

Comunicación Breve

Bebidas energizantes: desarrollo de un método por electroforesis capilar para la identificación y cuantificación de cafeína y vitaminas hidrosolubles.

RECIBIDO: 25/06/2009

ACEPTADO: 03/09/2009

Maidana Petersen, Magdalena • Williner, María Rosa.1

¹ Bromatología y Nutrición, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina. C.C. 242. 3000 Santa Fe, Argentina. Teléfono: (342) 457 5211 Fax: 54-342-4575221. E-mail: williner@fcb.unl.edu.ar

RESUMEN: Se desarrolló un método para la determinación simultánea de cafeína y vitaminas hidrosolubles en bebidas energizantes por electroforesis capilar. Este tipo de bebidas son utilizadas por sus efectos estimulantes sobre el sistema nervioso central. Sus principales componentes son la cafeína, hidratos de carbono, vitaminas hidrosolubles y taurina. La separación de los componentes estudiados se llevó a cabo utilizando capilares de sílice desnudos y detección UV. Las curvas de calibración fueron lineales con $R^2 > 0,9987$. La desviación estándar relativa (RSD%) fue menor a 1,4% y la recuperación fue entre 95-102% para la cafeína, 97,5-103,5% para la riboflavina y 97,5-101,6% para el ácido pantoténico. El método analítico propuesto es adecuado para análisis de control de bebidas energizantes por ser preciso, exacto y sencillo.

PALABRAS CLAVE: bebidas energizantes, electroforesis capilar, cafeína, vitaminas hidrosolubles.

SUMMARY: *Energy drinks: development of a capillary electrophoresis method for identification and quantification of caffeine and water-soluble vitamins.*

A method for simultaneous determining caffeine and water-soluble vitamins in energy drinks by capillary electrophoresis with UV detection was developed. Energy drinks are a widely used group of beverages known for their stimulant effects on central nervous system. The main components of energy drinks are caffeine, carbohydrates, water-soluble vitamins and taurine. Separation of components was carried out using uncoated fused-silica capillaries and UV detection. The calibration curves were lineal with $R^2 > 0.9987$. The relative standard deviations (RSD%) were less than 1.4 % and the recovery were 95-102% for caffeine, 97.5-103.5% for riboflavin and 97.5-101.6% for pantotenic acid. The analytical method proposed is adequate for control analysis in energy drinks, because it is accurate, precise and simple.

KEYWORDS: energy drinks, capillary electrophoresis, caffeine, water-soluble vitamins.

Introducción

Durante los últimos años las denominadas “bebidas energizantes” (BE) han ganado gran popularidad. En un principio, entre deportistas, pero luego se extendió a oficinistas, ejecutivos y estudiantes, para combatir la fatiga del trabajo y el estudio. Pero, para las empresas de BE, el mercado más importante lo constituyen los jóvenes, ya que son consumidas en grandes cantidades en los locales bailables con el fin de aumentar la vigilia, el rendimiento físico y la diversión. Muchos las usan para saborizar bebidas alcohólicas. Estos productos tuvieron un gran crecimiento (1). Se espera que el consumo mundial alcance los 4.100 millones de litros en 2009 (2).

La composición habitual se basa en vitaminas solubles en agua, hidratos de carbono, cafeína y taurina (3). Las vitaminas se incluyen por su participación como coenzimas en las funciones biológicas normales. La cafeína por su bien conocido efecto estimulante sobre el sistema nervioso central (CNS), que induce sensaciones de bienestar y alerta, muestra mejoras significativas en el rendimiento mental. La taurina se agrega por estar involucrada en una serie de procesos fisiológicos cruciales incluyendo la modulación del flujo de calcio y la excitabilidad neuronal, la osmorregulación, la desintoxicación y la estabilización de la membrana. Varias investigaciones se han publicado indicando el efecto de este tipo de bebidas sobre el CNS, que muestra mejoras significativas en el rendimiento mental (rapidez de reacción, concentración y memoria) (4, 5, 6) y la reducción del estado de somnolencia (7, 8). El consumo de estas bebidas no se recomienda para las personas con enfermedades del corazón, problemas con la presión sanguínea, en el embarazo, etc.

