios todos.

Centrándonos en la espectrofotometría, es una técnica que se basa en la medición de la radiación electromagnética absorbida por un determinado compuesto. Esta radiación absorbida por el compuesto es la radiación que tiene la energía necesaria para que los electrones salten del orbital más alto ocupado al orbital más bajo sin ocupar.<sup>21</sup>

Como hablamos de espectrofotometría visible ultravioleta, son compuestos que absorben radiación visible o ultravioleta, el visible es en el intervalo que puede ser visto por el ojo humano, entre los 380 nm y los 780 nm y según la longitud de onda a la que absorben, corresponde a un color determinado.<sup>21</sup>

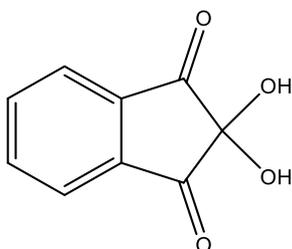
La ley de Lambert-Beer que relaciona la absorbancia de un compuesto con la concentración de este, por lo que se puede utilizar la absorbancia como señal para determinar la concentración de las muestras.<sup>21</sup>

$$A = \epsilon bc$$

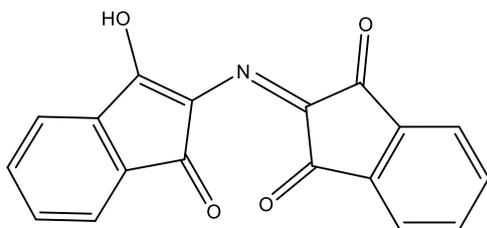
Siendo  $\epsilon$  el coeficiente de absorción molar,  $b$  la longitud de la celdilla y  $c$  la concentración del analito en cuestión.<sup>21</sup>

Los aminoácidos son especies que absorben radiación ultravioleta gracias a su grupo carboxilo a una longitud de onda de unos 200nm<sup>17</sup> y algunos como el triptófano la tirosina o la fenilalanina pueden absorber radiación con una longitud de onda máxima de 280 nm debido a la presencia de anillos aromáticos en su cadena lateral, pero esto no es un proceso muy selectivo, por lo que hay que buscar una forma de analizar los aminoácidos de forma selectiva.<sup>22</sup> Para ello se llevará a cabo una reacción para transformar los

diferentes aminoácidos en un producto coloreado. Para ello se utilizará la ninhidrina, que es un compuesto que, al reaccionar con los aminoácidos, genera un producto llamado Purpura de Ruhemann que absorbe a 570 nm.<sup>19</sup> La estructura de la ninhidrina se puede ver en la figura 2 y la estructura del Purpura de Ruhemann se puede ver en la figura 3.



**Figura 2 Estructura de la ninhidrina**



**Figura 3 Estructura del Purpura de Ruhemann**

Al tener el Purpura de Ruhemann, se puede determinar la concentración de aminoácidos totales que hay en la muestra, ya que todos los aminoácidos se transforman en el producto.

### 3. Objetivos

El objetivo de este trabajo es la determinación de aminoácidos totales en té, mediante espectrofotometría visible ultravioleta con derivatización con ninhidrina. Comprobar si el método propuesto es bueno para el análisis que se quiere realizar.

Por otro lado, centrándonos en los té, el objetivo es comparar el contenido de aminoácidos de dos tipos de té diferentes, el té verde y el té negro y también comparar el contenido de aminoácidos de dos té del mismo tipo, para ambos tipos de té analizados.

## 4. Metodología experimental

### 4.1 Reactivos

- Ninhidrina proveniente de Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA)
- Fosfato de disodio ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) proveniente de Merck (Darmstadt, Alemania)
- Dihidrógeno fosfato de potasio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) proveniente de Merck (Darmstadt, Alemania)
- Cloruro de estaño (II) proveniente de Fisher Scientific (Hampton, NH, USA)
- Ácido glutámico proveniente de Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA)
- Bolsas de té: Hornimans verde, Hornimans Negro, Negro de china y Bio 3

### 4.2 Equipo

- Espectrofotómetro vis-UV Thermo Fisher Genesys 20 y cubetas

### 4.3 Muestras que analizar

Se pretende analizar dos téis verdes, siendo uno de la marca Hornimans y el otro un té ecológico y dos téis negros, siendo el primero el de la marca Hornimans y el segundo un té de china, realizando cada análisis por triplicado.

