



FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PAMPA

Trabajo de tesis de grado

para optar el grado académico de

LICENCIADO EN QUÍMICA

**“DETERMINACIÓN DE CAFEÍNA EN MUESTRAS DE
CONSUMO MASIVO MEDIANTE CROMATOGRFÍA HPLC”**

AUTOR: HERMAN MINIG

DIRECTOR: Dr. MIGUEL Á. CANTARELLI

CO-DIRECTOR: Dr. JOSÉ M. CAMIÑA

SANTA ROSA (LA PAMPA). ARGENTINA.

2014

PREFACIO

Esta Tesina es presentada como parte de los requisitos para optar al grado Académico de **Licenciado en Química**, otorgado por **La Universidad Nacional de La Pampa** y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad ni en otra Institución Académica. Se llevó a cabo en el Departamento de Química de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, bajo la dirección del **Dr. Miguel Á. CANTARELLI** y la codirección del **Dr. José M. CAMIÑA**.

Herman MINIG.-

Departamento de Química

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PAMPA

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar es muy importante para mí agradecer a mi Director y mi co-Director, quienes me han permitido realizar este trabajo y poder alcanzar el grado de Licenciado en Química. Su colaboración y predisposición ha sido realmente valiosa, tanto en el plano académico pero fundamentalmente en el plano personal.

Agradecer también a la Universidad Nacional de La Pampa, Institución que me ha forjado y formado durante estos años, donde he tenido la oportunidad de crecer académicamente, pero al mismo tiempo he disfrutado de hermosos espacios compartidos con profesores, compañeros y amigos.

A la Lic. Silvana Azcárate y a mi compañera Carolina Beroisa, quienes han colaborado en la parte experimental, haciendo ameno su desarrollo.

A todos los compañeros, amigos y profesores que he tenido el placer de conocer durante estos años transcurridos, de quienes me llevo lo mejor de sus personas. Tanto aquellos con los que solo he mantenido contacto dentro del espacio universitario, como aquellos con los que he tenido la oportunidad de formar vínculos fuera del mismo, siendo para mí algo sumamente apreciado.

A mis amigos de la vida, algunos como hermanos, que tanto en la cercanía como en la distancia hacen sentir su presencia.

Por último, no por ser las personas menos importantes sino por ser las fundamentales en todo esto, quisiera agradecer a mi familia. Mis padres, que han dado todo incluso hasta lo que no han tenido, para que pueda gozar del privilegio de formarme como profesional. Orgulloso de ellos por hacer de mí lo que soy, por su amor, por sus valores, su apoyo, sus retos, sus consejos, por transmitirme su valiosa experiencia de vida.

A mis hermanos, quienes han compartido el día a día en esta vida de estudiante, bancado en las buenas y en las malas, queriéndome y aceptándome tal cual soy. Con risas y con llantos, con disgustos y placeres, pero siempre siendo un sostén, unidos para no sentir tan lejana la distancia de nuestro hogar.

A mi hija Paulina, quien hace que mi vida hoy sea maravillosa. Llegaste para moverme el mundo y demostrarme que a la felicidad se la encuentra en pequeñas cosas. Este Título y todo lo que vendrá consigo, va para vos hijita.

Herman Minig.-

RESUMEN

La cafeína es una metilxantina, componente natural en muchas plantas, también es empleada como el principal componente psicoactivo en bebidas de consumo masivo como son las bebidas energizantes o *energy drinks*.

Es considerada una sustancia GRAS (sustancia reconocida generalmente como segura) por parte de la FDA (Administración de drogas y alimentos) de los EEUU, aunque en 2012 vetó su uso en las bebidas alcohólicas y cuestionó la alta concentración de cafeína en las bebidas energizantes, luego de varias muertes asociadas a su consumo. En Argentina, la normativa vigente impartida por el Código Alimentario Argentino, establece un máximo de 32 mg de cafeína/100 mL de bebida energizante analcohólica, estando prohibida la comercialización de estas bebidas combinadas con alcohol. Por otro lado, la OMS recomienda como límite consumir 300 mg de cafeína/día, considerando una ingesta de 500 mg como tóxica y peligrosa.

Es preciso considerar que con la ingestión de 4 latas de bebidas de 250 mL, se alcanzaría la cantidad máxima diaria ingerida de cafeína recomendada por la OMS. En Argentina, unas de las bebidas más populares es el mate y su consumo elevado de yerba mate aporta cantidades significativas de cafeína, lo que hace aún más peligroso un consumo excesivo de bebidas energizantes.

En el presente trabajo se ha realizado la determinación de cafeína mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) en muestras de diferentes bebidas energizantes comercializadas en nuestro país, a fin de evaluar si las mismas cumplen con la normativa vigente respecto al contenido de cafeína y al mismo tiempo identificar aquellas que poseen valores más cercanos a los límites máximos, con las que será mayor la probabilidad de alcanzar los máximos diarios permitidos por la OMS.

SUMMARY

Caffeine is a methylxanthine, which is a natural component in many plants, but is also used as the main psychoactive component in consumer beverages such as energy drinks.

The US FDA (United State Food and Drug Administration) considered to caffeine as GRAS (generally recognized as safe) substance, but in 2012 vetoed its use in alcoholic beverages and questioned the high concentration of caffeine in energy drinks, after several deaths associated with its consumption. Furthermore, the WHO recommended a limit consuming 300 mg of caffeine per day, considering an intake of 500 mg as toxic and dangerous. In Argentina, the current regulations provided by the Argentine Food Code (CAA), section 1388, rules a maximum of 32 mg of caffeine per 100 mL of non-alcoholic energy drink; the marketing of these drinks combined with alcohol is forbidden.

The consumption of 4 beverage 250 mL cans, would reach the daily maximum consumption of caffeine recommended by WHO. In Argentina, one of the most popular drinks is the *mate*, an infusion made from yerba mate a plant that has caffeine. The high consumption of *yerba mate* provides significant amounts of caffeine, making it even more dangerous excessive consumption of energy drinks.

In the present study, caffeine was determined by High Performance Liquid Chromatography (HPLC), in samples of different energy drinks available in our country, in order to assess if they obey the current regulations regarding caffeine content, but also to identify those that have values near to maximum limits, in whose case will be greater likelihood of achieving the maximum permitted by the WHO.

INDICE

CAPITULO 1.	OBJETIVOS DEL TRABAJO.....	1
1.1.	GENERAL.....	1
1.2.	ESPECÍFICOS.....	1
CAPITULO 2.	INTRODUCCIÓN.....	2
2.1.	DESCUBRIMIENTO Y ABUNDANCIA DE LA CAFEÍNA	2
2.2.	BASES XÁNTICAS	4
2.2.1.	Relación estructura química - actividad farmacológica	4
2.3.	CAFEINA. PROPIEDADES	5
2.3.1.	Propiedades químicas y físicas	5
2.3.2.	Ruta metabólica y vida media	7
2.3.3.	Mecanismos de acción	8
2.3.4.	Farmacología	9
2.3.5.	Efectos fisiológicos beneficiosos de la cafeína	10
2.3.6.	Efectos fisiológicos nocivos de la cafeína	11
2.4.	CAFEÍNA EN PRODUCTOS DE CONSUMO MASIVO	12
2.4.1.	Café	12
2.4.2.	Té	12
2.4.3.	Mate	13

2.4.4. Cacao	14
2.4.5. Guaraná	14
2.4.6. Bebidas cola	15
2.4.7. Medicamentos	15
2.5. BEBIDAS ENERGIZANTES	17
2.5.1. Origen	18
2.5.2. Composición	19
2.5.3. Efectos fisiológicos de los principales componentes	23
2.6. MARCO NORMATIVO DEL CONTENIDO DE CAFEÍNA EN LAS BEBIDAS ENERGIZANTES	25
2.6.1. Europa	26
2.6.2. Oceanía	26
2.6.3. América	27
2.6.4. Argentina	28
2.6.4.1. Modificaciones	29
2.7. PROBLEMÁTICA EN EL CONSUMO DE BEBIDAS ENERGIZANTES	31
2.8. MÉTODOS DE SEPARACIÓN DE LA CAFEÍNA	32
2.9. METODOS ANALÍTICOS DE CUANTIFICACIÓN DE LA CAFEÍNA	34
2.9.1. HPLC	36
2.9.1.2. Instrumental	39
2.9.1.3. Medidas cualitativas y cuantitativas	39

CAPITULO 3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	41
3.1. REACTIVOS	41
3.1.1. Solución estándar de cafeína	41
3.1.2. Solvente metanol	41
3.1.3. Fase móvil	41
3.1.4. Muestras de bebidas energizantes	41
3.1.5. Agua ultrapura	42
3.2. INSTRUMENTAL	42
3.2.1. Cromatógrafo HPLC	42
3.2.2. pH-metro	42
3.3. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	42
3.3.1. Preparación de patrones de calibración de cafeína	42
3.3.2. Preparación de las muestras	43
3.3.3. Parámetros de ajustes	43
3.3.4. Elución cromatográfica	44
CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	45
4.1. ETAPA DE CALIBRACIÓN.....	45
4.1.2 ANOVA para Regresión Lineal.....	47
4.2. ETAPA DE PREDICCIÓN.....	47
4.3. ANALISIS ESTADÍSTICO.....	51

CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES	53
5.1. DE LOS COSTOS INSTRUMENTALES	53
5.2. DEL PRETRATAMIENTO DE LA MUESTRA	53
5.3. DEL TAMAÑO MUESTRAL	53
5.4. DEL CONTENIDO DE CAFEÍNA	53
5.5. DE LA COMPARACIÓN CON LOS LÍMITES LEGALES	54
5.6. DEL CONSUMO DE OTRAS BEBIDAS CON CAFEÍNA	54
CAPÍTULO 6. BIBLIOGRAFÍA	55

CAPÍTULO 1. OBJETIVOS DEL TRABAJO

1.1. GENERAL

Determinar el contenido de cafeína en muestras de bebidas energizantes comercializadas en el mercado argentino, empleando como metodología analítica la cromatografía HPLC.

1.2. ESPECÍFICOS

Realizar un pretratamiento de muestras de bajo costo, sencillo y rápido.

Contrastar los valores de cafeína hallados en las muestras de bebidas energizantes con los valores de cafeína especificados en los rótulos de sus envases comerciales.

Comparar los valores de cafeína hallados en las muestras de bebidas energizantes frente a los límites legales según la normativa vigente en Argentina establecida en el Código Alimentario Argentino (CAA), a fin de corroborar cuáles marcas comerciales cumplen con dicha normativa.

Estimar y relacionar la ingesta conjunta de cafeína debida a bebidas energizantes, en sumatoria con las cantidades aportadas con el mate, bebidas colas y medicamentos con cafeína, teniendo en cuenta los límites máximos establecidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS).

CAPÍTULO 2. INTRODUCCIÓN

2.1. DESCUBRIMIENTO Y ABUNDANCIA DE LA CAFEÍNA

La cafeína es un polvo inodoro, incoloro y amargo. Fue aislada por Friedrich Ferdinand Runge del café y del té en 1819 y 1827, respectivamente, pero su estructura química fue descrita recién en 1875, por E. Fischer. La cafeína (1, 3, 7-trimetilxantina) y los otros alcaloides metilxantínicos, como la teobromina (3, 7-dimetilxantina) y la teofilina (1, 3-dimetilxantina), son derivados del grupo de las xantinas, que a su vez se derivan de las purinas. También es conocida por el nombre teína, guaranína o mateína.

Su consumo se ha dado mundialmente desde hace ya varios siglos, superando aún prohibiciones por motivos morales, económicos, médicos o políticos. El descubrimiento del café tuvo lugar en el siglo IX en Arabia y se cultivó por primera vez en Etiopía.

La cafeína es una sustancia que está presente de forma natural en ciertas plantas y también se la puede producir sintéticamente en laboratorio. Bajo su forma natural, se localiza en cantidades variables en las semillas, las hojas y los frutos de algunas plantas, donde actúa como un pesticida natural que paraliza y mata ciertos insectos que se alimentan de las plantas. Se ha sugerido su capacidad de actuar como una defensa efectiva en las plantas jóvenes de café contra insectos herbívoros tales como el bicho minero de las hojas, *P. coffeella*, una plaga muy conocida en las plantaciones de café, aunque no se han encontrado evidencias claras. También se ha demostrado la alta bioactividad de la emulsión de oleato de cafeína contra *H. hampei* abre la posibilidad de utilizar esta formulación de insecticida como una forma efectiva de control de esta plaga que afecta en gran medida las plantaciones de café de todo el mundo. [1]

La cafeína se encuentra en el café, té, chocolate, yoco, cacao y, en bebidas de cola y energéticas. También se halla presente en bebidas que contienen guaraná (*Paullinia cupana* y a menudo como ingrediente en los suplementos de pérdida de peso y energizantes, las bebidas deportivas, preparaciones herbales y analgésicos.

El café, té y bebidas empleadas como refrescos son las fuentes de cafeína consumidas con mayor frecuencia. Las dosis presentes en los suplementos, las bebidas y las medicinas de venta sin receta no varían mucho, pero generalmente se recomienda limitar la ingesta en torno a 300 mg al día. Seguidamente, se ofrece una tabla con el contenido aproximado de cafeína de la mayoría de los productos que la contienen (*Tabla 2.1.*). [2]

Tabla 2.1. Contenido de cafeína en diferentes productos

	Volumen/peso	Rango de cafeína (mg)	Promedio de cafeína (mg)
Café			
Tostado	100 ml	41 – 83	60
Instantáneo	100 ml	27 – 72	50
Tostado descafeinado	100 ml	0,4 – 7	2,4
Instantáneo descafeinado	100 ml	5 – 1	3
Té			
Negro	100 ml	10 – 46	25
Verde	100 ml	8 – 17	12
Blanco	100 ml	2 – 11	6
Rojo	100 ml	5 – 30	18
Té helado	100 ml	4 – 21	12
Productos de Chocolate			
Grano de cacao	100 g	0,1 – 0,5	0,2
Cacao en polvo	10 g	10 – 16	12
Chocolate negro	100 g	17 – 118	68
Chocolate blanco	100 g		~ 0
Chocolate amargo	100 g	16 – 34	24
Chocolate con leche	100 g	1 – 38	20
Chocolate a la taza	100 ml	1 – 49	34
Leche con chocolate	100 ml	1 – 7	3
Bebidas de cola			
Colas	330 ml	3 – 7	4
Colas descafeinadas	330 ml		~ 0
Cola light	330 ml	2 – 7	4
Colas light descafeinadas	330 ml		~ 0
Bebidas Energéticas			
	330 ml	10	9 – 12
Guaraná			
Bebidas con guaraná	330 ml	0,1 – 12	8
Pasta de guaraná	100 g	2,5 – 5	4
Mate			
	100 ml	0,2 – 2	1,5
Postres congelados			
	100 ml	21 – 35	25
Medicamentos sin receta			
	1 dosis	36 – 200	102

2.2. BASES XÁNTICAS

Las bases xánticas o púricas son alcaloides derivados de la purina, provienen del anillo de la purina que se forma por la condensación de una pirimidina con un imidazol. Las más importantes son las metilxantinas: cafeína, teofilina y teobromina, conocidas respectivamente como 1,3,7-trimetilxantina, 1,3-dimetilxantina y 3,7-dimetilxantina.

En general, todas las bases xánticas presentan las siguientes actividades farmacológicas [3]: estimulante nervioso, acción antidepresiva, acción diurética, actividad digestiva, acción estimulante cardíaca, acción vasoconstrictora, acción broncodilatadora, acción lipolítica, efecto antiagregante plaquetario y efecto antioxidante.

