



Universidad
Zaragoza

Proyecto Fin de Carrera

Estudio comparativo del contenido de cafeína en
diferentes bebidas

Autor

Ainhoa Sancho Cubero

Director

Carlos Enrique Rubio Navarro

Escuela de Ingeniería y Arquitectura
2013



PROYECTO FIN DE CARRERA

ESTUDIO COMPARATIVO DEL CONTENIDO DE CAFEÍNA EN DIFERENTES BEBIDAS

AINHOA SANCHO CUBERO

DIRECTOR: CARLOS E. RUBIO NAVARRO

ESPECIALIDAD: QUÍMICA INDUSTRIAL

CONVOCATORIA: MARZO DE 2013



RESUMEN

En el presente proyecto se realiza un estudio comparativo de los niveles de cafeína que se encuentran en diferentes tipos de bebidas, tales como refrescos de cola, refrescos de té y bebidas energéticas, comparando además los niveles de sacarina y ácido benzoico que están presentes en algunos de los refrescos. Entre las muestras analizadas, se encuentran las bebidas más conocidas como Coca-Cola, Pepsi, Nestea, Lipton o Red Bull.

En el laboratorio se emplea un equipo cromatográfico de alta resolución (*HPLC*), con un detector *UV/Vis* a una longitud de onda fijada en los 254 nm. Para llevar a cabo la separación, se usa una columna del tipo C18, de 100 mm x 4,6 mm x 5,0 µm y elución en modo isocrático, usando una fase móvil compuesta por el 80 % de ácido acético tamponado a un pH 4,00 y 20 % en volumen de metanol; esta fase móvil atraviesa el sistema a un flujo constante de 1,00 mL/min.

Este método permite cuantificar los diferentes compuestos que se encuentran en las bebidas y representar los resultados de forma estadística para comprobar las diferencias que existen entre unas marcas y otras, así como entre los diferentes grupos de bebidas.

A partir de estos resultados se puede afirmar que éste es un método óptimo para este estudio estadístico.

TABLA DE CONTENIDOS

OBJETIVO	1
INTRODUCCIÓN	3
CAFEÍNA	4
SACARINA	6
ÁCIDO BENZOICO.....	7
REFRESCOS DE COLA.....	8
REFRESCOS DE TÉ	9
BEBIDAS ENERGÉTICAS	10
EXPERIMENTAL	12
MATERIALES	13
REACTIVOS	14
DISOLUCIONES.....	14
EQUIPOS	15
Cromatografía	15
Espectrofotometría	16
DESARROLLO Y RESULTADOS.....	16
Elección de condiciones	16
Justificación de la longitud de onda elegida	16
Condiciones cromatográficas.....	17
Bebidas de cola	21
Refrescos de té	25
Bebidas energéticas	28
Muestras que contienen ácido benzoico.....	31
Resumen comparativo de las muestras	32
CONCLUSIONES.....	34
BIBLIOGRAFÍA	36
ÍNDICE DE TABLAS	39
ÍNDICE DE FIGURAS.....	41

OBJETIVO

Este proyecto abarca en primer lugar el estudio teórico de los principales componentes que constituyen los ingredientes de distintas bebidas con cafeína y una recopilación de información de las bebidas que se analizan para determinar esta cantidad de cafeína como son las bebidas de cola, los refrescos de té y las bebidas energéticas.

El objetivo de este proyecto es determinar, por medio de técnicas cromatográficas, la cantidad de cafeína en las distintas bebidas, teniendo en cuenta otras sustancias como sacarina y ácido benzoico a través de su determinación cuantitativa.

Se analizarán las distintas muestras mediante el uso de un cromatógrafo líquido de alta resolución, con un detector UV/VIS.

Los resultados de estos análisis serán sometidos a una comparativa estadística de las muestras, de tal forma que se comprueben los resultados con datos previamente publicados por distintos autores y comparando unas marcas con otras.

INTRODUCCIÓN

La determinación de cafeína tiene 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. Debido a su variada presencia existen diferentes técnicas de análisis. A continuación, en la Tabla 1 se resumen algunas técnicas que se han utilizado para determinar este compuesto. (1)

Técnicas		Muestra
Métodos de separación	HPLC	Chocolate, café, té, bebidas cola, bebidas energéticas
	GC	Café, té y bebidas de cola
	TLC	Café, té y bebidas de cola
	SFC	Café instantáneo
	CE	Bebidas de café, té, cola y cacao
Métodos espectroscópicos	UV-Vis	Café, té, bebidas cola, bebidas energéticas
	IR	Café, té
	RMN	Café, té
Técnicas electroquímicas	Potenciometría Conductimetría	Café, té, bebidas cola

Tabla 1. Técnicas para la determinación de la cafeína

De todas las técnicas enumeradas, la más empleada en la determinación de cafeína es la cromatografía de líquidos de alta resolución, más conocida por su acrónimo inglés *HPLC*, la cual constituye una técnica muy utilizada para la separación y determinación de compuestos poco volátiles. Esta técnica comenzó a desarrollarse durante los años sesenta a partir de la clásica cromatografía líquida en columna, luego se mejoró la tecnología de las columnas y de los componentes instrumentales. A principio, las siglas *HPLC* significaban *High-Pressure Liquid Chromatography*, reflejando las elevadas presiones de operación generadas por las primeras columnas. Posteriormente, en los años setenta, se convirtió el nombre a *High Performance Liquid Chromatography* recalando las separaciones efectivamente alcanzadas. Esta técnica permite la separación completa de los tres componentes (sacarina, cafeína y ácido benzoico), y los resultados se cuantifican en menos de quince minutos. (2; 3; 4)

A parte de cuantificar la cafeína, en el presente trabajo se determinan la sacarina y el ácido benzoico, que son otros compuestos que principalmente forman las bebidas de cola, las bebidas de té y las bebidas energéticas que se han analizado en este proyecto. A continuación se explica, de forma más detallada, cada bebida y los principales compuestos.

CAFEÍNA

La cafeína, (1,3,7-trimetilxantina) es un alcaloide natural que se encuentra en determinadas plantas y puede producirse sintéticamente en el laboratorio. La cafeína, en su estado natural, se localiza en las hojas, semillas y frutos y actúa como un pesticida natural que paraliza y mata ciertos insectos que se alimentan de las plantas. Entre 60 y 80 especies de plantas distintas generan cafeína.(4; 5; 6)

La cafeína se añade a las bebidas refrescantes como un agente saborizante. También se encuentra a menudo como ingrediente en los suplementos de pérdida de peso y ampliamente utilizado en las bebidas deportivas como estimulante del sistema central nervioso. Por otro lado, también se encuentra en bebidas de guaraná, preparaciones herbales, analgésicos y, en menor proporción, en algunos preparados de repostería con chocolate. (4; 6)

La cafeína en el ser humano es un estimulante y produce cambios en el metabolismo de las grasas. La cafeína es cristalina, blanca y con un sabor muy amargo. La cafeína es hidrosoluble, por lo que, en condiciones normales, se elimina totalmente por la orina. La cafeína es el estimulante más consumido en el mundo, debido a su popularidad en el café y en otras bebidas energéticas. También es conocida como guaranina cuando se encuentra en la guaraná, mateína cuando se encuentra en el mate, y como teína cuando se encuentra en el té.(1; 6)

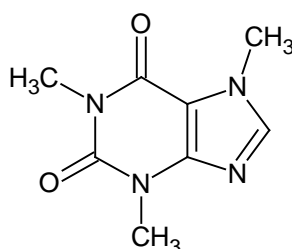


Figura 1. Molécula de cafeína

El consumo moderado de cafeína no está relacionado con ninguna enfermedad en niños, adolescentes o adultos, pero en cantidades excesivas sería perjudicial para la salud; por lo tanto, no se recomienda superar la ingesta de 300 mg/día de cafeína (tres o cuatro cafés), sabiendo que el consumo excesivo de cafeína puede llevar a las personas sufrir frecuencia cardíaca rápida, micción excesiva, náuseas, vómitos, inquietud, ansiedad, depresión, temblores y dificultad para dormir. No obstante, se clasifica como una droga de abuso por parte del Comité Internacional Olímpico (COI) cuando está presente en la orina a niveles de concentración más grande de 12 µg/mL.(1; 7)

La cafeína tiene propiedades importantes, entre ellas las siguientes:(1)

- Aumenta la energía, la rapidez, mejora el ánimo y la resistencia y disminuye la depresión y el cansancio.
- Reduce el sueño, aumenta la concentración.
- Reducción del dolor de cabeza, evitando coágulos sanguíneos, ya que la cafeína ayuda a dilatar los vasos sanguíneos.
- Podría ayudar a reducir el riesgo de sufrir Parkinson y Alzheimer, aunque no se ha demostrado.
- Dilata los bronquios, ayudando a mejorar el asma.

- Posee un efecto diurético.

En caso de tener problemas cardiovasculares graves, el consumo de cafeína está totalmente contraindicado. En las personas embarazadas y durante el periodo de lactancia, se recomienda evitar el consumo excesivo de cafeína, debido a que esto podría provocar una probabilidad mayor de aborto espontáneo; por último, en las personas con enfermedades diabéticas puede aumentar los niveles de glucosa en sangre. (7)

SACARINA

La sacarina es un compuesto orgánico que se utiliza como un agente edulcorante no nutritivo. Fue descubierto por los químicos Ira Remsen y Fahlberg Constantin en 1879. Se produce como sacarina insoluble o en forma de diferentes sales, principalmente de sodio y de calcio. Este compuesto tiene un sabor ligeramente amargo y metálico, aunque dependiendo de su utilización puede llegar a ser entre 200 y 700 veces más dulce que el propio azúcar. (8)

La sacarina es un cristal blanco que se funde en el rango de temperaturas que varía entre 228,8 y 229,7 °C. Es estable en un intervalo de pH de 2 a 7 y a temperaturas de hasta 150 °C.(8)

Se encuentra en muchos alimentos y bebidas, incluyendo goma de mascar, frutas en conserva, productos horneados y bebidas no alcohólicas, y como edulcorante de mesa. También se utiliza en algunos medicamentos y vitaminas y algunos de sus beneficios pueden ser:(9)

- Se puede sustituir al azúcar al hornear
- No contribuye a la caries dental
- No afecta los niveles de glucosa o de triglicéridos

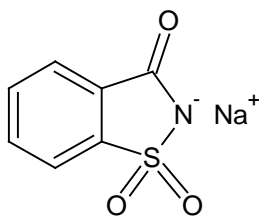


Figura 2. Molécula de sacarina

En estudios toxicológicos, se ha demostrado que la sacarina induce una mayor incidencia de cáncer de vejiga en ratas que han sido alimentados con el edulcorante en niveles altos. Al mismo tiempo, no se ha podido demostrar una relación entre el cáncer de vejiga humano y el uso de la sacarina en los niveles normales, y el edulcorante está aprobado para su utilización en los alimentos en la mayoría de los países del mundo.(9)

ÁCIDO BENZOICO

El ácido benzoico es un compuesto cristalino de color blanco orgánico que pertenece a la familia de los ácidos carboxílicos. Por lo general, se emplea como conservante de alimentos y en la fabricación de cosméticos, tintes, plásticos, y repelentes de insectos.(10)

Cuando se utiliza en la industria se produce mediante reacción química de tolueno con oxígeno a temperaturas alrededor de 200 °C (Figura 3), empleando sales de cobalto y manganeso como catalizadores. Por otra parte, el ácido benzoico se localiza de forma natural en algunos vegetales, como la canela o las ciruelas. En condiciones normales, el ácido benzoico es un sólido incoloro con un ligero olor característico, funde a 122 °C y es poco soluble en agua fría, pero tiene buena solubilidad en agua caliente o disolventes orgánicos.(10)

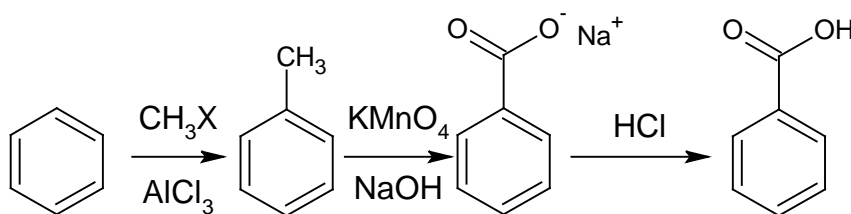


Figura 3. Formación del ácido benzoico a partir de benceno

Se utiliza como conservante tanto como ácido como en forma de sus sales de sodio, de potasio o de calcio. El ácido benzoico y sus derivados son eficaces en alimentos ácidos, y es un conservante barato, útil contra levaduras, bacterias y mohos, y se une al dióxido de azufre o sulfitos para atacar a una mayor cantidad de microorganismos. A continuación se muestran otros usos del ácido benzoico, como son:(10)

- En productos de perfumería.
- Para ablandecer plásticos como el policloruro de vinilo (PVC).
- El peróxido del ácido benzoico se utiliza como iniciador de reacciones radicalarias.
- Se usa para condimentar el tabaco, para hacer pastas dentífricas, como germicida en medicina y como intermediario en la fabricación de plastificantes y resinas.
- Los productos enlatados usan ácido benzoico derivado del tolueno como conservante.