### 4.4 Preparación de disoluciones

Para preparar la disolución tampón, se preparan dos disoluciones, una de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  de concentración 0,17 M preparada disolviendo 11,69 g en 500 mL de agua y otra de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  de concentración 0,07 M preparada disolviendo 0,908 g en 100 mL de agua. A partir de estas dos se genera una disolución de 100 mL que contenga un 95% en volumen de la disolución de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , y un 5% en volumen de la disolución de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .

Para preparar la disolución de ninhidrina, de concentración 0,11 M, 2 g se disuelven en 50 mL y se añaden 80 mg de  $\text{SnCl}_2$ , y se diluye todo a 100 mL.

#### **4.5 Preparación de cada muestra.**

En un matraz Erlenmeyer de 250 mL se añade una bolsa de té (0,5 g) previamente secada en la estufa y 50 mL de agua hirviendo. Se deja agitando a 90°C durante 10 minutos, en una placa caliente. Tras esto, la disolución se filtra. Los residuos se lavan 3 veces con 10 mL de agua. Se diluye el filtrado a 100 mL con agua.

En un vial, 1 mL de la disolución se mezcla con 0,5 mL de una disolución tampón y 0,5 mL de una disolución de ninhidrina, y se calienta en un baño de agua hirviendo durante 15 minutos.

Tras los 15 minutos, se diluyo la mezcla hasta los 25 mL. Se mide la absorbancia de la disolución 570 nm, ya que es la longitud de onda a la que absorbe el producto formado que es el púrpura de Ruhemann.

#### **4.6 Calibrado**

Para la curva de calibrado se usará el ácido glutámico, en la que se 0,252 g, se disolverán en 100 mL. 4mL de esta disolución además de 0,5 mL de la disolución tampón y 0,5 mL de la disolución de ninhidrina se añade a un vial, que se calienta durante 15 minutos en un baño de agua hirviendo. Pasado este tiempo diferentes alícuotas del contenido de este vial (0,2 mL; 0,4 mL; 0,6 mL, 0,8 mL) se pasaron a matraces de 25 mL y se enrasan los matraces, de cada una de ellas se midió la absorbancia, realizándose la recta de calibrado.

Previo al calibrado, se realiza un espectro del producto para el cual 2 mL de la disolución de ácido glutámico se añaden a un vial, junto con 0,5 mL de la disolución tampón y 0,5 mL de la disolución de ninhidrina. Este vial se calienta durante 15 minutos en un baño con agua caliente. 1 mL del contenido de este vial se añade a un matraz de 10 mL que se enrasa. El contenido se diluyó y se registró el espectro.

#### **4.7 Medida de la humedad en los té**

Antes de preparar las muestras, estas se secaron en la estufa, gracias a esto, se pudo saber el contenido en agua que traían las muestras, mediante el pesaje del contenido de las bolsas, antes de secarlas en la estufa y tras secarlas a 100 °C durante 24 horas.

## 5. Resultados y discusión.

En este apartado se expondrán y comentarán los diferentes resultados obtenidos, empezando por la recta de calibrado, para después pasar al contenido de aminoácidos de los téis y la humedad relativa de los téis.

### 5.1 Determinación de la humedad en las muestras.

Para poder determinar la humedad de cada una de las muestras, para cada una de las bolsas a analizar de cada uno de los téis, se pesó su contenido. Se dejó secando en la estufa y luego se pesó el contenido seco. Tras hacer esto se calculó contenido de agua que tenía cada bolsa. El contenido en agua de cada bolsa de cada uno de los téis se puede ver en la tabla 5 y en la tabla 6 se puede ver el contenido medio en agua para cada te.

