

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA



ELABORACIÓN DE UNA MARCHA ANALÍTICA PARA LA CUANTIFICACIÓN DE
TAURINA PRESENTE EN BEBIDAS ENERGIZANTES COMERCIALIZADAS EN EL
SALVADOR

TRABAJO DE GRADO EN MODALIDAD DIPLOMADO DE ESPECIALIZACIÓN

PRESENTADO POR:

ENRIQUE ALEXANDER HERRERA DOMÍNGUEZ

JOAQUÍN ERNESTO IRAHETA SALAZAR

PARA OPTAR AL GRADO DE

LICENCIADO EN QUÍMICA Y FARMACIA

AGOSTO 2024

SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTRO AMÉRICA

UNIVERSIDAD DE EL SAVADOR

RECTOR

MAESTRO JUAN ROSA QUINTANILLA

SECRETARIO GENERAL

LICENCIADO PEDRO ROSALÍO ESCOBAR CASTANEDA

FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA

DECANA

MAESTRA NANCY ZULEYMA GONZÁLEZ SOSA

SECRETARIA

LICENCIADA EUGENIA SORTO LEMUS

DIRECCIÓN GENERAL DE PROCESOS DE GRADO

DIRECTORA GENERAL (AD-HONOREM)

MAESTRA KATIA LISSETTE MARTÍNEZ DE PALACIOS

TRIBUNAL EVALUADOR

ASESORA

MAESTRA DINORAH DEL CARMEN RODRÍGUEZ DE LAÍNEZ

ASESORA DE AREA DE INDUSTRIA FARMACÉUTICA, COSMÉTICOS, VETERINARIA
Y PRODUCTOS AFINES

MAESTRA ROSA MIRIAN RIVAS DE LARA

ASESOR

MAESTRO LUIS DAVID ALONZO HERNÁNDEZ

ÍNDICE GENERAL

N° de pag

ABREVIATURAS

RESUMEN

CAPÍTULO I

1.0 Introducción 13

CAPÍTULO II

2.0 OBJETIVOS 17

2.1 Objetivo General 17

2.2 Objetivos Específicos 17

CAPÍTULO III

3.0 Marco teórico 19

3.1 Generalidades 19

3.2 Origen de las bebidas energizantes 19

3.2.1 Sustancias energizantes a traves de la historia 19

3.2.2 La evolución de las bebidas energizantes 22

3.3 Definición de bebidas energizantes 24

3.4 Composición de las bebidas energizantes 24

3.5 Descripción de los componentes principales en las bebidas energizantes 25

3.5.1 Cafeína 25

3.5.2 Glucoronolactona 26

3.5.3 Inositol 27

3.5.4 Carbohidratos 27

3.5.5 Vitaminas 27

3.5.6 Extractos naturales 27

3.5.7 Carnitina 27

3.6 Taurina 28

3.7 Efectos de la taurina en el organismo humano 29

3.8 Efectos adversos por el consumo excesivo de taurina en el organismo humano 32

3.9 Regulaciones y normativas de referencia para contenido de taurina 32

3.10	Importancia de la determinación de taurina en las bebidas energizantes	33
3.11	Métodos de análisis de aminoácidos	34
3.11.1	Métodos basados en cromatografía	34
3.12	Determinación de taurina por HPLC	37
3.13	Selección del método para análisis de taurina en bebidas energizantes	38

CAPÍTULO IV

4.0	Producto final	42
	Marcha analítica para la cuantificación del contenido de taurina	42
4.1	Alcance	42
4.2	Objetivo	42
4.3	Requerimiento de insumos	42
4.4	Procedimiento	44
4.4.1	Muestreo	44
4.4.2	Almacenamiento y transporte de las muestras	44
4.4.3	Preparación de solución de NBD-F 1 mmol/l en acetonitrilo. Solución A	44
4.4.4	Preparación de solución buffer	45
4.4.5	Preparación de solución de HCl 0.2 mol/l	45
4.4.6	Preparación de buffer	46
4.4.7	Preparación de fase móvil	46
4.4.8	Preparación de solución stock estandar de taurina concentración 3mg/ml	46
4.4.9	Preparación de diluciones para curva de calibración.	46
4.4.10	Preparación de la muestra. Concentración teórica 0.015mg/ml	47
4.4.11	Derivatización de diluciones estandar de taurina y muestra a concentración teórica	48
4.4.12	Preparación del sistema HPLC	48
4.4.13	Ambientación del sistema HPLC en fase móvil	49
4.4.14	Elaboración de curva de calibración	49
4.4.15	Cálculos para la curva de calibración	51
4.4.16	Análisis de la muestra	52
4.4.17	Lavado del sistema cromatográfico post análisis	56

CAPITULO V

5.0 CONCLUSIONES	59
CAPITULO VI	
6.0 RECOMENDACIONES	61
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla No.		Pag. No.
1	Componentes de las bebidas energizantes	23
2	Valores de referencia diarios y niveles máximos de consumo tolerables de vitaminas, minerales y oligoelementos para suplementos dietarios en bebidas energizantes	24
3	Comparación de ventajas y desventajas entre los métodos de análisis de taurina por HPLC	38
4	Ejemplo de tabla para registro de resultados para elaboración de curva de calibración	48
5	Ejemplo de tabla de datos para elaboración de curva de calibración	51
6	Ejemplo de una tabla de valores para efectos de ejercicio, presentando concentraciones de taurina versus absorbancia obtenidas	52
7	Ejemplo de una tabla de cálculos para efectos de ejercicio, en la que se tabulan los valores requeridos para cálculos estadísticos	53

ÍNDICE DE FÍGURAS

Figura No.		Pag. No.
1	Ejemplo de campañas publicitarias de bebidas energizantes comercializadas en El Salvador	18
2	Empleado de tienda dispensando una de las bebidas más famosas de todos los tiempos en la primera década del siglo XX	22
3	Remolque con la publicidad de la bebida Dr. Enuf en donde se autodeclaran la original bebida energizante	22
4	Molécula de cafeína	25
5	Moléculas de glucoronolactona en su forma aldehídica (izquierda) y forma lactol (derecha)	26
6	Molécula de L-carnitina	27
7	Estructura química de la taurina	27
8	Esquema HPLC	35
9	Proceso de filtración de soluciones estándares y muestras a través de membrana de nylon de 0.45 μm	46
10	Equipo HPLC Shimadzu	47
11	Espectro UV-VIS de NBD-aurina	48
12	Cromatograma HPLC de una muestra conteniendo taurina. El pico del complejo NBD-aurina ha sido eluido alrededor de los 5 minutos y la descomposición del NBD-F es eluido alrededor de los 8 minutos	48
13	Ejemplo de curva de calibración estándar de NBD-aurina	49
14	Ejemplo de etapa 1 para elaborar grafico de correlación lineal	53
15	Ejemplo de etapa 2 para elaborar grafico de correlación lineal	54
16	Ejemplo de etapa 3 para elaborar grafico de correlación lineal	54

ABREVIATURAS

NOM: Norma obligatoria mexicana

RTCA: Reglamento Técnico Centroamericano

FDA: Food and Drugs Administration (Administración de alimentos y fármacos)

HPLC: High Performance Liquid Chromatography (Cromatografía líquida de alta eficiencia)

OPA: o-ftaldehído

NBD-F: 4-fluoro-7-nitrofurazano

NBD-aurina: Complejo NBD-F y aurina

USP: United States Pharmacopeia (Farmacopea de los Estados Unidos)

RESUMEN

El presente trabajo se desarrolló para facilitar una metodología accesible que permita hacer análisis de taurina en bebidas energizantes, ya que hoy día su consumo se está normalizando entre estudiantes universitarios o personas que requieren mantenerse en estado de alerta en el desarrollo de sus actividades laborales o recreativas, esto se respalda en dos referencias: una investigación hecha en la Universidad Evangélica de El Salvador en 2018, indica que las bebidas energizantes se ubican en la 2da. posición de las preferencias de consumo del universo de estudio, únicamente por debajo del café y por encima del tabaco; y en un trabajo de graduación de 2010 hecho en la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador en el que los resultados indican que en los sectores estudiados se presenta un consumo por encima del 59% y que preocupantemente no se tiene información de los hábitos de consumo de bebidas energizantes en grupos con padecimientos cardiacos y otras enfermedades, otros resultados del estudio reportan que arriba del 65% de las personas que consumen las bebidas psicoactivas desconocen los efectos secundarios que estas pueden causar. Por otro lado, se pudo corroborar que actualmente no existe un marco regulatorio definido y por consiguiente el monitoreo de esta sustancia es prácticamente nulo.

En éste se hace un recorrido por las diferentes sustancias que históricamente han sido utilizadas, por diferentes poblaciones y en aplicaciones, como estimulantes y que dieron origen a preparados más sofisticados y formulados específicamente como energizantes. Se describe la composición química de estas bebidas y los efectos que su consumo puede presentar en el organismo, asimismo los padecimientos que pueden desencadenarse por el consumo excesivo de las mismas.

Seguido se citan las diferentes técnicas con las que, a través del tiempo se han analizado los aminoácidos, como se han vuelto más específicas para la detección de taurina y finalmente llegando a una metodología que, por su practicidad y eficiencia aventaja al resto y representa un procedimiento adecuado para el análisis de taurina en bebidas energizantes. La marcha analítica elaborada tiene como base un estudio hecho por el departamento de salud pública de la prefectura de Osaka en Japón, y fue diseñado para ser específico para este tipo de bebidas; su principio es lograr una reacción entre el 4-fluoro-7-nitrofurazano con el grupo amino presente en la taurina para formar un derivado que puede ser identificado y cuantificado de forma específica en el

espectro UV-VIS y sin necesidad de condiciones especiales en el equipo HPLC, por lo que permite superar las interferencias que pueden ser causadas por otras sustancias presentes en las muestras. En el procedimiento se enumeran todas las etapas necesarias para la determinación de taurina por medio de una marcha analítica por HPLC, desde el muestreo y manejo de las muestras, la preparación de los reactivos y equipos, y por último los procesos analíticos específicos y los cálculos necesarios para la presentación de resultados.

Finalmente, se concluye que debe ser mayor el esfuerzo de los diferentes actores responsables de la salud de la población salvadoreña. Primeramente, las instituciones educativas deben promover, durante la formación de los profesionales, el desarrollo y aplicación de metodologías que tengan la finalidad de contribuir a mejorar la calidad de vida en general; en segundo lugar, las entidades regulatorias aplicar los procedimientos analíticos para construir el marco normativo aplicable a las sustancias con potencial dañino a la salud; y por último, las entidades de monitoreo deben garantizar el cumplimiento de las normas aplicables realizando los análisis periódicos de los productos y lograr así un consumo consciente y medido de este tipo de bebidas.

CAPÍTULO I
INTRODUCCIÓN

1.0 INTRODUCCIÓN

En El Salvador actualmente están fácilmente disponibles una variedad de bebidas energizantes que, como se difunden en las campañas publicitarias colgadas en medios digitales y redes sociales, prometen mejorar el rendimiento físico y mental. Según los estudios hechos en 2 universidades de El Salvador, el porcentaje de personas consumidoras de bebidas energizantes la coloca en la segunda posición de las sustancias psicoactivas por las que estudiantes universitarios o personas que requieren mantenerse en un estado de alerta optan, solo por detrás del café y por encima del tabaco, aunque lo que requiere más atención es que los estudios muestran una amplia desinformación sobre los efectos nocivos que las sustancias que las componen tienen sobre quien los consume, y son ingeridos sin restricciones claras.