Sus principales inconvenientes destacan en que tiene un cierto sabor astringente poco agradable y su toxicidad que, aunque relativamente baja, es mayor que la de otros conservantes. Por otra parte, las personas sensibles al ácido benzoico pueden sufrir reacciones alérgicas y se les aconseja dejar de consumir productos que contengan entre sus ingredientes ácido benzoico. En combinación con ácido ascórbico (E300), se puede formar benceno, un hidrocarburo altamente cancerígeno. También la presencia de dióxido

de azufre y sus derivados (E220), colorantes artificiales, ácido salicílico, etc., pueden aumentar los riesgos de sufrir reacciones.(10; 11)

En España se utiliza como conservante en bebidas refrescantes, zumos para uso industrial, algunos productos lácteos, en repostería y galletas, en algunas conservas vegetales, como el tomate o el pimiento envasados en grandes recipientes para uso de colectividades, mermeladas, crustáceos frescos o congelados, margarinas, salsas y otros productos. La OMS considera como aceptable una ingestión de hasta 5 mg por kg de peso corporal y día. Con la actual legislación española este límite se puede superar, especialmente en el caso de los niños. Otras legislaciones europeas son más restrictivas. En Francia solo se autoriza su uso en derivados de pescado, mientras que en Italia y Portugal está prohibido su uso en refrescos. Actualmente se utiliza lo menos posible, substituyéndolo por otros conservantes menos peligrosos. El ácido benzoico no tiene efectos acumulativos, ni es mutágeno o carcinógeno.(11)

REFRESCOS DE COLA

Los refrescos de cola son bebidas que están constituidas principalmente por agua carbonatada, azúcares y distintos aditivos, sobre todo, saborizantes, colorantes, conservantes (como el ácido fosfórico y el ácido benzoico) y cafeína.(1; 12; 13)

La mayoría de los productos que comercializan bebidas de cola incorporan otros ingredientes a estos para crear un sabor propio de la marca. Las semillas de *Cola Acuminata* (en la Figura 4(1) se muestra un dibujo de ésta), tienen un sabor amargo, contribuyen en menor medida o ninguna a la mayoría de las recetas. Algunos endulzantes como el jarabe de fructosa, azúcar y otros suelen ser usados en la elaboración de la bebida de cola. Las bebidas marcadas como "light", "zero", "diet" o "sin azúcar" utilizan únicamente edulcorantes artificiales.(1; 12; 13)

Las bebidas de cola, al contener gas, son ácidas. La acidez es aportada por el ácido carbónico (formado a partir del CO₂ disuelto), y algunas veces está acompañado de algún cítrico. Al tener acidez, las bebidas pueden reaccionar violentamente con bases químicas como el hidrogenocarbonato de sodio. Muchas bebidas de cola también contienen ácido fosfórico y ácido cítrico, que incrementa altamente la acidez. Las colas son bebidas refrescantes altamente calóricas, el equivalente a 6 terrones de azúcar pequeños, que nos suponen unas 140 kcal. (12)

Por otra parte, su aporte en cafeína es elevado. Aunque la sensibilidad individual a la cafeína puede ser muy diferente de unas personas a otras y es cierto que existe un cierto grado de tolerancia, en general, aportes superiores a 400-600 mg/día durante varias semanas conllevan efectos nocivos para el organismo, como temblor, inquietud, crisis de ansiedad, insomnio, etc.(1; 12; 13)

Por último, y éste tal vez sea su efecto menos conocido, hay que señalar su elevado aporte de ácido fosfórico que, utilizado como aditivo antioxidante, conlleva un déficit de absorción del calcio.(12)



Figura 4. Semilla de Cola Acuminata

REFRESCOS DE TÉ

Los refrescos a base de té centran sus ventas en la imagen y, en algunos casos incluso, ayudándose de las virtudes del té. El té contiene más de 600 compuestos químicos que actúan sobre el sabor, el gusto, el color y los nutrientes. Algunas de las propiedades más interesantes del té son:(14)

- Contiene antioxidantes, sustancias que previenen la aparición de enfermedades cardiovasculares o el cáncer, entre otras.
- Tiene efecto diurético.
- Estimula el sistema nervioso central porque contiene cafeína.
- Puede ayudar a mantener a raya el peso corporal. Esta cualidad del té, sobre todo del té verde, aún no se ha demostrado categóricamente.
- Aumenta las defensas, puede tener una importante función en el sistema inmunológico y también como antibacteriano.

Todas estas ventajas de la planta de té crean una confusión al consumidor, que considera que las bebidas a base de té aportan un valor añadido (más que otro tipo de refresco), pero los refrescos de té no se pueden comparar con la planta de té ya que el sabor es totalmente distinto, y la planta de té es una bebida más amarga y astringente. Los refrescos de té utilizan menos cantidad de té y añaden otras sustancias y aditivos de bebidas para que el sabor resulte más dulce para los consumidores, pero no para la salud.(1; 14)

Una bolsita de té suele tener un peso aproximado de 2,2 g y ésta puede contener hasta 175 mg de polifenoles, aunque una parte de estos elementos se degradan cuando se prepara el té, siendo su aporte al organismo más reducido. Por otro lado, en los refrescos de té pueden llegar a 83 mg por cada 453 g de bebida, lo que muestra la diferencia entre consumir de una u otra manera el té. Para igualar los efectos de la planta de té en los refrescos sería necesario tomar varias bebidas, sin tener en cuenta los aditivos que se les añade, como la inclusión de azúcar, edulcorantes, cafeína o jarabe de maíz, esto convierte una bebida supuestamente saludable en una bebida más perjudicial. (1)

En la legislación no se obliga a informar sobre el contenido de polifenoles y elementos saludables en los refrescos de té, por lo que de esta forma se desconoce la verdadera aportación de estas bebidas al cuerpo.(14)

BEBIDAS ENERGÉTICAS

Las bebidas energéticas, deportivas o hipertónicas son bebidas sin alcohol y con propiedades estimulantes y regeneradoras para la fatiga y el agotamiento, además de aumentar la habilidad mental y desintoxicar el cuerpo. Están compuestas principalmente por cafeína, varias vitaminas, y otras sustancias naturales orgánicas, que no eliminan realmente la fatiga muscular ni el agotamiento en general; tan solo inhiben temporalmente estas sensaciones y, por lo tanto, es normal una sensación de decaimiento una vez que acaba su efecto en el organismo.(15; 16)

Estas bebidas surgen por la comercialización en el mercado mundial de bebidas ya existentes en países asiáticos o latinoamericanos, que solamente eran conocidas allí. En España este tipo de bebidas se introdujeron en el mercado mediante la famosa marca austríaca “Red Bull” que se comercializa desde los años 90, pero tiene más de 25 años de existencia.(15; 16)

Las bebidas energéticas contienen los siguientes ingredientes: agua carbonatada, cafeína, glucosa y otros azúcares que aportan energía al cuerpo. Además de éstos, entre los ingredientes también se pueden encontrar una variedad de vitaminas del grupo B, como B2, B3, B4, B5, B6, B12, taurina, guaraná o extracto, aspartamo (las versiones dietéticas), L-carnitina (3-hidroxi-4-trimetilaminobutirato), vitamina C, ácido cítrico,

acidulantes, ginseng o extracto, beta-caroteno, ácido pantoténico (vitamina B5), fosfato monopotásico, D-ribosa, colorante, caramelo, etc. Todo varía según el fabricante y la variedad que se escoja.(15; 16)

La presencia de carbohidratos, cafeína, vitaminas, carnitina o D-ribosa, hacen que supuestamente las bebidas sean regeneradoras volviéndose así famosa en deportistas, estudiantes, empleados nocturnos y cualquier otro tipo de personas. Se suele confundir este tipo de bebidas con los refrescos de tipo cola pero, las bebidas energéticas incluyen muchas vitaminas y otras sustancias que una simple cola o refresco no contienen. Su único punto en común está en la cafeína, aunque la concentración varía ampliamente de una a otra, siendo menor en las primeras. Principalmente los refrescos cola se comercializan con el fin de refrescar y las bebidas energéticas para revitalizar el agotamiento físico.(15; 16)

En la Tabla 2(1; 17; 18) se recogen datos correspondientes al contenido en cafeína, determinado por distintos autores, en diferentes bebidas.

Muestras	Cantidad	Rango de cafeína (mg)	Promedio de cafeína (mg)
Bebidas de cola			
Colas	330 mL	27 – 65	46
Colas light	330 mL	23 – 65	44
Colas zero	330 mL	23 – 65	44
Colas descafeinadas	330 mL	ND	ND
Colas light descafeinadas	330 mL	ND	ND
Refrescos de té			
Té normal	250 mL	9 – 50	30
Bebidas energéticas			
Bebidas energéticas	330 mL	10	10
Bebidas energéticas light	330 mL	10	10
Café			
Café tostado	150 mL	61 – 124	92,5
Café instantáneo	150 mL	40 – 108	74
Café tostado descafeinado	150 mL	2 – 5	3,5
Café instantáneo descafeinado	150 mL	2 – 8	5
Productos de chocolate			
Chocolate a la taza	28 g	18 – 118	68
Leche con chocolate	240 mL	2 – 7	5

Tabla 2. Contenido de cafeína en diferentes bebidas

EXPERIMENTAL

MATERIALES

Para la realización de este proyecto se utilizaron los materiales, de uso habitual en un laboratorio, que aparecen en las siguientes figuras:



Figura 5. Matracos de 10 mL



Figura 6. Matracos de 25 mL



Figura 7. 3 matracos de 100 mL



Figura 8. Matraz de 1000 mL



Figura 9. Vidrio de reloj



Figura 10. Filtro de nylon



Figura 11. Jeringa de 2,5 mL



Figura 12. Espátula



Figura 13. pH-metro

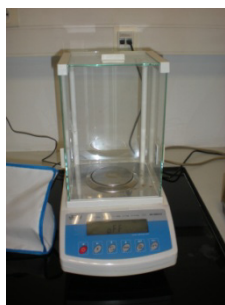


Figura 14. Balanza analítica



Figura 15. Ultrasonidos



Figura 16. Imán magnético



Figura 17. Pera



Figura 18. Pipetas graduadas

REACTIVOS

- Sacarina (sal sódica): Acros Organics, referencia: 223372500, lote: A015132001
- Cafeína: Sigma Aldrich, referencia: 27600100, lote: 08209BS-061
- Ácido benzoico: Scharlau, referencia: AC05650500, lote: 339564147
- Hidróxido de sodio: Carlo Erba Reagents, referencia: 480507, lote: 8M222238N
- Ácido acético: Panreac, referencia: 361008, lote: 306049ES
- Metanol: J. T. Baker, Baker analyzed LC-MS Reagent, referencia: 9822, lote: 1135533010
- Agua desionizada, obtenida mediante el Equipo Elix 3 de Millipore, por intercambio de iones y ósmosis inversa