**Tabla 2 Humedad de las muestras de té**

Muestras	Peso húmedo(g)	Peso seco(g)	Agua(g)	Humedad Muestra (%)
Té verde ecológico 1	1,92	1,746	0,174	9,06
Té verde ecológico 2	1,923	1,33	0,593	30,84
Té verde ecológico 3	1,904	1,63	0,274	14,39
Té Hornimans verde 1	1,5	1,362	0,138	9,20
Té Hornimans verde 2	1,588	1,435	0,153	9,63
Té Hornimans verde 3	1,662	1,5	0,162	9,75
Té Hornimans negro 1	1,847	1,684	0,163	8,83
Té Hornimans negro 2	1,837	1,611	0,226	12,30
Té Hornimans negro 3	1,83	1,636	0,194	10,60
Té de china 1	1,5	1,368	0,132	8,80
Té de china 2	1,499	1,36	0,139	9,27
Té de china 3	1,499	1,372	0,127	8,47

**Tabla 3 Humedad media para cada té**

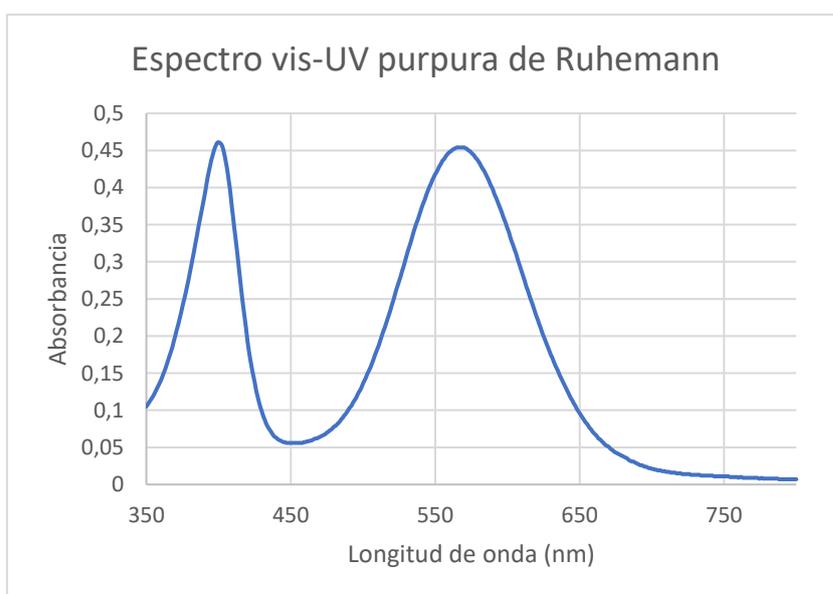
Muestra	Humedad media (%)	Desviación estándar	RSD (%)
Té verde ecológico	11,73	2,66	22,72
Té Hornimans verde	9,53	0,24	2,48
Té Hornimans negro	10,58	1,42	13,42
Té de china	8,85	0,76	8,62

Hablando de la humedad de las bolsas, como se puede ver en la tabla 6, la media para todos los tés esta entre el 8% y el 12% siendo el té de china el que menos humedad tiene y el té verde ecológico el que más. Estos contenidos en agua son bastante elevados, ya que lo habitual para un te es estar entre el 3% y el 6%.<sup>23</sup> Esto se puede deber a que hayan ganado humedad antes de haber medido el contenido de humedad

Por otro lado, si hablamos de la reproducibilidad de los resultados, es muy buena para los resultados obtenidos para el té de Hornimans verde ya que el RSD es menor del 5%, es buena para los resultados obtenidos para el té de china ya que es menor del 10%, y no es buena para los resultados obtenidos para el té de Hornimans negro y el té verde ecológico. Para este último no se tuvo en cuenta la segunda muestra (té verde ecológico 2) al obtener la humedad media al obtenerse un valor atípico, esto se puede ver en la tabla 5.

## 5.2 Espectro vis-UV del producto

Para obtener el espectro del purpura de Ruhemann, se añadieron 2 mL de la disolución patrón de ácido glutámico, se añadieron a un vial al que se le añadió 0,5 mL del tampón y 0,5 mL de la disolución de ninhidrina, esta mezcla se calentó durante 15 minutos. El contenido del vial, que tenía un color violeta-oscuro casi negro se pasó a un matraz de 10 mL del cual se realizó una primera medida. Como estaba demasiado concentrada, se diluyo el contenido de la cubeta y se midió de nuevo, obteniéndose el espectro que se puede ver en la figura 4.