El presente documento se enfoca en proponer una metodología por HPLC para determinar el contenido de taurina en bebidas energizantes y así contribuir a que, una vez puesta en práctica por instituciones académicas, entidades regulatorias o como herramienta de investigación, se pueda derivar en beneficios a la población. Estos beneficios pueden ir desde brindar información al consumidor para crear conciencia de consumo de bebidas energizantes y así propiciar una ingesta con criterio y poder evitar problemas a la salud relacionados a padecimientos cardiovasculares, daño renal o trastornos del sueño por sobre excitación; o bien para facilitar información técnica que sea un punto de partida para crear una norma regulatoria marco para este tipo de bebidas que poseen un efecto psicoactivo; o como instrumento para monitorear los diferentes productos disponibles en el mercado y, utilizándose como una metodología específica, viable y poco compleja, cuantificar el contenido y el cumplimiento de las cantidades de taurina declaradas en el etiquetado de estas.

Para el levantamiento de la marcha analítica, durante Noviembre 2023 a Julio 2024, se hicieron consultas de diferentes fuentes locales, regionales o mundiales; journals y publicaciones científicas, trabajos de investigación relacionados, bibliografía técnica y científica, e información disponible en la web con referencias validas, para recopilar la información previa y de referencia para entender las condiciones legales y normativas actuales sobre los límites del contenido de taurina en bebidas energizantes en El Salvador, corroborar resultados de investigaciones que brindaran entendimiento sobre el comportamiento de consumo de bebidas energizantes en

diferentes sectores de la población, además para entender el impacto actual o potencial del consumo de bebidas energizantes sobre la salud de las personas; finalmente para indagar sobre las metodologías existentes disponibles localmente para la determinación de taurina en alimentos y principalmente en bebidas energizantes y así obtener una marcha analítica apegada a los recursos y facilidades disponibles actualmente en la Universidad de El Salvador.

Finalmente, la metodología podría ser aplicable para laboratorios de análisis que cuenten con instrumental estándar y busquen utilizarla para fines didácticos, de monitoreo o investigación; logrando así contribuir a que a la población salvadoreña se le pueda apoyar, con información técnica adecuada que le permita cuidar de su salud de una manera más instruida.

CAPÍTULO II

OBJETIVOS

2.0 OBJETIVOS

2.1 Objetivo General

Elaborar una marcha analítica para la cuantificación de taurina presente en bebidas energizantes comercializadas en El Salvador

2.2 Objetivos Específicos

2.2.1 Realizar una revisión bibliográfica de los métodos analíticos para la cuantificación de taurina y reglamentación de referencia aplicable.

2.2.2 Seleccionar la metodología idónea para el diseño de la marcha analítica apropiada para la cuantificación de taurina en bebidas energizantes.

2.2.3 Elaborar la marcha analítica para determinar el contenido de taurina presente en bebidas energizantes, asimismo incluyendo el planteamiento para la realización de los cálculos necesarios para tal cuantificación.

CAPÍTULO III
MARCO TEÓRICO

3.0 MARCO TEÓRICO

3.1 Generalidades

Las bebidas energizantes son productos de venta libre que han ganado una gran aceptación dentro de la población urbana salvadoreña pues se promocionan como una forma de aliviar la fatiga, mantener la vigilia, mejorar el rendimiento físico y estimular las capacidades cognitivas ante situaciones de estrés. Su amplia distribución se debe por una parte por su bajo costo y fácil acceso en supermercados, tiendas de conveniencia y otros pequeños comercios dentro de las comunidades, y por otra parte por la casi completa desinformación generalizada dentro de los consumidores; estas condiciones son una combinación potencialmente peligrosa pues el consumo indiscriminado de estas bebidas pueden, a corto, mediano y largo plazo, causar graves efectos nocivos a la salud humana, por el exceso en el consumo de cafeína y taurina.



Figura No.1 Ejemplo de campañas publicitarias de bebidas energizantes comercializadas en El Salvador.

Fuente: Elaboración propia basada en ¹⁶

3.2 Origen de las bebidas energizantes

3.2.1 Sustancias energizantes a través de la historia

Históricamente alrededor del mundo se han utilizado numerosos productos con la creencia y experiencia de ser energizantes, estimulantes, reparadores e incluso terapéuticos, que permiten evitar el cansancio, tener una reactivación de las funciones y desempeño físico y mental de quien las ingiere. Dentro de estas sustancias presentes a lo largo de siglos se encuentran los siguientes:

– **Café**

Originario de Etiopía y con registros de su consumo que datan desde el siglo XI, es la bebida energizante natural más difundida en el mundo y es altamente estimulante por su contenido de cafeína, una sustancia psicoactiva. Es obtenida por la percolación de los granos de las plantas del género *coffea*, siendo uno de los productos más comercializados a nivel mundial, además de estar entre las tres bebidas más consumidas por el ser humano, junto con el agua y el té.

– **Yerba Mate**

Utilizada desde siglos atrás por los pueblos guaraníes, la yerba mate (*Ilex paraguariensis*) es una especie neotropical originaria de América del sur y su infusión es considerada una de las mejores bebidas del mundo por la gran cantidad de beneficios que posee, entre ellos, su poderoso efecto energizante pues contiene una importante cantidad de cafeína (entre 0,7% a 1,7% de peso seco).

– **Planta de Te**

Su primera aparición se registra en una historia que data del 2737 a. de C. durante el reinado del emperador Chino Shen Nong; el te es una infusión hecha a partir de las hojas y brotes de la planta del te (*Camellia Sinensis*). Los componentes más conocidos del té, y los más apreciados por su efecto, son sin duda las bases xánticas, la principal de las cuales es la cafeína, aunque también contiene teofilina, teobromina y la teanina. La presencia de vitaminas en el té es mínima, pero constituyen un enriquecimiento de la bebida, dado que contiene vitaminas A, B, C, E y P.

– **Hoja de coca**

La planta de coca ha tenido y tiene un papel importante en las culturas andinas ya que por siglos ha sido utilizada extensamente debido a sus propiedades medicinales y nutritivas, así como su relación con la adivinación y los fines apotropaicos (o de protección). Es utilizada en todos estos aspectos desde hace miles de años por culturas prehispánicas andinas como las muisca, aimara y quechua; así como culturas amazónicas. La planta de coca se hizo conocida en el mundo entero por sus alcaloides derivados de la pirrolidina y del tropano; el

más reconocido es la metil bezoil ecgonina (cocaína), una sustancia que es un potente estimulante del sistema nervioso central. Desde 1885, extractos de la hoja de la coca han sido utilizados en las bebidas como la Coca-Cola.

– **Nuez de cola**

Originario de África, el árbol de cola (*Cola acuminata*) de la familia de las malváceas, y más específicamente el extracto de su nuez, fue descrito por primera vez en 1832 por Schott y Endl y ha sido utilizado por su efecto estimulante derivado de su contenido de cafeína y otras sustancias con bases xánticas.

– **Ginko biloba**

Desde hace milenios, se ha utilizado por sus acciones terapéuticas, especialmente por la medicina tradicional china, y las hojas del árbol se usan en la herbolaria moderna. De las hojas del ginkgo se obtiene un extracto que posee flavonoides (ginkgoloides y heterósidos) que al ingerirse aumentan la circulación sanguínea central y periférica, y como consecuencia se hace más eficiente la irrigación de los tejidos orgánicos.

– **Ginseng**

El término ginseng se usa para denominar a numerosas especies de plantas del género *Panax*, en latín, panacea, y a otras que no son del género *Panax*, pero tienen propiedades muy similares, sus primeros usos se remontan en China hace más de 5000 años. La parte empleada de la planta es la raíz, se utiliza para tratar diversos trastornos de salud (tales como problemas cardíacos, la diabetes, el trastorno por déficit de atención con hiperactividad, etc.), fortalecer la memoria y el sistema inmunitario, mejorar el rendimiento, prevención del cáncer, etc. No obstante, no existe evidencia científica sólida de su efectividad en ninguno de ellos, por lo que no se puede hacer ninguna recomendación firme sobre su empleo, aunque es ampliamente utilizada tanto en preparaciones medicinales como en bebidas energizantes.

– **Chocolate (cacao)**

El chocolate es obtenido por el procesamiento de los granos del fruto del arbusto de *Theobroma cacao*, originario de la región Amazónica americana, pero muy relacionada a los pueblos prehispánicos en México y Centroamérica; este es muy rico en antioxidantes, superando al té verde y vino tinto, debido a su alto contenido en vitamina C, fibra y serotonina, que lo convierte en un excelente aliado para prevenir enfermedades cardiovasculares, cerebrovasculares, cáncer hepático, gástrico y de colon, además el chocolate es como golpe de energía y motivación. El chocolate aporta minerales como fósforo, hierro, magnesio y potasio. También vitamina A, E, B1 y B2, las cuales aportan un valor proteico que ayuda a nivel muscular.

– **Guaraná**

La guaraná es el fruto del arbusto *Paullinia cupana* de la familia Sapindaceae. Es originario de la Amazonia, utilizado durante siglos por los pueblos indígenas de Bolivia, Paraguay, Perú, Argentina, Brasil, Ecuador, Colombia y Venezuela; la guaraná es rica en vitaminas y estimulantes como la cafeína por lo que es utilizado principalmente como bebida en preparaciones artesanales y bebidas comerciales.

3.2.2 La evolución de las bebidas energizantes

En julio de 1886 en el laboratorio del farmacéutico John Stith Pemberton, mezclando ingredientes naturales como la hoja de coca, la nuez de cola y agua carbonatada dio origen a la fórmula de una de las bebidas de mayor fama y difusión en la actualidad, pero no como una bebida energizante, sino como un preparado medicinal¹. No fue hasta 1906 que por primera vez una marca de gaseosa de cola de fama mundial presenta su producto como “energy drink”, pero rápidamente este calificativo terminó disminuido.



Figura No.2 Empleado de tienda dispensando una de las bebidas más famosas de todos los tiempos en la primera década del siglo XX.
Fuente: Imagen extraída de ¹⁷

Posteriormente, en 1949, apareció formalmente en los Estados Unidos el término “bebida energizante” con la aparición de una bebida comercializada como “Dr. Enuf”, pero la popularidad y la expansión por todo el mundo comenzaron en 1987, la industria de bebidas colas inicia la distribución de productos con altas concentraciones de cafeína, azúcar, e incluso mezclas con guaraná que conducen a la génesis de la bebida energizante más conocida en Austria: Red Bull. A Estados Unidos llegan en 1997 y más tarde al resto de países de América².



Figura No.3 Remolque con la publicidad de la bebida Dr. Enuf en donde se autodeclaran la original bebida energizante
Fuente: Imagen extraída de ¹⁸

3.3 Definición de bebidas energizantes

El Codex alimentario o el RTCA (Reglamento Técnico Centroamericano) no especifican una definición de bebidas energizantes, y la NOM-218-SSA1-2011 la cataloga como una bebida adicionada con cafeína, sin darle espacio a una formulación más compleja; pero en Colombia la resolución 4150 del año 2009 del Ministerio de Protección Social establece el Reglamento Técnico Colombiano sobre los requisitos que deben cumplir las bebidas energizantes para consumo humano, ocupando en éste la siguiente definición: “Bebida energizante: Bebida analcohólica, generalmente gasificadas, compuesta básicamente por cafeína e hidratos de carbono, azúcares diversos de distinta velocidad de absorción, más otros ingredientes, como aminoácidos, vitaminas, minerales, extractos vegetales, acompañados de aditivos acidulantes, conservantes, saborizantes y colorantes”. Las bebidas energizantes o energéticas, también son conocidas como hipertónicas, neurotizantes o psicoactivas, contienen sustancias estimulantes, y que ofrecen al consumidor disminuir temporalmente la sensación de fatiga y el agotamiento, además de aumentar la habilidad mental y proporcionar un incremento de la resistencia física. En su mayoría contienen principalmente cafeína, vitaminas, carbohidratos, y otras sustancias naturales orgánicas como la taurina.

3.4 Composición de las Bebidas Energizantes.

Conforme al Reglamento técnico Colombiano, las bebidas energizantes tienen una fórmula base constituida por cafeína, taurina, glucoronolactona, inositol y carbohidratos.

Tabla N° 1. Componentes principales en las Bebidas Energizantes. ¹⁹.