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), el término más adecuado para este tipo de bebidas, es el de “estimulantes”, más que “energizantes”, pues estas últimas son en realidad bebidas utilizadas para proveer al organismo alto nivel de energía proveniente de carbohidratos. Sin embargo, estos términos son utilizados a menudo de forma indiferente. Mientras que las bebidas deportivas son diseñadas principalmente para reponer fluidos y proveer carbohidratos, las bebidas energizantes son comercializadas por su efecto estimulante mental (9).

Profesionales de la Secretaría de Programación para la Prevención de la Drogadicción y la Lucha contra el Narcotráfico (SEDRONAR) informan que médicos especialistas de diversos hospitales, comunican problemas cardíacos por el consumo de estas bebidas asociado con alcohol. La ingesta de más de dos latas de bebidas energizantes proporciona una dosis tóxica de cafeína, que provoca una peligrosa estimulación del sistema nervioso y cardiovascular. Contrarresta además, la ebriedad y somnolencia provocada por el consumo de alcohol, permitiendo continuar con la ingesta hasta llegar a una peligrosa intoxicación alcohólica y estado de coma (1, 10).

Por lo dicho anteriormente, la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT) en su disposición 3634/2005, obliga a las empresas productoras de bebidas energizantes a reducir la cantidad de cafeína en ese producto de 35 a 20 miligramos por cada 100 mililitros (11). Es de suma importancia controlar si se cumple esta disposición, tanto en las de manufactura nacional como en las importadas, ya que en los países de origen se permiten cantidades de cafeína sustancialmente mayores a los establecidos por nues-

tras autoridades. Se exige, además, que en las latas se inscriba la leyenda: "El consumo con alcohol es nocivo para la salud". Es necesario, por lo tanto, disponer de metodologías analíticas que permitan controlar los niveles de estos compuestos, fundamentalmente cafeína.

Se han publicado trabajos para la cuantificación simultánea de cafeína y vitaminas hidrosolubles por cromatografía planar múltiple con confirmación por espectroscopia de masa (2), por desorción/ionización láser asistido por matriz mediada por surfactantes (12), por cromatografía planar (HPTLC) acoplada a detección densitométrica (13), por lo que se propone desarrollar un método simple y rápido como la electroforesis capilar (EC). Con esta técnica se han publicado trabajos que determinan cafeína (14, 15, 16, 17, 18) y vitaminas hidrosolubles (19, 20, 21) bajo diferentes condiciones electroforéticas y no en forma simultánea.

La EC es una microtécnica analítica separativa de muy alta resolución basada en el movimiento diferencial de especies cargadas por atracción o repulsión en un campo eléctrico dentro de un capilar. Cuando la separación se realiza en un electrolito con capacidad amortiguadora, la modalidad se denomina electroforesis capilar en zona (CZE), pero si al electrolito se le agrega un surfactante a una concentración superior a la micelar crítica, se tiene un modo especial de EC, la cromatografía capilar electrocinética micelar (MEKC) donde el mecanismo de separación se basa además, en la distribución de los solutos en dos fases: el electrolito y la fase micelar (22, 23, 24). Las separaciones por EC ofrecen más facilidad y velocidad que otras técnicas separativas ampliamente difundidas como HPLC. Se elimina el problema de la toxicidad de los solventes y su costo, pues emplea solucio-

nes acuosas en su gran mayoría con muy baja concentración iónica. Consume además microlitros de muestra y volúmenes de las soluciones electrolíticas del orden de los nanolitros, lo que la hacen una técnica altamente versátil y económica (25).

La obtención de resultados óptimos, depende de la correcta elección de los parámetros que afectan la velocidad de la separación y la resolución de la muestra. El tiempo de separación depende de la naturaleza y pH del electrolito y de la longitud del capilar.

Materiales y métodos

Reactivos

Las soluciones patrones se prepararon a partir de cafeína, tiamina, riboflavina, biotina, ácido pantoténico y cianocobalamina (Merck, Ginebra, Suiza). En la preparación de los electrolitos se emplearon tetraborato de sodio ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$), ácido fosfórico (H_3PO_4), hidróxido de sodio (NaOH) y fosfato diácido de potasio (KH_2PO_3), adquiridos en la firma Cicarelli (San Lorenzo, Argentina), como así también hidroximetilaminometano (Tris) y el surfactante dodecilsulfato de sodio (SDS) (Merck, Ginebra, Suiza). Todos los reactivos fueron de calidad grado analítico. El agua fue purificada utilizando el sistema Milli-Q de Millipore (Bedford, MA, USA).