**Figura 3: Espectro de absorción de purpura de Ruhemann**

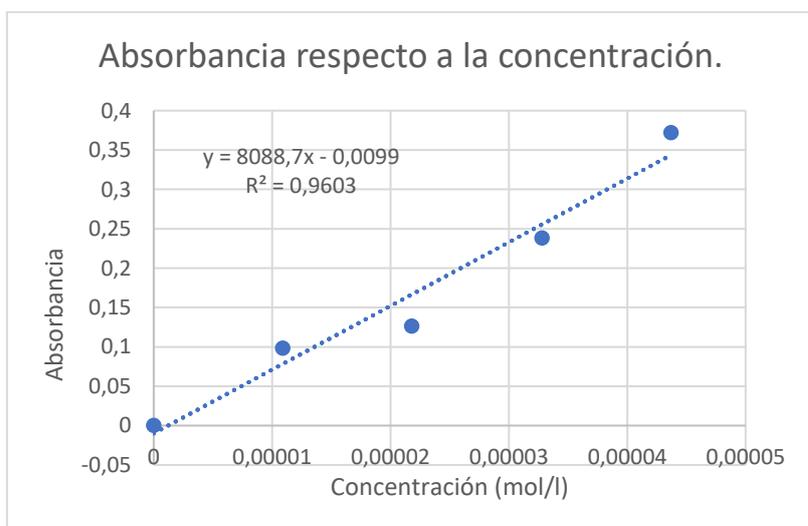
Como se puede ver en la figura 3 hay una absorción máxima entre los 564 nm y los 570 nm, más concretamente en los 567 nm, esto concordaría con los datos obtenidos de la bibliografía según los cuales esta especie absorbe sobre los 570 nm.<sup>19</sup> El color del producto tiene sentido, ya que el violeta es el color que se refleja cuando se absorbe en esas longitudes de onda.<sup>24</sup>

### 5.3 Obtención de la recta de calibrado

Para realizar la recta de calibrado, se realizó una disolución de ácido glutámico de la cual, a una alícuota de 4 mL, añadida a un vial, se le añadió 0,5 mL del tampón y 0,5 mL de la disolución de ninhidrina, y se dejó durante 15 minutos en agua caliente, de este vial se cogieron diferentes volúmenes que se disolvieron en matraces de 25 mL cada uno, midiéndose la absorbancia de cada una de las disoluciones, cuyas absorbancias se pueden ver en la Tabla 2 , y se realizó la recta de calibrado, que se puede ver en la figura 5.

**Tabla 4 Absorbancia frente a concentración**

c(mol/L)	Absorbancia
0	0
1,09E-05	0,098
2,18E-05	0,126
3,28E-05	0,238
4,37E-05	0,372



**Figura 5 Recta de calibrado (absorbancia frente a concentración)**

En este caso, la recta de calibrado tiene una pendiente cuyo valor es 8088,7 1/M y un error cuyo valor es 949,8 1/M. La ordenada en el origen tiene un valor de 0,001 y un error cuyo valor es 0,025. El límite de detección cuyo cálculo se puede ver en el anexo (pág. 21) tiene un valor de 1,26E-06 M. Como se puede ver en la figura 2, la recta es mejorable, ya que el  $R^2$  obtenido ha sido de 0,96 siendo este valor menor de 0,99<sup>25</sup> que es el valor recomendado para considerar que una recta de calibrado tiene buena linealidad.

Esta recta de calibrado fue posible realizarla debido a que la reacción funcionó correctamente, ya que, tras los 15 minutos se produjo un cambio de color evidente, pasando de un color transparente a un color violeta oscuro, señal de que estaba muy concentrado, y a partir del cual se hicieron las diferentes diluciones, que fueron las que se midieron.