Sustancias químicas autorizadas	Contenido máximo por 100 ml
Cafeína	32 mg
Taurina	400 mg
Glucoronolactona	250 mg
Inositol	20 mg
Carbohidratos	12 g

También se permite la adición de Tiamina (B1), Riboflavina (B2), Acido Pantoténico (B5), Piridoxina (B6), Cianocobalamina (B12), Niacina y Vitamina C conforme a lo establecido en el Decreto 3863 de 2008.

Tabla N° 2. Valores de referencia diarios y niveles máximos de consumo tolerable de vitaminas, minerales y oligoelementos para suplementos dietarios permitidos en bebidas energizantes. ¹⁹

Nutriente	Unidad de medida	Valores de referencia diarios (VRD)	Niveles máximos de consumo tolerables (UL)
		Niños mayores de 4 años y adultos	Adultos
Vitamina C/ Ac. Ascórbico	Mg	60	1000
Vitamina B1/ Tiamina	Mg	1.5	1004
Vitamina B2/ Riboflavina	Mg	1.7	40
Vitamina B5/ Ac. Pantoténico	Mg	10	200
Vitamina B6/ Piridoxina	Mg	2	100
Vitamina B12/ Cianocobalamina	Microgramo	6	20005
Niacina/ Ac. Nicotínico	mg	20	35

Además, según sea el fabricante, también son complementadas con vitaminas, extractos vegetales como el de guaraná y ginseng, y aminoácidos como la carnitina.

3.5 Descripción de los componentes principales en las Bebidas Energizantes.

Con excepción de la taurina (ver Pág. 27), a continuación, se describe de forma general los principales componentes de las bebidas energizantes:

3.5.1 Cafeína: La cafeína es un antioxidante alcaloide del grupo de las xantinas, sólido cristalino, blanco y de sabor amargo con formula molecular $C_8H_{10}N_4O_2$, que actúa como una droga psicoactiva, estimulante del sistema nervioso central, por su acción antagonista no selectiva de los

receptores de adenosina. Es consumida por los humanos principalmente en infusiones extraídas del fruto de la planta del café y de las hojas del arbusto del té, así como también en varias bebidas y alimentos que contienen productos derivados de la nuez de cola. En los humanos, la cafeína es un estimulante del sistema nervioso central que produce un efecto temporal de restauración del nivel de alerta y eliminación de la somnolencia. Las bebidas que contienen cafeína, tales como el café, el té, el mate, algunas bebidas no alcohólicas (especialmente los refrescos de cola) y las bebidas energéticas gozan una gran popularidad. La cafeína es la sustancia psicoactiva más ampliamente consumida en el mundo. En Norteamérica, el 90 % de los adultos consumen cafeína todos los días. En los Estados Unidos, la Food and Drug Administration (Administración de Drogas y Alimentos) se refiere a la cafeína como una "sustancia alimentaria generalmente reconocida como Segura (Generally Recognized As Safe) utilizada para múltiples propósitos"³.

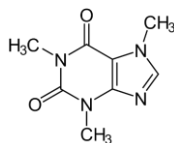


Figura No. 4. Molécula de cafeína.
Fuente: Elaboración propia en base a ³

3.5.2 Glucuronolactona: la glucuronolactona es un carbohidrato derivado de la glucosa mediante su metabolismo en el hígado el cual se presenta naturalmente y es un importante componente estructural de casi todos los tejidos conectivos, además de relacionarse a los procesos de desintoxicación del cuerpo como lo confirma el manual Merck, también se encuentra en la savia de muchas plantas, granos y el vino tinto. Este es un compuesto blanco sólido inodoro, soluble en agua caliente o fría con formula molecular $C_6H_8O_6$, puede existir en forma de aldehído o en forma de hemiacetal bicíclico (lactol).



Figura No.5 Moléculas de glucuronolactona en su forma aldehídica (izquierda y forma lactol (derecha)
Fuente: Elaboración propia en base a ³

La glucuronolactona es un ingrediente popular en bebidas energéticas, aunque los niveles de ésta en las mismas excedan los del resto de la dieta, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria concluyó que la exposición a este compuesto con el consumo regular de bebidas energéticas no es preocupante. El nivel de no observación de efectos adversos de glucuronolactona es de 1000 mg/kg/día.

3.5.3 Inositol: El inositol es un compuesto orgánico de la familia de los polioles o polialcoholes de fórmula molecular $C_6H_{12}O_6$, con 9 posibles estereoisómeros; presente en las membranas plasmáticas y en otras estructuras de productos naturales, es considerado parte del conjunto de vitaminas B, siendo nombrado como vitamina Bh. Algunos estudios clínicos lo relacionan al combate contra la depresión, trastorno bipolar y por lo menos otras 6 enfermedades mentales, la neuropatía diabética y en la prevención del cáncer. En suplementos alimenticios o bebidas, es utilizado pues se presume que contribuye a la mejora del estado de ánimo de quien lo ingiere.

3.5.4 Carbohidratos: las bebidas energizantes son formuladas con gran cantidad de carbohidratos como la glucosa, sacarosa, maltodextrina, galactosa y sucrosa; siendo sus funciones principales otorgar un sabor dulce agradable, y contribuir a potenciar el efecto estimulante de las bases xánticas y los demás compuestos estimulantes⁴.

3.5.5 Vitaminas: dentro de las vitaminas permitidas en las bebidas energizantes se encuentran la Tiamina (B1), Riboflavina (B2), Acido pantoténico (B5), Piridoxina (B6), Cianocobalamina (B12), Niacina y vitamina C; siendo su función principal contribuir con el rendimiento físico y mental, reducir el cansancio y la fatiga. No obstante, su acción coadyuvante no es significativa para personas que suplen sus necesidades vitamínicas por medio de una dieta adecuada, pues las vitaminas no son capaces de causar sobresaturación o sobredosis, eliminándose sin causar ningún efecto⁴.

3.5.6 Extractos naturales: los más comúnmente utilizados por su popularidad histórica derivada de sus usos en medicina tradicional o en suplementos estimulantes, son el extracto de guaraná y de ginseng. En el caso del extracto de guaraná su acción proviene de la presencia de bases xánticas que se suman al contenido original de cafeína, pero en el caso del extracto de ginseng no tiene un respaldo científico que sustente su utilización más que su reputación de siglos de uso en medicina tradicional⁴.

3.5.7 Carnitina: La carnitina es una amina cuaternaria sintetizada en el hígado, los riñones y el cerebro a partir de dos aminoácidos esenciales: lisina y metionina; con fórmula molecular $C_7H_{15}NO_3$ conocida comúnmente como L-Carnitina pues en la naturaleza se encuentra en su estereoisómero levo-rotatorio. El principal papel de la carnitina es acelerar el proceso de oxidación de ácidos grasos, y de esta manera la ulterior producción de energía. El déficit de carnitina conduce a una disminución sustancial de la producción de energía y al aumento de masa del tejido adiposo. Un exceso de carnitina produce un aumento de trimetilamina, conduciendo a patologías en el sistema circulatorio y cáncer. En suplementos es incluida pues se ha asociado a mejorar el desempeño muscular durante el ejercicio por disminuir el estrés oxidativo, por lo que en bebidas energéticas promete contribuir con la mejora del desempeño físico.

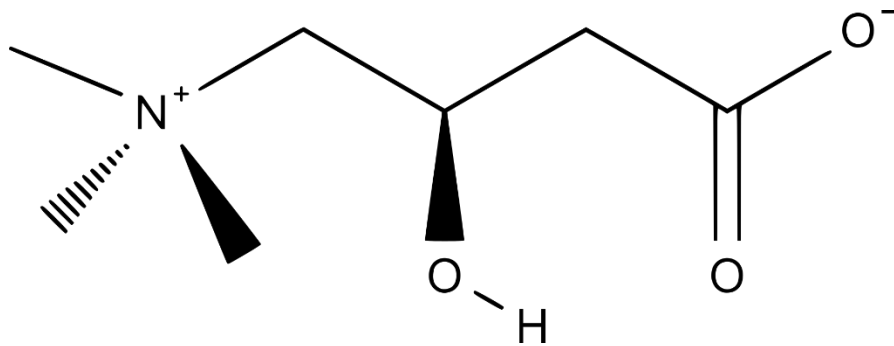


Figura 6. Molécula de L-carnitina.
Fuente: Elaboración propia.

3.6 Taurina

La taurina fue aislada por primera vez en 1827 de la bilis de buey donde se encuentra en altas concentraciones, esta conexión con el bovino cuyo nombre proviene de la raíz latina “tauros” explica su denominación.

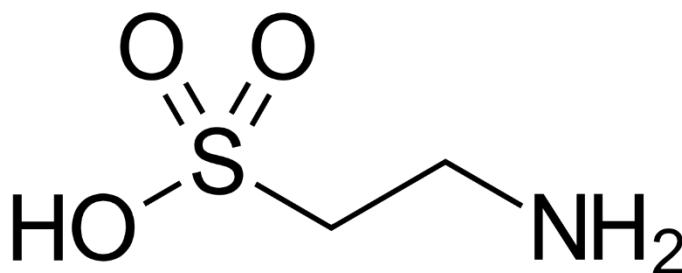


Figura No. 7. Estructura Química de la Taurina.
Fuente: Elaboración propia en base a ⁵

Nombre común:	Taurina
Fórmula química:	$C_2H_7NO_3S$
Formula semidesarrollada:	$NH_2-CH_2-CH_2-SO_3H$
Sinónimos:	Ácido 2-amino-etano-sulfónico
Peso molecular:	125.14 g/mol
Apariencia:	Solido de polvo cristalino blanco e inodoro.
Punto de Fusión:	305 °C
Punto de Sublimación:	178 °C.
Densidad y fase:	1.72 g/ml, sólido.
Solubilidad:	Soluble en Agua, prácticamente insoluble en alcohol.
Acidez (pKa):	1.5 a 4°C

La taurina se sintetiza en las células humanas a partir del aminoácido azufrado metionina, se considera semi-esencial ya que puede ser sintetizado por el organismo, pero esta producción endógena es insuficiente por lo que necesitamos ingerirlo en la dieta. Es diferente de los otros aminoácidos ya que contiene un grupo ácido sulfónico, generalmente se la clasifica como un aminoácido pero no posee un grupo carboxílico. La taurina es un derivado de la cisteína que está formada por azufre, el cual es necesario para mantener la estructura proteínica, la actividad enzimática, y el metabolismo de la energía. Es uno de los aminoácidos más abundantes del organismo y se encuentra de forma libre en el tejido muscular (incluido el tejido cardiaco), en grandes cantidades en las plaquetas y en el sistema nervioso. Es un componente de los ácidos biliares donde se utiliza para ayudar a la absorción de las grasas y de las vitaminas liposolubles. También se encuentra de forma natural en el calostro que segregan las madres en los primeros días de alumbramiento y en la leche materna por lo que es esencial en los recién nacidos⁵.

3.7 Efectos de la Taurina en el organismo humano.

La taurina posee diversas funciones biológicas tales como:

- Participa en la formación de ácidos biliares primarios junto a la glicina, por lo que ayuda a la excreción del colesterol por medio de la bilis.
- Ejerce acción antioxidante y antiinflamatoria por su capacidad de atrapar moléculas prooxidantes, las cuales pueden causar daño celular.
- Modifica la permeabilidad del agua y regula las condiciones de isoosmolaridad de las células.
- Constituye un neuromodulador del sistema nervioso central y neurotransmisor.
- Participa en la función y desarrollo de la retina.
- Mejora el perfil lipídico y disminuye la presión sanguínea, lo cual es útil en la prevención de problemas cardiovasculares.
- Un déficit de taurina provoca cardiomiopatías, por lo que presenta un rol en el normal desarrollo de la capacidad contráctil.
- La taurina es un nutriente esencial en los niños nacidos prematuramente.
- Se ha sugerido, que podría actuar como modulador del crecimiento.
- Influye en la función hepática, reduciendo la hepatotoxicidad inducida por las sales biliares⁶.