Soluciones patrones, muestras comerciales y soluciones de electrolitos.

Todas las soluciones estándares fueron preparadas por disolución en agua calidad Milli-Q a una concentración de 500 mg L⁻¹.

Las bebidas energizantes fueron adquiridas en el mercado local (Santa Fe, Argentina). Las muestras fueron desgasificadas por ultrasonido. Todas las soluciones patrones y las muestras, fueron filtradas a través

de filtro de 0,2 μm de poro (Sartorius) antes del análisis por electroforesis capilar.

Las soluciones de diferentes concentraciones de borato pH=9,2, fosfórico pH = 2,2 y Tris pH=2,5, fueron preparadas en el día, filtradas y desgasificadas antes de su uso.

Instrumentos

Para determinar la longitud de onda de detección de la cafeína y de las vitaminas hidrosolubles, se realizaron los espectros de absorción de cada una de las soluciones patrones en un espectrofotómetro UV/Vis Lambda 20 (Perkin-Elmer, Norwalk, USA), usando cubetas de cuarzo de 1,00 cm.

Los electroferogramas se obtuvieron con un equipo de electroforesis capilar SpectraPHORESIS 100 con detector UV variable (Termo Separation Products, San José, California, USA). Los capilares de sílice de 75 μm de diámetro interno, 70 cm de longitud total y 42 cm de longitud de detección fueron provistos por MicroSolv Technology Corporation (Eatontown, NJ, USA). El voltaje aplicado fue de 12 Kv a 25 °C. El capilar fue acondicionado diariamente antes de su uso con NaOH 0,1 M durante 10 minutos, seguido de un lavado con agua MilliQ por 10 minutos y finalmente con el electrolito de corrida por 10 minutos. Posteriormente, entre corridas, el capilar fue lavado 5 minutos con NaOH 0,1 M, 5 minutos con agua MilliQ y 3 minutos con el electrolito. Las soluciones patrones y las muestras fueron inyectadas a la columna aplicando vacío durante 1 segundo.

Análisis estadístico

Los valores obtenidos para cafeína, riboflavina y ácido pantoténico en bebidas energizantes se expresaron como las medias \pm SEM.

Para comparar los valores hallados con los declarados en el rótulo se aplicó un test estadístico de hipótesis de igualdad de medias con un grado de confianza del 95%.

Resultados y discusión

Selección de la longitud de onda de trabajo

Se realizaron los espectros individuales de las soluciones patrones de cafeína, tiamina, riboflavina, biotina, ácido pantoténico y cianocobalamina en el rango de longitudes de onda correspondiente al UV (200 a 380 nm). Para la cafeína, principal componente a ser cuantificado, el pico de absorción fue a 210 nm. Las vitaminas que presentaron absorbancia a esa longitud de onda fueron la riboflavina y el ácido pantoténico. Como los otros analitos no absorben a 210 nm, no es posible determinarlos en forma simultánea con la cafeína. Por lo tanto, se trabajó en el desarrollo de un método que permita la separación y cuantificación simultánea de estas 3 sustancias. Las otras vitaminas deberán cuantificarse bajo otras condiciones.

Separación mediante CZE

Se realizaron corridas electroforéticas de la mezcla de los estándares cafeína, riboflavina y ácido pantoténico a diferentes concentraciones de electrolito borato, fosfato y Tris en función de información hallada en la bibliografía para cafeína y para vitaminas hidrosolubles, respectivamente. La mejor separación de los 3 picos se obtuvo con borato 30 mM pH = 9,2, pero con poca resolución (Fig. 1). Para lograr la separación de la riboflavina y el ácido pantoténico, se agregó al borato 30 mM pH = 9,2, un surfactante como el SDS, por lo que la metodología pasó de ser electroforesis capilar de zona (CZE) a cromatografía electrocinética capilar micelar (MEKC).

Figura 1: Electroferograma de los estándares de cafeína, riboflavina y ácido pantoténico. Electrolito: borato 30 mM.