DISOLUCIONES

- Hidróxido de sodio al 10 % (m/v): Se pesan 10 g de hidróxido de sodio y se disuelven en 100 mL con agua destilada
- Disolución amortiguadora de pH 4,0. Se ponen 28,5 mL de ácido acético en un matraz de 1000 mL, enrasando con agua destilada; se lleva al pH-metro y se vierten gotas de hidróxido de sodio al 10 % hasta que el pH sea 4,0
- Fase móvil. Para preparar 100 mL, se mezclan 80 mL de la disolución reguladora de pH 4,0 con 20 mL de metanol
- Patrón de cafeína de 1000 mg/L: Se pesan, con exactitud, 0,1 g de cafeína y se llevan a un matraz de 100 mL, enrasando con agua destilada
- Patrón de sacarina de 1000 mg/L: Se pesan, con exactitud, 0,1 g de sacarina y se llevan a un matraz de 100 mL, enrasando con agua destilada
- Patrón ácido benzoico 1000 mg/L: Se pesan, con exactitud, 0,1 g de sacarina y se llevan a un matraz de 100 mL, enrasando con agua destilada

EQUIPOS

CROMATOGRAFÍA

- Equipo: *HPLC* de Jasco compuesto por un sistema de desgasificación (LG 1580-04), un sistema de bombeo (PU-1580) y un sistema de detección (UV-1575)
- Longitud de onda del detector: 254 nm, a 0,04 AUFS
- Columna: Scharlau Kromaphase C18/2, de 100 mm x 4,6 mm x 5,0 μm
- Válvula de inyección *Rheodyne*, con bucle de volumen fijo (20 μL)

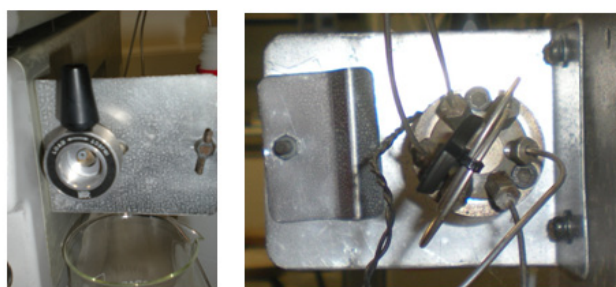


Figura 19. Fotos de la válvula de inyección

- Flujo constante: 1,0 mL/min
- Modo de elución: Isocrático
- Tiempo del cromatograma: 15 minutos

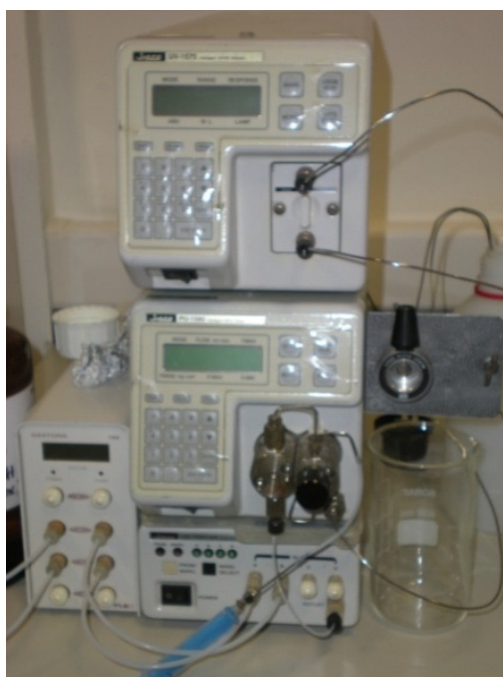


Figura 20. Foto del equipo de HPLC

ESPECTROFOTOMETRÍA

- Espectrómetro Unicam Helios Gamma: Espectrofotómetro de absorción molecular Helios Unicam Gamma UV - Visible; adecuado para trabajar a unas longitudes de onda entre 190 y 1100 nm y provisto de un paso de luz de 1 mm a 50 mm
- Cubeta de cuarzo de paso óptico de 10 mm: Cubetas de cuarzo UV macro Standard, Nahita, con un paso de luz de 10 mm y un volumen de 3,50 mL



Figura 21. Foto del equipo UV Unicam

DESARROLLO Y RESULTADOS

ELECCIÓN DE CONDICIONES

Justificación de la longitud de onda elegida

La espectrofotometría de ultravioleta – visible es una técnica de medición de concentración de masa de elementos y compuestos químicos (análisis cuantitativo), cuyo principio es la interacción entre la energía electromagnética con la materia.

En las siguientes figuras (Figura 22(19), Figura 23(20) y Figura 24(21)), se ven los distintos espectros que absorben a unas longitudes de onda que rondan desde 200 a 300 nm. Dentro de este intervalo, los tres compuestos se cruzan en un rango que va desde 240 a 260 nm, por lo tanto cualquier longitud de onda que se seleccione dentro de este rango permitirá la separación completa de los tres compuestos para que se puedan cuantificar en el cromatograma posteriormente. Se selecciona la longitud de onda en 254 nm, de tal forma que el equipo funciona de forma óptima y los picos de los tres patrones se observen perfectamente.

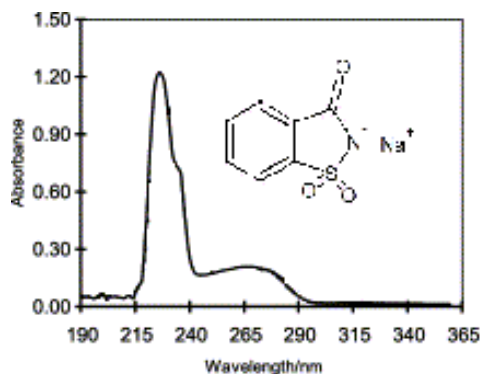


Figura 22. Espectro UV de la sacarina

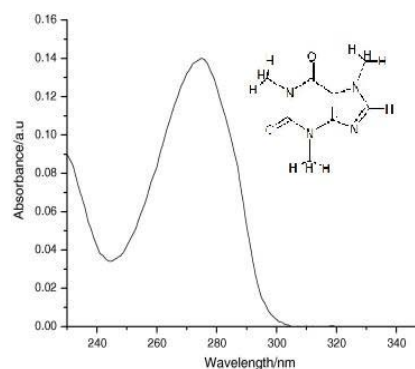


Figura 23. Espectro UV de la cafeína

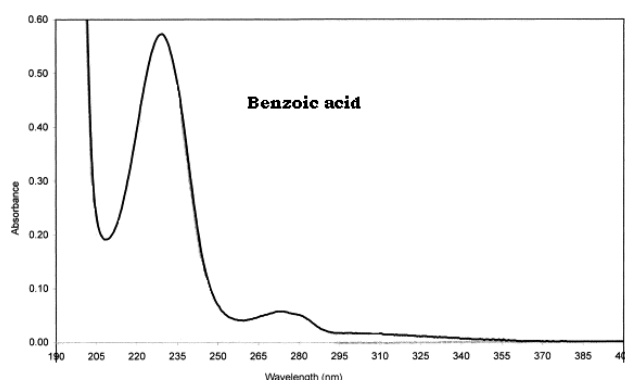


Figura 24. Espectro UV del ácido benzoico

Condiciones cromatográficas

Para la preparación de la fase móvil que se utiliza en este experimento, se constituye con el 80 % en volumen de tampón pH 4,0 y 20 % en volumen de metanol. El tampón pH 4,0 se prepara con ácido acético diluido con agua y ajustando el pH con hidróxido de sodio al 10 % (m/v). Posteriormente se introduce la fase móvil en el equipo de ultrasonidos para desgasificarla (unos 15 minutos).

Una vez se tenga todo preparado, se enciende el equipo, se purga para eliminar las posibles burbujas que se hayan quedado retenidas en los conductos y se estabiliza pasando fase móvil durante unos 15 minutos de tal forma que en el cromatograma salga una línea base perfecta. Por último, se inyectan los patrones y las muestras.

Como disoluciones patrón se utiliza sacarina, cafeína y ácido benzoico puros. Se toman vidrios de reloj y de cada patrón se pesa con exactitud 0,1 g que se disuelven en 100 mL de agua, de tal forma que cada una de las concentraciones de las disoluciones patrón sea de 1000 mg/L.

Para realizar un estudio comparativo cuantitativo, lo primero de todo, se basa en realizar una curva de calibrado con los patrones. Como se presentan desviaciones de la linealidad, nunca se debe fundamentar la medida de un único patrón, por lo que se toman 6 patrones con distintas concentraciones para

determinar la correspondiente recta de calibrado. En este caso se seleccionan concentraciones de 6,250; 12,50; 25,00; 50,00; 75,00; 100,0 mg/L de tal forma que las concentraciones estén repartidas de la forma más homogénea posible.

Patrones			Sacarina		Cafeína		Ácido benzoico	
Analito	Peso	Concentración	Teórica (mg/L)	Real (mg/L)	Teórica (mg/L)	Real (mg/L)	Teórica (mg/L)	Real (mg/L)
Abril - Mayo								
Sacarina	0,1025 g	1025 mg/L	100,0	6,150	6,250	6,222	6,250	6,132
			12,50	12,30	12,50	12,44	12,50	12,26
			25,00	25,62	25,00	25,92	25,00	25,55
			50,00	51,25	50,00	51,85	50,00	51,10
			75,00	71,75	75,00	72,59	75,00	71,54
Benzoico	0,1022 g	1022 mg/L	100,0	102,5	100,0	103,7	100,0	102,2
Septiembre								
Sacarina	0,1069 g	1069 mg/L	6,250	6,628	6,250	6,467	6,250	6,739
			12,50	13,36	12,50	13,03	12,50	13,59
			25,00	26,72	25,00	26,07	25,00	27,18
			50,00	53,45	50,00	52,15	50,00	54,35
			75,00	80,18	75,00	78,22	75,00	81,52
Benzoico	0,1087 g	1087 mg/L	100,0	106,9	100,0	104,3	100,0	108,70

Tabla 3. Concentraciones de los patrones

Estos patrones son inyectados en el equipo, y van apareciendo diferentes cromatogramas, donde aparecen los diferentes picos, se cuantifican por área y por altura y se determina la curva de calibrado. A continuación, en la Figura 25, se presenta un cromatograma de un patrón de 50,00 mg/L, donde se ven los tres picos de sacarina, cafeína y ácido benzoico. El primer pico, es el de sacarina que aparece a los 1,94 minutos; el segundo pico, a los 4,68 minutos, pertenece a la cafeína; y el último pico es el de ácido benzoico.