Sobre los músculos esqueléticos, se conoce que hay una elevada concentración de taurina en ellos, la mayor parte, en forma libre. La taurina ha demostrado su participación en el mecanismo de excitación - contracción del músculo esquelético, lo que significa que afecta a la transmisión de la señal eléctrica hacia las fibras musculares. Esto tiene una gran importancia para asegurar un rendimiento muscular óptimo.

También actúa como un agente anti catabólico; todas las formas de estrés provocan el agotamiento de los niveles de taurina y de glutamina en los músculos, la taurina ha demostrado prevenir la disminución de las proteínas estructurales presentes en el músculo esquelético. Estudios con animales han demostrado un incremento en el desarrollo y un mayor crecimiento de estos cuando incluían un suplemento de este aminoácido en su dieta. Se ha observado una relación directa entre la suplementación con taurina y el incremento de síntesis proteica deteniendo la tasa de catabolismo inducido por el estrés o el entrenamiento intenso, esto significa un incremento de masa muscular magra.

En la voluminización celular, la implicación de la taurina en la regulación del volumen celular se ha demostrado en el cerebro, células de cultivo y tejido nervioso; ésta puede producirse por la exposición de una célula a condiciones hipoosmóticas en el que el fluido tiende a moverse hacia la célula y este cambio en volumen celular se asocia a modificaciones en la síntesis de glucógeno y proteína. Cuando los niveles de taurina aumentan hasta un cierto nivel, se produce una inflamación de esas células.

A nivel del sistema nervioso, la taurina se encuentra en cantidades importantes en todos los tejidos excitables del sistema nervioso central, donde tienen una gran influencia en la regulación de este. Es un importante estabilizador de las membranas de las células nerviosas pues, si la membrana de la célula está eléctricamente inestable, la transmisión nerviosa no se hará correctamente dando lugar a alteraciones del sistema nervioso; si la transmisión del impulso nervioso a nivel neuromuscular no se realiza correctamente, la contracción muscular se verá alterada y como tal, no se logrará un rendimiento físico adecuado. La taurina actúa como un neurotransmisor, al estimular el sistema nervioso se le considera como estimulante suave; es muy útil en epilepsia por disminuir la frecuencia de las crisis convulsivas y por normalizar los niveles de ácido glutámico.

En la retina, la taurina y su derivado, la hipotaurina, funcionan como protector de los bastoncitos pigmentados u otros elementos de la retina, contra la acción deteriorativa de agentes oxidantes producidos por la luz.

También actúa como un limitador de insulina, pues se comporta de forma similar a la hormona insulina sobre el metabolismo de los carbohidratos y las proteínas; ayuda a empujar a la glucosa y a los aminoácidos dentro de las células musculares, esto significa un incremento del metabolismo de la glucosa y de los aminoácidos. Tiene un efecto hipoglucémico y el resultado es un aumento de la síntesis proteica. Es un aminoácido muy útil en diabéticos, por su efecto hipoglucémico, por su efecto normalizador de la agregación plaquetaria, por su mejora en la cardiopatía y en las enfermedades retinales, consecuencias de la diabetes.

En la función biliar; las sales biliares son producidas y conjugadas en el hígado y excretados al duodeno, donde participan en la emulsificación de las grasas para su absorción. La taurina es un componente normal de los ácidos biliares, donde se utiliza para ayudar a la absorción de las grasas y de las vitaminas liposolubles, se une a los ácidos biliares y por ello mejora la habilidad para la digestión de las grasas. La suplementación con taurina puede inhibir la formación de cálculos

biliares y mejorar el funcionamiento de sistema hepático-biliar. Mejora la fuerza del músculo cardiaco, previniendo el desarrollo de cardiomiopatía y disminuyendo la presión arterial.

En resumen, el papel de este aminoácido está ligado a muchas funciones normales y necesarias para el organismo, pero es de igual importancia conocer los efectos adversos relacionados a su ingesta excesiva⁷.

3.8 Efectos adversos causados por el consumo excesivo de Taurina en el organismo humano.

Entre los principales efectos adversos asociados al consumo de taurina están:

- Enfermedad renal por síndrome nefrótico, debido al daño a los racimos de vasos sanguíneos que filtran los desechos y el exceso de agua de la sangre.
- Alteración de la síntesis hepática de la fosfatidilcolina, pudiendo llegar hasta el padecimiento de hígado graso, y aumento de los niveles de colesterol y triglicéridos en sangre.
- En hipertensos, por la influencia que tiene sobre la presión arterial, puede alterarla e incluso modificar la efectividad de la medicación que la controla.
- En conjunto con la cafeína, puede causar ansiedad, taquicardia, arritmias cardiacas y otros padecimientos cardiovasculares. Además, en algunos casos puede provocar temblor en manos, somnolencia o insomnio.

Con el conocimiento de los múltiples efectos potenciadores y de mejora del rendimiento físico y mental causado por la taurina en el cuerpo humano, asimismo de los efectos adversos derivados del exceso de su ingesta, es necesario que se hagan esfuerzos por tener más información sobre estas sustancias y que permitan robustecer una regulación apropiada, asimismo la cuantificación del contenido de los productos que la contienen para evitar un consumo excesivo por desconocimiento o por incumplimiento de los límites normativos que puedan existir hasta este momento, regional o localmente⁸.

3.9 Regulaciones y normativas de referencia para contenido de taurina en bebidas energizantes

A pesar de que las bebidas energizantes existen y se comercializan ampliamente al público desde el principio del siglo XX, a la fecha no existe un consenso general que pueda utilizarse

universalmente como referencia normativa exclusiva. En Noviembre de 2001, la comisión del Codex Alimentarius y en específico el comité sobre nutrición y alimentos para regímenes especiales, durante el debate sobre bebidas para deportistas y bebidas energéticas, sobre las regulaciones aplicables reconoce que no era posible llegar a una conclusión y acordó mediante una carta circular se pidiesen observaciones para poder continuar con el debate en próximas reuniones y tomar las decisiones a futuro.

Posteriormente los países y las regiones adoptaron disposiciones propias; en el caso de Suramérica, Brasil, Paraguay, Colombia, Ecuador y Argentina coincidieron en sus normativas locales estableciendo un límite máximo de taurina en bebidas energizantes de 400 mg/ 100 ml. La Unión Europea, Australia y Nueva Zelanda concluyen que el consumo moderado de bebidas energéticas no representa riesgos para la salud, pero también consideran que debe ponerse la advertencia sobre la prohibición de su consumo por embarazadas o en etapa de lactancia, y niños menores de 12 años. De igual forma, el Reglamento Técnico Centroamericano y la Norma Mexicana no establecen un límite específico, únicamente establecen normas de etiquetado con las mismas advertencias mencionadas anteriormente.

Ante este escenario normativo, puede adoptarse en adelante el valor de 400 mg/ 100 ml como referencia del contenido máximo de taurina en bebidas energizantes.

3.10 Importancia de la determinación de taurina en las bebidas energizantes.

La cuantificación de taurina en bebidas energizantes es importante por varias razones:

- **Seguridad alimentaria:** La taurina se utiliza en muchas bebidas energizantes como ingrediente activo. La cuantificación precisa de la taurina en estas bebidas es crucial para garantizar que los niveles de este aminoácido se mantengan dentro de los límites seguros para el consumo humano. El exceso de taurina puede tener efectos adversos para la salud, por lo que es importante controlar su concentración. En un estudio hecho en la Universidad de El Salvador en 2010⁹, se recopiló información que muestra que cerca de un 59.5% de la población consume bebidas energizantes, indicando también que el 76.4% son menores de 18 años, además el estudio arroja que la frecuencia de consumo es menor de 1 semana con un valor del 78.99%; aunque lo que más atención requiere es que el 65.55% de la población participe de la encuesta desconocían los efectos secundarios generados por un consumo de

este tipo de bebidas. Otro estudio hecho en la Universidad Evangélica de El Salvador en 2018¹⁰ expone que las bebidas energizantes, con un 27.9%, son el segundo producto psicoestimulante más consumido por el universo encuestado, solo por detrás del café y por delante del tabaco y bebidas carbonatadas, para estimular su energía y obtener un estado de alerta. Con este tipo de estudio se respalda la importancia que tiene, en materia de seguridad alimentaria, el monitoreo que debe sostenerse sobre las bebidas energizantes y sus componentes psicoactivos.

- **Calidad del producto:** La cantidad de taurina presente en una bebida energizante puede afectar la eficacia percibida por los consumidores. Cuantificar con precisión la cantidad de taurina en el producto final asegura que cumpla con las especificaciones de formulación y calidad establecidas por el fabricante.
- **Etiquetado nutricional:** Muchos consumidores buscan información detallada sobre los ingredientes de los productos que consumen, incluidas las bebidas energizantes. La cuantificación precisa de taurina permite a los fabricantes proporcionar información precisa en el etiquetado nutricional, lo que ayuda a los consumidores a tomar decisiones informadas sobre su consumo.
- **Investigación y desarrollo:** La cuantificación de taurina en bebidas energizantes es importante para la investigación y el desarrollo de nuevos productos. Comprender cómo varía la concentración de taurina bajo diferentes condiciones de formulación y procesamiento puede ayudar a los fabricantes a optimizar sus productos y desarrollar nuevas formulaciones con perfiles de ingredientes mejorados.

3.11 Métodos de análisis para aminoácidos.

La taurina, por sus características similares a los aminoácidos, comparte las técnicas instrumentales diseñadas y utilizadas para este tipo de moléculas, aunque se requieren preparaciones específicas para lograr una detección singular y cuantificación exacta.

3.11.1 Métodos basados en cromatografía¹¹

Las técnicas cromatográficas para análisis de aminoácidos son varias y dependientes de su exactitud, siendo las principales las siguientes:

– **Cromatografía de adsorción.**

Basada en la separación de una mezcla de sustancias mediante el reparto de estas en la fase móvil y la fase estacionaria; la migración de cada sustancia dependerá del coeficiente de reparto de cada una de ellas entre las fases, este es calculado por el cociente de las distancias recorridas por la sustancia y la fase móvil. Los principales referentes de este método son la cromatografía de papel y cromatografía de capa fina, el primero siendo uno de los métodos clásicos el cual utiliza papel Whatman como fase estacionaria y el analito dentro de una solución como fase móvil; el segundo utiliza una fina capa de adsorbente dispuesta sobre una lámina, usualmente de vidrio, como fase estacionaria e igualmente la fase móvil es una solución que contiene el analito.

– **Cromatografía de intercambio iónico**

Se fundamenta en hacer la separación de las sustancias en función de su carga eléctrica. La fase estacionaria posee una naturaleza catiónica o aniónica que se vuelve un intercambiador iónico con los iones del analito. En este tipo de cromatografía se hace pasar una disolución con el analito y los iones de este van formando uniones estables con la fase estacionaria, seguido se hace pasar la fase móvil, la cual contiene esta compuesta por especies iónicas que compiten con el analito por un lugar en la fase estacionaria haciendo un intercambio entre ellos en la fase móvil y eluyéndose así de la columna cromatográfica.

– **Electroforesis**

El principio de este método es hacer una separación según la diferencia de velocidad de las moléculas en un campo eléctrico a través de una membrana porosa, la cual las separa por diferencia de tamaño molecular y carga eléctrica. El procedimiento utiliza una tira recubierta de una sustancia porosa impregnada en un electrolito, la cual tiene sus extremos sumergidos en depósitos independientes conteniendo el mismo electrolito y se encuentran conectados a un generador de corriente, la muestra se deposita sobre la tira habiendo controlado previamente el pH para favorecer su comportamiento de zwitterion y así adquiera carga para que logre migrar hacia uno de los electrodos.

– **Cromatografía de gases**

Este método además que permite hacer el análisis más rápido, posee una alta resolución y sensibilidad; es utilizada principalmente para separar y analizar compuestos volátiles y semivolátiles de una mezcla. En la cromatografía de gases la muestra se disuelve en una fase móvil que puede ser un gas, un líquido o un fluido supercrítico; esta se hace pasar a través de otra fase, inmóvil o inmiscible, denominada fase estacionaria. El resultado de la diferencia de movilidad de las sustancias en la mezcla conlleva a la separación de los distintos componentes conforme atraviesan la fase estacionaria, permitiendo así su caracterización.