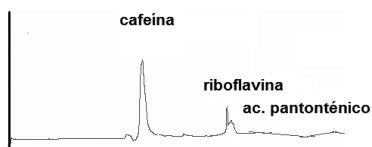


Figura 2: Electroferograma de los estándares de cafeína, riboflavina y ácido pantoténico. Electrolito: borato 30 mM + SDS 20 mM.

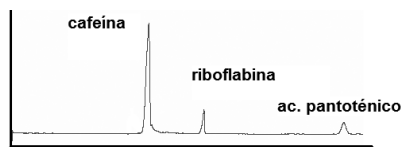


Tabla 1: Resultados de la calibración por electroforesis capilar, precisión y exactitud.

Datos estadísticos	Cafeína	Riboflavina	Ácido pantoténico
Rango (mg L ⁻¹)	0 - 400	0 - 60	0 - 100
Pendiente	0,0607 ± 0,0067	0,2247 ± 0,0439	0,1320 ± 0,0120
Ordenada al origen	-0,1040 ± 0,1759	-0,4771 ± 0,0846	-0,3854 ± 0,3178
R ²	0,9987	0,9989	0,9996
RSD %	1,40	1,15	0,59
Recuperación %	95,0-102,0	97,5-103,5	97,5-101,6

Separación mediante MECK

Al borato 30 mM pH = 9,2 se le adicionó SDS a diferentes concentraciones (entre 20 y 60 mM).

La mejor resolución de picos en el menor tiempo se obtuvo con la solución borato 30mM + SDS 20 mM (Fig. 2).

Linealidad

Con las condiciones de trabajo establecidas se realizaron las curvas de calibración para cafeína, riboflavina y ácido pantoténico. Se trabajó por triplicado con cinco concentraciones aplicando diferentes volúmenes de la solución estándar, según las recomendaciones de la Conferencia Internacional de Armonización (26). Las gráficas de calibración mostraron ser lineales con coeficientes de determinación $R^2 > 0,9987$ (Tabla 1).

Precisión y exactitud

La precisión fue evaluada por medio de la desviación estándar relativa (RSD) o coeficiente de variación. Los valores obtenidos para los puntos medios de las curvas de calibración, que indican la precisión del sistema, fueron 1,40 % para cafeína, 1,15 % para riboflavina y 0,59 % para ácido pantoténico. Los ensayos de recuperación, para determinar la exactitud del método, se encuentran dentro de los siguientes valores: 95-102% para cafeína, 97,5-103,5% para riboflavina y 97,5-101,6% para ácido pantoténico (Tabla 1). Tanto la precisión como la exactitud del método desarrollado, son comparables a los hallados con otros métodos separativos evaluados por otros autores (2, 13, 14).

Límite de detección y límite de cuantificación

Los límites de detección y cuantificación se calcularon en base a las curvas de calibración (26) y se verificaron experimentalmente. Los límites de detección y cuantificación fueron 1,02 y 3,40 para la cafeína, 0,23 y 0,76 para la riboflavina, y 2,28 y 7,60 para el ácido pantoténico, respectivamente.

Análisis de muestras comerciales

Se analizaron por triplicado 5 marcas de bebidas energizantes comercializadas en Argentina, 1 importada (BE1) y 4 producidas en el país (BE2, BE3, BE4 y BE5). En la figura 3 se muestra un electroferograma de la BE2. En todas las muestras, los picos correspondientes a cafeína, riboflavina y ácido pantoténico fueron confirmados por adición de cada estándar en sucesivas corridas electroforéticas. Las concentraciones de los compuestos estudiados en las muestras se presentan en la Tabla 2.

Cuando se compara estadísticamente por medio del test de hipótesis la cantidad de cafeína declarada en el rótulo de cada BE con lo hallado analíticamente, se obtiene en todos los casos una probabilidad $< 0,05$ para un intervalo de confianza del 95%, lo que indica que la diferencia entre lo declarado y lo hallado es significativa. En el caso de la riboflavina, sólo en la BE4 se acepta la hipótesis nula por presentar una probabilidad $p \geq 0,05$. Para el ácido pantoténico, las BE1 y BE2 presentan una probabilidad $p \geq 0,05$, por lo que se acepta la hipótesis nula para el mismo intervalo de confianza. En las otras BE la diferencia entre lo declarado en el rótulo y lo cuantificado es significativa.