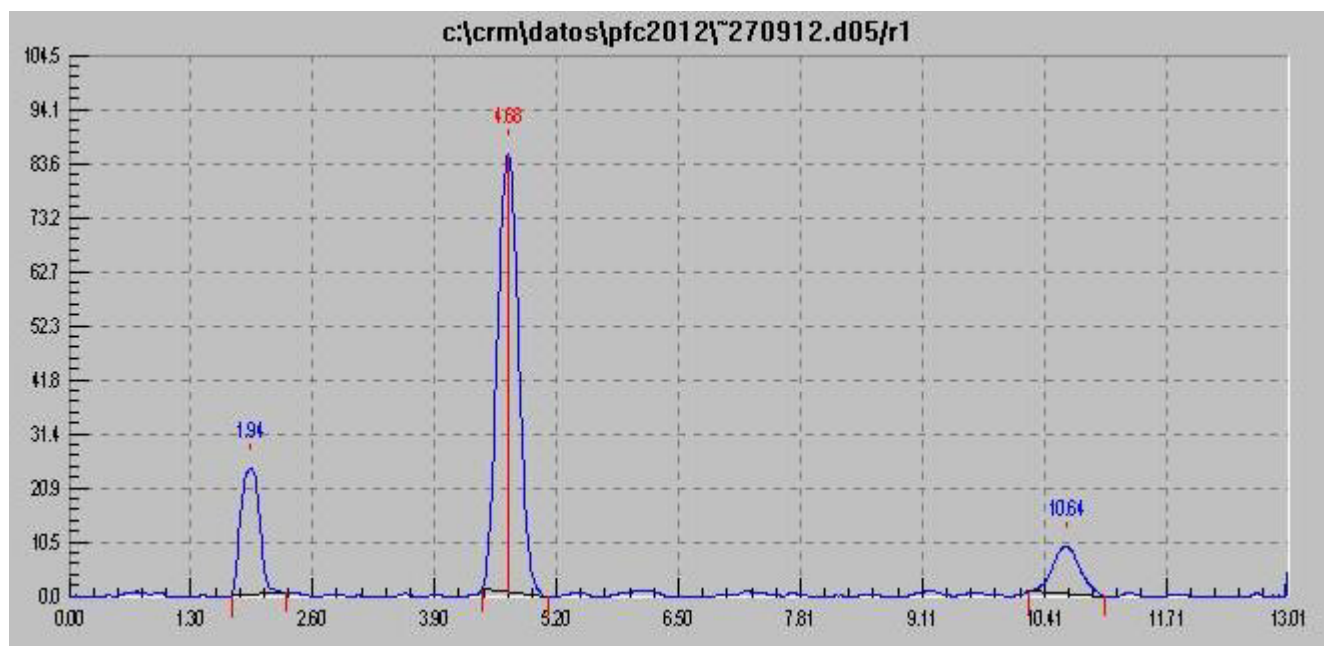


Figura 25. Cromatograma de una disolución patrón de 50,00 mg/L

Los seis patrones, una vez inyectados, se cuantifican de tal forma que se realiza una recta de calibrado. El intervalo de concentración de cafeína varía entre los valores que denota el límite de detección

que se encuentra alrededor de los 6,222 y 6,467 mg/L, según el día que se hayan analizado los patrones, y el límite de linealidad se sitúa en torno a 103,7 y 104,3 mg/L.

En la Figura 26 y en la Figura 27 se representan dos ejemplos de curvas de calibrado de los patrones de cafeína; se observa que tanto cuantificando en área como altura salen los resultados bastantes óptimos.

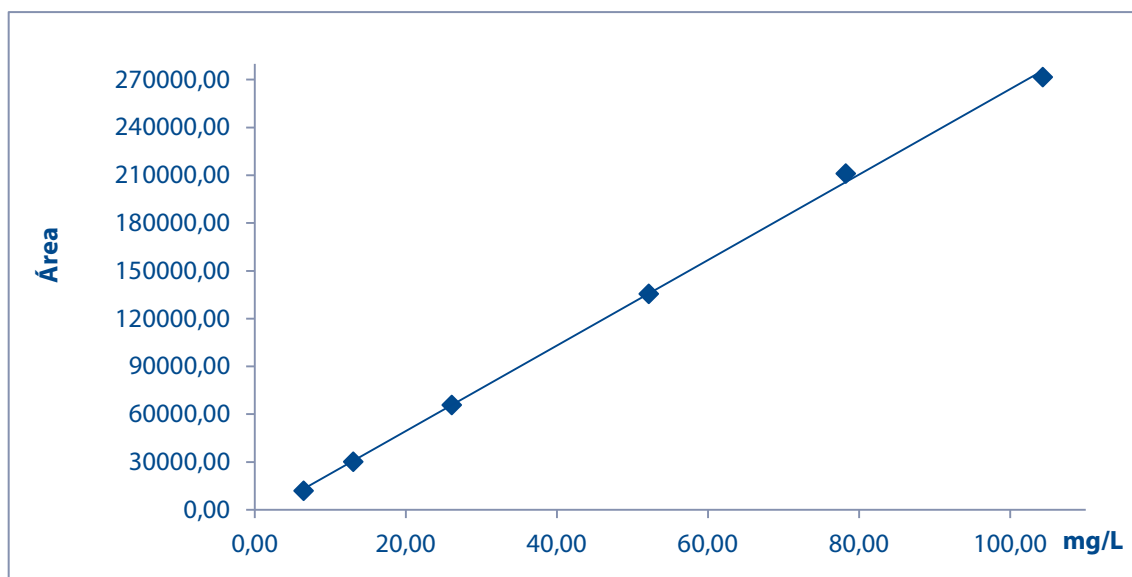


Figura 26. Curva de calibrado de patrones de cafeína (área frente a concentración)

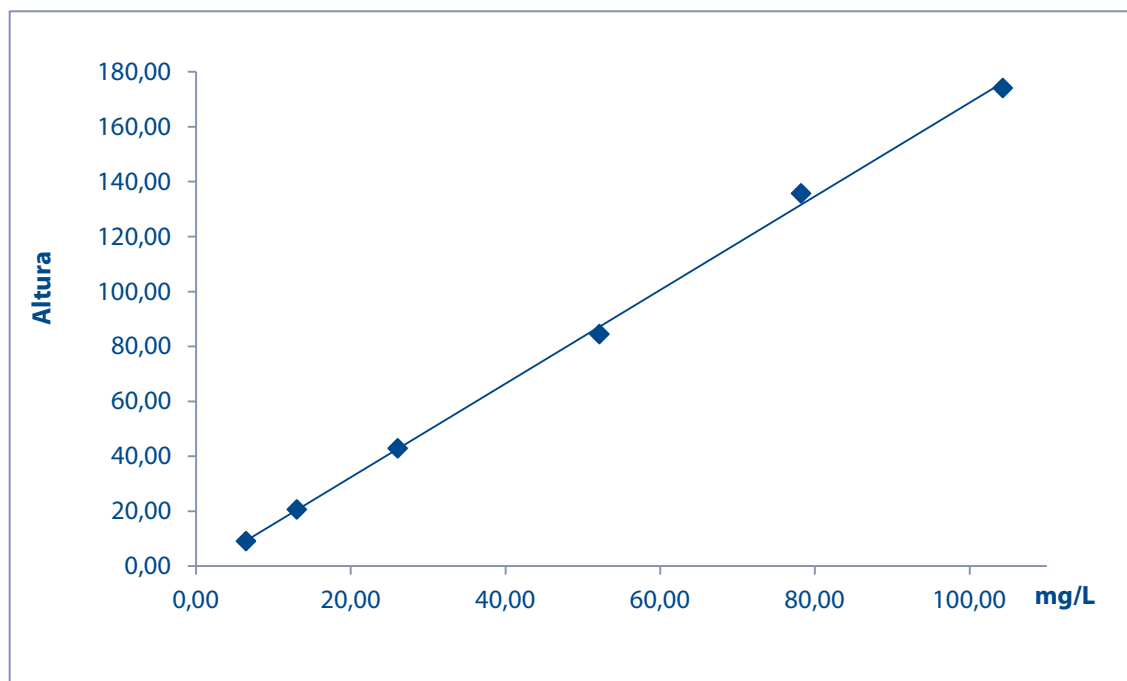


Figura 27. Curva de calibrado de patrones de cafeína (altura frente a concentración)

A continuación se muestra en la Tabla 4, un resumen de los resultados de los distintos patrones que se cuantificaron cada día para la realización del proyecto, tanto en área como altura.

Fecha de análisis	Área			Altura		
	Pendiente	Ordenada	Coeficiente de correlación	Pendiente	Ordenada	Coeficiente de correlación
Sacarina						
24/04/12	450,4	129,9	0,9993	0,3135	0,1784	0,9993
25/04/12	466,1	272,0	0,9974	0,3409	0,1003	0,9963
27/04/12	620,5	-1201	0,9999	0,4293	-0,8030	0,9987
02/05/12	839,9	-3664	0,9985	0,5826	-2,074	0,9960
04/05/12	763,7	299,5	0,9977	0,5431	0,6114	0,9977
07/05/12	777,1	-58,41	0,9988	0,5548	0,2320	0,9986
08/05/12	756,8	-291,0	0,9986	0,5430	-0,2682	0,9986
09/05/12	775,2	250,6	0,9989	0,5306	1,439	0,9974
11/05/12	721,8	1123	0,9991	0,5253	0,9005	0,9980
14/05/12	766,2	-1756	0,9983	0,5398	-0,6610	0,9975
25/09/12	626,6	581,0	0,9969	0,4528	0,3628	0,9967
27/09/12	628,6	946,9	0,9970	0,4552	0,7070	0,9968
Cafeína						
24/04/12	1790	1747	0,9995	1,114	-2,659	0,9924
25/04/12	2091	-5448	0,9983	1,276	-1,662	0,9980
27/04/12	2274	-6203	0,9396	1,425	-2,828	0,9394
02/05/12	637,3	5178	0,9989	1,450	-5,804	0,9965
04/05/12	2484	-4799	0,9983	1,529	-1,501	0,9978
07/05/12	2460	-7255	0,9989	1,577	-3,697	0,9965
08/05/12	2399	-624,0	0,9993	1,514	-0,2006	0,9991
09/05/12	2501	-1534	0,9983	1,566	-0,7711	0,9983
11/05/12	2469	-1,912	0,9979	1,584	-1,912	0,9979
14/05/12	2372	-1272	0,9964	1,556	-3,529	0,9963
25/09/12	2521	1020	0,9998	1,693	0,1763	0,9990
27/09/12	2684	-4294	0,9996	1,705	-1,810	0,9994
Ácido benzoico						
24/04/12	423,0	-3081	0,9993	0,1928	-1,446	0,9917
25/04/12	423,8	1195	0,9982	0,2056	1,087	0,9967
27/04/12	534,4	-1335	0,9863	0,2200	-0,1778	0,9620
02/05/12	256,4	-964,7	1,0000	0,1920	-1,224	1,0000
04/05/12	382,7	-7096	0,9780	0,1581	-2,316	0,9731
07/05/12	304,0	-1770	0,9996	0,1166	-0,3033	0,9969
08/05/12	272,3	-1311	0,9992	0,1138	0,0012	0,9992
09/05/12	204,8	-394,4	0,9978	0,0982	0,2393	0,9965
11/05/12	265,5	-925,2	0,9996	0,1042	-0,4770	0,9996
14/05/12	195,3	-622,7	0,9999	0,0828	0,3883	0,9993
25/09/12	318,7	464,4	0,9961	0,1837	-0,5562	0,9857
27/09/12	376,4	-433,7	0,9967	0,1803	-0,2379	0,9963

Tabla 4. Tabla resumen de las curvas de calibrado de los patrones

Lo primero que se observa en la Tabla 4 es que, tanto en área como en altura, el ajuste a una recta de las distintas curvas de calibrado tiene un valor por encima del 0,9, lo que asegura que no se desvían de la linealidad. Comparando entre los valores de coeficientes de correlación, los valores cuando el parámetro de cuantificación es el área salen un poco mayores que los correspondientes al de altura; por lo tanto, se selecciona trabajar con el área, aunque daría lo mismo trabajar con altura, ya que los resultados no se verían afectados.

Después de la inyección de los seis patrones se procede a la inyección de las muestras, para poder cuantificar el contenido en sacarina, en cafeína y en ácido benzoico.

Para la preparación de las muestras de las distintas bebidas que se analizan, se toma una alícuota de aproximadamente 20,00 mL de la muestra que se quiere analizar, se desgasifica en el ultrasonidos, se toma una alícuota de la muestra desgasificada y se lleva a un matraz de 25,00 mL enrasando con fase móvil. Luego se filtra, se guarda en un vial y se inyecta en el equipo. Los resultados se presentan a continuación en diferentes tablas.

BEBIDAS DE COLA

La cuantificación de las muestras de refrescos cola y cola light se muestra en la Tabla 5; en ella se resumen los resultados obtenidos.