#### **5.4 Contenido de aminoácidos totales en los té.**

Para poder determinar el contenido de aminoácidos, en cada uno de los té, se sometió al mismo procedimiento, en primer lugar, para cada uno de los té se preparó una disolución de 100 mL Después, 1 mL de esta disolución se pasó a un vial al que se le añadieron, 0,5 mL del tampón y 0,5 mL de la ninhidrina y se dejó en agua hirviendo durante 15 minutos, después de esto, se pasó la disolución a un atrás de 25 mL, donde se diluyo. Se midió absorbancia de esta disolución, para luego calcular la concentración de aminoácidos en cada uno de los té. Este procedimiento se realizó por triplicado para cada uno de los té. En la tabla 3 se puede ver la absorbancia de cada una de las muestras analizadas, así como la concentración de aminoácidos, el contenido en aminoácidos de cada una de las muestras en gramos y el tanto por ciento en peso de aminoácidos. En la tabla 4 se puede ver el tanto por ciento en peso de aminoácidos medio, que tiene cada uno de los té.

**Tabla 5 Contenido en aminoácidos totales (en porcentaje) de cada muestra**

Muestras	Absorbancia	c (mol/L)	Aminoácidos (g)	Masa de té (g)	% Aminoácidos
Té verde ecológico 1	0,022	3,94E-06	0,0014	0,50	0,29
Té verde ecológico 2	0,045	6,78E-06	0,0025	0,51	0,49
Té verde ecológico 3	0,028	4,68E-06	0,0017	0,50	0,35
Té Hornimans verde 1	0,006	1,96E-06	0,0007	0,50	0,14
Té Hornimans verde 2	0,024	4,19E-06	0,0015	0,50	0,31
Té Hornimans verde 3	0,046	6,91E-06	0,0025	0,50	0,50
Té Hornimans negro 1	0,014	2,95E-06	0,0011	0,50	0,22
Té Hornimans negro 2	0,026	4,43E-06	0,0016	0,50	0,33
Té Hornimans negro 3	0,011	2,58E-06	0,0009	0,50	0,19
Té de china 1	0,018	3,44E-06	0,0013	0,50	0,25
Té de china 2	0,022	3,94E-06	0,0014	0,50	0,29
Té de china 3	0,011	2,58E-06	0,0009	0,50	0,19

**Tabla 6 Contenido en aminoácidos total medio (en porcentaje) en cada té**

Muestra	% aminoácidos medio	% Desviación estándar	RSD [%]
Té verde ecológico	0,38	0,11	23
Té Hornimans verde	0,32	0,19	46
Té Hornimans negro	0,24	0,08	24
Té de china	0,24	0,05	17

Al comparar los resultados obtenidos para el contenido de aminoácidos que se pueden ver en la tabla 4, se puede observar que ambos té verdes, tienen mayor contenido de aminoácidos que ambos té negros, lo cual concuerda con lo investigado en la literatura, y que para el té ecológico y el té de Hornimans verde, ambos té verdes, su contenido de aminoácidos es similar siendo el del té ecológico un poco mayor que el té de Hornimans, para los dos té negros que son el té de Hornimans y el té de china su contenido de aminoácidos es el mismo.

Al comparar el contenido obtenido de aminoácidos con respecto a los datos encontrados en la literatura, se encuentra que el contenido en aminoácidos de estos té es bajo.

Por un lado, si hablamos de los té verdes, se encuentra que el contenido de aminoácidos para este tipo de té esta sobre el 2,3% de media, mientras que en los resultados obtenidos que se pueden ver en la tabla 4, la media del contenido de aminoácidos de las muestras para té de Hornimans verde ha sido del 0,32 %, y para él té ecológico, también verde, ha sido del 0,38 %. Esto hace que el contenido en aminoácidos de estos té sea aproximadamente una sexta parte

del contenido de los tés de la bibliografía en el caso del té ecológico y entre una sexta y una séptima parte para el té de Hornimans.<sup>26</sup>

Por otro lado, el contenido de aminoácidos para los tés negros en la bibliografía está en el 1,75% de media, mientras que la media del contenido de aminoácidos en las muestras de ambos tés negros es del 0,24 %. Este contenido en aminoácidos esta entre una séptima parte y una octava parte del contenido de los tés de la bibliografía.<sup>26</sup>

Estos resultados inferiores a los obtenidos en la bibliografía se pueden deber a que no se obtuvo el color deseado al hacer la reacción, que debería haber sido púrpura como si ocurrió en las disoluciones preparadas para la recta de calibrado, si no que se mantuvo un color parecido al de la disolución preparada al calentar el té y filtrar el té, siendo la absorbancia registrada baja, y obteniéndose un contenido en aminoácidos bajo. Esto puede deberse al filtro utilizado, que fue de papel, en vez de utilizar uno de algodón.