Como se puede observar la BE1 supera el contenido de cafeína permitido por la ANMAT (200 mg L⁻¹). Cabe señalar que la

empresa importadora ha presentado un recurso de amparo para poder comercializar dicha bebida a pesar de superar el límite estipulado por el organismo de control. Además, en esta misma bebida se halló y cuantificó riboflavina que no está declarada en el rótulo. Este hallazgo coincide con lo publicado por Aranda y col. (2) que identificaron y cuantificaron cafeína y riboflavina mediante cromatografía planar múltiple con confirmación por espectroscopia de masa.

Por otro lado, todas las bebidas nacionales analizadas se ajustan a las disposiciones establecidas por la ANMAT.

Conclusiones

La electroforesis capilar ofrece un método alternativo para determinar simultáneamente cafeína, riboflavina y ácido pantoténico en bebidas energizantes. La precisión y exactitud del método, sumados a la simplicidad del análisis y de la preparación de las muestras hacen que sea un método útil de rutina y control. El empleo de volúmenes pequeños de electrolito de corrida, que además no es tóxico, contribuye a su aceptación por el bajo costo operativo y bajo impacto en la contaminación ambiental, tan discutida en otros métodos analíticos separativos.

Figura 3: Electroferograma de la BE 2. Electrolito: borato 30 mM + SDS 20 mM.

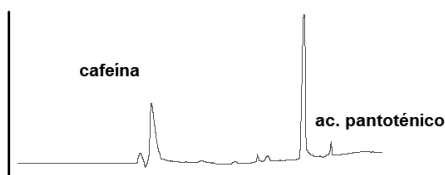


Tabla 2: Análisis de muestras comerciales (n = 3) comparado con los valores declarados en el rótulo.

	Cafeína (mg L-1)		Riboflavina (mg L-1)		Ácido pantoténico (mg L-1)	
	Valor declarado	Valor hallado	Valor declarado	Valor hallado	Valor declarado	Valor hallado
BE 1	320,00	325,14 ± 0,85	-	7,40 ± 0,04	24,00	23,20 ± 0,60
BE 2	200,00	136,28 ± 0,60	-	ND*	13,30	12,23 ± 0,40
BE 3	192,00	160,00 ± 0,80	1,36	ND	8,00	12,48 ± 1,17
BE 4	200,00	120,40 ± 2,56	2,10	2,00 ± 0,02	10,00	13,76 ± 0,40
BE 5	200,00	153,34 ± 8,05	-	ND	12,00	ND

Nota: Estos resultados fueron presentados en el "XII Encuentro de Jóvenes Investigadores de la Universidad Nacional del Litoral y III Encuentro de Jóvenes Investigadores de Universidades de Santa Fe", desarrollado en el año 2008, bajo el título "Bebidas energizantes: desarrollo y validación de una metodología por cromatografía capilar electrocinética micelar (MEKC) para la identificación y cuantificación de cafeína y vitaminas hidrosolubles". Este trabajo recibió una Mención Especial en el concurso de trabajos presentados en el Área Temática Ciencias Exactas

Referencias Bibliográficas

- Nadra E. 2005. Bebidas energizantes ¿Suplementos dietarios o sustancias psicoestimulantes? Hablemos, 14-17.
- Aranda, M.; Morlock, G. 2006. Simultaneous determination of riboflavin, pyridoxine, nicotinamide, caffeine and taurine in energy drinks by planar chromatography-multipledetection with confirmation by electrospray ionization mass spectrometry. J. Chromatogr. A. **1131**: 253-260.
- Melgarejo M. 2004. El verdadero poder de las bebidas energéticas. Énfasis Alimentación. **6**: 98-105.
- Alford, C.; Cox, H.; Wescott, R. 2001. The effects of red bull energy drink on human performance and mood. Amino Acids. **21**, **2**: 139-150.
- Seidl, R.; Peyrl, A.; Nicham, R.; Hauser, E. (2000). A taurine and caffeine-containing drink stimulates cognitive performance and well-being. Amino Acids. **19**: 635-642.
- Rao, A.; Hu, H.; Nobre, A. 2005. The effects of combined caffeine and glucose drinks on attention in the human brain. Nutr. Neurosc. **8**, **3**: 141-153.
- Reyner, L.; Horne, J. 2000. Early morning driver sleepiness: effectiveness of 200 mg caffeine. Psychophysiol. **37**, **2**: 251-256.
- Reyner, L.; Horne, J. 2002. Efficacy of a 'functional energy drink' in counteracting driver sleepiness. Physiol. Behav. **75**, **3**: 331-335.
- Améndola, C.; Iannilli, I.; Restuccia, D.; Santini, I.; Vinci, G. 2004. Multivariate statistical analysis comparing sport and energy drinks. Innov. Food Sc. Emerg. Technol. **5**: 263-267.
- Marczinski, C.A.; Fillmore, M.T. 2006. Clubgoers and Their Trendy Cocktails: Implications of Mixing Caffeine Into Alcohol on Information Processing and Subjective Reports of Intoxication. Exp. Clin. Psychopharmacol. **14**, **4**: 450-458.