Muestra	Fecha de análisis	Dilución (mL)	Sacarina			Cafeína		
			Señal	Matraz (mg/L)	Muestra (mg/L)	Señal	Matraz (mg/L)	Muestra (mg/L)
Refrescos cola								
Coca-Cola	25/09/12	5 en 25	2130,30	2,47	12,36	50927,38	19,71	98,55
			2260,15	2,68	13,40	53414,43	20,68	103,41
			2235,25	2,64	13,20	55600,41	21,53	107,67
Pepsi	25/09/12	5 en 25	2396,24	2,90	14,18	58487,06	22,66	113,31
			1875,86	2,07	10,33	59562,57	23,08	115,41
			1889,18	2,09	10,44	57451,47	22,26	111,29
Hacendado Cola	25/04/12	10 en 25	1732,42	3,03	7,57	30496,15	16,66	41,65
			2027,36	3,62	9,06	14259,57	9,15	22,89
			2420,72	4,42	11,05	ND	ND	ND
Carrefour Cola	27/09/12	5 en 25	1817,34	1,38	6,92	14741,59	7,26	36,31
			1701,26	1,20	6,00	14893,72	7,32	36,59
			1722,94	1,23	6,17	14268,31	7,09	35,43
Día Cola	02/05/12	10 en 25	5353,21	14,49	36,21	31237,99	28,30	70,75
			4820,38	13,89	34,73	31088,20	28,22	70,55
			5431,02	14,61	36,53	29112,18	27,13	67,83
Super Cola	02/05/12	10 en 25	13823,58	27,47	68,69	24172,77	13,74	34,34
			15865,95	31,60	79,01	25943,33	14,55	36,38
			8830,85	17,38	43,45	16110,71	10,01	25,02
Refrescos cola light								
Coca-Cola Light	27/09/12	5 en 25	ND	ND	ND	73218,88	28,97	144,84
			ND	ND	ND	71115,48	28,19	140,94
			ND	ND	ND	70858,38	28,09	140,46
Pepsi Light	27/09/12	5 en 25	ND	ND	ND	67964,28	27,02	135,09
			ND	ND	ND	64642,52	25,78	128,92
			ND	ND	ND	65732,25	26,19	130,94
Hacendado Cola Light Sin Cafeína	25/04/12	10 en 25	2835,43	5,26	13,15	ND	ND	ND
			2843,89	5,28	13,19	ND	ND	ND
			2983,15	5,56	13,89	ND	ND	ND
Carrefour Cola Light	08/05/12	10 en 25	ND	ND	ND	11988,69	8,13	20,33
			ND	ND	ND	12632,04	8,39	20,98
			ND	ND	ND	11306,01	7,86	19,64
Día Cola Light	08/05/12	10 en 25	3598,10	5,14	12,85	29320,79	15,15	37,88
			3838,56	5,46	13,64	31926,65	16,21	40,52
			3772,02	5,37	13,42	36255,48	17,96	44,90

Tabla 5. Resultados en sacarina y cafeína de bebidas cola y cola light

En el grupo de cola normal se analizan las marcas Coca-Cola, Pepsi, Hacendado Cola, Carrefour Cola, Día Cola, Super Cola y Berta Cola. Comparando las concentraciones de sacarina, se destaca la marca de Super Cola, que tiene una concentración muy superior a las otras marcas de cola normal, ya que se obtiene

una concentración media de 154,6 mg/L. Seguido, está la marca Berta Cola que también tiene una concentración elevada, con una media de 73,85 mg/L. Luego, la marca Día con una concentración de 35,82 mg/L. Después estarían las marcas Coca-Cola, Pepsi y Hacendado Cola con concentraciones de 12,98, 11,75 y 9,23 mg/L. Por último, está la marca Carrefour Cola, que es la bebida de cola que contiene la menor concentración de este grupo con 6,36 mg/L.



Figura 28. Algunas muestras de cola que se han analizado

En este grupo hay dos marcas con números en rojo: se destaca que hubo problemas con la válvula de inyección, de forma que la cantidad introducida diera una señal menor de lo esperado, o con resultados erróneos. Posteriormente se procedió a ajustar los tornillos que sujetan la válvula de inyección y se comprobó que no daban errores las inyecciones de la muestra en la válvula.

Atendiendo a la comparativa de concentraciones de cafeína de estas muestras, la marca Super Cola, también es la que tiene la mayor concentración de cafeína con una concentración media de 152,85 mg/L. Luego se encuentran las marcas Coca-Cola, Pepsi con 103,21 y 113,34 mg/L respectivamente. Después la marca Día contiene una concentración media de 69,71 mg/L y por último, se encuentran los grupos Hacendado Cola, Carrefour Cola y Berta Cola con concentraciones de 32,27, 36,11 y 35,36 mg/L.

En el grupo light, se analizan las marcas, Coca-Cola, Pepsi, Hacendado Sin Cafeína, Carrefour y marca Día. Al ser marcas light, por lo general, no se detectan picos de sacarina, y los pocos que se detectan contienen concentraciones pequeñas. Las marcas Hacendado y Día no detectan picos de sacarina y en las

otras dos que si se aprecian picos, el contenido de sacarina es mínimo, en torno a los 12-14 mg/L. Por otro lado, en el contenido de cafeína se destaca que las marcas Coca-Cola y Pepsi contienen concentraciones parecidas de cafeína con una media cada una de 142,08 y 131,65 mg/L. Las marcas blancas Carrefour y Día Light tienen menores concentraciones de cafeína comparando con las otras marcas, pero entre ellas el contenido es muy parecido: la marca Carrefour contiene una media de 20,32 mg/L y la marca Día tiene una media de 41,1 mg/L.

A parte de muestras de cola y cola light, también se analizaron muestras de refrescos cola zero y cola sin cafeína, que se muestra un resumen en la siguiente tabla.

Muestra	Fecha de análisis	Dilución (mL)	Sacarina			Cafeína		
			Señal	Matraz (mg/L)	Muestra (mg/L)	Señal	Matraz (mg/L)	Muestra (mg/L)
Refrescos cola zero								
Coca-Cola Zero	27/09/12	5 en 25	ND	ND	ND	50958,60	20,70	103,52
			ND	ND	ND	53313,69	21,58	107,90
			ND	ND	ND	53202,85	21,54	107,69
Carrefour Cola Zero	08/05/12	10 en 25	ND	ND	ND	184889,00	78,16	195,41
			ND	ND	ND	175464,41	73,98	184,95
			ND	ND	ND	165346,20	70,25	175,62
Día Cola Zero	08/05/12	10 en 25	ND	ND	ND	157088,71	66,90	167,26
			ND	ND	ND	153767,78	65,56	163,89
			ND	ND	ND	157697,44	67,15	167,87
Refrescos cola sin cafeína								
Coca-Cola Sin Cafeína	25/04/12	10 en 25	2531,78	4,64	11,61	ND	ND	ND
			2630,08	4,84	12,11	ND	ND	ND
			1953,97	3,48	8,69	ND	ND	ND
Pepsi Sin Cafeína	25/04/12	10 en 25	1144,94	1,84	4,60	ND	ND	ND
			1427,60	2,41	6,03	ND	ND	ND
			1856,28	3,28	8,20	ND	ND	ND
Día Cola Sin Cafeína	08/05/12	10 en 25	4076,19	5,77	14,43	ND	ND	ND
			3322,51	4,77	11,94	ND	ND	ND
			3295,00	4,74	11,85	ND	ND	ND

Tabla 6. Resultados de las muestras cola zero y cola sin cafeína

En el grupo zero, se analizan las marcas Coca-Cola, Carrefour y Día, al ser refrescos zero, sucede lo mismo que en el análisis de las muestras light que por lo general no se detectan los picos de sacarina. En la detección de cafeína se observa que las cantidades son parecidas entre unas marcas y otras. La marca Coca-Cola Zero contiene una media de 106,37 mg/L, la marca Carrefour tiene una concentración de 188,44 mg/L y las bebidas de Día Cola Zero 166,34 mg/L.



Figura 29. Muestras de cola zero

En el subgrupo de refrescos sin cafeína, se destaca por un lado que los números mostrados en rojo nos indican que en la tercera inyección de Coca-Cola sin cafeína no se ha introducido toda la cantidad que se inyecta de forma normal debidos a problemas con la válvula de inyección. Ninguna de estas muestras detecta picos en cafeína y por otro lado la cantidad de sacarina es muy similar en la marca Coca-Cola y en la marca Día y un poco menor en la marca Pepsi.



Figura 30. Muestras de cola sin cafeína

Una muestra comparativa de todas estas muestras se observa en el siguiente gráfico:

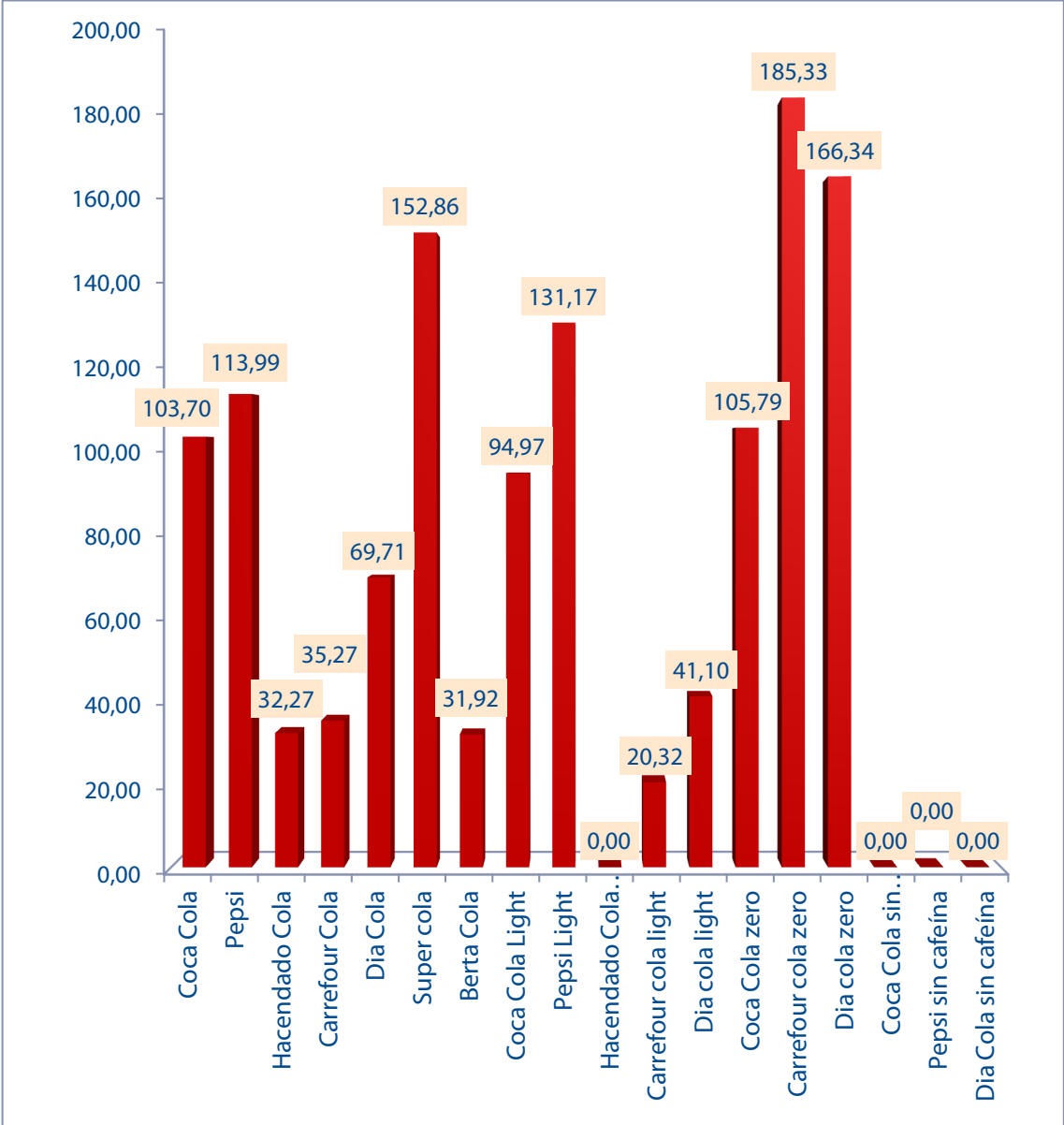


Figura 31. Gráfico comparativo de concentración de cafeína en muestras de cola

REFRESCOS DE TÉ

Para continuar con los estudios comparativos de muestras, se analizaron refrescos de té y té light, siendo un total de 8 muestras analizadas que los resultados se ven a continuación.