– **Cromatografía líquida de alta eficiencia con columna de fase reversa (HPLC)**

Esta técnica permite hacer la separación de las sustancias con base en la polaridad de estas aprovechando las fuerzas de repulsión que se producen entre un compuesto polar (fase móvil), un compuesto relativamente apolar y una fase estacionaria apolar. En este tipo de cromatografía la mezcla con el analito se introduce en la columna y circula a través de la fase estacionaria impulsada por la fase móvil, cada sustancia lo hará a una velocidad diferente según su afinidad con cada una de las fases. Esta técnica es una de las más utilizadas para análisis de aminoácidos.

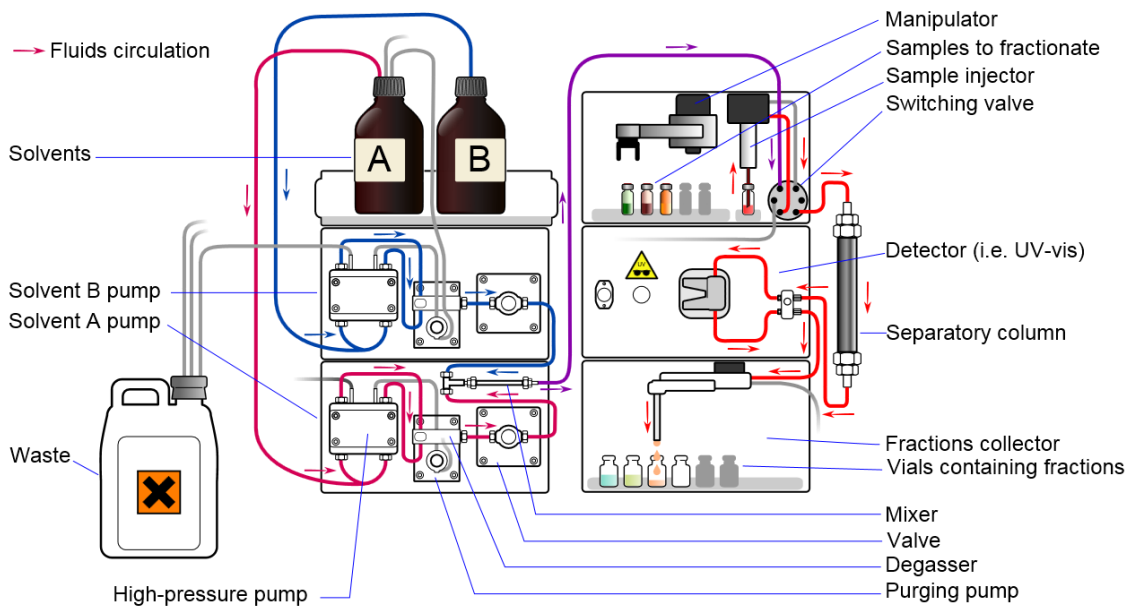


Figura N° 8 Esquema HPLC.

Fuente: Imagen extraída de ¹⁴

3.12 Determinación de taurina por HPLC

A pesar de la disposición de diferentes métodos de análisis para aminoácidos, las investigaciones se han orientado para analizar la taurina por métodos basados en HPLC, siendo los más utilizados los siguientes¹¹:

- **Método de la ninhidrina:** La ninhidrina se utiliza para la determinación de los aminoácidos tras su separación en su forma natural por cromatografía de intercambio iónico. Ésta reacciona con los aminoácidos en medio ácido (pH 3-4) produciendo un complejo de color púrpura-azulado. La determinación de aminoácidos requiere previamente de la eliminación de interferentes como proteínas, amoníaco, urea, etc. Por tanto, la derivatización con ninhidrina es exclusivamente postcolumna, así se evita que la ninhidrina reaccione con otras sustancias no deseadas. La reacción de la ninhidrina con los aminoácidos es muy sensible, llegándose a detectar cantidades inferiores a un picomol, pero raramente reproducibles por debajo de 100 picomoles. Esta limitación la hace inadecuada para muchas de las aplicaciones demandadas actualmente. La sensibilidad de la ninhidrina depende de una serie de factores: es muy sensible a la luz, al oxígeno atmosférico, a cambios de temperatura y de pH. Este derivado de color azul absorbe una longitud de onda de 540 nm.
- **Método del o-ftaldehido (OPA):** Los aminoácidos pueden reaccionar con OPA en presencia de 2-mercaptoetanol a pH básico produciendo un compuesto fluorescente con un máximo de excitación de 340 nm y un máximo de emisión de 455 nm. La reacción se realiza rápidamente sin necesidad de calentamiento. Una clara ventaja que posee este método es que es hasta 10 veces más sensible que el método de la ninhidrina; pero su principal inconveniente es que se necesita un detector de fluorescencia en el cromatógrafo.
- **Método de la fluorescamina:** Los aminoácidos reaccionan con la fluorescamina dando origen a un derivado fluorescente con un máximo de excitación de 390 nm y un máximo de emisión de 475 nm, el cual es inestable en soluciones acuosas, pero estable en solventes orgánicos como la acetona. La reacción se produce rápidamente a temperatura ambiente.

- **Método del Cloruro de dansilo:** Los aminoácidos reaccionan con cloruro de dansilo a pH básico (pH=9,5) para formar un compuesto fluorescente. El color del compuesto es dependiente del aminoácido específico del cual se formó, por lo que, no hay una longitud de onda específica para todos los aminoácidos, pero se suele utilizar una longitud de onda de excitación de 360 nm y una de emisión de 480 nm¹².
- **Método del 4-fluoro-7-nitrofurazano (NBD-F)¹²:** es un método rápido y simple por HPLC pre-columna en el que no hay necesidad de un instrumento exclusivo para hacer las determinaciones y se basa en la derivatización de la taurina con 4-fluoro-7-nitrofurazano. La reacción entre taurina y NBD-F finaliza en 10 minutos a 60°C. El derivado se mide por HPLC en un detector UV-visible a 470 nm usando una columna convencional de octadecil silano (ODS). La fase móvil utilizada es una mezcla de solución buffer de fosfato disódico – ácido cítrico (pH 5.4) conteniendo bromuro de tetrabutilamonio 10 mmol/l y acetonitrilo (7:3). En un estudio hecho en Japón, experimentalmente se lograron recuperaciones que se encuentran en el rango del 98.2 al 99.9%; la precisión, como desviación estándar, estuvo en el rango de 0.3 a 0.5%; la linealidad, como valor de coeficiente de correlación, fue de 0.999. Para análisis de aminoácidos los métodos de derivatización post-columna son la elección más común, pero requieren cromatografía de intercambio iónico y/o instrumentos exclusivos, los métodos de derivatización pre-columna suelen requerir largos tiempos de reacción, pero el NBD-F actúa como un agente fluorescente que produce fácilmente como derivados, aminas primarias y secundarias que pueden ser determinadas con instrumental disponible en la mayoría de los laboratorios.

3.13 Selección del método para análisis de taurina en bebidas energizantes

Teniendo a la disposición diferentes métodos por HPLC para la determinación de taurina, al hacerse una comparación entre las ventajas y desventajas que presentan cada uno de ellos se puede determinar que el más factible para el desarrollo de una marcha metodológica es el basado en la derivatización con NBD-F pues permite que la puesta en práctica sea accesible, menos compleja y con menor tiempo de análisis, esta comparación se presenta a continuación:

Tabla N° 3. Comparación de ventajas y desventajas entre los métodos de análisis de taurina por HPLC.

Método	Ventajas	Desventajas
Ninhidrina	<ul style="list-style-type: none"> - No requiere derivatización previa - Permite detectar la mayoría de los aminoácidos 	<ul style="list-style-type: none"> - Requiere eliminación de interferencias: proteínas, amoniaco, urea, etc - Mucha sensibilidad a la luz, oxígeno, temperatura y pH - Requiere utilizar cromatografía por intercambio iónico - Reacciones a temperaturas altas (100°C)
o-ftaldehido	<ul style="list-style-type: none"> - No requiere calentamiento - Mayor sensibilidad que el método de ninhidrina - Muy útil para moléculas grupo amino primario 	<ul style="list-style-type: none"> - Requiere trabajarse a pH básico - Requiere detector de fluorescencia - Requiere derivatización - Poca utilidad para moléculas con grupo amino secundario
Fluorescamina	<ul style="list-style-type: none"> - No requiere calentamiento - Reacción rápida y a temperatura ambiente 	<ul style="list-style-type: none"> - Inestabilidad en soluciones acuosas - Requiere detector de fluorescencia - Requiere derivatización - Menor sensibilidad que el método de ninhidrina
Cloruro de dansilo	<ul style="list-style-type: none"> - No requiere equipos específicos 	<ul style="list-style-type: none"> - Requiere trabajarse a pH básico - No es selectivo para taurina, rango de trabajo desde 360 a 480 nm - Requiere derivatización a 70°C por tiempo prolongado
NBD-F	<ul style="list-style-type: none"> - No requiere equipos específicos - Es selectivo - La fase móvil tamponada da estabilidad a cambios de pH - Reacción rápida 	<ul style="list-style-type: none"> - Requiere derivatización a 60°C

Fuente: Elaboración propia

En esta comparativa, el método por NBD-F aventaja al resto de métodos al no requerir equipos específicos para su ejecución, no son necesarias etapas en las que deba tenerse un control minucioso de alguna variable química o física, y el tiempo de análisis es de los más cortos respecto al resto. También debe considerarse que, en Japón, en el Instituto de salud pública de la prefectura de Osaka, este método se desarrolló específicamente para analizar el contenido de taurina en bebidas energizantes, por lo que lo hace específico para determinación del aminoácido en cuestión.

CAPÍTULO IV
PRODUCTO FINAL

4.0 PRODUCTO FINAL

Marcha analítica para la cuantificación de taurina presente en bebidas energizantes comercializadas en El Salvador

4.1 Alcance

El presente documento aplica como referencia técnica y académica para la cuantificación de taurina en bebidas energizantes comercializadas al público en general en El Salvador y disponibles en supermercados, expendios, tiendas, etc.

4.2 Objetivo

Caracterizar y cuantificar taurina en bebidas energizantes por medio de cromatografía líquida de alta eficiencia, y evaluación de su cumplimiento normativo.

4.3 Requerimiento de insumos

Reactivos

- Estándar de referencia USP de Taurina
- Solución de 4-fluoro-7-nitrofurazano (NBD-F) 1mmol/l en acetonitrilo
- Acetonitrilo HPLC
- Agua HPLC
- Metanol HPLC
- Sln Buffer de fosfato 0.1 mol/l conteniendo 20 mmol/l EDTA pH 9.0
- Sln HCl 0.2 mol/l
- Buffer fosfato de sodio – ácido cítrico pH 5.4
- Fase móvil, Buffer de hidrogenofosfato disódico – ácido cítrico (pH 5.4) conteniendo 10 mmol/l de bromuro de tetrabutilamonio y acetonitrilo (7:3)
- Agua destilada (filtrada por filtro 0,45 µm)

Materiales y equipos

- Balanza analítica (Ohaus, Mettler Toledo, Sartorius, etc)
- Cromatógrafo líquido de alta resolución con detector UV-VIS (Shimadzu LC10 CLASS-VP preferiblemente, Agilen, Perkin Elmer, etc)
- Columna L ODS (150 x 4.6 mm, 5 μ m)
- Detector UV/VIS longitud de onda (λ) = 470 nm.
- Bomba isocrática, flujo 1 ml/min
- Ordenador
- Jeringas de vidrio, inyección de 20 μ l (para equipos de inyección manual)
- Equipo para filtración de solventes
- Papel filtro Whatman No. 2, para muestras
- Membrana de celulosa 0.45 μ m de poro y 47 mm de diámetro, para filtración de fase móvil
- Baño de ultrasonido
- Baño maría
- Baño de hielo
- pHmetro
- Equipo de filtración al vacío
- Filtros de 0,45 μ m y membrana de PVDF, Nylon o equivalente
- Tubos de ensayo con rosca
- Beakers de 250, 500, 1000 y 2000 ml
- Balones volumétricos de 10, 100 y 1000 ml
- Pipetas volumétricas de 1, 5 y 10 ml
- Probetas de 500 y 1000 ml
- Embudos de vidrio
- Jeringa de 3.00 mL
- Pinzas de sostén
- Hielera

4.4 Procedimiento^{12, 13,14, 15}

4.4.1 Muestreo

El muestreo es aleatorio simple y las muestras deben ser obtenidas al azar, directamente de los espacios de venta al público y teniendo el cuidado de escoger solamente aquellas que no presenten daño mecánico, completamente selladas y dentro de su vida útil.