11. Disposición 3634/2005. Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT). <http://www.anmat.gov.ar>
12. Grant, D.C.; Helleur, R.J. 2008. Simultaneous analysis of vitamins and caffeine in energy drinks by surfactant-mediated matrix-assisted laser desorption/ionization. *Anal Bioanal Chem.* 391, **8**: 2811-2818.
13. Abourashed, E.A.; Mossa, J.S. 2004. HPTLC determination of caffeine in stimulant herbal products and power drinks. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **36**: 617-620.
14. Walker, J.C.; Zaugg, S.E.; Walker, E.B. 1997. Analysis of beverages by capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A.* **781**: 481-485.
15. Sombra, L.L.; Gómez, M.R.; Olsina, R.; Martínez, L.D.; Silva, M.F. 2005. Comparative study between capillary electrophoresis and high performance liquid chromatography in "guarana" based phytopharmaceuticals. *J Pharm Biomed Anal.* **36**: 989-994.
16. Maeso, N.; del Castillo C.; Cornejo, L.; García-Acicollar; M., Alguacil L.F.; Barbas C. 2006. Capillary electrophoresis for caffeine and pyroglutamate determination in coffees: Study of the in vivo effect on learning and locomotor activity in mice. *J Pharm Biomed Anal.* 41, **4**:1095-1100.
17. Zhao, Y.; Lunte, C.E. 1997. Determination of caffeine and its metabolites by micellar electrokinetic capillary electrophoresis. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 688, **2**:265-274.
18. Hyötyläinen, T.; Sirén, H.; Riekkola, M.L. 1996. Determination of morphine analogues, caffeine and amphetamine in biological fluids by capillary electrophoresis with the marker technique. *J Chromatogr A.* 735, **2**: 439-447.
19. Fotsing, L.; Fillet, M.; Bechet, I.; Hubert, P.; Crommen, J. 1997. Determination of six water-soluble vitamins in a pharmaceutical formulation by capillary electrophoresis. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 15, **8**: 1113-1123.
20. Fotsing, L.; Boulanger, B.; Chiap, P.; Fillet, M.; Hubert, P.; Crommen, J. 2000. Multivariate optimization approach for the separation of water-soluble vitamins and related compounds by capillary electrophoresis. *Biomed. Chromatogr.* 14, **1**: 10-11.
21. Delgado-Zamarreno, M.M.; Gonzalez-Maza, I.; Sanchez-Perez, A.; Carabias-Martinez, R. 2002. Separation and simultaneous determination of water-soluble and fat-soluble vitamins by electrokinetic capillary chromatography. *J. Chromatogr. A.* **953**: 257-262.
22. Grossman, P.D.; Colburn, J.C. 1992. "Capillary electrophoresis. Theory and Practice". Academic Press, Inc. (San Diego).
23. Guzmán, N. 1993. "Capillary Electrophoresis Technology". Marcel Dekker, Inc. (New York), 857-995.
24. Baker, D.R. 1995. "Capillary Electrophoresis". John Wiley & Sons, Inc. (New York), 54-105.
25. Castagnino, J.M. 1999. Electroforesis capilar. *Acta Bioquím. Clín. Latinoam.* 33, **3**: 297-329.
26. International Conference on Harmonisation. 2005. ICH Harmonised tripartite guideline validation of analytical procedures: text and methodology, Q2(R1).