Muestra	Fecha de análisis	Dilución (mL)	Sacarina			Cafeína		
			Señal	Matraz (mg/L)	Muestra (mg/L)	Señal	Matraz (mg/L)	Muestra (mg/L)
Refrescos té								
Nestea	04/05/12	10 en 25	4411,37	5,38	13,46	45909,13	20,41	51,03
			4459,95	5,45	13,62	44908,34	20,01	50,02
			3738,00	4,50	11,26	45315,00	20,17	50,43
Lipton Ice Tea	27/04/12	10 en 25	4569,92	13,44	33,59	27919,79	17,51	43,77
			3100,09	10,70	26,57	28623,19	17,85	44,63
			4543,19	13,39	33,47	27925,03	17,51	43,78
Carrefour Té	27/04/12	10 en 25	1326,51	7,40	18,50	44608,49	25,68	64,19
			1804,15	8,29	20,72	45592,11	26,16	65,40
			1708,16	8,11	20,27	45041,68	25,89	64,72
Eroski Té	07/05/12	10 en 25	66888,99	86,15	215,36	32286,83	16,08	40,19
			70729,26	91,09	227,72	30978,26	15,54	38,86
			70174,30	90,37	225,93	27594,41	14,17	35,42
Refrescos té light								
Nestea Light	07/05/12	10 en 25	ND	ND	ND	40252,81	19,31	48,29
			ND	ND	ND	38188,47	18,48	46,19
			ND	ND	ND	43565,36	20,66	51,65
Super Té Light	07/05/12	10 en 25	ND	ND	ND	31314,38	15,68	39,20
			ND	ND	ND	28160,09	14,40	36,00
			ND	ND	ND	29098,78	14,78	36,95
Eroski Té Light	07/05/12	10 en 25	ND	ND	ND	44893,50	21,20	53,00
			ND	ND	ND	44725,51	21,13	52,83
			ND	ND	ND	47535,76	22,28	55,69
Hacendado Té Light	04/05/12	10 en 25	ND	ND	ND	45794,40	20,36	50,91
			ND	ND	ND	42890,59	19,20	47,99
			ND	ND	ND	47955,29	21,23	53,09

Tabla 7. Resultados de las muestras de té

Comparando los té se observa que en todas las muestras se detectan picos en los cromatogramas tanto de sacarina como cafeína. Comparando los resultados de sacarina, hay una gran variación de concentración, se va desde la muestra de Nestea que tiene una media de 12,78 mg/L, seguido está la marca Carrefour con una media de 19,83 mg/L, después la marca Lipton Ice con una concentración media de 31,27 mg/L. Estas tres marcas contienen concentraciones parecidas en cuanto al contenido en sacarina, pero, por otro lado, se destaca la marca blanca Eroski que contiene una concentración elevada de sacarina, que sobrepasa los 200 mg/L.

En las concentraciones de cafeína, en cambio se ven que los parámetros oscilan en concentraciones similares sean marcas normales como marcas blancas, todos los té tiene una media de 49,37 mg/L.



Figura 32. Muestras de té al limón

En el otro grupo, se determina la composición de sacarina y cafeína de otras cuatro muestras de té light. En la cuantificación de sacarina sucede lo mismo que se ha comentado en la Tabla 5. Al ser bebidas light, por lo general, no se detectan picos de sacarina. En la cuantificación de cafeína, la concentración de cafeína es muy similar en todas las marcas de refrescos té, tres de las bebidas light rondan aproximadamente la misma concentración, se sitúan Nestea, Eroski y Hacendado Light con una concentración media de 51,07 mg/L. Luego, con una concentración un poco inferior a estas tres muestras, está la marca Super Té Light que presenta una concentración media de 37,38 mg/L.



Figura 33. Muestras de té light

Si se compara en la Tabla 7 las muestras que tienen la misma marca pero en distinto grupo, se observa que tanto Nestea como Nestea Light prácticamente tienen la misma concentración de cafeína, y comparando la marca Eroski Té y Eroski Té Light también se parecen las concentraciones de cafeína aunque la concentración de cafeína en Eroski Té Light es algo superior que en el caso de la bebida Eroski té. De forma general, la media de concentraciones de cafeína en las bebidas té tienen concentraciones mayores de cafeína que las muestras de té light.

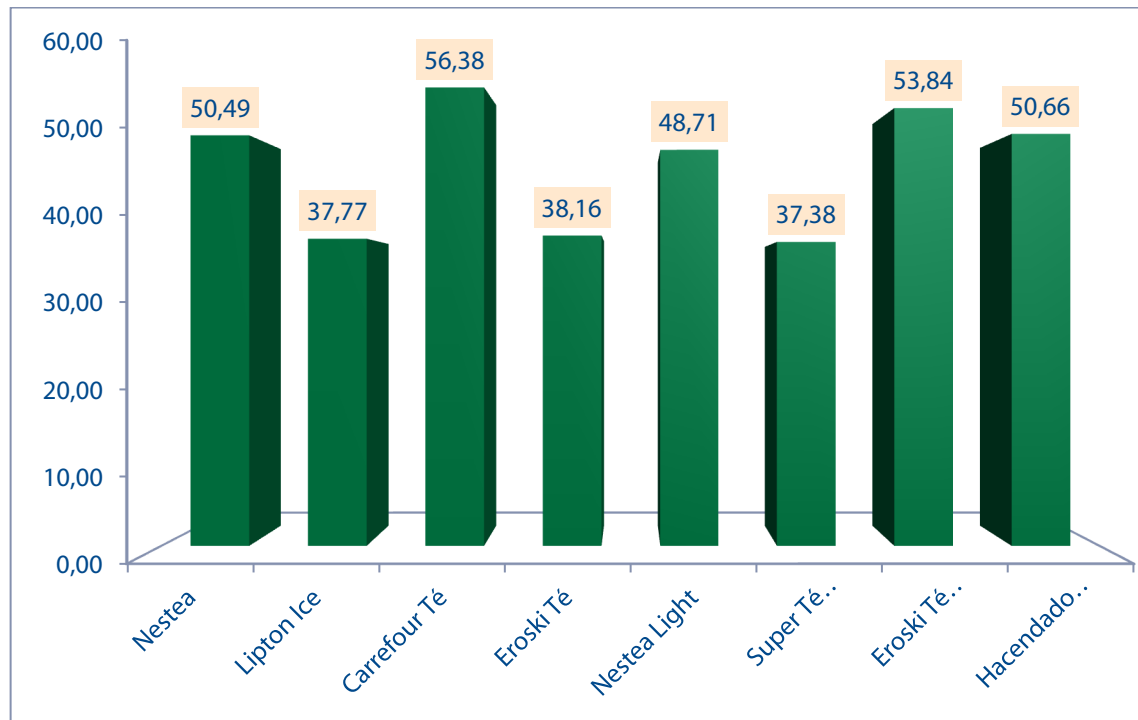


Figura 34. Gráfico comparativo de muestras de té según contenido en cafeína

BEBIDAS ENERGÉTICAS

Al cuantificar muestras de bebidas energéticas se tomaron un total de 8 muestras, entre ellas 6 bebidas energéticas normales y 2 muestras light. En la Tabla 8, se observan los resultados.

Muestra	Fecha de análisis	Dilución (mL)	Sacarina			Cafeína		
			Señal	Matraz (mg/L)	Muestra (mg/L)	Señal	Matraz (mg/L)	Muestra (mg/L)
Bebidas energéticas								
Monster	11/05/12	5 en 25	21242,22	29,98	149,89	199414,30	83,40	417,02
			20076,23	28,41	142,03	201718,22	84,31	421,54
			18939,43	26,87	134,37	199878,96	83,59	417,93
Rockstar	11/05/12	5 en 25	40184,00	55,51	277,55	177935,00	74,97	374,87
			36199,00	50,14	250,69	175325,00	73,95	369,75
			39200,00	54,18	270,92	174703,00	73,71	368,53
Carrefour E.D.	14/05/12	2,5 en 25	1613,44	6,38	63,78	41098,46	20,80	207,95
			1224,92	5,88	58,81	42142,16	21,22	212,21
			1122,68	5,75	57,50	43283,87	21,69	216,86
Burn	14/05/12	2,5 en 25	18877,00	28,47	284,69	88303,00	40,04	400,36
			19736,00	29,57	295,68	91090,00	41,17	411,72
			18642,21	28,17	281,69	89142,00	40,38	403,78
Toro XL	14/05/12	2,5 en 25	12395,00	20,17	201,75	57514,00	27,49	274,86
			11421,00	18,93	189,28	55421,00	26,63	266,33
			12047,00	19,73	197,29	56478,00	27,06	270,64
Red Bull	09/05/12	2,5 en 25	44977,44	63,12	631,17	189027,14	81,30	812,95
			45736,12	64,09	640,86	178754,05	77,26	772,61
			47839,06	66,77	667,70	184951,94	79,69	796,95
Bebidas energéticas light								
Red Bull Light	09/05/12	5 en 25	21447,11	33,08	165,40	179977,59	77,74	388,71
			21599,20	33,27	166,37	183627,32	79,17	395,87
			21768,31	33,49	167,45	183229,85	79,02	395,09
Carrefour E.D. Light	09/05/12	5 en 25	3838,64	10,60	53,01	106018,36	48,70	243,49
			4497,36	11,44	57,21	98988,91	45,94	229,68
			4438,56	11,37	56,84	93882,33	43,93	219,66

Tabla 8. Resultados de las muestras de bebidas energéticas

Las bebidas energéticas, tal como se comenta en la Introducción, el contenido tanto en sacarina como en cafeína es muy superior a las bebidas de cola y los refrescos de té.

En cuanto a la cuantificación de sacarina, la marca Carrefour Energy Drink destaca presentando la menor cantidad de sacarina con una media de 60,03 mg/L. La segunda marca con menor sacarina es Monster con una concentración media de 142,10 mg/L. Seguido está la marca Toro XL, después están las marcas Rockstar y Burn con concentraciones de 266,39 y 287,35 mg/L. Por último se destaca la marca Red Bull con una concentración muy elevada comparando con las otras muestras, teniendo una concentración de 646,58 mg/L. Por otro lado, en las bebidas energéticas light se detectan picos de sacarina con concentraciones inferiores respecto a sus marcas con azúcar. En el caso de Red Bull Light presenta una concentración media de 166,41 mg/L, siendo una cantidad bastante inferior a Red Bull. En cambio, la marca Carrefour Energy Drink Light contiene una cantidad parecida de sacarina que en el caso de Carrefour Energy Drink.



Figura 35. Muestras de bebidas energéticas analizadas

Cuantificando la cafeína, se presentan concentraciones muy elevadas siendo las cantidades menores las marcas Carrefour E.D. y Toro XL con unas concentraciones medias de 212,34 y 270,61 mg/L respectivamente. Posteriormente, en torno a los 400 mg/L, están las marcas Monster, Rockstar y Burn. Finalmente, la marca que contiene concentraciones elevadas en cuanto a cafeína igual que sucede en la cuantificación de sacarina es la marca Red Bull con una concentración media de 794,17 mg/L. En el grupo de bebidas energéticas light, Red Bull Light tiene una concentración media de 393,22 mg/L y luego Carrefour E.D. Light tiene 230,94 mg/L. Comparando estas dos bebidas con sus respectivas con azúcar, sucede lo mismo que en la cuantificación de sacarina, en el caso de la bebida Carrefour E.D. Light tiene concentraciones muy similares a la bebida con azúcar y en este caso, incluso contiene una ligera concentración mayor en cafeína. Por otro lado, con Red Bull Light pasa lo mismo que en sacarina, la concentración de cafeína es inferior respecto a Red Bull.