El número de unidades a muestrear, para ser representativa, debe ser como mínimo de 3 unidades por locación y por cada marca comercial.

4.4.2 Almacenamiento y transporte de las muestras

Las condiciones de almacenamiento y transporte deberán garantizar que la muestra no se altere o degrade de ningún modo que se afecten los valores del analito en ella.

En general, inmediatamente después de su recolección, las muestras deben almacenarse temporalmente en un recipiente que las proteja de cambios excesivos de temperatura y brinde protección a la luz solar directa durante el traslado del punto de muestreo hacia el laboratorio de análisis. En el laboratorio, mientras no se realice el análisis, deben almacenarse en un lugar limpio, seco, protegido de la luz solar directa, ventilado y que no las exponga a cambios bruscos de temperatura. La temperatura de exposición de las muestras no podrá ser inferior a 0 °C ni superar los 30 °C.

4.4.3 Preparación de solución de NBD-F 1 mmol/l en acetonitrilo. Solución A.

- Pesar en balanza analítica 0.1868 gramos de NBD-F pureza rotulada al 98%.
- Transferir a balón volumétrico de 1000 ml y agregar 250 ml de acetonitrilo HPLC y colocar en un baño ultrasonido por 5 minutos.
- Aforar con acetonitrilo HPLC y homogenizar. Concentración final de 1 mmol/l.

4.4.4 Preparación de solución de buffer de fosfato 0.1 mol/l conteniendo 20 mmol/l de EDTA (pH 9.0). Solución B.

- Preparar una solución stock de fosfato de sodio dibásico dihidratado (0.5 M, Stock 1), disolviendo en balón volumétrico, 35.5 g en un volumen final de 500 ml de agua HPLC (puede ocurrir cristalización si se almacena a 4°C, agitar en baño de agua tibia para deshacer los cristales)
- Preparar una solución stock de fosfato de sodio monobásico anhidro (0.5M, Stock 2), disolviendo en balón volumétrico, 30 g de fosfato de sodio monobásico anhidro en un volumen final de 500 ml de agua HPLC.
- Preparar solución 0.1 M de fosfato de sodio dibásico (solución principal): Agregar 80 ml de solución stock 1 de fosfato de sodio di básico 0.5 M a un beaker de 500 ml y ajustar a un volumen final de 400 ml con agua HPLC.
- Preparar solución 0.1 M fosfato de sodio monobásico (solución de ajuste): Agregar 30 ml de solución stock 2 de fosfato de sodio dibásico 0.5 M a un beaker de 250 ml y ajustar a un volumen final de 150 ml con agua HPLC.
- Ajustar el pH de la solución principal a 7.2 añadiendo solución de ajuste en cantidad necesaria.
- Pesar 0.5845 gramos de EDTA y transferir a un balón volumétrico de 100 ml, añadir 80 ml de agua HPLC y mezclar. Ajustar el pH a 9.0 con solución principal o solución de ajuste.
- Aforar hasta 100 ml con agua HPLC y homogenizar.

4.4.5 Preparación de solución de HCl 0.2 mol/l

- Medir con pipeta graduada un volumen de HCl ($\rho=1.18$ g/ml, pureza 37% en peso) de 16.8 ml y transferir a un balón volumétrico de 1000 ml, agregar cuidadosamente 250 ml de agua HPLC y disolver.
- Aforar con agua HPLC y homogenizar. Concentración final 0.2 mol/l.

4.4.6 Preparación de buffer de fosfato disódico – ácido cítrico (pH 5.4) conteniendo 10 mmol/l de bromuro de tetrabutilamonio. Solución C.

- Preparar 800 ml de agua destilada en balón volumétrico de 1000ml.
- Añadir 18.15 g de fosfato de sodio dibásico dihidratado a la solución. Disolver. Agregar 9.605 g de ácido cítrico anhidro a la solución. Disolver.
- Ajustar la solución al pH final deseado usando HCl o NaOH diluidos.
- Añadir 3.256 g de bromuro de tetrabutilamonio (99%) a la solución. Disolver
- Aforar hasta 1000 ml con agua HPLC.

4.4.7 Preparación de fase móvil. Solución C y acetonitrilo (7:3)

- Medir con una probeta de 1000 ml, 700 ml de solución C.
- Medir con una probeta de 500 ml, 300 ml acetonitrilo HPLC
- Trasferir el contenido de ambas probetas a un beaker de 2000 ml. Mezclar, desgasificar con baño de ultrasonido y filtrar a través de papel Whatman No.2.

4.4.8 Preparación de solución stock estándar de Taurina concentración 3 mg/ml

- Pesar 3 gramos de Taurina USP en balanza analítica.
- Transferir este estándar a un balón volumétrico de 1000 ml, adicionar 250 ml de agua HPLC y colocar en un baño ultrasonido por 5 minutos, aforar con agua HPLC y homogenizar. Concentración final de 3 mg/ml.

4.4.9 Preparación de diluciones para curva de calibración. Concentraciones 0.15 mg/ml, 0.015 mg/ml y 0.0015 mg/ml.

- Tomar una alícuota de 5 ml de la solución stock estándar de taurina y transferirlo a un balón volumétrico de 100 ml. Aforar con agua HPLC hasta volumen. Homogenizar. Concentración obtenida: 0.15 mg/ml.
- Tomar una alícuota de 10 ml de la solución de taurina a concentración 0.15 mg/ml y transferirlo a un balón volumétrico de 100 ml. Aforar con agua HPLC hasta volumen. Homogenizar. Concentración obtenida: 0.015 mg/ml.

- Tomar una alícuota de 10 ml de la solución de taurina a concentración 0.015 mg/ml y transferirlo a un balón volumétrico de 100 ml. Aforar con agua HPLC hasta volumen. Homogenizar. Concentración obtenida: 0.0015 mg/ml.

4.4.10 Preparación de la muestra. Concentración teórica 0.015 mg/ml

- Verter el contenido del envase de bebida energizante en beaker de 2000 ml y desgasificar por ultrasonido durante 20 minutos.
- Tomar una alícuota de 1 ml de muestra desgasificada y transferir a un balón volumétrico de 10 ml. Llevar a volumen con agua HPLC. Homogenizar. Concentración teórica 3 mg/ml, partiendo de una concentración de taurina rotulada de 750 mg en 250 ml de bebida.
- Tomar una alícuota de 5 ml de la muestra diluida a 3 mg/ml y transferir a balón volumétrico de 100 ml, aforar con agua HPLC. Homogenizar. Concentración teórica 0.15 mg/ml.
- Tomar una alícuota de 10 ml de la muestra diluida a 0.15 mg/ml y transferir a balón volumétrico de 100 ml, aforar con agua HPLC. Homogenizar. Concentración teórica 0.015 mg/ml.
- Filtrar la solución (0.015 mg/ml) a través de una membrana (poro 0.45 μm), descartando los primeros ml filtrados (Figura N°9). Reservar el extracto final para los análisis de determinación de taurina por HPLC.



Figura No.9 Proceso de filtración de soluciones estándares y muestras a través de membrana de nylon de 0.45 μm .
Fuente: Imágenes extraídas de Baltrons ⁹

4.4.11 Derivatización de diluciones de estándar de taurina y muestra a concentración teórica.

- En un tubo de ensayo con rosca transferir volumétricamente 1 ml solución de taurina, 2 ml de solución B y 1 ml de solución A.
- Cerrar firmemente el tubo de ensayo y agitar hasta homogenizar.
- Llevar a baño maría a 60°C por 10 minutos.
- Alcanzado el tiempo, retirar el tubo y llevar a baño de agua a temperatura ambiente por 1 minuto; seguido a baño de hielo por 1 minuto más.
- Agregar 1 ml de HCl 0.2 mol/l y reservar para el análisis.
- Repetir el procedimiento con cada solución estándar y muestra.

4.4.12 Preparación del sistema del HPLC

Setear el instrumento (Figura 10) equipado con detector a 470 nm y una columna L de 150 x 4.6 mm, 5 μ m. Rango de flujo de 1.0 ml por minuto. Temperatura 40°C.



Figura. N.º 10: Equipo HPLC Shimadzu.

Fuente: Imagen extraída de ¹⁴

- Encender la computadora.
- Encender los módulos del HPLC.
- Inicializar el programa que controla los módulos del HPLC.
- Purgar el sistema con agua calidad HPLC filtrada a través de poro de 0.45 μ m y desgasificada, permitiendo que corra al flujo programado por 1 ml/min por 5 minutos (la presión de la bomba en este paso debe ser en el intervalo de 0 a 1 Bar)

- Después de transcurrido el tiempo se apaga la bomba desde la terminal de computadora y se cierra la perilla de purga de la bomba manualmente hasta que quede ajustada.

4.4.13 Ambientación del sistema HPLC con fase móvil

- Ambientar el sistema con fase móvil filtrada a través de poro de 0.45 μm y desgasificada, permitiendo que corra al flujo programado de 1 ml/min.

4.4.14 Elaboración de la curva de calibración

La longitud de onda sensible al complejo NBD-aurina formado en la derivatización es a 470 nm, observándose el gráfico típico siguiente:

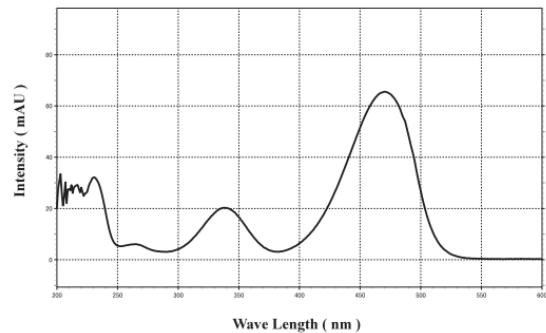


Figura 11. Espectro UV-VIS de NDB-aurina.
Fuente: Imagen extraída de ³

Y un cromatograma resultado de la medición de una muestra en la que esta presente la taurina, posterior a la derivatización se observa como el siguiente:

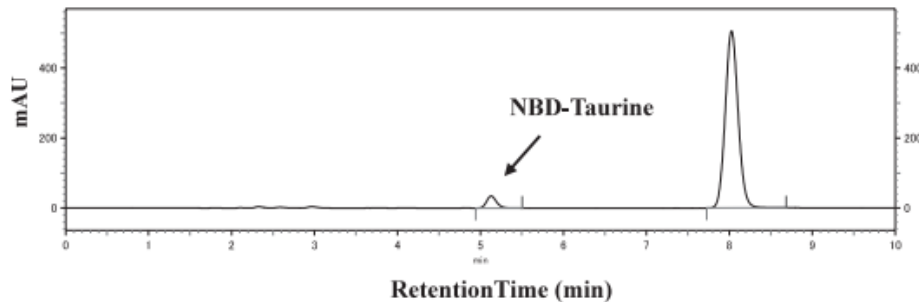


Figura No. 12 Cromatograma HPLC de una muestra conteniendo taurina. El pico del complejo NBD-aurina ha sido eluído alrededor de los 5 minutos y la descomposición del NBD-F es eluído alrededor de los 8 minutos
Fuente: Imagen extraída de ³

- Inyectar por separado volúmenes iguales (20 μL) de cada solución estándar a concentraciones 0.15 mg/ml, 0.015 mg/ml y 0.0015 mg/ml, previamente derivatizadas a una velocidad de 1.0 ml/min por un tiempo de 10 minutos.
- Registrar las respuestas. Tabular de la siguiente forma:

Tabla 4. Ejemplo de tabla para registro de resultados para elaboración de curva de calibración.