En la *Tabla 2.2.*, se pueden visualizar las diferencias y características de las metilxantinas. [2]

2.2.1. Relación estructura química - actividad farmacológica

Existe en las metilxantinas una correlación entre la posición de los grupos metilos y las acciones farmacológicas (*Figura 2.1.*). El grupo metilo como R1 (posición 1) tiene acción estimulante sobre el sistema nervioso central; el metilo como R2 (posición 3) ejerce acción diurética y como R3 (posición 7) acción cardioestimulante. La cafeína posee tres metilos en posiciones 1, 3, 7, por lo tanto se dan las tres acciones. [4]

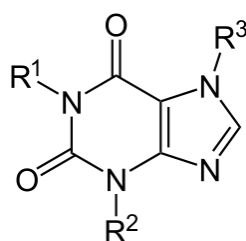
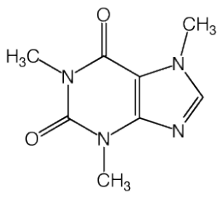
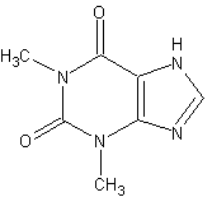
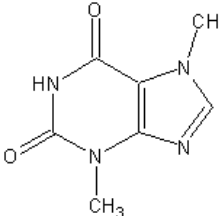


Figura 2.1. Estructura general de las metilxantina

Tabla 2.2. Diferencias y características de las metilxantinas

Nombre común	Nombre y estructura	Propiedades físicas	Aplicaciones
Cafeína	<p>1, 3, 7- trimetilxantina</p> <p>1, 3, 7- trimetil- 2, 6-dioxopurina</p> 	<p>Cristaliza en forma de prismas hexagonales. Funde a 237°C Sublima a 176°C pH de 6.9 en disolución acuosa al 1% Soluble en alcohol, agua, acetona y cloroformo.</p>	<p>En farmacia se emplea en la fabricación de analgésicos como excitante del sistema nervioso central. En veterinaria se usa como estimulante cardíaco y respiratorio, también como agente esterilizador contra plagas. En industria alimentaria se utiliza en la fabricación de bebidas de cola y energéticas.</p>
Teofilina	<p>1, 3- dimetilxantina</p> <p>1,7- dimetil- 2, 6-dioxopurina</p> 	<p>Cristaliza en el sistema monocíclico. Sublima a 270-274°C. Soluble en cloroformo, agua y en menor medida en alcohol.</p>	<p>En farmacia se emplea en la fabricación de medicamentos. De uso indicado en el tratamiento sintomático del asma. Contraindicado en enfermos con hipersensibilidad a las xantinas.</p>
Teobromina	<p>3,7- dimetilxantina</p> <p>3,7-dimetil- 2, 6-dioxopurina</p> 	<p>Cristaliza como agujas en el sistema monocíclico. Funde a 357°C. Sublima a 290-295°C. Soluble en alcohol y agua. Insoluble en benceno, éter, cloroformo y tetracloruro de carbono.</p>	<p>Tiene efectos diuréticos, así como estimulante cardíaco y vaso dilatador, y relajante muscular. Responsable de los efectos adictivos del chocolate.</p>

2.3. CAFEÍNA. PROPIEDADES

2.3.1. Propiedades químicas y físicas

Ya mencionamos que la cafeína es un alcaloide del grupo de las xantinas, perteneciente a la familia de las metilxantinas, que también incluye los compuestos

teofilina y teobromina, con estructura química similar y con equivalentes efectos en el organismo.

Su fórmula química es $C_8H_{10}N_4O_2$, con una masa molecular de 194,19 g/mol. Es una molécula química aquiral, y por lo tanto, no tiene enantiómeros ni tiene estereoisómeros. En la *Figura 2.2.* se puede observar la estructura molecular de la cafeína.

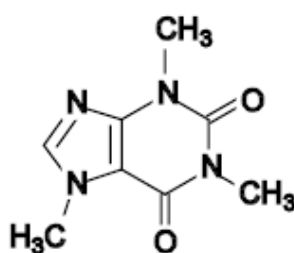


Figura 2.2. Estructura molecular de la cafeína

Su nombre sistemático es 1,3,7-trimetilxantina, 1,3,7-trimetil-2,6-dioxopurina o 3,7-dihidro-1,3,7-trimetil-1H-purina-2,6-diona. También es conocida como trimetilxantina, teína, mateína, guaranína, metilteobromina o metilteofilina, ya que se obtiene por extracción de materiales vegetales como el café, té, guaraná, chocolate, yerba mate o la nuez de cola.

En estado puro es un sólido cristalino blanco inodoro en forma de agujas blancas o polvo, de gusto muy amargo, densidad de 1,23 g/ml, punto de fusión de 237 °C y es fluorescente en contacto con aire (propiedad que poseen algunos minerales y sustancias químicas, hidratos, de reducirse a polvo por si mismos por pérdida de agua de cristalización al ser expuestos al aire). A presión atmosférica sublima a 176 °C sin descomponerse. También, puede cristalizar en forma de prismas hexagonales.

Es soluble en agua y su solubilidad es función de la temperatura. A 25 °C se disuelven 22 mg de cafeína en 100 ml de agua, mientras que a 80 °C se diluyen 180 mg/mL y a 100 °C lo hacen 670 mg/mL. En agua hirviendo es muy soluble, cristalizando como monohidrato, ya que va perdiendo progresivamente la molécula de agua, hasta que lo hace totalmente a los 100 °C.

Por tratarse de compuesto orgánico, presenta alta afinidad por algunos disolventes orgánicos, como el cloroformo (CHCl₃) y el diclorometano (CH₂Cl₂), dos solventes prácticamente inmiscibles en agua.

La cafeína puede formar combinaciones estables con sales alcalinas de ácidos débiles, como el benzoato y silicato de sodio, pero su reacción con ácidos da lugar a compuestos muy inestables. Se descompone fácilmente por la acción de álcalis calientes y por cloro.

2.3.2. Ruta metabólica y vida media

Una vez ingerida es rápidamente absorbida a partir del tracto gastrointestinal, alcanzando un nivel máximo de concentración en plasma en unos 30-45 minutos. Una vez en el torrente, se introduce rápidamente en todos los tejidos corporales. Para su excreción, dada su gran capacidad de atravesar las membranas, la cafeína debe transformarse en sus metabolitos.

El período de semivida (el tiempo requerido para que el cuerpo elimine la mitad de la presente en el plasma sanguíneo, es decir, la vida media) oscila entre horas y días, dependiendo de la edad, el sexo, la mediación y las condiciones de salud. La cafeína puede sufrir las siguientes transformaciones metabólicas (*Figura 2.3.*): Demetilación inicial, dando origen a dimetilxantinas como teofilina, teobromina y paraxantina (1,7-dimetilxantina); oxidación para generar el ácido 1,3,7-trimetilúrico; hidratación y ruptura del anillo, en C8 y N9, para dar dimetiluracilo. Las dimetilxantinas sufren luego una nueva demetilación y se metabolizan a través de reacciones de oxidación e hidratación. [2]

La metabolización de la cafeína es ejercida en forma mayoritaria, aproximadamente en un 95%, por la isoenzima CYP1A2, del CYP-450. Participan de forma minoritaria otras enzimas, mientras que sólo entre un 1-2% de la dosis ingerida de cafeína se excreta sin cambios en orina.

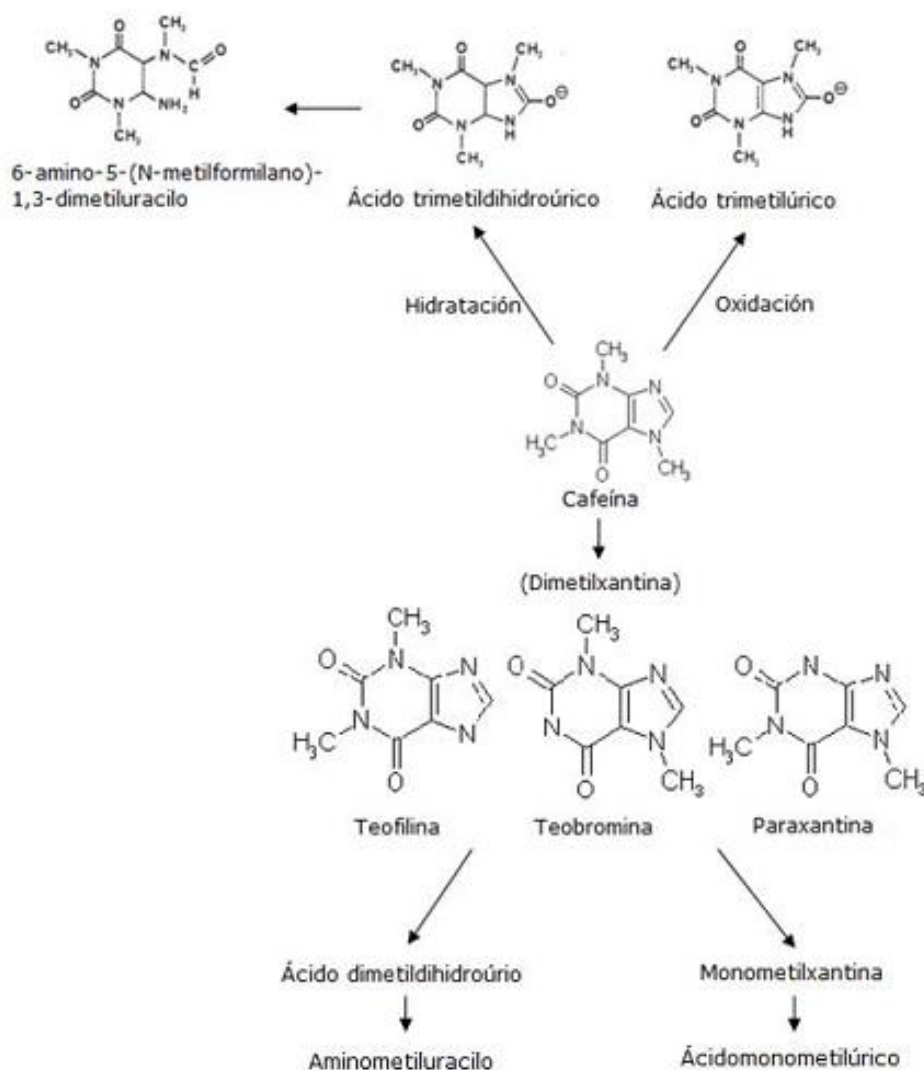


Figura 2.3. Transformaciones metabólicas de la cafeína

2.3.3. Mecanismos de acción.

Es considerada un antagonista competitivo de los receptores de adenosina, localizados en las membranas celulares del sistema nervioso central (SNC) y sistema nervioso parasimpático (SNP). La adenosina se comporta como un autacoide (neuromodulador), una especie de neurotransmisor que regula las funciones celulares. La adenosina, al actuar sobre receptores específicos de la superficie de ciertas células, produce sedación, regula la entrega de oxígeno a las células, dilata los vasos sanguíneos celulares y coronarios, produce bronco espasmo (asma) y normaliza otros procesos metabólicos.

Las neuronas que liberan adenosina constituyen un importante sistema depresor del sistema nervioso central, que es bloqueado por la cafeína, provocando la actividad de neurotransmisores como la dopamina y la acetilcolina.

El aumento de la acción dopaminérgica es causado la liberación de dopamina y acetilcolina por antagonismo de los receptores locales de adenosina. El consumo crónico de la cafeína puede incrementar el número de receptores de adenosina en el sistema nervioso central (tolerancia).

2.3.4. Farmacología

La cafeína es el estimulante leve psicoactivo más consumido en el mundo y la podemos encontrar en productos como café, té, cacao, chocolate, bebidas carbonatadas y gran variedad de fármacos de prescripción y venta directa. En páginas anteriores ya se han descrito los principales efectos farmacológicos de las metilxantinas. A diferencia de la teofilina y la teobromina, la cafeína tiene su acción más significativa sobre el SNC (acción cortical, bulbo-raquídea y medular) y el aparato cardiovascular.

A dosis bajas estimula los centros bulbo-raquídeos (respiratorio y vaso motor), la corteza cerebral, exaltando las funciones sensoriales y químicas, y produciendo, entre otros efectos, disminución de la sensación de fatiga y abatimiento. A dosis muy elevadas actúa sobre la médula espinal, pudiendo aparecer un cuadro de hiperexcitabilidad muscular y convulsiones. [5]

Se pueden resumir los principales efectos de la cafeína en los siguientes tópicos:

- *Efectos sobre el Sistema Nervioso Central:* Es un potente estimulante del sistema nervioso central, y actúa primero sobre la corteza cerebral, después sobre el bulbo, y finalmente sobre la médula espinal. Mediante la inhibición de los receptores A₂, la cafeína tiene una acción reforzante mediante la liberación de dopamina en el circuito cerebral de recompensa (sistema mesolímbico y nucleus accumbens).

Esta acción se explicaría por un aumento de la fosforilación del DARPP-32 (fosfoproteína de la regulación de dopamina y AMPc).

- *Efectos sobre el Sistema Cardiovascular:* Tiene una importante acción circulatoria, estimula directamente al músculo cardíaco aumentando la fuerza de contracción, frecuencia y capacidad eyectiva (capacidad expulsiva); su efecto inotrópico (movimiento del corazón) deriva en una taquicardia y en el de la tensión arterial.

Además, estimulan las catecolaminas de la médula suprarrenal. Causa dilatación coronaria y pulmonar, aumenta la resistencia vascular cerebral con decrecimiento de la circulación cerebral total y la tensión de oxígeno, vasoconstricción.

- *Efectos sobre en el Aparato Digestivo:* Suministrada por vía bucal o parenteral (cualquier vía diferente a la bucal), estimula la secreción tanto de ácido gástrico como de enzimas digestivas, aumentando tanto la secreción de ácido clorhídrico como de pepsina.
- *Efectos sobre el Aparato Excretor:* incrementa la producción de orina (aumenta el volumen urinario), sin embargo es un diurético débil. Provoca un aumento tanto en la secreción de agua (acción diurética) como de iones sodio y cloruro, en menor grado el ion potasio (acción salinúrica). Esto se debe tanto al aumento en la tasa de filtración glomerular, como a una disminución de la reabsorción tubular de sodio (y así también del agua, que sigue pasivamente al sodio y al cloruro) a nivel especialmente del túbulo proximal. A pesar de lo comentado en este apartado, la cafeína no se usa como diurético debido a su escasa potencia y por ser un estimulante del sistema nervioso central.

2.3.5. Efectos fisiológicos beneficiosos de la cafeína

Tiene efectos significativos importantes en la bioquímica y la fisiología celular, razón por la que se la encuentra en algunos medicamentos para el resfriado, para el dolor, y supresores del apetito. Muchas de sus propiedades que se pueden considerar benéficas responden a las propiedades farmacológicas antes mencionadas.

Entre sus beneficios encontramos que: efecto estimulante (sensación energética) y disminuye la depresión; aumenta el alerta y la concentración; reduce de dolor de cabeza (vasodilatador); evita coágulos sanguíneos; mejora el asma y las alergias; previene la formación de cálculos (por efecto diurético).

2.3.6. Efectos fisiológicos nocivos de la cafeína

La Administración de Alimentos y Drogas de los Estados Unidos (FDA) incluyó en 1958 a la cafeína en la categoría GRAS, o sea, generalmente reconocidos como seguros y reafirmó su postura de que no produce un aumento en el riesgo para la salud. En la actualidad su categorización está bajo revisión por diferentes organismos internacionales pero aún mantiene dicho status. [6]. Tiene un uso frecuente en bebidas refrescantes y en fármacos, aunque sea generalmente considerada como estimulante a dosis bajas. El consumo de una taza de café, produce una concentración plasmática máxima de 5-10 μM , un consumo excesivo (concentración plasmática $>50 \mu\text{M}$) produce síntomas de cafeinismo (ansiedad, agitación, dificultades de conciliar el sueño, diarrea, tensión muscular, palpitaciones cardíacas).

Dosis diarias muy altas de cafeína (más de 8 tazas diarias) pueden producir niveles altos de azúcar en sangre y niveles de acidez importantes en la orina. Puede provocar efectos tóxicos a partir de los 240 mg, con síntomas de toxicidad en el cuerpo que van desde un simple trastorno corporal hasta una descompensación cardíaca severa. Para mujeres embarazadas, la dosis normal no debe superar los 300 mg/día. En el caso de los niños, su consumo debe moderarse, ya que puede provocar nerviosismo e irritabilidad, síntomas que desaparecen al eliminarse la cafeína vía metabólica y por orina.

La dosis letal media (miligramos de una sustancia necesarios por kilogramo de peso corporal, para matar al 50% de la población expuesta) o LD_{50} , incorporada en forma oral es de 192 mg/kg en ratas. La LD_{50} para el hombre depende de varios factores, entre ellos la sensibilidad individual, pero se estima entre 150-200 mg/kg de peso corporal, equivalente al consumo de una sola vez de unas 80-100 tazas de café. [7]

2.4. CAFEÍNA EN PRODUCTOS DE CONSUMO MASIVO

La cafeína se encuentra en diferentes productos comerciales, muchos de ellos de origen natural. Existen más de 50 plantas que contienen este principio activo.