Por otro lado, si hablamos de la reproducibilidad vemos que no es muy bueno, ya que se ha obtenido para cada té un RSD mayor al 10%.

## 6. Conclusiones

El objetivo de este trabajo fue determinar el contenido en aminoácidos que tenían diferentes tipos de tés. Se analizaron dos tés verdes, uno de la marca hornimans y uno ecológico, y dos tés negros, el primero de la marca Hornimans y el segundo un té de China. En este caso, se centró en determinar el contenido total de aminoácidos, sin especificar que aminoácidos específicos lo conformaban. También se calculó la humedad que tenían los tés.

Para ello se estudiaron varios métodos entre los que estaban la cromatografía líquida de alto rendimiento, la cromatografía de gases o la electroforesis capilar, para al finar elegir la espectrofotometría visible ultravioleta con derivatización con ninhidrina ya que era un método más rápido y barato que las otras opciones.

En primer lugar, la derivatización con ninhidrina sirvió para poder realizar la recta de calibrado, ya que al realizar la reacción en las condiciones previstas se observó un cambio de color evidente, señal de que había ocurrido la reacción. Respecto a la recta de calibrado, hay que comentar que su linealidad es mejorable, ya que se ha obtenido un  $R^2$  menor de 0,99. Con un límite de detección cuyo valor es  $1,26E-06$  M.

Pasando a los resultados, por un lado, hay que comentar que la humedad de estos té es elevada con respecto a lo normal, ya que se han obtenido humedades que están entre el 8 % y el 12 % mientras que la humedad normal para un té en bolsa esta entre el 3% y el 6%. Esta humedad elevada de los té puede deberse a que los análisis fueron realizados en Asturias, una región con alta humedad relativa.

Por otro lado, el contenido en aminoácidos de estos té es bastante bajo con respecto a la media. Los dos té verdes tienen un contenido en aminoácidos medio que es del 0,38 % para el té verde ecológico y 0,32 % para el té de marca Hornimans. Los dos té negros, tanto el de la marca Hornimans como el té de china tienen ambos un contenido en aminoácidos medio del 0,24 %. Si los comparamos con los valores de la bibliografía, se ve que el contenido en aminoácidos de los té es aproximadamente una sexta parte para el té ecológico, aproximadamente una séptima parte para el té de hornimans verde, y una octava parte para ambos té negros.

Este método, con una mejor preparación de muestra, podría ser un buen método para el analizar el contenido de aminoácidos en té, ya que es un método que es rápido, más barato que las otras opciones, y tiene una buena sensibilidad, al tener un límite de detección cuyo valor es  $1,26E-06$  M.

## 7. Bibliografía

- (1) Wu, G. Amino Acids: Metabolism, Functions, and Nutrition. *Amino Acids*. **2009**, 1–17. DOI: 10.1007/s00726-009-0269-0.
- (2) Wu, G. Functional Amino Acids in Nutrition and Health. *Amino Acids*. **2013**, 407–411. DOI: 10.1007/s00726-013-1500-6.
- (3) Whitford, D. *Proteins: Structure and Function*; Wiley & Sons, Incorporated, John, **2013**.
- (4) Marsh, J. A.; Teichmann, S. A. Structure, Dynamics, Assembly, and Evolution of Protein Complexes. *Annual Review of Biochemistry*. **2015**, 84 (1), 551–575. DOI: 10.1146/annurev-biochem-060614-034142
- (5) Collins, A.; Budgett, R.; Lanham-New, S. A.; Stear, S.; Shirreffs, S. *Sport, and Exercise Nutrition*; Wiley & Sons, Limited, John, **2011**.
- (6) Mair, V. H. *The true history of tea*; Thames & Hudson: New York, **2009**.
- (7) Types of tea - The complete No-Fluff guide | TeaSource | TeaSource. <https://www.teasource.com/pages/types-of-tea> (consultado el 20/04/2024).