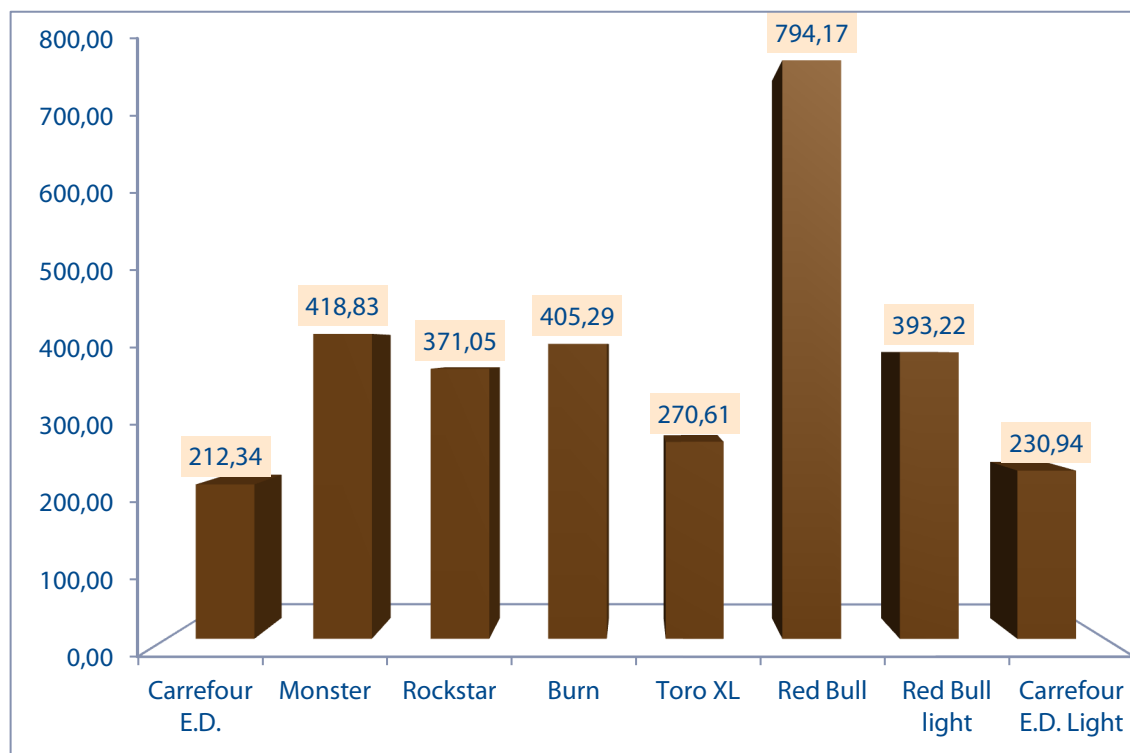


Figura 36. Gráfico comparativo de muestras de bebidas energéticas según contenido en cafeína

MUESTRAS QUE CONTIENEN ÁCIDO BENZOICO

Algunas de las muestras analizadas presentaron concentraciones de ácido benzoico, si bien el número de muestras es mínimo ya que, como se ha mencionado en el apartado de Introducción, el ácido benzoico ha sido dejado de ser utilizado como conservante en muchas marcas. A continuación, en la Tabla 9, se muestra un resumen de los contenidos observados en las muestras analizadas.

Muestras	Fecha de análisis	Dilución (mL)	Ácido benzoico		
			Señal	Matraz (mg/L)	Muestra (mg/L)
Refrescos cola					
Berta Cola	25/04/12	10 en 25	22701,04	51,77	129,43
			21941,00	50,01	125,04
			14763,84	33,40	83,50
Refrescos té					
Super Té Light	07/05/12	10 en 25	1158,83	10,76	26,90
			1475,16	11,75	29,37
			1561,63	12,02	30,05
Bebidas energéticas					
Rockstar	11/05/12	5 en 25	19247,00	77,23	386,14
			20234,00	80,79	403,93
			19478,00	78,06	390,31

Tabla 9. Muestras con contenido en ácido benzoico

Comparando las concentraciones de las muestras donde se detectan picos de ácido benzoico, se observa que hay una muestra de cola, otra muestra de té y otra de bebida energética. Como se menciona en el apartado correspondiente al ácido benzoico en la Introducción, es un conservante que puede ser considerado tóxico y, aunque su concentración es relativamente baja, como el grado de toxicidad es superior a otro tipo de conservantes, las principales marcas decidieron retirarlo de sus ingredientes y sustituirlo por otro tipo de aditivos. En cambio, como se observan en estos resultados, aún hay marcas blancas de colas y té (como Berta Cola y Super Té Light y la bebida energética Rockstar) que presentan concentraciones de ácido benzoico en su composición.

Por otro lado y de manera análoga a lo que se ha comentado en la Tabla 5, la tercera inyección de la muestra de Berta Cola no ha de ser considerada, debido a los problemas observados en la válvula de inyección: se introdujo en el sistema cromatográfico menor cantidad de muestra que en las otras dos repeticiones.

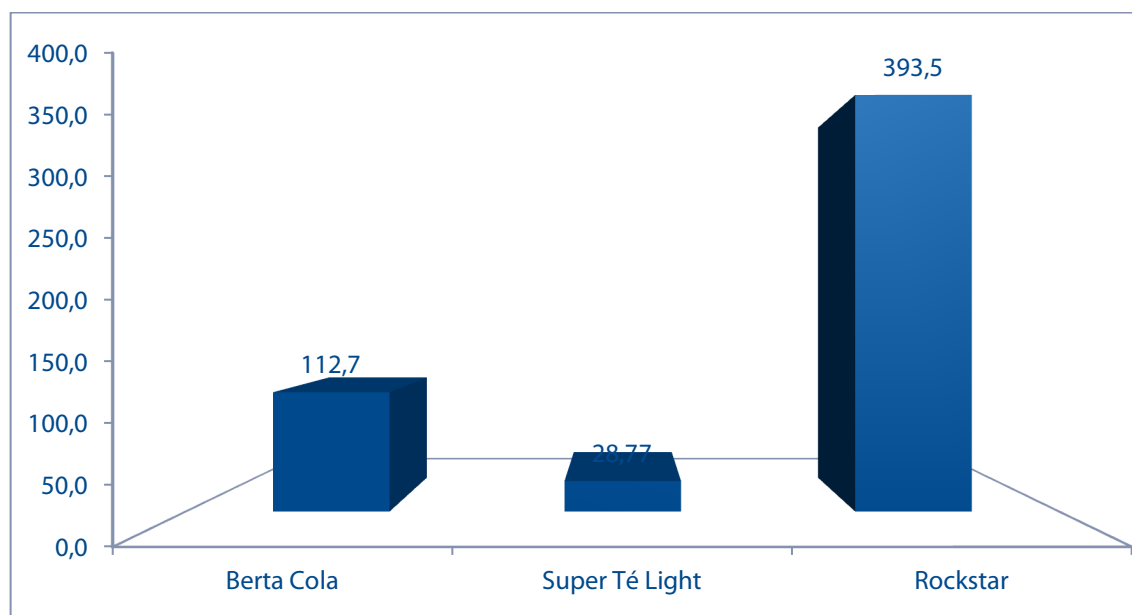


Figura 37. Concentraciones de ácido benzoico en diferentes bebidas

Comparando los tres tipos de bebidas, como se ve en la Figura 37, la bebida que tiene menor cantidad de ácido benzoico es la marca Super Té Light con una concentración media de 28,77 mg/L, seguido se sitúa la bebida Berta Cola con una concentración media de 112,7 mg/L y la bebida que contiene mayor concentración de ácido benzoico es la bebida energética Rockstar con una media 393,46 mg/L.

RESUMEN COMPARATIVO DE LAS MUESTRAS

A continuación se muestran la Tabla 10 y la Figura 38 en las que se puede comparar de forma más visual las diferentes bebidas que han sido analizadas.

Muestras	Concentración media (mg/L)		
	Sacarina	Cafeína	Ácido benzoico
Refrescos cola			
Refrescos cola	42,07	75,52	112,66
Refrescos cola light	13,36	83,79	ND
Refrescos cola zero	ND	152,68	ND
Refrescos cola sin cafeína	9,94	ND	ND
Refrescos té			
Refrescos de té	71,72	49,37	ND
Refrescos de té light	ND	47,65	28,77
Bebidas energéticas			
Bebidas energéticas	266,43	412,05	393,46
Bebidas energéticas light	111,05	312,08	ND

Tabla 10. Comparación media de las muestras analizadas

Esta Tabla 10, resume de forma cuantitativa los resultados promedios de las muestras en concentración de sacarina, cafeína y ácido benzoico. Comparando con la Tabla 2, los valores obtenidos experimentalmente son más elevados tanto en los refrescos cola como en las bebidas energéticas, en cambio en los refrescos té, también sale los resultados algo superiores, pero bastante similares.

A continuación, en la gráfica siguiente que se muestra en la Figura 38, se puede observar de forma más visual un resumen de los grupos de bebidas que han sido analizadas, comparando los contenidos de sacarina, cafeína y ácido benzoico.

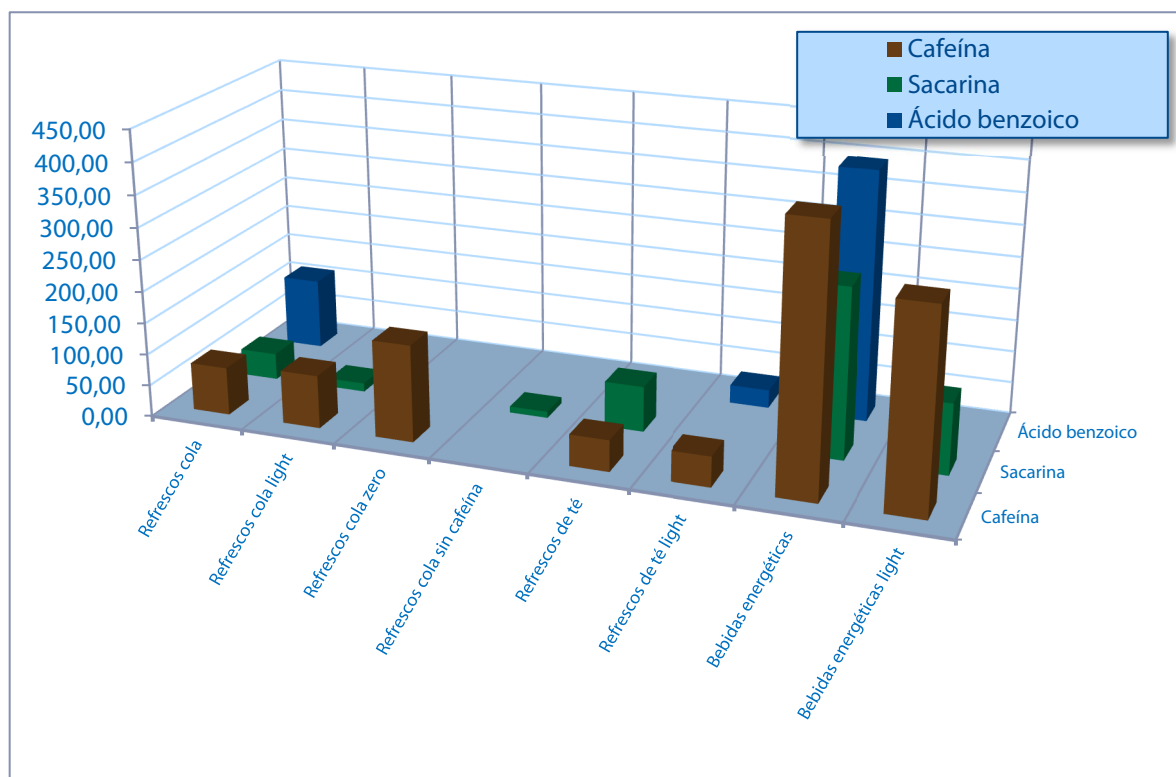


Figura 38. Gráfico comparativo en contenido de cafeína en todas las muestras analizadas

En este gráfico, se ve un gráfico resumen de todos los grupos de bebidas, los cuatro primeros son los que pertenecen a los refrescos de cola, los siguientes a los refrescos de té y los dos últimos las bebidas energéticas. Se puede observar que las bebidas energéticas contienen un contenido elevado tanto en cafeína, como sacarina y ácido benzoico. Por otro lado, los refrescos de té, por lo general son los que visualmente tienen el menor contenido en cafeína y ácido benzoico.