2.4.1. Café

El café es una bebida que se obtiene por la infusión de las semillas tostadas de las plantas del café o cafetos (*Coffea spp.*). Los cafetos son arbustos de hoja perenne de la familia de las Rubiáceas.

Existen aproximadamente unas 40 especies de cafetos, pero la bebida del café se obtiene fundamentalmente de tres plantas: El cafeto de Arabia (*Coffea arabica*), el cafeto robusta (*Coffea canephora*) y el cafeto libérica (*Coffea libérica*). La primera de ellas, constituye la especie más importante en la actualidad y la que produce un café de mayor calidad; la segunda proporciona un contenido más elevado en cafeína, con un sabor más amargo que el anterior; la última mencionada produce semillas más grandes que proporcionan poco sabor.

Los granos de café contienen cientos de sustancias diferentes, pero su ingrediente farmacológicamente activo es la cafeína. En muchas especies también se pueden encontrar teofilina y teobromina. Los granos de café o semillas son la parte del fruto que posee mayor contenido de cafeína.

En promedio, una taza de café instantáneo (aproximadamente 150 mL) contiene 60 mg de cafeína, una taza de café filtrado cerca de 80 mg y una de café descafeinado proporciona alrededor de 3 mg.

2.4.2. Té

El té es una infusión de las hojas y brotes de la planta del té (*Camellia sinensis*) o (*Thea sinensis*). Se suele llamar té a todas las infusiones ingeridas (tilo, cedrón, menta, etc.), pero desde el punto de vista botánico es erróneo. Este tipo de bebidas se deben llamar adecuadamente *tisanas* ó *infusiones de hierbas*. La denominación *té* es exclusiva de la planta *Camellia sinensis*.

Los cuatro tipos principales de té (blanco, verde, negro y rojo) se distinguen según su procesamiento posterior a la recolección de las hojas. *Camellia sinensis* es un arbusto cuyas hojas, si no son secadas apenas se recolectan, comienzan a oxidarse. Para prevenir este proceso de oxidación, las hojas se secan artificialmente con el objetivo de eliminar la humedad contenida en ellas.

El té está compuesto por cientos de sustancias orgánicas que determinan el gusto, el sabor, el color, el valor nutricional y efectos terapéuticos. Entre estas sustancias, los alcaloides representan no más que del 3 al 5 % del té seco, aunque juegan un papel decisivo para el gusto. Agrupan sobre todo la cafeína y en menor proporción la teofilina y la teobromina.

2.4.3. Mate

Es una infusión a partir de las hojas desecadas de la yerba mate, *Ilex paraguariensis*, comúnmente denominada yerba. Es una planta arbustiva o arbórea neotropical originaria de las cuencas de los ríos Paraná y Paraguay. La expresión "mate" nace del vocablo quechua "matí", que significa calabaza (el recipiente para beber mate suele ser hecho de calabaza). El mismo se tomaba a través de una cañita denominada "tacuarí", en cuyo extremo se colocaba una semilla ahuecada que hacía las veces de filtro. También se lo ha llamado "té del Paraguay" u "oro verde".

El mate posee un efecto estimulante debido a la cafeína que contiene. Antiguamente, y en forma popular se pensaba que tenía un energizante similar pero no igual, al que se llamaba "mateína". Los estudios sobre el mate no son frecuentes, pero se ha estudiado que el contenido de cafeína está fuertemente influenciada por la genética de la plantación, características del suelo y las condiciones climáticas en las zonas de plantación. Se han mostrado evidencia de un contenido de cafeína en las hojas de yerba mate de 0.89-2.2% (sobre una base de peso seco), el cual puede variar dependiendo de la edad de las hojas y las épocas de cosecha. [8-9]. Según el Instituto Nacional de la Yerba Mate de Argentina (INYM), el extracto acuoso de una porción de 50 g. extraída con 500 ml de agua a 70°C con mate y bombilla contiene 0,30 g. de cafeína (600 mg/Kg). [10]

Argentina es el mayor productor mundial de yerba mate, pero se ubica en el segundo puesto en consumo per cápita, superado por Uruguay, donde a pesar de no ser un país productor se toman alrededor de 119 litros de mate por persona al año, frente a los 100 litros que toman los argentinos. [11]

Según el presidente del INYM, Luis Prietto, en la Argentina el consumo de yerba mate es de 6,2 kilogramos por persona por año. Cabe mencionar esta estimación per cápita puede variar según los hábitos de consumo poblacional. [12]

2.4.4. Cacao

Theobroma cacao L. es el nombre científico que recibe el árbol del cacao o cacaotero. *Theobroma* significa en griego “alimento de los dioses”; *cacao* deriva del nahua “cacáhua”. Este nombre científico lleva añadida al final una abreviatura botánica convencional, en este caso L., que es la inicial del apellido del naturalista sueco que clasificó la planta, C. Linneo.

Es el fruto (la nuez del cacao) contiene entre 30 y 40 semillas, que una vez secas y fermentadas se convierten en cacao en grano. De las metilxantinas que posee, la teobromina se manifiesta en grandes concentraciones (2,5%) mientras que la cafeína aparece en un menor grado (0,4%). Cabe recordar que el poder estimulante de la teobromina es mucho menor que el de la cafeína.

El cacao da origen a uno de los productos más deliciosos del mundo, el chocolate. Se obtiene a partir de las semillas del árbol del cacao. Este alimento se confecciona con pasta de cacao o manteca de cacao, ambos pueden combinarse mutuamente o utilizarse aisladamente. Además, lleva otros ingredientes como azúcar, leche y aditivos alimentarios.

Según la proporción de los componentes tenemos las siguientes clases de chocolate (negro, blanco, con leche, etc.). El contenido de cafeína del chocolate oscila entre 5-20 mg/100g y depende del lugar de procedencia del cacao. [6]

2.4.5. Guaraná

Paullinia cupana, es una especie tropical sudamericana. La composición química de la planta del guaraná se caracteriza por la presencia de alcaloides del

tipo metilxantinas, además de otros compuestos orgánicos. Una antigua denominación de la cafeína era la “guaranina”, por ser un alcaloide que se encuentra en esta planta. El contenido de cafeína presente hallado en semillas de guaraná ha sido entre de 2%-4,5% p/p. [13]

Se elaboran muchas bebidas gaseosas estimulantes, a base de extracto de semillas de guaraná tostada y molida. La mayoría de estas bebidas son producidas en Brasil y consumidas ahí o en países cercanos. Su consumo es habitual como bebida refrescante y tónico, con un amplio número de ventas incluso mayores que las gaseosas de cola.

2.4.6. Bebidas cola

Son refrescos usualmente saborizados con caramelo colorado y que frecuentemente contienen cafeína.

En la elaboración de las primeras recetas se usaban hojas de coca y semillas de *Cola acuminata* (el extracto de la nuez de cola podía contener hasta un 5% de cafeína), en una búsqueda de un remedio contra el dolor de cabeza por la acción de sus alcaloides psicoactivos. Se dice que de allí proviene el mundialmente famoso nombre *Coca Cola*. En África se usan todavía las semillas de forma tradicional. El contenido de cafeína en las bebidas colas más comunes está entre 95-120 mg/L). [14]

2.4.7. Medicamentos

Existen medicamentos para los resfriados y las alergias, analgésicos, supresores del apetito, estimulantes del sistema nervioso, que contienen cafeína en combinación con otros principios activos o muchas veces, como único principio activo. Esta presente tanto aquellos que no requieren prescripción médica o de venta libre (en inglés “OTC”, “over the counter”) como en los de prescripción. Los contenidos oscilan habitualmente entre 15 y 200 mg, Existen medicamentos que se venden sólo bajo receta cuyo único principio activo es la cafeína a dosis elevadas (hasta 300 mg) y se emplean en situaciones clínicas particulares. [5]

En la *tabla 2.3* se pueden observar una lista de algunos medicamentos de venta en Argentina, que contienen cafeína como principio activo. Los datos fueron extraídos del Vademécum Farmacológico de la ANMAT de su Página Web Oficial. El contenido de cafeína ronda entre los 30 y los 200 mg por unidad, siendo de venta bajo receta aquellos que poseen mayores contenidos de cafeína. Cabe mencionar que en Argentina existen graves problemas en torno a la venta libre de medicamentos que requieren prescripción médica; de esta manera los consumidores pueden acceder a unidades con altas dosis de cafeína con mayor facilidad. [15]

Tabla 2.3. Medicamentos con cafeína de venta en Argentina

Productos (Empresa)	Venta	Principios activos	Contenido de Cafeína
Actron Max Rápida Acción	Bajo receta	Cafeína anhidra Ibuprofeno	100 mg. por cápsula
Alikal (GLAXOSMITHKLINE)	Libre	Cafeína anhidra Ácido acetilsalicílico	50 mg. por comprimido
Bio Grip 4 (SANOFI AVENTIS ARGENTINA S.A.)	Libre	Cafeína Butetamato citrato Fenilefrina clorhidrato	30 mg. por cápsula
Cafiaspirina (BAYER S.A.)	Libre	Cafeína Aspirina	40 mg. por comprimido
Cafiaspirina Plus (BAYER S.A.)	Libre	Cafeína Aspirina	65mg. por comprimido
Cefalex Plus (LABORATORIOS)	Bajo receta	Cafeína Clorfeniramina maleato Ergotamina tartrato	100mg. por comprimido
Ibuevanol Extra Rápida Acción	Bajo receta	Cafeína Ibuprofeno	100mg. por cápsula
Cafeína al 25% Bioquim (LABORATORIOS)	Baje receta	Cafeína Benzoato de sodio	250 mg. por ampolla de 1 ml (inyectable)

2.5. BEBIDAS ENERGIZANTES

Las denominadas “bebidas energizantes” (BE) son bebidas sin alcohol generalmente gasificadas, que según sus productores fueron creadas para proporcionar ciertos beneficios a quien las consume.

Esto incluye aumentar la resistencia física, proveer reacciones más veloces, mayor concentración, aumentar el estado de alerta mental, evitar el sueño, proporcionar sensación de bienestar, estimular el metabolismo y ayudar a eliminar sustancias nocivas para el cuerpo. Es por todos estos beneficios que aseguran brindar, que el mercado de estas bebidas está orientado principalmente a la gente joven, estudiantes y deportistas. Los ingredientes principales de la mayoría de estas bebidas son cafeína, glucosa, taurina y glucuronolactona, entre otros.

Actualmente existe un debate en torno a su denominación de “energizantes”, donde muchos sugieren el reemplazo por “estimulante”. Una bebida energizante es aquella que se utiliza para aportar un alto nivel de energía al cuerpo, especialmente a expensas de los glúcidos que contiene. En cambio, en estas bebidas el término utilizado de “energía” se refiere a cierto efecto farmacológico de algunas de las sustancias que contienen y no a su aporte calórico a partir de sus nutrientes. Parte de la sensación de bienestar producida por las mismas es a causa de un efecto energético que se produce por la acción de sustancias psicoactivas que actúan sobre el sistema nervioso central, inhibiendo en diferentes grados, según el producto, los neurotransmisores encargados de transmitir las sensaciones de cansancio, sueño, etc. y potenciando aquellos relacionados con las sensaciones de bienestar y la concentración. Es componente activo fundamental que produce esta acción es la cafeína.

Al mismo tiempo, está planteada la controversia de considerar a las BE como alimentos funcionales. No existe una definición consensuada y precisa sobre este grupo de alimentos, pero en términos generales se hace referencia a cualquier alimento que forma parte de la dieta normal o ingrediente alimentario potencialmente saludable, que puede proporcionar beneficios a la salud que van más allá de los nutrientes tradicionales que contienen. [16]

Los defensores de su inclusión en esta categoría se basan en que las BE han sido diseñadas para proporcionar un beneficio específico, brindar al consumidor vitalidad y energía cuando, por propia decisión o necesidad, debe actuar ante esfuerzos extras, físicos o mentales.

Los detractores, se apoyan en que las BE no forman parte de la dieta normal e incluso su efecto fisiológico “energizante” es temporal, causado por el efecto de las sustancias psicoactivas que contienen, fundamentalmente por la cafeína.

2.5.1. Origen

Todas estas bebidas surgen con el fin de lograr en sus consumidores efectos como el incremento de la resistencia física, la velocidad de las reacciones, la concentración, evitar el sueño, proporcionar sensación de bienestar, estimular el metabolismo, entre otras. Por estas cualidades que ofrecen, es que su mercado apunta principalmente a deportistas, estudiantes, empleados nocturnos.

El consumo de estas bebidas varía por marcas y regiones, teniendo productos más o menos conocidos según la región del mundo. Aunque existen marcas tradicionales, hay otras que son exclusivas o más conocidas en un país o región determinada.

Su comercialización el mercado mundial surgió a partir de la introducción de bebidas que utilizaron como base algunas ya existentes en países asiáticos. En Japón, la bebida energética data al menos ya en la década de 1960, con el lanzamiento de la marca *Lipovitan*. En 1985, *Jolt Cola* se introdujo en los Estados Unidos. Su estrategia de marketing centrada en el contenido de cafeína de la bebida, con el fin de promover el estado de vigilia, bajo el lema publicitario "All the sugar and twice the caffeine" (Todo el azúcar y el doble de cafeína). En 1995, *PepsiCo* lanzó *Josta*, la primera bebida energética presentada por una importante empresa de bebidas de EE.UU. Su venta sería cancelada por la misma empresa en 1999; *Pepsi* más tarde volvería al mercado de las bebidas energéticas con la marca *AMP*.

Su aparición en el mercado europeo se dio principalmente a partir de 1995, cuando el mercado austriaco decidió comercializarlas después de descubrirlas.

Las primeras fueron lanzadas primariamente por la empresa Lisa y un producto llamado *Horse Power*. Poco tiempo después, el empresario austríaco Dietrich Mateschitz, presentó la bebida energizante *Red Bull*.

La misma fue desarrollada a fines de la década de los 80, sobre la base de una bebida tailandesa *Krating Daeng*, la cual ya era a base de la mencionada *Lipovitan*. Pero más tarde, *Red Bull* logro ser la marca dominante en los EE.UU., luego de su introducción en 1997.

Hoy en día, se ha convertido en la bebida energizante más representativa a nivel mundial, presentándose globalmente con una gran campaña publicitaria y de patrocinio, fundamentalmente en deportes de riesgo y de motor. [17]

Aunque es una de las bebidas más consumidas, existen cerca de 200 marcas que compiten por el mercado con nombres agresivos, tales como: Adrenaline Rush[®], Battery[®] (finlandesa), Blue Shot[®], Bomba[®] (austríaca), Boost[®] (mexicana), Ciclón[®] (austríaca), Cult[®] (alemana), Dark Dog[®] (austríaca), Feel the Rush[®], Hype Energy[®], Iron Cat[®], Lipovitan B3[®], Monster[®], Piranha[®], Pit Bull[®] (holandesa), Private Energy[®] (austríaca), Reanimator[®] (española), Red Bull[®] (holandesa), Red Devill[®] (holandesa), Red Energy[®], Roaring Lion[®], Sobe Rush[®], Speed[®], XTC[®] (austríaca), etc., y, con lemas sugestivos, como “Red Bull te da alas para volar”, “Feel the Rush, energía radical líquida”, “*Despierto todo es posible*” (Rocket Fuel), “*Desata la bestia*” (Monster Energy).

En Argentina la primera bebida de este tipo ingresó en el año 1999. El mercado argentino cuenta hoy con más de 10 marcas que tienen similares características, resaltando en ellas los mensajes de energía, vigor y fuerza. Algunas de ellas son *Red Bull*, *Speed Unlimited*, *Hot Power*, *V. Vitaliza*, *Energy Drink*, *Black Fire*, *Rocket Fuel*, *Extra Power*, *Blue Demon Energy Drink*, *X4 Energy Drink*, *Referendum Plus*. [18]

2.5.2. Composición

Ya se ha mencionado que los componentes básicos de estas bebidas son cafeína, glucosa, taurina y glucuronolactona, más otros ingredientes como aminoácidos, vitaminas, minerales, extractos vegetales, acompañados de aditivos acidulantes, conservantes, saborizantes y colorantes.