No. De muestra	Concentración (x)	Área (y)
1		
2		
3		

Fuente: Elaboración propia

- Elaborar la curva de calibración graficando en el eje x, la concentración de las muestras y en el eje y, el área leída por el equipo según corresponda a cada muestra, por ejemplo:

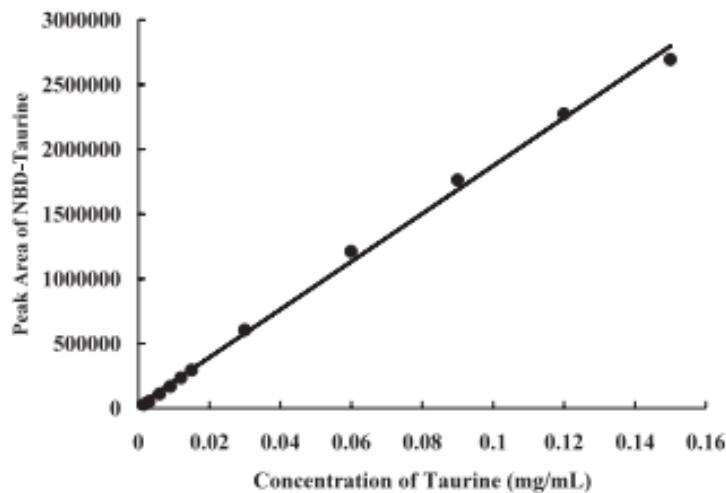


Figura 13. Ejemplo de curva de calibración estándar de NBD-aurina.
Fuente: Imagen extraída de ³

4.4.15 Cálculos para la curva de calibración.

- Cálculo de la recta de regresión. Se calcula la función lineal utilizando la formula siguiente:

$$y = mx + b$$

donde:

x: cantidad de analito (variable independiente)

y: área (variable dependiente)

m: pendiente

b: intercepto

- Para encontrar el intercepto “b” se utiliza la formula siguiente:

$$b = \frac{\Sigma y - m \Sigma x}{n}$$

- Para calcular la pendiente “m” se utiliza la formula siguiente:

$$m = \frac{\Sigma(x - \bar{x})(y - \bar{y})}{\Sigma(x - \bar{x})^2}$$

donde n: número de mediciones.

- Hacer los cálculos correspondientes a xy , x^2 , y^2 , Σx , Σy , Σxy , Σx^2 , Σy^2 , $\Sigma(x)^2$, $\Sigma(y)^2$, $\Sigma x/n$, $\Sigma y/n$, etc., según sean necesarios, y tabularlos según el ejemplo siguiente:
(Ver imagen en siguiente página)

Tabla 5. Ejemplo de tabla de datos para elaboración de curva de calibración.

k	x	y	xy	x ²	y ²
50%	0,0098828	216,68499	2,14145442	0,0000976697	46 952,38489
	0,0098828	217,19527	2,14649741	0,0000976697	47 173,78531
	0,0098854	213,49287	2,11046242	0,0000977211	45 579,20554
75%	0,0149080	325,42934	4,85150060	0,0002222485	105 904,25533
	0,0148547	324,19366	4,81579956	0,0002206621	105 101,52918
	0,0148979	325,23779	4,84536007	0,0002219474	105 779,62004
100%	0,0198291	434,35150	8,61279933	0,0003931932	188 661,22555
	0,0197809	435,89384	8,62237246	0,0003912840	190 003,43975
	0,0198317	441,79920	8,76162919	0,0003932963	195 186,53312
125%	0,0247985	567,39504	14,07054590	0,0006149656	321 937,13142
	0,0247883	545,30888	13,51728011	0,0006144598	297 361,77461
	0,0247527	543,79763	13,46045960	0,0006126962	295 715,86239
150%	0,0297500	664,78955	19,77748911	0,0008850625	441 945,14579
	0,0297322	649,94305	19,32423675	0,0008840037	422 425,96824
	0,0297399	660,88404	19,65462526	0,0008844617	436 767,71433
Variables	Σx = 2,4099721 Σx/n = 0,16066481	Σy = 52 749,71 Σy/n = 3 516,65	Σxy = 9 548,481564	Σx ² = 0,435282247 (Σx) ² = 5,807965523	Σy ² = 209 513 184,5 (Σy) ² = 2 782 532 098

donde:

k = 5 (número de series, concentraciones crecientes de analito)

N = 3 (número de réplicas, se analizan por triplicado)

n = 15 (número de determinaciones)

x = Concentración mg/mL

y = Áreas de respuesta

Fuente: Elaboración propia basada en ¹²

- Cálculo del coeficiente de correlación (r). Representa el grado de relación entre las variables “x” e “y”. Su valor máximo es 1 y la cercanía a dicho valor significa que existe correlación en una probabilidad elevada. Se calcula utilizando la siguiente formula:

$$r = \frac{\frac{\sum xy - \sum x \sum y}{n}}{\sqrt{\left[\sum x^2 - \frac{\sum(x)^2}{n} \right] \left[\sum y^2 - \frac{\sum(y)^2}{n} \right]}}$$

En donde se debe hacer la siguiente valoración:

Si:

r = 1 : indica una recta perfectamente igual

r = -1 : indica una recta perfectamente igual negativa

r = 0 : indica que no existe correlación entre “x” e “y”

criterio de aceptación: 0.999

- Cálculo del coeficiente de determinación (r^2). El cuadrado del coeficiente de correlación se denomina coeficiente de determinación o varianza total de “y”. Indica el grado de ajuste de la ecuación. En este valor debe considerarse un criterio de aceptación mínimo de 0.990.
- Cálculo de desviación estándar. Se calcula por medio de la siguiente formula:

$$S = \sqrt{\frac{n(\Sigma y^2) - (\Sigma y)^2}{n(n-1)}}$$

- Cálculo de desviación estándar relativa. Se calcula por medio de la siguiente formula:

$$RSD = \frac{S}{\bar{y}} * 100$$

4.4.16 Análisis de la muestra

- Inyectar por separado volúmenes iguales (20 μ L) de la preparación muestra, habiendo previamente sido derivatizadas, en el cromatógrafo a una velocidad de 1.0 ml/min por un tiempo de 10 minutos.
- Registrar las respuestas y tabular.
- Realizar el cálculo de la concentración de taurina haciendo la extrapolación en la curva de calibración previamente hecha, por ejemplo:

Ej.: Una muestra de bebida energizante derivatizada con NDB-F presenta una absorbancia de 0.735 al medirse a 470 nm en una celda de 1 cm, ¿Cuál es la concentración de taurina en la muestra? Antes del análisis de la muestra se midieron estándares de taurina a diferentes concentraciones, resultando la siguiente tabla:

Tabla 6. Concentraciones de taurina versus absorbancia obtenidas.

No. De muestra	Concentración de taurina (x)	Absorbancia (y)
1	0.0300	0.162
2	0.0600	0.330
3	0.0900	0.499
4	0.1200	0.670
5	0.1500	0.840

Fuente: Elaboración propia

R/ Se realiza el cálculo de la función lineal con la formula $y = mx + b$, iniciando por la pendiente “m” y el intercepto “b”, utilizando las fórmulas citadas en el numeral 4.4.16. Se prepara una tabla de valores de xy , x^2 , y^2 , Σx , Σy , Σxy , Σx^2 , Σy^2 , $\Sigma(x)^2$ y $\Sigma(y)^2$ para hacer las sustituciones en las fórmulas para cálculos de “m”, “b” y “r²”.

Tabla 7. Tabulación de los valores requeridos para cálculos estadísticos.

No. De muestra	Concentracion de taurina (x)	Absorbancia (y)	xy	x2	y2
1	0.0300	0.162	0.00486	0.0009	0.026244
2	0.0600	0.330	0.0198	0.0036	0.1089
3	0.0900	0.499	0.04491	0.0081	0.249001
4	0.1200	0.670	0.0804	0.0144	0.4489
5	0.1500	0.840	0.126	0.0225	0.7056
Σ	0.4500	2.5010	0.2760	0.0495	1.5386
$\Sigma(x)^2$	0.2025	6.255001			

Fuente: Elaboración propia

Entendiendo que la finalidad del presente documento es poder hacer el cálculo de la concentración de analito en una muestra, para el cálculo de “m” se utiliza la herramienta de Excel para graficar la regresión lineal y el cálculo automático de “m”, siguiendo los siguientes pasos:

- Seleccionar los valores de la columna x (concentración) e y (absorbancia). En la pestaña “insertar”, seleccionar la opción de gráficos de dispersión:

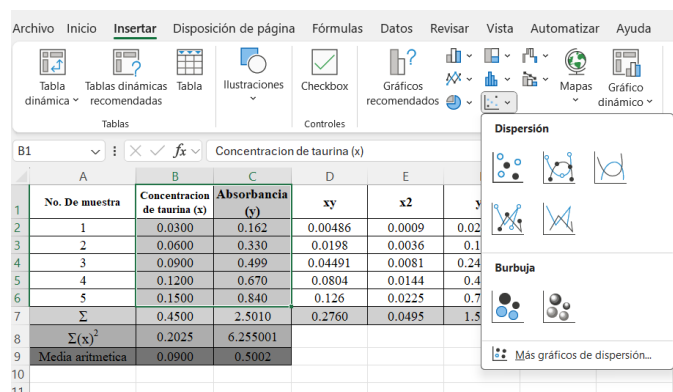


Figura 14. Ejemplo de etapa 1 para elaborar un gráfico de correlación lineal.

Fuente: Elaboración propia

- Seleccionar la opción “Dispersión con líneas suavizadas y marcadores”.

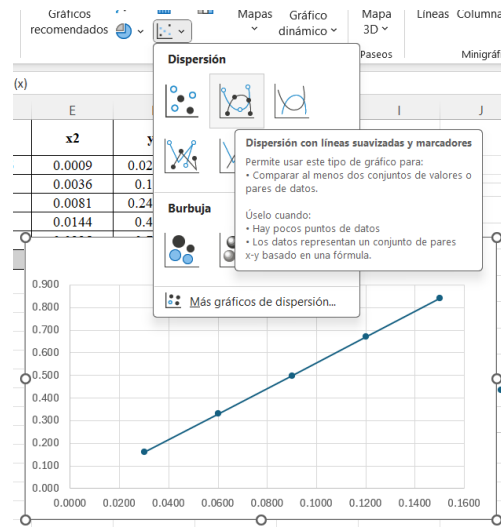


Figura 15. Ejemplo de etapa 2 para elaborar un gráfico de correlación lineal.
Fuente: Elaboración propia

- Colocarse en cualquier punto de la gráfica y dar click derecho sobre él, en el menú desplegado seleccionar la opción de “Formato de línea de tendencia”. Una vez desplegado el menú, activar el “check” en la opción “lineal”, “presentar ecuación en el grafico” y “presentar el valor R cuadrado en el grafico”.