CONCLUSIONES

En este proyecto, la determinación de los distintos compuestos de sacarina, cafeína y ácido benzoico se ha realizado por el método cromatográfico de *HPLC*, de tal forma que se ha podido cuantificar sin problemas todas las muestras de una forma rápida y sencilla.

- Las bebidas energéticas son las que tienen los niveles superiores en cuanto a sacarina, cafeína y ácido benzoico.
- Por lo general, las bebidas normales tienen concentraciones más elevadas que las bebidas light en todos los aspectos. Se encuentra una excepción, como es el caso de los refrescos cola light y cola zero que tienen unas cantidades superiores de cafeína respecto a las bebidas cola normal.
- Por lo general, las bebidas light y zero tienen concentraciones muy pequeñas en la cuantificación de sacarina, o ni siquiera se detectan picos.
- Se presentan picos de otros aditivos en los cromatogramas de las bebidas light y zero que sustituyen a la sacarina (como por ejemplo, aspartamo).
- Tanto en la cuantificación de cafeína como de ácido benzoico, las bebidas energéticas son las que mayor concentración tienen, seguido de los refrescos de cola y por último los refrescos té; en cambio, en la cuantificación de sacarina los que tienen menor concentración son los refrescos cola.
- Solamente se han detectado concentraciones de ácido benzoico en una marca de cada grupo de bebidas, destacando que tanto la marca de los refrescos cola, como la marca de refrescos té eran marcas "blancas".
- Como curiosidad, no se han encontrado refrescos de té ni bebidas energéticas que sean del tipo zero o sin cafeína.
- Se debería de informar y advertir a los consumidores de este tipo de bebidas los peligros que puede conllevar el consumo excesivo.
- Se debería de controlar este consumo, sobre todo entre niños y adolescentes, para evitar problemas de salud.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Calle Aznar, Silvia.** *Determinación analítica de la cafeína en diferentes productos comerciales.* Departamento de Química Industrial, Universitat Politècnica de Catalunya (UPC). Barcelona : Universitat Politècnica de Catalunya (UPC), 2011. pág. Volumen III, Proyecto final de carrera.
2. **Harris, Daniel C.** *Análisis químico cuantitativo.* Segunda. Barcelona : Reverté S.A., 2001. 84-291-7222-X.
3. **Nielsen, S. Suzzane y Ferrando Navarro, Ana Cristina.** *Análisis de los alimentos.* Zaragoza : Acribia S.A., 2008. 978-84-200-1114-1.
4. *Simultaneous determination of caffeine, theobromine, and theophylline by high-performance liquid chromatography.* **Bispo, Marcia S., et al.** [ed.] Preston Publications. 1, Oxford : Journal of Chromatographic Science, January 2002, Vol. 40, pp. 45-48. 0021-9665.
5. *Caffeine: a well known but little mentioned compound in plant science.* **Ashihara, Hiroshi and Crozier, Alan.** 9, Cambridge : Trends in Plant Science, September 1, 2001, Elsevier, Vol. 6, pp. 407-413. 1360-1385.
6. *Voltammetric determination of caffeine in beverage samples on bare boron-doped diamond electrode.* **Švorc, L'ubomír, et al.** [ed.] G.G. Birch. 3, Amsterdam : Food Chemistry, 1 December 2012, Elsevier, Vol. 135, pp. 1198-1204. 0308-8146.
7. **Organización de consumidores y usuarios (OCU).** *Cafeína: ¿necesaria o peligrosa?* OCU Ediciones, S.A. [En línea] 23 de noviembre de 2009. [Citado el: 3 de octubre de 2012.] <http://www.ocu.org/salud/cafe/informe/cafeina-necesaria-o-peligrosa-472254>.
8. **Das, Darshana.** Britannica Online Encyclopedia. *Saccharin (chemical compound).* [Online] January 9, 2011. [Cited: octubre 15, 2012.] <http://www.britannica.com/EBchecked/topic/515193/saccharin>.
9. **FamilyDoctor.org.** FamilyDoctor.org. *Sustitutos para el azúcar | Lo que usted necesita saber -- FamilyDoctor.org.* [En línea] 4 de enero de 2010. [Citado el: 20 de octubre de 2012.] <http://familydoctor.org/familydoctor/es/prevention-wellness/food-nutrition/sugar-and-substitutes/sugar-substitutes-what-you-need-to-know.html>.
10. **Young, Grace.** Britannica Online Encyclopedia. *Benzoic acid (chemical compound).* [Online] April 16, 2008. [Cited: octubre 15, 2012.] <http://www.britannica.com/EBchecked/topic/61357/benzoic-acid>.
11. **Calvo Rebollar, Miguel.** *Aditivos alimentarios : propiedades, aplicaciones y efectos sobre la salud.* Zaragoza : Mira Editores, 1991. <http://milksci.unizar.es/adit/conser.html>. 84-86778-35-2.
12. **SERNAC.** *Bebidas de Cola: Análisis de cafeína, azúcar y edulcorantes (mayo 2005).* Servicio Nacional del Consumidor (SERNAC), Gobierno de Chile. Santiago : Servicio Nacional del Consumidor, 2005. Niveles de azúcar, edulcorantes y cafeína. <http://www.sernac.cl/85005/>.
13. **Colaboradores de Wikipedia.** *Bebidas de cola.* Wikipedia, la enciclopedia libre. [En línea] 63682108, 9 de septiembre de 2012. [Citado el: 08 de octubre de 2012.] http://es.wikipedia.org/w/index.php?title=Bebida_de_cola&oldid=63682108.
14. **Organización de consumidores y usuarios (OCU).** *Bebidas de té: ¿más que refrescos?* OCU Ediciones, S.A. [En línea] 29 de junio de 2009. [Citado el: 08 de octubre de 2012.] <http://www.ocu.org/alimentacion/nc/noticias/bebidas-de-te-mas-que-refrescos-453414>.
15. **Colaboradores de Wikipedia.** *Bebida energizante.* Wikipedia, La enciclopedia libre. [En línea] 63756334, 13 de septiembre de 2012. [Citado el: 08 de octubre de 2012.] http://es.wikipedia.org/w/index.php?title=Bebida_energizante&oldid=63756334.

16. **Organización de consumidores y usuarios (OCU).** Bebidas energéticas: buenas si eres bueno. *OCU Ediciones*, S.A. [En línea] 7 de agosto de 2012. [Citado el: 15 de octubre de 2012.] <http://www.ocu.org/alimentacion/alimentos/informe/bebidas-energeticas-buenas-si-eres-bueno>.
17. *Cafeína: un nutriente, un fármaco, o una droga de abuso.* **Pardo Lozano, Ricardo, y otros.** [ed.] Amador Calafat. 3, Palma de Mallorca: Adicciones (Revista de SOCIDROGALCOHOL), octubre de 2007, SOCIDROGALCOHOL (Sociedad Científica Española de Estudios sobre el Alcohol, el Alcoholismo y las otras Toxicomanías), Vol. 19, págs. 225-238. 0214-4840.
18. **Gilbert, R.M.** Caffeine as a Drug of Abuse. [book auth.] R.J. Gibbins, et al. *Research Advances in Alcohol and Drug Problems*. New York : Wiley & Sons, 1976, Vol. 3, pp. 49-176.
19. *Kinetics of hydrolysis and cyclization of ethyl 2-(aminosulfonyl)benzoate to saccharin.* **Di Loreto, H.E., Czarnowski, J. and M. dos Santos, Afonso.** [ed.] X. Cao, et al. 3, Amsterdam : Chemosphere, octubre 2002, Elsevier, Vol. 49, pp. 353-361. 0045-6535.
20. *Measurement of caffeine in coffee beans with UV/vis spectrometer.* **Belay, Abebe, et al.** [ed.] G.G. Birch. 1, Amsterdam : Food Chemistry, 01 May 2008, Elsevier, Vol. 108, pp. 310-315. 0308-8146.
21. *Analysis of Soft Drinks: UV Spectrophotometry, Liquid Chromatography, and Capillary Electrophoresis.* **McDevitt, Valerie L., Rodríguez, Alejandra and Williams, Kathryn R.** [ed.] Sarah B. Tegen. 5, Washington : Journal of Chemical Education, mayo 05, 1998, American Chemical Society, Vol. 75, pp. 625-629. 0021-9584.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Técnicas para la determinación de la cafeína	4
Tabla 2. Contenido de cafeína en diferentes bebidas	11
Tabla 3. Concentraciones de los patrones	18
Tabla 4. Tabla resumen de las curvas de calibrado de los patrones	20
Tabla 5. Resultados en sacarina y cafeína de bebidas cola y cola light.....	21
Tabla 6. Resultados de las muestras cola zero y cola sin cafeína.....	23
Tabla 7. Resultados de las muestras de té	26
Tabla 8. Resultados de las muestras de bebidas energéticas.....	29
Tabla 9. Muestras con contenido en ácido benzoico.....	31
Tabla 10. Comparación media de las muestras analizadas	32

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Molécula de cafeína.....	5
Figura 2. Molécula de sacarina.....	6
Figura 3. Formación del ácido benzoico a partir de benceno	7
Figura 4. Semilla de Cola Acuminata.....	9
Figura 5. Matraces de 10 mL.....	13
Figura 6. Matraces de 25 mL.....	13
Figura 7. 3 matraces de 100 mL.....	13
Figura 8. Matraz de 1000 mL	13
Figura 9. Vidrio de reloj.....	13
Figura 10. Filtro de nylon	13
Figura 11. Jeringa de 2,5 mL	13
Figura 12. Espátula	13
Figura 13. pH-metro.....	13
Figura 14. Balanza analítica	13
Figura 15. Ultrasonidos.....	13
Figura 16. Imán magnético	13
Figura 17. Pera.....	13
Figura 18. Pipetas graduadas	13
Figura 19. Fotos de la válvula de inyección	15
Figura 20. Foto del equipo de HPLC	15
Figura 21. Foto del equipo UV Unicam.....	16
Figura 22. Espectro UV de la sacarina	17
Figura 23. Espectro UV de la cafeína.....	17
Figura 24. Espectro UV del ácido benzoico.....	17
Figura 25. Cromatograma de una disolución patrón de 50,00 mg/L	18
Figura 26. Curva de calibrado de patrones de cafeína (área frente a concentración)	19
Figura 27. Curva de calibrado de patrones de cafeína (altura frente a concentración)	19
Figura 28. Algunas muestras de cola que se han analizado.....	22
Figura 29. Muestras de cola zero.....	24
Figura 30. Muestras de cola sin cafeína	24
Figura 31. Gráfico comparativo de concentración de cafeína en muestras de cola.....	25
Figura 32. Muestras de té al limón	27
Figura 33. Muestras de té light	27
Figura 34. Gráfico comparativo de muestras de té según contenido en cafeína	28
Figura 35. Muestras de bebidas energéticas analizadas.....	30
Figura 36. Gráfico comparativo de muestras de bebidas energéticas según contenido en cafeína	30
Figura 37. Concentraciones de ácido benzoico en diferentes bebidas	32
Figura 38. Gráfico comparativo en contenido de cafeína en todas las muestras analizadas.....	33