Aunque este tipo de bebidas tienen varios ingredientes, el “efecto energético” lo proporcionan básicamente dos: el azúcar y la cafeína, siendo esta última el principal ingrediente activo.

El contenido de cafeína que pueden contener las BE presenta un rango muy variable, incluso se las puede clasificar en BE de bajo o alto contenido en cafeína, lo que demuestra la amplia diversidad existente en el mercado. De manera general, el contenido está en el rango de 30-500 mg/envase (considerando un envase promedio de 250 ml aproximadamente). [19-20]

La BE más popular, *RedBull*, contiene aproximadamente 325 mg/L (una lata comercial contiene un valor cercano a los 80 mg). En la *Tabla 2.4.* se muestran los valores totales de cafeína (mg) de algunas marcas del mercado de EEUU. [19]

Tabla 2.4. Bebidas Energizantes en EEUU. Año 2006. (Extractada y Adaptada)

	Volumen de botella o lata (ml)	Concentración de cafeína (mg/L o ppm)	Total de cafeína (mg)
Bebidas Energizantes más vendidas			
Red Bull	249	320	80
Monster	480	333	160
Rockstar	480	333	160
Full throttle	480	300	144
No Fear	480	363	174
Amp	252	297	75
SoBe Adrenaline Rush	249	317	79
Tab Energy	315	303	95
Bebidas Energizantes altas en cafeína			
Wired X505	720	700	505
Fixx	600	833	500
BooKoo Energy	720	500	360
Wired X344	480	717	344
SPIKE Shooter	252	1190	300
Viso Energy Vigor	600	500	300
Cocaine Energy Drink	252	1110	280
Jolt Cola	705	397	280
NOS	480	543	250
Redline RTD	240	1043	250
Blow (energy Drink Mix)	240	1000	240
Bebidas Energizantes bajas en cafeína			
Bomba Energy	252	297	75
HiBall Energy	300	250	75
Airforce Nutrisoda Energize	255	197	50
Whoop Ass	255	197	50
Vitamin Water (Energy Citrus)	600	83	50
Bebidas Energizantes de alta concentración			
RedLine Power Rush	75	4667	350
Ammo	30	5700	171
Powershot	30	3333	100
Fuel Cell	60	3000	180

Cabe destacar que tanto el contenido de cafeína en las BE como su etiquetado, deben adecuarse a la normativa regulatoria vigente, la cual puede variar según distintos países o regiones.

Siguiendo el objetivo de nuestro trabajo, más adelante se analizará el contenido de cafeína en relación a la legislación vigente en Argentina.

Respecto a los carbohidratos, los más usados son glucosa, glucuronolactona (carbohidrato derivado de la glucosa), sacarosa, maltodextrinas (oligómeros de glucosa resultantes de la hidrólisis del almidón), fructosa y galactosa.

Las BE contienen aproximadamente 27 g de glucosa por porción (115 g/L) [20], glucuronolactona entre 2,0 y 2,4 g/L y un contenido total de azúcares aproximado al 12 % (p/p).

La taurina es un derivado del aminoácido cisteína que contiene el grupo tiol; no es estrictamente un aminoácido ya que contiene un grupo ácido sulfónico, en lugar de un grupo ácido carboxílico. Las concentraciones de taurina en las BE varían entre 300 mg/L y 4000 mg/L. [21] También suelen contener otros aminoácidos individuales como la glutamina, la arginina y aminoácidos de cadena ramificada (leucina, isoleucina y valina).

Dentro de las vitaminas se encuentran las del grupo B (hidrosolubles), especialmente B1, B2, B6 y B12. Puede adicionarse también vitamina C. En algunas bebidas se incluyen algunos minerales, como magnesio y potasio, aunque en cantidades reducidas. Con respecto a aditivos acidulantes, se utilizan ácido cítrico y citratos de sodio, solos o en mezclas buffers. El conservante más común es el benzoato de sodio, el sabor más utilizado es el cítrico y el color en consonancia es levemente amarillo verdoso, tonalidad alcanzada con riboflavina (vitamina B2) o con extracto de cártamo.

Muchas bebidas energéticas contienen extractos de hierbas de semillas de guaraná, nueces de cola u hojas de yerba mate, donde el principio activo es la cafeína. Otro extracto utilizado en estas bebidas es el ginseng, cuyas sustancias activas son diferentes a la cafeína, corresponden al grupo de las saponinas y tendrían acción sobre la adaptación corporal a los efectos del estrés, las enfermedades y la fatiga. [18]

Otros componentes que también pueden encontrarse en las BE son: la creatina, ácido orgánico no esencial derivado de varios aminoácidos, que se encuentra en cantidades muy pequeñas como para producir efecto beneficioso al rendimiento físico.

También suelen contener carnitina, amina cuaternaria sintetizada en el hígado, los riñones y el cerebro a partir de dos aminoácidos esenciales, la lisina y la metionina.

2.5.3. Efectos fisiológicos de los principales componentes

Es importante considerar los ingredientes de las bebidas energizantes y su efecto a la salud. Nuestro trabajo se ha basado en la cafeína, sobre la cual hemos descrito con anterioridad sus efectos fisiológicos, pero también resulta importante detallar en forma breve los principales efectos de los demás componentes fundamentales de estas bebidas:

- **Carbohidratos:** el contenido de azúcares simples contribuye a un importante aporte de energía a nivel celular. Su alto contenido en las BE retarda el vaciamiento gástrico y la posterior absorción intestinal. Por esta razón, estas bebidas no deben ser ingeridas inmediatamente antes o durante la actividad física, cuando un reemplazo rápido del sudor perdido es muy importante. Además, su consumo antes o durante el ejercicio de elevadas concentraciones de carbohidratos pueden producir malestar gastrointestinal.
- **Glucuronolactona:** se sugiere que elimina sustancias nocivas producidas durante el estrés, por lo que contrarrestaría el mismo, pero aún no se ha comprobado científicamente. En los humanos es un intermediario en varias rutas metabólicas a nivel hepático, como la conjugación por glucuronización de una amplia variedad de sustancias, esencial para la detoxificación de sustancias.

Si bien el contenido en las BE duplica al doble requerido en dietas normales, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) ha concluido que no se presenta riesgo por consumo regular de estas bebidas. [22]

- **Taurina:** nuestro organismo puede sintetizarlo, pero puede llegar a encontrarse en cantidades insuficientes. Participa en múltiples procesos fisiológicos que aún no se han dilucidado en forma completa. Sus efectos por consumo de ED están siendo discutidos. [21]
- **Carnitina:** Interviene en el metabolismo degradativo de los ácidos grasos a nivel mitocondrial. Normalmente las personas producen o ingieren suficiente

cantidad para mantener la función corporal, por lo tanto su contenido en las BE no ayuda a perder peso, ni eliminar grasa corporal ni reducir la acumulación de lactato durante el ejercicio máximo.

- Vitaminas y minerales: Su contenido es tan bajo, que no ofrecen beneficios extras si la persona que las consume mantiene cubierta la recomendación nutricional óptima de vitaminas y minerales.
- Extractos de hierbas: El guaraná al ser ingerido en grandes cantidades puede causar deshidratación, en tanto que el ginseng puede provocar cambios abruptos en la presión sanguínea.

A modo de resumen, en la *Tabla 2.5.* se muestra la composición de algunas de las BE consumidas a nivel mundial [2]:

Tabla 2.5. Composición de BE consumidas a nivel mundial

Componente	Guaraná Lamanita	Dynamite	Red Bull	Speed Unlimited	Guaraná Natural	B52
Fructosa (%)	5.4	5.4	0.6	5.0	5.8	5.9
Glucosa (g %)	6.1	6.4	2.6	5.5	5.9	6.1
Sacarosa (g %)	1.1	0.0	8.0	1.8	0.1	0.2
Azúcares totales (g %)	12.6	12.1	11.2	12.3	11.8	12.2
Kcal/240 ml	-	95	109	-	-	-
Sórbico (mg/L)	37	0	0	0	0	0
Benzoico (mg/L)	289	0	0	0	0	0
Taurina (g/L)	0	4.6	4.0	0.7	0	0.5
Cafeína (mg/L)	6	336	341	322	300	263
Vitamina C (mg/L)	0	0	0	138	139	231
Ácido Pantoténico (mg/L)	0	5	24	13	6	23
Vitamina B6 (mg/L)	0	23.6	24.8	4.1	4.0	7.4
Niacina B3 (mg/L)	0	0	81	0	34	62
Riboflavina B2 (mg/L)	0	0.9	6	0	3.2	0
Ácido Fólico (mg/L)	0	0	0	0	0	0.64
Biotina mg/L)	0	0	0	0.32	0	0
Vitamina B12 (mg/L)	0	0	23.9	0	0	0
Otros posibles ingredientes (variable según la marca)	Arginina – Cisteína – Carnitina – Creatinina – Ribosa – Electrolitos – Piruvato – Inositol – Cromo – Otros aminoácidos – Proteínas - Gluconolactona					

2.6. MARCO NORMATIVO DEL CONTENIDO DE CAFEÍNA EN LAS BEBIDAS ENERGIZANTES

Es muy grande el impacto que han tenido las BE transcurridos casi veinte años desde su lanzamiento al mercado mundial, que ya son más de cuatrocientas las empresas que elaboran bebidas bajo este concepto y las comercializan en más de ciento veinte países del mundo (*RedBull* se comercializa en 165 países, basando su mercado en Europa Occidental y Estados Unidos, como en países en crecimiento como Brasil, Japón, la India y Corea del Sur).

En cuanto a volumen, las ventas ascienden actualmente a más de 5 mil millones de latas/botellas por año (*RedBull* vendió más de 5226 millones de latas en el año 2012). [23]

Aunque la denominación “bebidas energéticas” o “energy drinks”, utilizada para referirse a esta nueva categoría de productos alimenticios, no implica por sí misma ninguna información relacionada con la salud y la nutrición, ha sido ampliamente aceptada por los consumidores y las autoridades regulatorias de distintos países del mundo. Debe, además, distinguirse a estas bebidas de las “bebidas refrescantes” y de las denominadas comúnmente como “bebidas rehidratantes para deportistas”, debido a que las BE no están específicamente destinadas a quitar la sed o rehidratar, sino que fueron desarrolladas como un producto destinado básicamente a aumentar el rendimiento físico, la capacidad de concentración y a mejorar la velocidad de reacción y el estado de alerta.

Es importante considerar el aspecto legal de las BE tanto a nivel mundial como en Argentina, que involucra tanto su composición (a valor de nuestro trabajo será de mayor importancia la regulación del contenido de cafeína), su etiquetado como a su publicidad, en algunos casos. El desarrollo de este producto y su avance en el mercado mundial ha estado acompañado por un proceso de adecuación en la regulación de sus componentes activos, aplicable en cada uno de los mercados locales donde se fue introduciendo.

Existen diferencias notorias en el marco regulatorio que cada país o mercado implementan, donde en la mayoría de los casos están sujetos a revisiones y cambios periódicos.

La OMS, en su *Glosario de términos de alcohol y drogas*, recomienda como límite consumir 300 miligramos de cafeína por día, considerando una ingesta de 500 mg como tóxica y peligrosa. [24]

Por otro lado, ya se ha mencionado que muchos la categorizan como un alimento funcional. En la actualidad, no existe una normativa a nivel mundial que defina legalmente a estos alimentos, mucho menos una lista de alimentos aprobados como tales.

2.6.1. Europa

Lógicamente, uno de los primeros países en implementar normativa fue Austria, donde la producción y exportación de estos alimentos ha pasado a constituir un segmento muy importante de su industria alimentaria. La misma era establecida por el *Codex Alimentarius Austriacus*, que fue un trabajo ejemplar acerca de los alimentos, siendo luego el modelo precursor del *Codex Alimentarius Europeus*, que a su vez fue precursor del *Codex Alimentarius*.

Este último es el actual codex internacional para alimentos elaborado colaborativamente en el marco de la FAO y la OMS. [25] En la actualidad, la única normativa que involucra a las BE es la impartida por la *REGULATION (EU) No 1169/2011 OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL Annex III (4.1, 4.2)* [26]. La misma prevé, entre otras cosas, que bebidas con contenido de cafeína en proporción mayor a 150 mg/L, debe figurar en su etiqueta “Contenido elevado de cafeína” y expresar el mismo en mg/100 ml. A su vez, deberán contener la leyenda “No recomendado para niños, mujeres embarazadas o en periodo de lactancia” en el mismo campo de visión que el nombre de la bebida.

2.6.2. Oceanía

Otro ejemplo que podemos citar es el caso de Australia y Nueva Zelanda. Estos países resolvieron, en 2001, incorporar a su Código de Estándares Alimentarios una norma específica para las bebidas energéticas, a las que denomina “*Formulated Caffeinated Beverages*”.

Define a las bebidas con formulado de cafeína, a las bebidas no alcohólicas basadas en agua y saborizadas, que contienen cafeína y pueden contener carbohidratos, aminoácidos, vitaminas y otras sustancias, incluyendo otros alimentos, cuyo propósito es mejorar la performance mental. El límite mínimo al contenido de cafeína es de 145 mg/L y el límite máximo 320 mg/L.

Con respecto al rotulado, la norma sólo exige que en la etiqueta de las bebidas energéticas esté declarada (por tamaño de porción y por cada 100 mL), tanto la cantidad de cafeína expresada en miligramos, como los demás ingredientes típicos.

También deben incluirse las advertencias “alimento que contiene cafeína” y “no recomendado para niños, mujeres embarazadas o en periodo de lactancias; personas sensibles a la cafeína“. Debe mencionarse además la advertencia “Consuma no más de [monto de la cantidad de un día (como latas, botellas o mL)] por día”. [27]

2.6.3. América

En cuanto a legislación se refiere, también han hecho lo propio distintos países sudamericanos, cuando estos productos comenzaron a desembarcar en la región. En el caso de Chile, el Reglamento Sanitario de los Alimentos regula a las bebidas energéticas bajo una categoría especial denominada “Alimentos para Deportistas”. La legislación chilena admite expresamente la incorporación de cafeína a estos productos, con las siguientes limitaciones: las bebidas analcohólicas que contengan cafeína no deberán exceder la cantidad de 180 mg/L de la misma (art. 481); la recomendación de consumo en la etiqueta y/o publicidad no podrá sobrepasar los 500 mg de cafeína por día (art. 540 inc. J); cuando se trate de alimentos líquidos y el contenido de cafeína sea mayor a 180 mg/L, deberá incluirse en el rótulo una leyenda que diga: “No recomendable para menores de 15 años, en embarazo, ni lactancia” (art. 541). [28]

En el caso de Brasil, por medio de la Resolución N° 273 de la Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria (ANVISA), de fecha 22 de septiembre de 2005, se aprobó el “Reglamento Técnico para Mezclas para la Preparación de Alimentos y Alimentos Listos Para el Consumo”.

En el mismo se permite un contenido de cafeína en concentraciones no mayores a 350 mg/L. También establece que deben incluirse en los rótulos de estos productos las siguientes dos leyendas específicas: “Niños, gestantes, mujeres que estén amamantando, ancianos y portadores de enfermedades: consultar al médico antes de consumir el producto”; y “No es recomendado el consumo con bebida alcohólica”. [29]

En el caso de EE.UU., las bebidas energéticas se venden desde el año 1997 al amparo de la Federal Food, Drug and Cosmetic Act (FD&C Act) y de la Dietary Supplement Health And Education Act of 1994 (DSHEA), aplicables también a otras categorías de productos.

La comercialización de bebidas energéticas en este país no requiere de la aprobación previa de la Food and Drug Administration (FDA), puesto que sus ingredientes (en particular, la cafeína, la taurina y la glucuronolactona) han sido calificadas como Generally Recognized as Safe (GRAS). En 2012, la FDA vetó el uso de cafeína en las bebidas alcohólicas y cuestionó la alta concentración de cafeína en las bebidas energizantes, después de que varias muertes fueran aparentemente asociadas con su consumo [30].

La FDA tiene la autoridad de establecer límites para la cantidad de cafeína que se agrega a los alimentos, si los avances en la ciencia lo consideran necesario y oportuno.