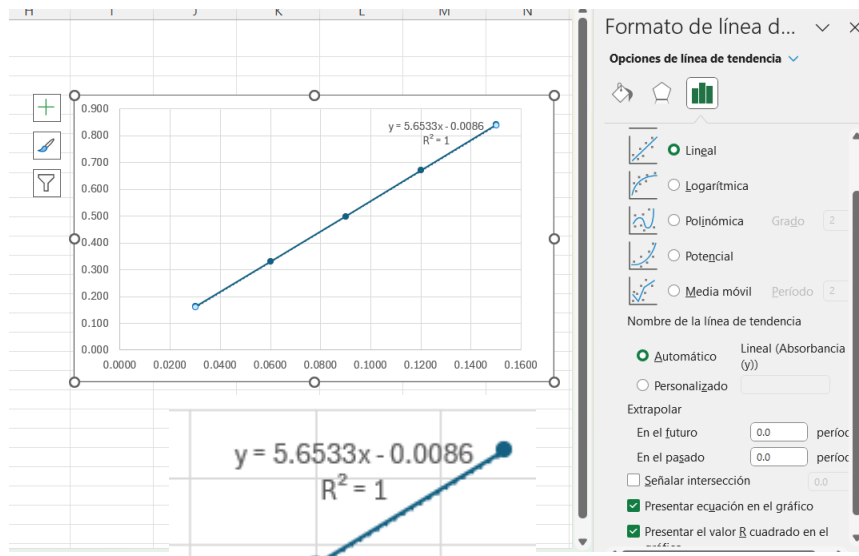


Figura 16. Ejemplo de etapa 3 para elaborar un gráfico de correlación lineal.
Fuente: Elaboración propia

- En el grafico se despliega la ecuación lineal presentando los valores de “m”, “b” y “r²”.

Con el valor de “m” obtenido automáticamente, se hace la comprobación del valor de “b” sustituyendo el valor la pendiente en la fórmula para cálculo del intercepto, resultando:

$$b = \frac{2.5010 - (5.6533)(0.45)}{5}$$

$$b = -0.0086$$

Finalmente, para conocer el valor de la concentración de la muestra, se despeja x de la función de lineal, utilizando el valor de absorbancia obtenido, así:

$$x = \frac{y - b}{m}$$

$$x = \frac{0.735 - (-0.0086)}{5.6533}$$

$$x = 0.1315 \text{ mg}$$

De esta manera se logra determinar la concentración de taurina en la muestra.

El desarrollo del cálculo del resto de variables estadísticas se omitirá en el presente documento pues es material para discusión y presentación de un trabajo de investigación específico en dicho tema.

4.4.17 Lavado del sistema cromatográfico post análisis

- Colocar en el lugar de la fase móvil, agua calidad HPLC filtrada a través de poro de 0.45 μm y desgasificada, lavando el filtro de entrada de la fase móvil con agua HPLC.
- Purgar el sistema abriendo la perilla de purga de la bomba manualmente hasta que quede floja.
- Configurar la bomba a un flujo de 5 ml/min
- Encender la bomba.
- Dejar que corra el agua por 5 minutos.

- Apagar la bomba
- Cerrar la perilla de purga de la bomba.
- Configurar el flujo de la bomba a 1 ml/min
- Encender la bomba dejando que el agua corra por el sistema durante 30 minutos
- Apagar la bomba
- Repetir todo el procedimiento anterior usando una mezcla filtrada y desgasificada de Metanol HPLC: agua HPLC (50:50).
- Realizar el último lavado colocando en lugar de la mezcla metanol/agua el reactivo metanol calidad HPLC.
- Al terminar los 90 minutos de lavado se apaga la bomba y los demás componentes del sistema HPLC
- Cerrar el programa del sistema HPLC y el servidor
- Apagar el sistema de cómputo desde el botón de inicio del sistema operativo
- Apagar el UPS manteniendo presionado el botón de encendido.

CAPÍTULO V
CONCLUSIONES

5.0 CONCLUSIONES

- 1 No existe uniformidad sobre los métodos utilizados para la cuantificación de taurina en bebidas energizantes, y los estudios hechos son aún más escasos; pero la investigación bibliográfica permitió encontrar el método más específico y selectivo para poder levantar una metodología idónea, el cual se basó en el publicado en el Journal of Health Science en 2008 y elaborado por Sawabe Y., “Determinación de Taurina en bebidas energizantes utilizando un derivado pre-columna”.
- 2 Se encontraron deficiencias generales sobre el control del contenido de taurina en las bebidas energizantes; los problemas van desde la falta de lineamientos para su declaración en las etiquetas, la ausencia de una norma salvadoreña para el control y monitoreo de esta sustancia, y lo más preocupante, la desinformación de los consumidores sobre su consumo; con el desarrollo de este documento se logra reunir en una sola referencia, los límites que deberían aplicarse en futuras normativas y la metodología para poder hacer un monitoreo y control futuro.
- 3 Después de realizar una comparación de diversos métodos disponibles para la cuantificación de taurina en alimentos, se concluye que el método elaborado por Sawabe Y. en Japón, es el idóneo por cumplir los 3 criterios necesarios: ser accesible, presentar menor complejidad y poder ejecutarse en el menor tiempo de análisis.
- 4 La marcha analítica trabajada tiene como referencia el método “Determinación de Taurina en bebidas energizantes utilizando un derivado pre-columna”, desarrollado en Japón por investigadores en salud pública, y que es específico para cuantificar taurina en bebidas energizantes; dicha marcha presenta el desarrollo de todas las etapas de análisis, desde la preparación de los reactivos, las soluciones cromatográficas, preparación del estándar y muestras, y el análisis por HPLC.

CAPITULO VI

RECOMENDACIONES

6.0 RECOMENDACIONES

- 1 A los cursos de especialización impartidos en la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador, que den el seguimiento a los trabajos presentados por los alumnos en proceso de graduación, en específico a los que proponen metodologías que se ejecutaran a futuro, para que puedan ser llevados a la práctica y sirvan para la formación de los estudiantes en los últimos años de la carrera de licenciatura en química y farmacia, y con los datos obtenidos contribuir a obtener información práctica sobre temas sensibles a la salud de las personas.
- 2 A la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador, que utilice la marcha analítica propuesta en este documento como una herramienta para la enseñanza y formación de los estudiantes de la carrera, específicamente con los que cursan materias con base en el análisis instrumental, análisis bromatológico, y salud pública.
- 3 A la Universidad de El Salvador, que reúna de las diferentes facultades aquellos trabajos que tengan el potencial para el beneficio público, para facilitar el recurso económico, logístico y humano para su ejecución.
- 4 Al Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, se responsabilice de normar lo concerniente al contenido de taurina en bebidas energizantes disponibles para el mercado salvadoreño; y, durante el proceso del levantamiento del marco normativo y posteriori, se establezcan prohibiciones de consumo para los grupos específicos (mujeres embarazadas, mujeres en etapa lactante, menores de 18 años, personas de la tercera edad, inmunodeprimidos o con enfermedades crónicas, asimismo la restricción a su mezcla con bebidas alcohólicas u otras drogas)
- 5 A la Superintendencia de Regulación Sanitaria, se responsabilice de verificar el contenido presente y rotulado en las diferentes bebidas energizantes comercializadas en El Salvador.
- 6 A las instituciones académicas relacionadas, incluir en su protocolo formativo proyectos enfocados en mejorar la calidad de vida de las personas, facilitándoles la información que les permita mejorar sus condiciones de salud. Igualmente, con dichos proyectos brindar información a las autoridades competentes para que puedan ser insumo para levantar las regulaciones nacionales necesarias.

- 7 A la población en general, evitar el consumo excesivo de bebidas energizantes, pues aún deben robustecerse las investigaciones enfocadas a determinar los efectos nocivos a la salud de las personas.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Revista mediterránea de la comunicación [Internet]. Dr. Argiñano J. Bebidas energéticas en los ciber medios: fuentes, encuadres y falacias en la construcción de un discurso indulgente. Universidad del país Vasco, España, 2021; 12(1), 221-233. Disponible en: <https://doi.org/10.14198/MEDCOM000002>
2. Scielo [Internet]. Manrique C, Arroyabe-Hoyos C, Galvis-Pareja D. Bebidas cafeinadas energizantes: efectos neurológicos y cardiovasculares. Iatreria. 2018 Ene-Mar; 31(1):65-75. Disponible en: [10.17533/udea.iatrevia.v31n1a06](https://doi.org/10.17533/udea.iatrevia.v31n1a06)
3. American Heart Association [Internet]. Williamson L. La cafeína ¿es amiga o enemiga?. American Heart Association News, Agosto 8, 2022. Disponible en: <https://www.heart.org/en/news/2022/08/08>
4. Scielo [Internet]. Cote-Menéndez M, Rangel-Garzón C, Sánchez-Torres M, Medina-Lemus A. Bebidas energizantes ¿hidratantes o estimulantes? Revista de la facultad de medicina, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Vol. 59 No.3 julio-septiembre 2011. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-00112011000300008
5. Diccionario Medico [Internet]. Clínica Universidad de Gamarra. Taurina. Disponible en: <https://www.cun.es/diccionario-medico/terminos/taurina>
6. efDeportes.com [Internet]. Dr. Salinero J. Taurina y L-carnitina. Acción y efectos en el rendimiento deportivo. Instituto de ciencias del deporte. Universidad Camilo José Cela. Revista Digital. Buenos Aires, Año 15, No. 166, marzo 2012. Disponible en: <https://www.efdeportes.com/efd166/taurina-y-l-carnitina-en-el-rendimientodeportivo.htm>
7. EcuRed [Internet]. Taurina. Disponible en: <https://www.ecured.cu/Taurina>
8. Psicología y mente [Internet]. Rovira I. Taurina: efectos de este neurotransmisor en nuestro cuerpo. 22 de febrero, 2018 – 20:07. Disponible en: <https://psicologiaymente.com/neurociencias/taurina>
9. Baltrons E, Bernal N. Determinación del contenido de cafeína presente en bebidas energizantes comercializadas en el área metropolitana de San Salvador. El Salvador. Universidad de El Salvador, Facultad de Química y Farmacia; febrero 2010.

10. Maravilla J, Lucero L, Cisneros J, Barrera D. Consumo de psicoestimulantes lícitos en estudiantes de doctorado en medicina. *Revista Crea Ciencia UEES*. 2018, Vol. 12 Núm. 1: 19-28
11. Chambers C. Determinación de taurina en jugos de mariscos mediante HPLC. Universidad Técnica Federico Santa María. Valparaíso, Chile. 2018
12. Sawabe Y, et al. Determinación de Taurina en Bebidas Energéticas por HPLC utilizando un derivado Pre-columna. *Journal of Health Science*, 54 (6) 661-664. Japón. 2008.
13. Mayorga G, Del Castillo C. Validación de una técnica de análisis por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) para cuantificar norfloxacino y fenazopiridina clorhidrato en capsulas orales. Lima, Perú. Universidad Nacional mayor de San Carlos, Facultad de Química y Farmacia; 2010.
14. CONICET INQUISUR. Protocolo de prendido y estabilización del equipo HPLC. Departamento de Química. Laboratorio Instrumental de uso compartido (LIUC). ID N°: P-HPLC-01, Versión 00. Argentina, 21/09/2015
15. Washington J, Mogollón R, De Q, Raúl M, Soria A. Estudio de niveles de cafeína y taurina en comparación con la Norma Técnica Ecuatoriana INEN 2411:2008, para una muestra de la población de bebidas energéticas comerciales del país. Universidad Central de Ecuador, Facultad de ciencias químicas. 2014. Disponible en: <https://www.dspace.uce.edu.ec/server/api/core/bitstreams/5d8cbaf9-e384-443e-9db8-010d1f774ecc/content>
16. PUBLICITY. (2020, 31 julio). Fury Energy llega a El Salvador para llenarte de energía. Noticias de el Salvador - [elsalvador.com](https://historico.elsalvador.com/historico/737476/industrias-la-constancia-fury-energy-nueva-bebida-energizante-el-salvador.html). <https://historico.elsalvador.com/historico/737476/industrias-la-constancia-fury-energy-nueva-bebida-energizante-el-salvador.html>
17. Historia de Coca-Cola - Marca mundial de bebidas | Coca-Cola. (s. f.). <https://www.coca-cola.com/sv/es/about-us/history>
18. Be original! (s. f.). <https://www.drenuf.com/>
19. Cámara de la industria de bebidas. (2020). Norma de autorregulación respecto a los compromisos de la industria de bebidas en información nutricional, innovación, publicidad consciente, estilos de vida saludable y comercialización responsable [Norma técnica]. Ministerio de la protección social Colombia.