- (8) Yilmaz, C.; Özdemir, F.; Gökmen, V. Investigation of Free Amino Acids, Bioactive and Neuroactive Compounds in Different Types of Tea and Effect of Black Tea Processing. *LWT* **2020**, *117*. DOI: 10.1016/j.lwt.2019.108655.
- (9) Juneja, L. L-Theanine—a Unique Amino Acid of Green Tea and Its Relaxation Effect in Humans. *Trends in Food Science and Technology*. **1999**, *10* (6-7), 199–204. DOI: 10.1016/s0924-2244(99)00044-8
- (10) Luo, Q.; Luo, L.; Zhao, J.; Wang, Y.; Luo, H. Biological Potential and Mechanisms of Tea's Bioactive Compounds: An Updated Review. *Journal of Advanced Research*. **2023**. DOI: 10.1016/j.jare.2023.12.
- (11) Liang, Y.; Lu, J.; Zhang, L.; Wu, S.; Wu, Y. Estimation of Black Tea Quality by Analysis of Chemical Composition and Colour Difference of Tea Infusions. *Food Chemistry* **2003**, *80* (2), 283–290. DOI: 10.1016/S0308-8146(02)00415-6.
- (12) Sharer, J. D.; De Biase, I.; Matern, D.; Young, S.; Bennett, M. J.; Tolun, A. A. Laboratory Analysis of Amino Acids, 2018 Revision: A Technical Standard of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). *Genetics in Medicine*. **2018**, *20* (12), 1499–1507. DOI: 10.1038/s41436-018-0328-6.
- (13) Mustatea, G.; Ungureanu, E. L.; Iorga, E.; Mustăţea, G.; Ungureanu, E. L.; Iorga, E. Protein acidic hydrolysis for amino acids analysis in food-progress over time: a short review; 2019; Journal of Hygienic Engineering and Design Vol. 388. 81-87  
<https://www.researchgate.net/publication/332440930>.
- (14) Klikarová, J.; Česlová, L.; Fischer, J. Rapid Analysis of Phenyl Isothiocyanate Derivatives of Amino Acids Present in Czech Meads. *Journal of Chromatography A*. 2021, 1644, 462134. DOI: 10.1016/j.chroma.2021.462134
- (15) Bidlingmeyer, B. A.; Cohen, S. A.; Tarvin, T. L. Rapid Analysis of Amino Acids Using Pre-Column Derivatization. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. **1984**, *336* (1), 93–104. DOI: 10.1016/s0378-4347(00)85133-6
- (16) Bai, J.; Baker, G. L.; Baker, S. M.; Goodrich Schneider, R. M.; Montazeri, N.; Sarnoski, P. J. Simultaneous Determination of Amino Acids and Biogenic Amines in Tuna and Mahi-Mahi by Reversed-Phase Ultra-High Performance Liquid Chromatography. *Journal of Aquatic Food Product Technology*. **2019**, *28* (8), 848–860. DOI: 10.1080/10498850.2019.1652715
- (17) Callejón, R. M.; Troncoso, A. M.; Morales, M. L. Determination of Amino Acids in Grape-Derived Products: A Review. *Talanta*. **2010**, *81* (4-5), 1143–1152. DOI: 10.1016/j.talanta.2010.02.040
- (18) Mæhre, H. K.; Dalheim, L.; Edvinsen, G. K.; Elvevoll, E. O.; Jensen, I. J. Protein Determination—Method Matters. *Foods*. **2018**, *7* (1), 5. DOI: 10.3390/foods7010005
- (19) Friedman, M. Applications of the Ninhydrin Reaction for Analysis of Amino Acids, Peptides, and Proteins to Agricultural and Biomedical Sciences. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2004**, 385–406. DOI: 10.1021/jf030490p
- (20) Otter, D. E. Standardised Methods for Amino Acid Analysis of Food. *British Journal of Nutrition*. **2012**, *108*, S2, S230—S237. DOI: 10.1017/s0007114512002486
- (21) Gore, M.; Bashford, C. L.; A, H. D. *Spectrophotometry and Spectrofluorimetry: A Practical Approach*; Oxford University Press, **2000**.