Aún cuando los cuestionamientos actuales permanecen, 26 de agosto de 2013, fue publicado en el blog oficial de la FDA (FDAVoice) un artículo de Michael R. Taylor, el Comisionado Adjunto de la FDA para los Alimentos y Veterinaria, donde manifiesta “la FDA tiene la autoridad de establecer límites para la cantidad de cafeína que se agrega a los alimentos” y asume “vamos a tomar todas las acciones que sean necesarias en pos de la protección de la salud de los consumidores de enfermedades o exposición a sustancias”. [31]

2.6.4. Argentina

En Argentina, el proceso de adecuación normativa fue, en un principio, similar al que transitaron otros países del mundo. En efecto, con motivo de la recepción por parte de la Administración Nacional de Alimentos, Medicamentos y Tecnología

Médica (ANMAT) de las primeras solicitudes de inscripción de bebidas energéticas, con fecha 16 de noviembre de 2000, este organismo dictó la Disposición N° 6611/00. La misma establecía que las BE podrían registrarse y comercializarse bajo la categoría de suplementos dietario. Al mismo tiempo, establecía como valor máximo de contenido de cafeína el generalmente aceptado por otras legislaciones del mundo (35 mg/100 mL).

Mientras tanto, en materia de rotulado, además de las leyendas que resultaban exigibles por aplicación del artículo 1381 del Código Alimentario Argentino (CAA), las etiquetas de las bebidas energéticas debían incluir la advertencia: “Personas de edad o con enfermedades deberán consultar con su médico antes de consumir este producto”.

La norma también aclaró que sólo podría consignarse la leyenda “Alto en energía” cuando el contenido de energía aportado, principalmente por hidratos de carbono, fuera igual o mayor a 190 kJ/100 mL, lo que equivale a 45 Kcal/100 mL.

Previa intervención del Instituto Nacional de Alimentos (INAL), la ANMAT tuvo especialmente en cuenta que la cantidad de cafeína incorporada a las bebidas energéticas no presentaba efectos nocivos ni tóxicos.

Aclara al respecto que, mientras una taza de té de 150 mL aporta entre 60 y 90 mg de cafeína, y una taza de café de 125 mL aporta entre 95 y 125 mg de cafeína, una lata de 250 mL de este nuevo producto sólo aporta 80 mg.

2.6.4.1. Modificaciones

El 27 de junio de 2005, la ANMAT emitió la Disposición N° 3634 [32] donde se derogó la Disposición N° 6611/00 y se introdujo una serie de modificaciones al régimen localmente aplicable a estos productos. El cambio fundamental fue la reducción del valor máximo de cafeína admisible cada 100 mL de bebida energética, de 35 mg a 20 mg. De este modo, se lo equipara al contenido máximo que fija el artículo 1000 del CAA para ciertas bebidas sin alcohol, elaboradas con soluciones extractivas que contienen cafeína como componente natural, como puede ser el caso de las semillas de cola. Otro cambio importante fue la obligación de incluir en los rótulos de las mismas una nueva leyenda que dice: “El consumo con alcohol es nocivo para la salud”.

A ello, además, debe sumarse una serie de restricciones aplicables en materia de publicidad y difusión comercial. Según explica esta norma, los cambios normativos dispuestos estarían fundados en la preocupación que habría generado el uso desvirtuado que los jóvenes estarían dando a estos productos, al consumirlos conjuntamente con bebidas alcohólicas. La ANMAT entiende que la reducción del contenido máximo de cafeína de 35 mg a 20 mg, resulta conveniente para disminuir la ingesta de dicho componente.

De esta forma, la ANMAT decidió apartarse de los estándares fijados internacionalmente en la materia, dejando en manos de la Comisión Nacional de Alimentos la sanción de una regulación definitiva que diera un marco legal adecuado a esta categoría.

El 11 de marzo de 2013 el Ministerio de Salud y el Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca elevaron la *Resolución Conjunta N° 90/2013 y N° 121/2013*, con aportes de la ANMAT y la CONAL, en la que deciden incluir en el CAA el Artículo 1388 [33].

En el mismo se define a “Bebida analcohólica con cafeína y taurina” a aquella bebida no alcohólica gasificada o no que contenga en su composición cafeína y taurina, asociadas o no con glucuronolactona y/o inositol, con los valores máximos que se detallan a continuación: Taurina: 400 mg/100 mL, Glucuronolactona: 250 mg/100 mL, Cafeína: 32 mg/100 mL, Inositol: 20 mg/100 mL. Este producto se deberá rotular con la denominación de venta “Bebida analcohólica con cafeína y taurina; deberá cumplir con las exigencias generales obligatorias establecidas en el presente Código para alimentos envasados; deberá consignar además las siguientes leyendas obligatorias: “No consumir en caso de embarazo, lactancia, niños y personas de edad avanzada”, “Se sugiere no consumir con alcohol”, “Alto contenido de cafeína” cuando ésta supere los 20 mg/100 mL.

Al mismo tiempo, se estableció que la publicidad de estas bebidas deberán cumplir con las exigencias establecidas en CAA, considerando las siguientes restricciones, cualquiera sea el medio de difusión que se utilice: no deben ser asociadas directa o indirectamente al consumo con bebidas alcohólicas; no deben presentarse como productores de bienestar o salud; su consumo no debe vincularse con ideas o imágenes de mayor éxito en la vida afectiva y/o sexual de las personas

o hacer exaltación de prestigio social, virilidad o femineidad; en el mensaje no deben participar en imágenes o sonidos, menores de dieciocho (18) años de edad.

En la mencionada resolución, también se incluye en el CAA el artículo 1388 bis “Bebida analcohólica con cafeína y taurina suplementadas con...”, completando el espacio en blanco con las vitaminas y/o minerales que superen los valores de ingesta diaria recomendada y/o las hierbas autorizadas. Las mismas deben cumplir con las exigencias del artículo 1388. [33]

La *Resolución Conjunta N° 90/2013* y *N° 121/2013*, se pondría en vigencia a partir del día siguiente al de su publicación en el Boletín Oficial, otorgándosele a las empresas un plazo de CIENTO OCHENTA (180) días para su adecuación.

2.7. PROBLEMÁTICA EN EL CONSUMO DE BEBIDAS ENERGIZANTES

Como ya se ha mencionado, el nivel de cafeína que aportan las bebidas energéticas es del mismo orden que el de otras bebidas, como el mate, café y té.

Pese a esto, es necesario poner en escena las características de su consumo y la problemática que se genera en torno al mismo.

La popularidad de estas bebidas ha ido en aumento en los últimos años, siendo consumidas principalmente por adolescentes, adultos jóvenes y deportistas. Los motivos más frecuentemente están referidas al aumento o mejora del rendimiento, sea para estudiar, obtener energía, manejar un vehículo por un período de tiempo prolongado, mantenerse despierto en las noches de discoteca, contrarrestar los efectos del alcohol, tratar la resaca, maximizar el rendimiento y anular la fatiga en las competencias deportivas, entre otros.

Es preciso mencionar que hay mucho desconocimiento sobre sus propiedades, ingredientes utilizados en sus formulaciones, grado de seguridad en su consumo y posición dentro de las normas alimentarias, normas que discrepan en los distintos países que las reglamentan.

Siendo su función la de aportar nutrientes, el consumidor debe ser el responsable de leer el rotulado antes de su ingesta para evaluar si puede consumirlo, en qué cantidad y que advertencias se mencionan.

El consumo de más de dos latas, aumenta los riesgos de fallas cardiovasculares, producidos por el contenido de cafeína.

Esto se ve aún en crecimiento cuando se mezclan con otras sustancias, como alcohol, tabaco, medicamentos o drogas, sustancias consumidas en forma masiva por los jóvenes y adolescentes.

Estas bebidas no se aprobaron para ser utilizadas en combinación con bebidas alcohólicas; cuando se combinan con alcohol (depresor del SNC), el efecto de la cafeína (estimulante del SNC) puede enmascarar y retardar los efectos depresores del primero llevando a consumir una mayor cantidad de bebida alcohólica. Al mismo tiempo, ambas sustancias, cafeína y etanol, son diuréticos y combinados potencian este efecto, siendo crítico si no se repone agua adecuadamente. Por otro lado, su ingesta conjunta con otras drogas estimulantes del SNC (antidepresivos, cocaína, anfetaminas), pueden producir daños irreparables provocando, por ejemplo, accidentes vasculares severos, crisis hipertensivas, hemorragias cerebrales o infarto de miocardio.

La mezcla de BE con alcohol (generalmente con vodka o champagne) comenzó en bares y clubes nocturnos de Europa, difundiéndose luego a Estados Unidos, y de allí a otros países como el nuestro. Las compañías fabricantes tanto de bebidas alcohólicas como BE alentaron esta práctica.

En Argentina, la mezcla de BE con bebidas alcohólicas se da especialmente en las llamadas “previas”, los preparativos que estilan hacer los jóvenes antes de salir a bailar, entrada la madrugada de los fines de semana. También se nota el incremento en las cartas de bebidas de locales bailables y pubs de tragos que combinan energizantes con distintas bebidas alcohólicas. La modalidad de consumo es grupal, la mezcla se prepara en jarras que los adolescentes beben en común, favoreciendo la sobreingesta. Al mismo tiempo, las empresas que las comercializan, no utilizan estrategias de marketing tradicionales (como publicidad en televisión, radio, revistas, o en la vía pública) sino que buscan su difusión persona a persona a través de eventos, sea auspiciando deportes extremos o eventos nocturnos donde se permite la venta libre de alcohol.

2.8. MÉTODOS DE SEPARACIÓN DE LA CAFEÍNA

Para separar la cafeína de productos naturales es necesario llevar a cabo una serie de operaciones que permitan su obtención en forma pura, aislada del resto de

las sustancias que la acompañan en la matriz y que por lo tanto, deben eliminarse para que no interfieran en su posterior determinación.

El proceso de separación dependerá del producto comercial con el que se trabaje y de acuerdo a la matriz se pueden realizar diferentes operaciones que permitirán obtener la cafeína en forma pura. [2]

La extracción es un proceso mediante el cual una sustancia que se encuentra en una mezcla sólida o disuelta en un determinado disolvente es transferida a otro disolvente. Su fundamento es aislar, concentrar o separar un analito de una especie que interferiría en su análisis. Dependiendo del estado físico de los materiales puede clasificarse en: sólido-líquido o líquido-líquido. Aunque la cafeína es soluble en agua, es mucho más soluble en cloroformo y por eso puede ser extraída con este disolvente orgánico.

Una vez realizado este proceso y previo a una posterior purificación del extracto, suele emplearse algún agente desecante como sulfato de sodio anhidro, para eliminar toda el agua y las sales solubles en agua que se mantienen en el disolvente orgánico. Posteriormente, el disolvente puede ser eliminado fácilmente por evaporación o por destilación, teniendo en cuenta su punto de ebullición, o mediante vacío usando un equipo de evaporación rotatoria. Una vez separada la cafeína de la mezcla, debe ser purificada ya que en el proceso de su aislamiento, las distintas fases orgánicas pueden arrastrar algún componente que no se haya disuelto bien en la fase acuosa correspondiente.

La filtración es la operación unitaria en la que el componente sólido insoluble de una suspensión sólido-líquido se separa del componente líquido haciéndolo pasar a través de una membrana porosa que retiene a las partículas sólidas en su superficie. En algunas ocasiones es el líquido (el filtrado) el que constituye al producto deseado, y en otras ocasiones el sólido retenido en el filtro. Las condiciones en las que puede efectuarse son en caliente o frío, y tanto por gravedad o por vacío.

Las filtraciones que se realizan en la separación de la cafeína se hacen con la solución caliente y por vacío para evitar la formación de cristales y obtener un rendimiento óptimo. Esta operación debe efectuarse con mucho cuidado y lentamente, ya que la solución tiene pequeñas partículas sólidas que van

obstruyendo progresivamente los poros del papel de filtro y se puede producir alguna reabsorción.

Un procedimiento que también es muy usado para la purificación de sustancias sólidas es la cristalización. La purificación por recristalización se basa en la diferencia de solubilidad de una sustancia entre el solvente frío y caliente.

El sólido que se va a purificar se disuelve en el disolvente caliente, generalmente a ebullición, la mezcla caliente se filtra para eliminar todas las impurezas insolubles, y entonces la solución se deja enfriar para que se produzca la cristalización. Durante este proceso, es aconsejable que la velocidad de enfriamiento de la solución que contiene la sustancia a recristalizar sea moderada, para obtener de esta forma cristales medianos. Si el enfriamiento es rápido, el tamaño de los cristales será muy pequeño y, en conjunto, poseerán una mayor superficie de adsorción en la que podrán fijarse una mayor cantidad de impurezas.

Si el enfriamiento es lento, el tamaño será muy grande y podrán quedar atrapadas impurezas en el interior del cristal. Finalmente, los cristales obtenidos se separan por filtración y se dejan secar. Si con una cristalización sencilla no se llega a una sustancia pura, el proceso puede repetirse empleando el mismo u otro disolvente.

2.9. METODOS ANALÍTICOS DE CUANTIFICACIÓN DE LA CAFEÍNA

La determinación de cafeína ha adquirido mucha importancia, debido a su uso en la industria farmacéutica y en la industria de alimentos; ya sea como ingrediente en la elaboración de refrescos y bebidas energéticas o por su presencia en productos como el té, el mate, el cacao y el café.

En todos estos casos, el control de calidad del parámetro cafeína es necesario. Por esta razón, son varios los métodos instrumentales que se emplean y que permiten su determinación en diversas matrices, especialmente en alimentos.

Para elegir una técnica de separación, además de tener en cuenta los criterios económicos y de accesibilidad, hay que tener en cuenta a dos tipos de consideraciones [35]: unas tienen que ver con las propiedades físicas y estructurales de las moléculas que se pretende separar, o de las características de la matriz en

que se encuentran; otras se derivan de los objetivos del análisis (sensibilidad, resolución, tiempo de análisis, necesidad de una detección específica).

El método de selección debe considerar los pasos necesarios para la obtención, preparación y posible fraccionamiento de la muestra, la aplicación de la técnica analítica adecuada y el tratamiento de los datos obtenidos.

Las técnicas analíticas más empleadas en la actualidad pueden englobarse en dos grandes grupos: técnicas de separación y técnicas espectroscópicas. Las técnicas espectroscópicas proporcionan, para cada compuesto analizado, una información compleja, relacionada con sus características estructurales específicas, por otro lado las técnicas de separación se utilizan para resolver los componentes de una mezcla y la señal obtenida puede utilizarse con fines analíticos cuantitativos o cualitativos. En la actualidad, las separaciones analíticas se efectúan fundamentalmente por cromatografía y electroforesis.

Se han propuesto una variedad de métodos analíticos para la separación y / o determinación de cafeína en diversas matrices (biológicas, plantas, alimentos, medicamentos, etc.). Su determinación en bebidas se ha llevado a cabo mediante técnicas de separación cromatográficas como HPLC o Cromatografía líquida de alta eficiencia [36], Electroforesis capilar o CE [37], Cromatografía de capa fina o TLC, Cromatografía de gases o CG [38] [39], Cromatografía iónica [40]. Los sistemas de detección empleados abarcan técnicas electroquímicas como Voltamperometría cíclica [41] técnicas espectroscópicas como Infrarrojo con transformada de Fourier [42], espectrometría de movilidad iónica [43], UV/Visible [44], Infrarrojo cercano o NIR [45] [46] Infrarrojo cercano con transformada de Fourier [47]. Inclusive se ha realizado su determinación por acople de estas técnicas, como CG/MS o CG/Espectrometría de Masas [48].

La elección de una u otra técnica depende del problema a resolver, el tipo de matriz, el volumen de muestra y de su concentración.

Existe un método oficial aprobado por la AOAC Internacional, para la determinación de la cafeína en bebidas no alcohólicas, bajo el número 962.13. Establece que la concentración de cafeína en bebidas no alcohólicas debe determinarse usando una recta de regresión lineal obtenida a partir de soluciones estándares determinadas a 276 nm con triclorometano (CHCl_3). [49]

2.9.1. HPLC

De todas las técnicas mencionadas anteriormente, HPLC es una de las más empleadas, variando en distintos tipos de columnas y sistemas de detección. El empleo de ésta comúnmente ofrece un menor número de interferencias respecto a otras alternativas. [35] [50]

La ventaja más notoria del HPLC con respecto a la cromatografía líquida convencional, es que las muestras pueden ser separadas con mayor rapidez. Por otro lado, pueden ser eficientemente resueltos sistemas cuya separación no es posible mediante cromatografía de gases, tales como muchas muestras no volátiles o susceptibles de descomposición térmica. Aún así, este método analítico puede complementarse con la cromatografía de gases.

La cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) hace uso de una bomba para suministrar una fase móvil a una velocidad de flujo uniforme y presiones comprendidas entre 500 y 5000 psi (1 psi = 6894,75 Pa). Se realiza por medio de la inyección de una pequeña cantidad de muestra líquida en un fluido líquido, *fase móvil*, que atraviesa una columna rellena con partículas de la denominada *fase estacionaria*. Del mismo modo que para la cromatografía de gases, la separación de una mezcla en sus componentes depende de los diferentes niveles de retención de cada componente en la columna.

La *Figura 2.4.A* muestra una representación del proceso de elución cromatográfica. Un componente es retenido en la columna en mayor o menor medida dependiendo de su partición entre la fase móvil líquida y la fase estacionaria. Se han desarrollado una gran variedad de metodologías de separación HPLC que hacen uso de diferentes fases móviles y estacionarias.

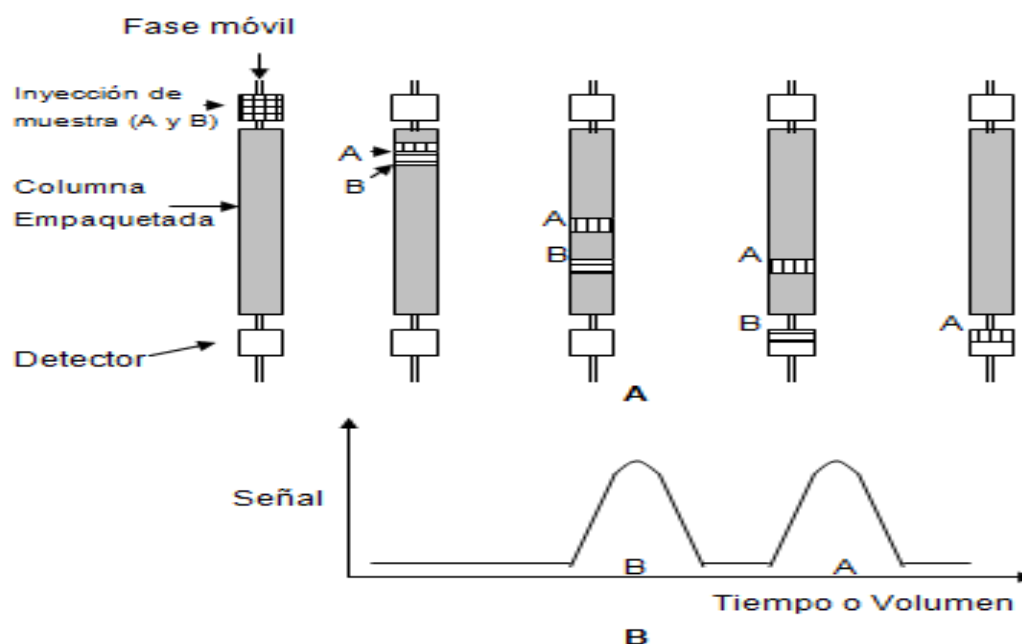


Figura 2.4 A. Representación esquemática de una separación cromatográfica de una mezcla de dos componentes A y B. **Figura 2.4 B.** Cromatograma de A y B.

Existen distintas variantes dentro de la cromatografía HPLC:

- **Cromatografía de adsorción.**

La cromatografía de adsorción hace uso de una fase estacionaria sólida de naturaleza polar, tal como partículas de sílice o alúmina. La fase móvil y los solutos (componentes de la mezcla) compiten por los sitios activos de adsorción sobre las partículas de la fase estacionaria. Por lo tanto, aquellos componentes de mayor polaridad se adsorben sobre superficies polares más fuertemente que los menos polares, la retención en la columna se relaciona con la polaridad de los diferentes analitos que constituyen la muestra, pudiendo controlarse mediante la polaridad de la fase móvil, que compite con los componentes de la muestra por los sitios de adsorción. En consecuencia, una fase móvil más polar desplazará con mayor efectividad moléculas de soluto adsorbidas, provocando una disminución del tiempo de retención.

- **Cromatografía de partición.**

Esta forma de HPLC particiona al soluto entre una fase móvil líquida y un segundo líquido inmiscible unido a las partículas sólidas de la fase estacionaria.

Aquellos compuestos que particionan con mayor intensidad en la fase líquida estacionaria son retenidos por más tiempo en la columna.

Este tipo de cromatografía se denomina de fase normal si la fase estacionaria es más polar que la fase móvil, y de fase reversa si la fase móvil es más polar que la fase estacionaria. La fase estacionaria puede ser un líquido impregnado en un soporte sólido y son las columnas más utilizadas para cromatografía de partición.

Por ejemplo, el n-octadecano puede unirse directamente a la sílice a través de grupos hidroxilos para formar lo que se conoce como C₁₈. El grado de partición de un soluto en la fase estacionaria se puede controlar variando la polaridad del solvente.

- **Cromatografía de intercambio iónico.**

Este tipo de HPLC se basa en la partición de iones entre la fase móvil líquida polar y una fase estacionaria líquida con sitios para intercambio iónico. Estos sitios de intercambio generalmente se inmovilizan en pequeñas perlas de resina, la cual está formada por un polímero entrecruzado de estireno y divinilbenceno.

También se dispone de columnas de fase unida o enlazada, en las cuales el ion intercambiador se une a pequeñas partículas de sílice. Los cationes se separan con resina de intercambio iónico catiónicas que contienen grupos funcionales cargados negativamente tales como $-\text{SO}_3^-$ y $-\text{COO}^-$. Los aniones se separan con resinas de intercambio aniónico que contienen grupos funcionales cargados positivamente tales como $-\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$, un ion de amonio cuaternario.

La separación se basa en los diferentes niveles de partición de los iones en la fase del ion intercambiador. La selectividad de una resina por un ion se determina principalmente mediante la carga y radio hidratado del ion en estudio. La afinidad de una resina aumenta con el aumento de la densidad de carga.

2.9.1.2. Instrumental

La *Figura 2.5* muestra el esquema de un cromatógrafo líquido de alta resolución típico. El aparato consiste en un recipiente que contiene la fase móvil, una bomba que proporciona hasta 4000 psi de presión, una válvula para inyectar la muestra (por lo general volúmenes desde 10 a 500 μl), la columna (generalmente revestida en acero inoxidable), un detector, accesorios electrónicos conectados al detector y un registrador.

El método de detección más comúnmente usado es espectrofotometría de absorción molecular UV-visible. Tales detectores permiten que el efluente de la columna fluya a través de una celda espectrofotométrica de 8 a 10 μL para la detección de los componentes a una dada longitud de onda. Los detectores electroquímicos y de fluorescencia frecuentemente se utilizan para mejorar los límites de detección. Otro detector de uso frecuente es el que se basa en la medición de las diferencias de índice de refracción.

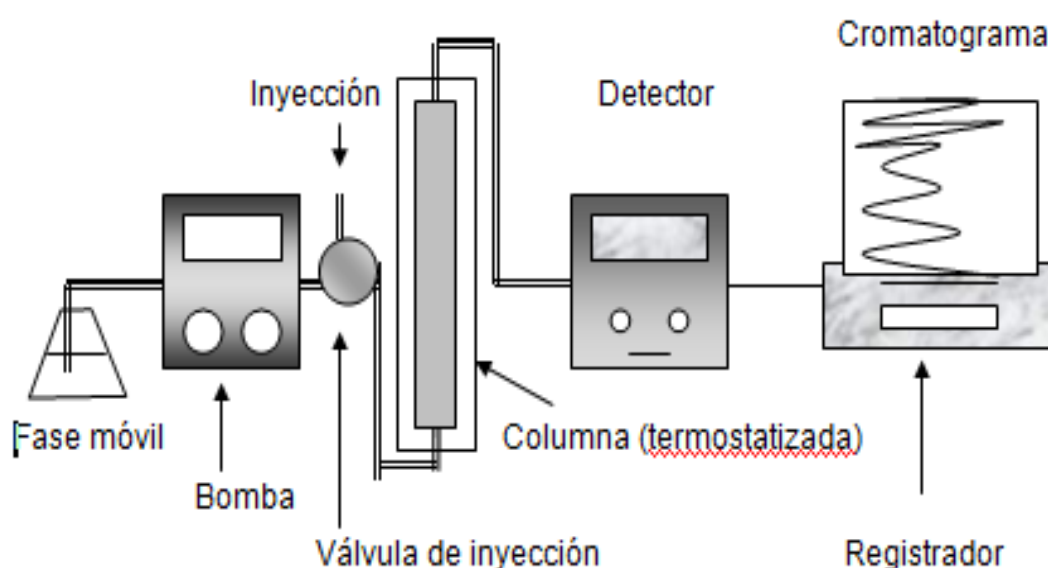


Figura 2.5. Representación esquemática de un cromatógrafo líquido de alta resolución.

2.9.1.3. Medidas cualitativas y cuantitativas

Los resultados se analizan a través de una gráfica llamada cromatograma. Cada componente de la mezcla se puede identificar cualitativamente mediante su

tiempo de retención, que consiste en el tiempo entre la inyección de la muestra y la detección.

Para un dado componente el tiempo de retención, al igual que en la cromatografía gaseosa, es constante para un conjunto de condiciones cromatográficas determinadas (velocidad de flujo, temperatura, columna). La identificación cualitativa se realiza comparando el tiempo de retención de un componente desconocido con el tiempo de retención de un patrón que se ha inyectado en el cromatógrafo.

Esta técnica resulta útil siempre que los componentes posean un único tiempo de retención y que la composición de la muestra sea conocida.

El área debajo de cada pico es proporcional a la concentración de ese componente en la muestra original. Si los picos son razonablemente agudos y la velocidad de flujo se controla cuidadosamente, las áreas de picos son proporcionales a la concentración.

Por lo tanto, se puede elaborar una recta de calibración mediante una gráfica de áreas de los picos como una función de la concentración para una serie de patrones.

El proceso de cuantificación se puede dividir en dos etapas: la etapa de calibración y la de predicción.

La etapa de calibración se realiza a partir de los cromatogramas obtenidos de los patrones. Se determina el tiempo de retención t_R de la cafeína y el área del pico (o altura) para cada uno de ellos. Se grafica área de pico vs la concentración de cafeína. Como la respuesta es lineal, se espera obtener una recta cuya pendiente (b) representa la sensibilidad del método. Como la velocidad de flujo se ha de mantener constante, el t_R para las muestras debe ser el mismo, por lo que el uso del sistema HPLC permite además análisis cualitativo. La etapa de predicción se realiza determinando el área del pico de cafeína en las muestras incógnita e interpolando el valor de concentración correspondiente a partir de la recta de calibración obtenida previamente.

CAPÍTULO 3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. REACTIVOS

3.1.1. Solución estándar de cafeína

Para obtener una solución de 1000 mg/L, se pesó 1,0000 g de Cafeína p.a. se trasvasó a un matraz de 1000 mL y se adicionó agua ultrapura de calidad analítica hasta el enrase.

3.1.2. Solvente metanol

Se empleó metanol de grado HPLC, previamente desgasificado durante 20-30' en baño con sonicación.

3.1.3. Fase móvil

Composición 30 % de Metanol (CH₃OH) grado HPLC y 70% de agua desionizada. Se ajustó su pH a un valor de 3,5 mediante la adición de H₃PO₄ (p.a.)

3.1.4. Muestras de bebidas energizantes

Se emplearon latas comerciales de las siguientes BE:

<i>X4 Energy Drink</i>	(Volumen: 250 mL. Contenido de Cafeína: 20 mg/100mL equivalente a 200 mg/L)
<i>Block Energy Drink</i>	(Volumen: 250mL. Contenido de cafeína: 50mg/250mL equivalente a 200 mg/L)
<i>V Energy Drink (Black)</i>	(Volumen: 250mL. Contenido de cafeína: 50mg/250mL equivalente a 200 mg/L)
<i>Red Bull</i>	(Volumen: 250mL. Contenido de cafeína: 0,03% v/v equivalente a 300 mg/L)

<i>Sobe Rush</i>	(Volumen: 250mL. Contenido de cafeína: 53mg/265mL equivalente a 200 mg/L)
<i>Blue Demon Energy Drink</i>	(Volumen: 473mL. Contenido de cafeína: 94,6mg/473mL equivalente a 200 mg/L)
<i>Speed Unlimited</i>	(Volumen: 250mL. Contenido de cafeína: 0,020% v/v equivalente a 200 mg/L)

3.1.5. Agua ultrapura

Se obtuvo a partir de un sistema de ultra purificación de agua marca Millipore Sinergy Pack, con una resistividad de 18 MΩ cm.

3.2. INSTRUMENTAL

3.2.1. Cromatógrafo HPLC

Se utilizó un cromatógrafo de líquidos marca *KONIK 500-A series*, con detector con monocromador UV-visible y adquisición de datos mediante el programa Konichrom. Posee un inyector de 20 μL y una columna marca *Phenomenex* de 300 mm x 4,6 mm ID.

3.2.2. pH-metro

Las medidas de pH se realizaron con pH-Metro *Metrohm Herisau E516 Titriskop* con electrodo combinado de vidrio y electrodo de referencia interna de Ag/AgCl.

3.3. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

3.3.1. Preparación de patrones de calibración de cafeína

Para elaborar la recta de calibración para cafeína, se prepararon patrones con cinco niveles de concentración conocida de cafeína, de volumen final igual a 5 mL, partiendo de la solución estándar de cafeína descrita en el inciso 3.1.1. Para ello se

tomaron los volúmenes necesarios de la misma, posteriormente disueltos en la fase móvil (3.1.3.) hasta completar volumen. El rango de concentraciones de los patrones obtenidos fue entre 0 y 50 ppm (*Tabla 3.1.*), teniendo en cuenta la concentración de cafeína que se espera en cada muestra y la dilución de la misma en la fase móvil.

Para realizar las diluciones se empleó la fórmula de dilución:

$$V_e \times C_e = V_p \times C_p$$

Siendo: V_e el volumen en μL tomado de la solución estándar
 C_e la concentración de la solución estándar (1000 mg/L)
 V_p el volumen final del patrón (5mL)
 C_p la concentración del patrón en ppm

Para poder igualar las unidades se transformaron las unidades de V_e a mL.

Tabla 3.1. Volumen de solución estándar y concentración de patrones

V_e (μL)	C_p (mg/L)
0	0
50	10
100	20
150	30
200	40
250	50

3.3.2. Preparación de las muestras

Las muestras de Bebidas Energizantes comerciales se desgasificaron, colocando las latas abiertas en un baño con sonicación. Posteriormente se realizaron diluciones 1/10 en microtubos de 1mL (1000 μL), llevando a volumen final con la fase móvil.

3.3.3. Parámetros de ajustes

Debido a que las columnas de fase reversa se guardan en metanol puro, previo a iniciar la corrida cromatográfica se realizó el cambio de solvente. Para ello,

primero se pasó como fase móvil metanol, y luego se aumentó en forma gradual la polaridad del solvente con la fase móvil. Este procedimiento evita el desangrado de la columna y un mayor tiempo de su vida útil. El proceso contrario se realizó previo al apagado del equipo, para obtener nuevamente el metanol puro como solvente de almacenaje en la columna.

Se ajustó el detector en los 250 nm, que corresponde a la $\lambda_{\text{máx}}$ de la cafeína. Se mantuvieron las condiciones de corrida, siendo T° igual a 25°C , el flujo de 1,2 ml/min, la presión máxima igual a 300 atms (aproximadamente 4400 psi).

Es preciso mantener estas condiciones constantes durante toda la experiencia, a fin de poder comparar los tiempos de retención de cafeína en patrones y muestras.

3.3.4. Elución cromatográfica

Se chequeó la estabilidad de la línea base y se ajustaron los parámetros de atenuación del detector y del registrador.

Se lavó el loop de inyección con metanol varias veces, empleando una micro jeringa de 50 μl , repitiendo la misma operación con los patrones y muestras, a fin de no generar errores por dilución dentro del sistema de inyección.

Se procedió a la obtención de los cromatogramas de cada patrón por triplicado y se determinó el t_R de la cafeína y el área del pico para cada uno de ellos.

Se repitió el mismo procedimiento con las muestras de bebidas energizantes comerciales, también por triplicado.

CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. ETAPA DE CALIBRACIÓN

Se realizó la elución por triplicado de los patrones preparados previamente, cuyas concentraciones estaban en el rango de 0-50 mg/L. A partir de los cromatogramas obtenidos, se determinaron los tiempos de retención (t_R) y áreas de los picos correspondientes a la cafeína. En la *Tabla 4.1* se resumen los resultados obtenidos.

Tabla 4.1 Datos de las corridas de los patrones

Patrones (mg/L) _{repetición}	t_R (min)	Área de picos
0 ₁	0	0
0 ₁	0	0
0 ₁	0	0
10 ₁	9,633	230675
10 ₂	9,550	236381
10 ₃	9,417	234387
20 ₁	9,300	472957
20 ₂	9,250	474051
20 ₃	9,317	481107
30 ₁	9,150	730941
30 ₂	9,233	751154
30 ₃	9,017	732205
40 ₁	9,033	987632
40 ₂	9,567	988467
40 ₃	9,517	1005268
50 ₁	9,317	1242332
50 ₂	8,983	1212920
50 ₃	9,050	1186433

Se calculó el tiempo de retención promedio, siendo de $9,289 \pm 0,215$ minutos. Conocer el t_R es importante, ya que nos permite identificar posteriormente nuestro analito en cuestión en los cromatogramas de las muestras de bebidas energizantes.

A partir de los resultados de los cromatogramas, también se puede destacar que las áreas de los picos incrementaban en forma proporcional al aumento de las concentraciones de los patrones. Esto es de esperarse, ya que como se ha mencionado anteriormente, el área debajo de cada pico es proporcional a la concentración de ese componente en la muestra original.

Para establecer el modelo matemático lineal mediante regresión por mínimos cuadrados entre la señal y la concentración, se realizó una recta de calibración para cafeína, graficando área de picos vs. concentración de cafeína en mg/L, tal como se puede observar en la siguiente figura.

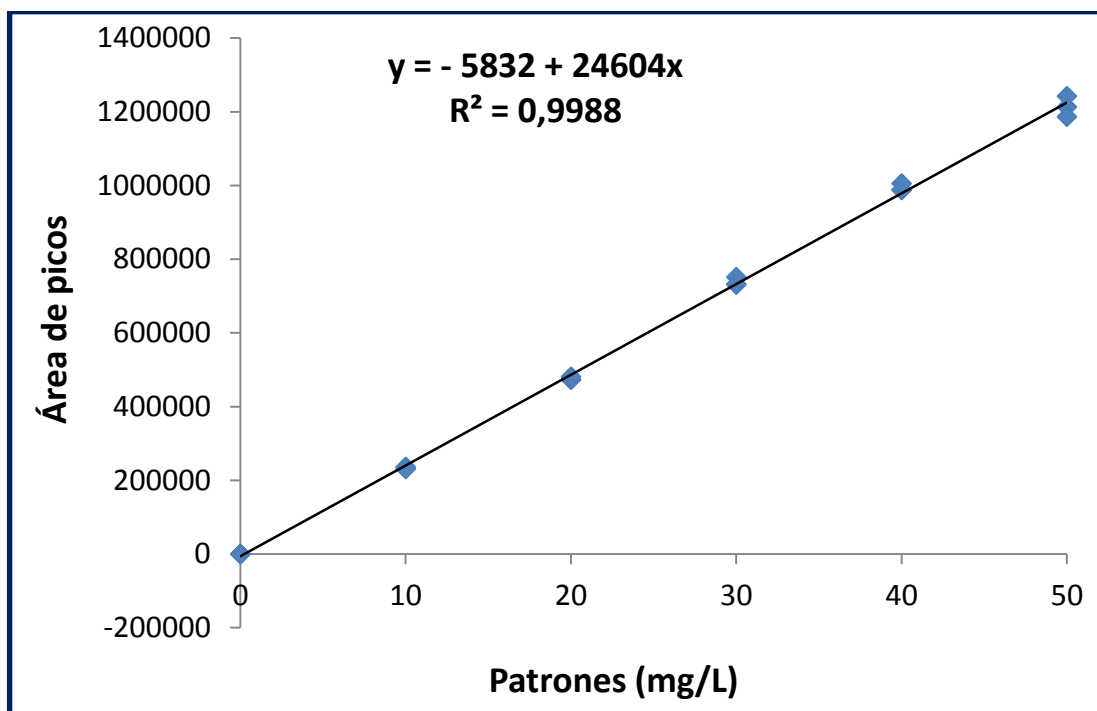


Figura 4.1. Recta de calibración para cafeína

La ecuación de la recta obtenida fue $y = -5832 + 24604 x$, con un $R^2 = 0,9988$. El estadístico R^2 indica que el modelo ajustado explica un 99,88% de la variabilidad en la variable dependiente (señal analítica). Por otra parte se realizó un test de hipótesis mediante el cual se pudo comprobar el grado de ajuste de los puntos experimentales a un modelo lineal basado en el Análisis de la Varianza.

4.1.2 ANOVA para Regresión Lineal

Tabla 4.2. Tabla de ANOVA

<i>Fuente de Varianza</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Modelo	$3,17817 \times 10^{12}$	1	$3,17817 \times 10^{12}$	13527,74	0,0000
Residuo	$3,75899 \times 10^9$	16	$2,34937 \times 10^8$		
Falta de Ajuste	$1,6849 \times 10^9$	4	$4,21225 \times 10^8$	2,44	0,1041
Error Puro	$2,07409 \times 10^9$	12	$1,72841 \times 10^8$		
Total	$3,18193 \times 10^{12}$	17			

Planteo de Hipótesis

Prueba de bondad de ajuste de la regresión

Hipótesis Nula $H_0: y = a + bx$

Hipótesis Alternativa $H_1: y \neq a + bx$

En función de la tabla 4.2., se puede afirmar estadísticamente con un 95 % de confianza que los datos experimentales con los cuales se construyó la recta, se adaptan perfectamente al modelo lineal propuesto, debido a que la relación del estadístico F calculado es menor (2,44) que el F crítico (3,26) para 4 y 12 grados de libertad utilizando un nivel de significancia de 0,05 en tabla de valores F críticos de una cola.

4.2. ETAPA DE PREDICCIÓN

Una vez realizada la primera etapa, correspondiente a la calibración, se procedió a la elución de las muestras de bebidas energizantes, por triplicado y bajo las mismas condiciones de corrida que los patrones. Se calculó el tiempo de retención promedio de la cafeína en las muestras fue de $9,130 \pm 0,283$ minutos.

A través de una interpolación en la ecuación de la recta de calibración, y teniendo en cuenta la dilución 1/10 se hallaron las concentraciones en mg/L para las réplicas y posteriormente el valor *promedio* de la cafeína contenida en cada una de las muestras.

La ecuación de la recta de calibración es de la forma:

$$A = a + bC$$

A = área de pico

C = concentración en mg/L de cafeína de la muestra diluida inyectada

b = pendiente de la recta de calibración

a = ordenada al origen de la recta de calibración

Como ya mencionamos, la ecuación de la recta de calibración obtenida fue **$y = - 5832 + 24604 C$** , donde C es la concentración expresada en mg/L de la muestra diluida inyectada. Para obtener el valor de concentración de la muestra sin diluir se procede:

$$C \text{ (mg/L)} = x \cdot Fd \quad ; \text{ siendo } Fd \text{ el factor de dilución. } Fd= 10$$

$$C \text{ (mg/L)} = x \cdot 10$$

Para analizar los valores promedios de cafeína en las muestras, se compararon cada uno de estos con el respectivo valor ofrecido por los rótulos o etiquetas de las latas comerciales de bebidas energizantes, donde se calcularon las diferencias existentes en torno a estos últimos. En la *Tabla 4.3.* se detallan los resultados obtenidos a partir de los cromatogramas de las muestras.

Tabla 4.3. Datos de las determinaciones cromatográficas de las muestras (por triplicado)

Muestra repetición	t _{retención} (min)	Área de picos	mg/L	mg/L promedio ± sd ^{*1}
V ₁	9,800	511873	210,41	211,25 ± 1,68
V ₂	9,667	511212	210,15	
V ₃	9,533	518669	213,18	
Speed ₁	9,323	478155	196,71	193,12 ± 3,32
Speed ₂	9,383	462019	190,15	
Speed ₃	9,283	467797	192,50	
Sobe Rush ₁	9,233	472172	196,90	197,20 ± 0,35
Sobe Rush ₂	9,183	479121	197,10	
Sobe Rush ₃	9,150	480315	197,59	
X4 ₁	9,050	436009	179,58	179,66 ± 0,16
X4 ₂	9,050	436658	179,84	
X4 ₃	9,000	435936	179,55	
Blue Demon ₁	8,967	502583	206,64	207,35 ± 1,23
Blue Demon ₂	8,950	502563	206,63	
Blue Demon ₃	8,933	507826	208,77	
Block ₁	9,017	449883	185,22	186,35 ± 1,10
Block ₂	8,900	452840	186,42	
Block ₃	8,867	455295	187,42	
Red Bull ₁	8,833	772862	316,49	317,82 ± 1,16
Red Bull ₂	8,800	778152	318,64	
Red Bull ₃	8,800	777400	318,34	

^{*1}Desviación estándar

Se hallaron discrepancias en todas las muestras (*Tabla 4.3.*); en las bebidas *Blue Demon*, *V*, *Red Bull*, se obtuvieron valores por encima de los que indican los rótulos correspondientes, habiendo mayor diferencia en la última bebida mencionada con 17,82 mg/L por encima de lo informado en la lata.

Por el contrario, para las bebidas restantes (*Speed*, *Sobe Rush*, *X4*, *Block*), los valores estuvieron por debajo de los ofrecidos por los rótulos, siendo la muestra *X4* la mayor diferencia con 20,34 mg/L por debajo de lo informado.

Del total de las muestras analizadas, solamente en la de *Sobe Rush* se obtuvo un valor muy cercano a lo indicado en la lata, con una diferencia de 1,61 mg/L por debajo. (*Tabla 4.4.*)

Tabla 4.4. Diferencia entre concentraciones según rótulo y concentraciones halladas analíticamente.

Muestra	mg/L en rótulo	mg/L hallado	Diferencia
V	200	211,25	-11,25
Speed	200	193,12	+6,88
Sobe Rush	200	197,20	+1,61
X4	200	179,66	+20,34
Blue Demon	200	207,35	-7,35
Block	200	186,35	+13,65
Red Bull	300	317,82	-17,82

Para un mejor análisis, se realizaron para cada bebida comparaciones entre los valores de cafeína declarados en sus rótulos y los hallados por medio de la cuantificación por HPLC, frente a al valor máximo permitido según la legislación vigente en La República Argentina (*ver 2.6.4.1*), de 320 mg/L de cafeína en energizantes. Esto se puede visualizar en la *Figura 4.2.* que se presenta a continuación.

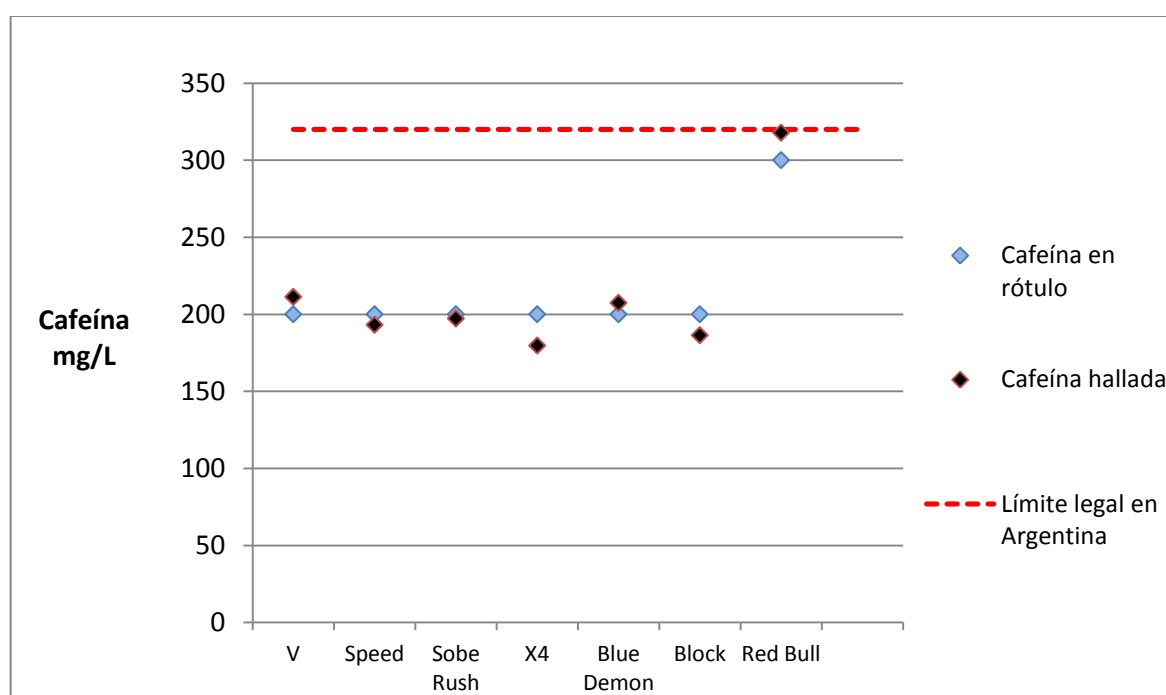


Figura 4.2. Comparación del contenido de cafeína frente al máximo permitido.

4.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Como *Red Bull* fue la única que presentaba valores de cafeína muy cercanos al límite legal en Argentina, estando por debajo del mismo en solo 2,18 ppm, mientras que en las demás los valores hallados fueron lejanos a éste. Por esta razón, se realizó una Prueba o Test de Hipótesis para comparar estadísticamente el valor hallado promedio ($317,82 \pm 1,16$) mg/L de cafeína frente al límite legal de 320 mg/L, para determinar si existen diferencias significativas entre ellos. [51-54]

Para la elección del test adecuado, se consideró lo siguiente:

- Que los datos siguen una distribución normal.
- Que el tamaño de muestra es $n \leq 30$ (en nuestro caso $n = 3$).
- El valor promedio de cafeína hallado para la bebida Red Bull es nuestra media muestral con varianza conocida
- El límite legal para Argentina es nuestra media poblacional con varianza desconocida.

Teniendo en cuenta los puntos anteriores, se seleccionó la estadística de la prueba t, con una distribución *t-Student* y $n-1$ grados de libertad (cabe recordar que si $n > 30$, se puede usar la tabla de la distribución normal z en vez de la t). Se estableció una prueba unilateral (de cola izquierda) con un nivel de significancia $\alpha = 5\% = 0,05$, por ende nuestro nivel de confianza es del 95% ($1 - \alpha = 0,95$).

Las hipótesis formuladas fueron:

Hipótesis nula $H_0 : \mu = 320 \text{ mg/L}$

Hipótesis alternativa $H_1 : \mu < 320 \text{ mg/L}$

A partir de una tabla *t-Student* de una cola se recoge el estadístico $t_{\text{teórico}} = t_{\alpha; n-1}$ para $n - 1 = 2$ grados de libertad y un $\alpha = 0,05$. Su valor equivale a -2,920 (su signo es negativo por tratarse de la cola izquierda de la distribución t). En la *figura 4.3* se puede observar de manera ilustrativa cuáles serían las zonas de aceptación y rechazo para el test.

El estadístico de prueba t se calcula a partir de la siguiente fórmula:

$$t_{prueba} = \frac{\bar{x} - \mu}{\frac{S}{\sqrt{n}}};$$

Siendo \bar{X} : media muestral : 317,82 mg/L cafeína
 S : Desvío estándar : 1,16 mg/L de cafeína
 μ : Límite legal de cafeína, considerado como media poblacional. = 320 mg/L
 n : tamaño de muestra

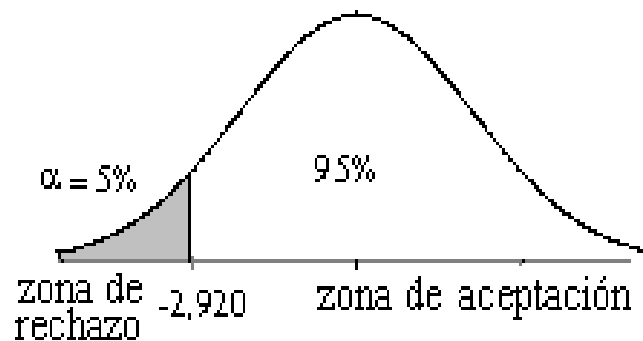


Figura 4.3. Zonas de aceptación y rechazo para t-Student de cola izquierda.