- (22) Grigoryan, K. R.; Shilajyan, H. A. Fluorescence 2d and 3d Spectra Analysis of Tryptophan, Tyrosine and Phenylalanine. *Proceedings of the Yerevan State University: Chemical and Biological Sciences*. **2017**, 51(1), 3-7.
- (23) Tea Storage: The Environment | Tea Guardian. Tea Guardian, s. f. <https://www.teaguardian.com/tea-hows/tea-storage-environment/> (consultado el 18/04/2024).
- (24) Tilley, R. J. D. *Colour and the Optical Properties of Materials*; John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, UK, 2010. DOI: 10.1002/9780470974773
- (25) Ross, S. M. Linear Regression. *Introductory Statistics*. **2010**, 537–604. DOI: 10.1016/B978-0-12-374388-6.00012-0
- (26) Yao, L.; Liu, X.; Jiang, Y.; Caffin, N.; D'Arcy, B.; Singanusong, R.; Datta, N.; Xu, Y. Compositional Analysis of Teas from Australian Supermarkets. *Food Chemistry*. **2006**, 94 (1), 115–122. DOI: 10.1016/j.foodchem.2004.11.009

## 8. Anexos

### 1- Cálculo de las concentraciones para la recta de calibrado

- Concentración de la disolución patrón

$$\frac{0,0252 \text{ g ácido glutámico} \times \frac{1 \text{ mol ácido glutámico}}{147,2 \text{ g ácido glutámico}}}{100 \text{ ml} \times \frac{1 \text{ L}}{1000 \text{ ml}}} = 1,37 \times 10^{-3} \text{ M}$$

- Concentración en el vial

$$1,37 \times 10^{-3} \text{ M} \times \frac{2 \text{ ml}}{3 \text{ ml}} = 9,13 \times 10^{-4} \text{ M}$$

- Concentración en las disoluciones medidas

$$\frac{9,13 \times 10^{-4} \text{ M} \times 0,2 \text{ ml} \times \frac{1 \text{ mol purpura de Ruhemann}}{1 \text{ mol ácido glutámico}}}{25 \text{ ml}} = 1,09 \times 10^{-5} \text{ M}$$

$$\frac{9,13 \times 10^{-4} \text{ M} \times 0,4 \text{ ml} \times \frac{1 \text{ mol purpura de Ruhemann}}{1 \text{ mol ácido glutámico}}}{25 \text{ ml}} = 2,18 \times 10^{-5} \text{ M}$$

$$\frac{9,13 \times 10^{-4} M \times 0,6 ml \times \frac{1 \text{ mol purpura de Ruhemann}}{1 \text{ mol acido glutamico}}}{25 ml} = 3,27 \times 10^{-5} M$$

$$\frac{9,13 \times 10^{-4} M \times 0,8 ml \times \frac{1 \text{ mol purpura de Ruhemann}}{1 \text{ mol acido glutamico}}}{25 ml} = 4,37 \times 10^{-5}$$

2- Cálculo del límite de detección.

$$LD = \frac{3 \times S_y}{b} = \frac{3 \times 0,0033}{8088,7} = 1,26 \times 10^{-6} M$$

3- Cálculo del contenido en aminoácidos de los téis

- Calibrado

$$Abs = 8088,7 \times C(M) - 0,0099$$

$$C(M) = \frac{Abs + 0,0099}{8088,7}$$

- Cálculo del porcentaje de aminoácidos

$$C(M) \times \frac{25 ml}{\frac{1000 ml}{1L}} \times \frac{1 \text{ mol aminoacido}}{1 \text{ mol purpura de Ruhemann}} \times \frac{100 ml}{1 ml} \times \frac{147,2 g}{1 \text{ mol aminoacido}}$$

$$= \frac{g \text{ aminoacidos}}{g \text{ té}} \times 100 = \% \text{ aminoacidos}$$

4- Cálculo de la humedad relativa

$$Humedad(\%) = \frac{té humedo - g \text{ té seco}}{g \text{ té}} \times 100$$