El estadístico de prueba calculado es $t_{prueba} = -3,255$.

Al contrastar los estadísticos, resulta que el $t_{prueba} = -3,255 < t_{teórico} = -2,920$; el t_{prueba} cae dentro de la zona de rechazo, se rechaza la hipótesis nula $H_0 : \mu = 320$ mg/L y se acepta la hipótesis alternativa $H_1 : \mu < 320$ mg/L, con una probabilidad de error (α) del 5%.

Al aceptar H_1 , estamos diciendo que hay diferencias significativas entre \bar{X} y μ , por lo tanto el contenido de cafeína hallado en la bebida Red Bull es menor al límite máximo permitido para Argentina (320 mg/L).

Cabe recordar que la verdad o falsedad de una hipótesis en particular, nunca puede conocerse con certidumbre, a menos que pueda examinarse toda la población. Al rechazar H_0 decimos que la misma es falsa, existe suficiente evidencia estadística para inferir su falsedad y rechazarla. Para aumentar la potencia del test, sería adecuado aumentar el tamaño muestral n .

CAPITULO 5. CONCLUSIONES

5.1. DE LOS COSTOS INSTRUMENTALES

Considerando que hoy en día, encontrar un equipo HPLC en un laboratorio que realice controles de calidad en alimentos es factible, la metodología que hemos empleado ofrece un instrumental de bajo costo relativo al de otras metodologías como las que se mencionaron en la sección 2.9., para la cuantificación de cafeína en bebidas energizantes.

5.2. DEL PRETRATAMIENTO DE LA MUESTRA

El método analítico sobre el cual hemos basado este trabajo tiene la ventaja de no requerir un pretratamiento para muestras que sea costoso, de larga duración y poco accesible. Solamente fue preciso contar con un sonicador por ultrasonido, para la desgasificación de las mismas, posteriormente disueltas en fase móvil para ser cuantificadas mediante HPLC. Una posible variante aún más accesible para su desgasificación, podría ser mediante agitación magnética.

5.3. DEL TAMAÑO MUESTRAL

Para obtener mejores resultados, sería conveniente trabajar con un número mayor de muestras para cada bebida analizada.

5.4. DEL CONTENIDO DE CAFEÍNA

Luego de la cuantificación de cafeína, en ninguna de las muestras de bebidas energizantes analizadas se han encontrado valores de concentraciones de cafeína que coincidan con los expresados en los rótulos de los envases comerciales, incluso muchas de ellas presentaban valores por encima de los informados.

Estos resultados podrían ser de utilidad para las autoridades competentes en el control de calidad de las bebidas energizantes, quienes podrían sancionar a las empresas y hasta incluso retirar del mercado aquellos productos que consideren inapropiados por brindar información falsa en sus rótulos y ser perjudiciales para la salud de los consumidores.

5.5. DE LA COMPARACIÓN CON LOS LÍMITES LEGALES

En todas las bebidas energizantes analizadas se hallaron valores de cafeína muy por debajo del límite máximo establecido por la normativa argentina para este producto (320 mg/L). La bebida Red Bull poseía valores cercanos al legal, pero se comprobó estadísticamente que el contenido de cafeína no alcanzaba dicho valor. A pesar de esto, es necesario llevar a cabo mediante la autoridad correspondiente un control estricto en ésta bebida, ya que sus valores están muy próximos a los 320 mg/L.

5.6. DEL CONSUMO DE OTROS PRODUCTOS CON CAFEÍNA

Como ya hemos mencionado, el consumo de otros productos con significativo contenido de cafeína como lo es el mate en nuestro país, así como las bebidas colas, medicamentos de venta libre (o algunos bajo receta pero que igualmente se venden libres), junto con un inadecuado consumo de las bebidas energizantes, podrían aumentar la probabilidad de alcanzar los valores máximos de cafeína establecido por la OMS y de esta forma elevar el riesgo de intoxicación por cafeína.

CAPITULO 6. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Araque, P.; Casanova, H.; Ortiz, C.; Henao, B.; Pelaez, C. (2007). *Insecticidal activity of caffeine aqueous solutions and caffeine oleate emulsions against Drosophila melanogaster and Hypothenemus hampei*. Journal of Agricultural Food Chemistry. 55, 6918-6922.
- [2] Calle Aznar, S. (2011). *Determinación analítica de la cafeína en diferentes productos comerciales*. Departamento de Química Industrial, Universitat Politècnica de Catalunya. Barcelona, España.
- [3] Tránsito López Luengo, M. (2003). *Drogas con bases xánticas*. Offarm, Farmacia y Sociedad. 22 (4), 126-128.
- [4] Cátedra de Química Orgánica II. (2010). *Guía de estudio dirigido. Guía de trabajos prácticos. Material complementario*. Departamento de Química. Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia. Universidad Nacional de San Luis.
- [5] Pardo Lozano, R.; Alvarez García, Y.; Barral Tafalla, D.; Farré Albaladejo, M. (2007). *Cafeína: un nutriente, un fármaco, o una droga de abuso*. Revista Adicciones. 19 (3), 225-238.
- [6] Página Oficial de la Administración de Alimentos y Drogas (FDA) de Estados Unidos. <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcr/CFRSearch.cfm?fr=182.1180>, Consulta: 30/07/14.
- [7] Peters, J.M. (1967). *Factors affecting caffeine toxicity: a review of the literature*. The Journal of Clinical Pharmacology and the Journal of New Drugs. 7 (7), 131-141.
- [8] Clifford, M.N.; Ramirez Martinez, J.R. (1990). *Chlorogenic acids and purine alkaloids contents of maté (Ilex paraguariensis) leaf and beverage*. Food Chemistry. 35, 13-21.
- [9] Pokolenko, J.J.; Schmalko, M.E. (2003). *Contenido de cafeína y extracto acuoso y su velocidad de extracción en la yerba mate en diferentes épocas de cosecha*. http://www.minagri.gob.ar/site/economias_regionales/produccion_es_regionales/01_origen_vegetal/05_infusiones/trabajos/contenido_de_cafeina.pdf, Consulta: 5/03/14
- [10] Instituto Nacional de la Yerba Mate. INYM. <http://yerbamateargentina.org.ar/> Consulta: 12/11/14
- [11] <http://www.argentina.ar/temas/pais/20285-la-yerba-mate-busca-conquistar--mercados> Consulta: 12/11/14

- [12] <http://www.telam.com.ar/notas/201408/74877-crece-la-exportacion-de-yerba-mate-por-su-uso-como-componente-de-gaseosas-y-energizantes.html>
Consulta: 19/11/14
- [13] Bempong, D.K.; Houghton, P.J.; Steadman, K. (1993). *The xanthine content of guarana and its preparations*. Int J Pharmacog. 31 (3), 175-181.
- [14] Caffeine intake by the U.S. population. (2012). FDA.
<http://www.fda.gov/downloads/AboutFDA/CentersOffices/OfficeofFoods/CFSAN/CF-SANFOIAElectronicReadingRoom/UCM333191.pdf>, Consulta: 15/05/1
- [15] Vademécum Farmacológico de la ANMAT. Página Oficial de la ANMAT
http://www.anmat.gov.ar/aplicaciones_net/applications/consultas/vademecum/vademecum.asp . Consulta: 19/11/14
- [16] Alimentos Funcionales. INTI.
http://www.inti.gob.ar/productos/pdf/mat_alim_funcional.pdf, Consulta:10/09/1
- [17] Energy Drink. Wikipedia. http://en.wikipedia.org/wiki/Energy_drink, Consulta: 11/09/13
- [18] Roussos, A.; Franchello, A.; Flax Marcó, F.; De Leo, M.; Larocca, T.; Barbeito, S.; Rochaix, A.; Jacobez, S., Alculumbre, R. (2009). *Bebidas energizantes y su consumo en adolescentes*. Actualización en Nutrición. 10 (2), 124-129.
- [19] Reissig, C.J.; Strain, E.C.; Griffiths, R.R. (2009). *Caffeinated energy drink: A growing problem*. Drug and Alcohol Dependence. 99, 1-10.
- [20] Giles, G.E.; Mahoney, C.R.; Brunyé, T.T.; Gardony, A.L.; Taylor, H.A.; Kanarek, R.B. (2012). *Differential cognitive effects of energy drink ingredients: Caffeine, taurine, and glucose*. Pharmacology, Biochemistry and Behavior. 102, 569-577
- [21] Hohmann, M.; Felbinger, C.; Christoph, N.; Wachter H.; Wiest, J.; Holzgrabe, U. (2014). *Quantification of taurine in energy drinks using ¹H NMR*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 93, 156-160.
- [22] Glucuronolactone. Wikipedia. <http://en.wikipedia.org/wiki/Glucuronolactone>, Consulta: 07/05/14
- [23] Página oficial de Red Bull. <http://energydrink-ar.redbull.com/origen-de-empresa> _Consulta: 07/05/14
- [24] *Glosario de términos, alcohol y drogas*. (1994). Página oficial de la OMS.http://www.who.int/substance_abuse/terminology/lexicon_alcohol_drugs_spanish.pdf Consulta: 02/03/14.
- [25] Página oficial de la EDE (Energy Drinks Europe).
<http://www.energydrinkseurope.org/webroot/>, Consulta: 03/03/14

- [26] Regulation (EU) no 1169/2011 of the european parliament and of the council. Annex III (4.1 , 4.2). Official Journal of the European Union. (2011). 304, 18-63.
- [27] Australia New Zealand Food Standards Code - Standard 2.6.4 - Formulated Caffeinated Beverages. Ultimate modification Junio/2013.
- [28] Reglamento sanitario de los alimentos DTO. N° 977/96 (D.OF. 13.05.97). Ministerio de Salud, Republica de Chile.
- [29] http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/b683960047457a8b8736d73fbc4c6735/RDC_273_2005.pdf?MOD=AJPERESConsulta: 20/08/2014
- [30] Página oficial de la FDA.
<http://www.fda.gov/ForConsumers/ConsumerUpdates/ucm350570.htm> Consulta: 08/12/13
- [31] Blog oficial de la FDA (FDAVoice)
<http://blogs.fda.gov/fdavoice/index.php/2013/08/defining-boundaries-for-caffeine-in-todays-marketplace/> Consulta: 08/12/13
- [32] Disposición N° 3634. (2005). ANMAT.
http://www.anmat.gov.ar/Legislacion/Alimentos/Disposicion_ANMAT_3634-2005.pdf Consulta: 10/03/14
- [33] Ministerio de Salud, Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca, ANMAT, CONAL. Resolución conjunta n° 90/2013 y n° 121/2013. República Argentina.
<http://infoleg.mecon.gov.ar/infolegInternet/anexos/210000214999/210022/norma.htm> Consulta: 14/05/14
- [34] CAA. Capítulo XVII. Alimentos de régimen o dietéticos. Artículos 1388 y 1388 bis.
- [35] Skoog, D.; Holler, F.; Nieman, T. (2001). *Principios de Análisis Instrumental*. Mc Graw-Hill. 5^o Edición. Madrid, España.
- [36] Rahim, A.A.; Nofrizal, S.; Saad, B. (2014). *Rapid tea catechins and caffeine determination by HPLC using microwave-assisted extraction and silica monolithic column*. Food Chemistry. 147, 262-268.
- [37] Dillenburg Meinhart, A.; Schaper Bizzotto, C.; Ballus, C.A.; Prado, M.A.; Bruns, R.E.; Teixeira Filho, J.; Teixeira Godoy, H. (2010). *Optimisation of a CE method for caffeine analysis in decaffeinated coffee*. Food Chemistry. 120, 1155-1161.
- [38] Rahim, A.A.; Saad, B.; Osman, H.; Hashim, N.H.; Yahya, S.; Talib, K.M. (2011). *Simultaneous determination of diethylene glycol, diethylene glycol monoethyl ether, coumarin and caffeine in food items by gas chromatography*. Food Chemistry. 126, 1412-1416.
- [39] Sereshti, H.; Samadi, S. (2014). *A rapid and simple determination of caffeine in teas, coffees and eight beverages*. Food Chemistry. 158, 8-13.

- [40] Chen, Qing-chuan; Mou, S.; Hou, X.; Ni, Z. (1998). *Simultaneous determination of caffeine, theobromine and theophylline in foods and pharmaceutical preparations by using ion chromatography*. *Analytica Chimica Acta*. 371, 287-296.
- [41] Švorc, L.; Tomčík, P.; Svítková, J.; Rievaj, M.; Bustin, D. (2012). *Voltammetric determination of caffeine in beverage samples on bare boron-doped diamond electrode*. *Food Chemistry*. 135, 1198-1204.
- [42] Gallignani, M.; Marifred Torres, C.A.; Brunetto, M. (2008). *Determination of caffeine in coffee by means Fourier Transform Infrared Spectrometry*. *Rev. Téc. Ing. Univ. Zulia*. 31 (2), 159-168.
- [43] Jafari, M.T.; Rezaei, B.; Javaheri, M. (2011). *A new method based on electrospray ionisation ion mobility spectrometry (ESI-IMS) for simultaneous determination of caffeine and theophylline*. *Food Chemistry*. 126, 1964-1970.
- [44] Belay, A.; Kassahun, T.; Mesfin, R.; Araya, A. (2008). *Measurement of caffeine in coffee beans with UV/vis spectrometer*. *Food Chemistry*. 108, 310-315.
- [45] Chen, Q.; Zhao, J.; Zhang, H.; Wang, X. (2006). *Feasibility study on qualitative and quantitative analysis in tea by near infrared spectroscopy with multivariate calibration*. *Analytica Chimica Acta*. 572, 77-84.
- [46] Zhang, X.; Li, W.; Yin, B.; Chen, W.; Kelly, D.P.; Wang, X.; Zheng, K.; Du, Y. (2013). *Improvement of near infrared spectroscopic (NIRS) analysis of caffeine in roasted Arabica coffee by variable selection method of stability competitive adaptive reweighted sampling (SCARS)*. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 114, 350-356.
- [47] Sinija, V.R.; Mishra, H.N. (2009). *FT-NIR spectroscopy for caffeine estimation in instant green tea powder and granules*. *LWT-Food Science and Technology*. 42, 998-1002.
- [48] Jenkins, A.J. (1996). *Identification and quantitation of alkaloids in coca tea*. *Forensic Science International*. 77, 179-189.
- [49] Standardized analytical methods for analysis of active ingredients in functional foods. Página oficial del Institute for Reference Materials and Measurements (IRMM), European Commission.
https://irmm.jrc.ec.europa.eu/activities/functional_foods_incl_antioxidative/Documents/eur21831enannex.pdf, Consulta: 22/05/14
- [50] Harris, D.C. (2001). *Análisis Químico Cuantitativo*. Editorial Reverté. 2º Edición. Barcelona, España.

- [51] Maronna, R.A. (1995). *Probabilidad y Estadística Elementales para Estudiantes de Ciencias*. (Versión Digital). Facultad de Ciencias Exactas Universidad Nacional de La Plata, Argentina.
- [52] Walpole, R.E.; Myers, R.H.; Myers, S.L.; Ye, K. (2012). *Probabilidad y estadística para ingeniería y ciencias*. Pearson Educación. 9° Edición. México.
- [53] Ruíz Díaz, F.; Barón López, F.J.; Sánchez Font, E.; Parras Guijosa, L. (2005). *Bioestadística: métodos y aplicaciones*. Editorial Paraninfo. Facultad de Medicina, Universidad de Málaga, España.
<http://www.bioestadistica.uma.es/baron/bioestadistica.pdf> Consulta: 23/10/14
- [54] Maidana Petersen, M.; Zannier, M.S.; Williner, M.R. (2011). *Bebidas energizantes comercializadas en la ciudad de Santa Fe (Argentina): cuantificación de sus componentes y cumplimiento de la legislación*. Revista FABICIB. 15; 33-46.