



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

TESINA DE
LICENCIADA EN QUÍMICA

Determinación del contenido de cafeína en
suplementos dietarios de Guaraná

Agustina Florencia Romeo

ÁREA III, QUÍMICA ANALÍTICA

DIRECTORA/OR: Dra Carolina Acebal
DIRECTORA/OR ASISTENTE: Dra. Natalia Llamas

BAHÍA BLANCA, ARGENTINA
20 DE DICIEMBRE DE 2024

DEDICATORIAS

En primer lugar, quiero agradecer a todos los profesores que me acompañaron a lo largo de mi carrera. Su dedicación y entusiasmo no solo me motivaron, sino que también me inspiraron a querer aprender más y a disfrutar de esta hermosa profesión. Siempre estuvieron dispuestos a resolver mis dudas, y gracias a eso, pude transitar este camino con más confianza y ganas.

También quiero agradecer a mis amigos, que fueron mi soporte en este proceso. Gracias por escucharme cada vez que me sentía tensa antes de un examen, por entender cuando no podía salir porque tenía que estudiar, y por alegrarse conmigo en cada pequeño logro, como si fuera suyo.

Por último, y no menos importante, quiero agradecer a mi familia, especialmente a mis padres y a mi hermana. En estos años de universidad, viví momentos de alegría, tensión, tristeza y nervios, pero ustedes siempre estuvieron ahí para contenerme, para recordarme que confiara en mí y para darme fuerza cuando las cosas no salían como esperaba. Nunca dejaron de desearme lo mejor, hicieron lo imposible por apoyarme y se alegraron con cada paso que di. Gracias por ser mi mayor impulso y por compartir conmigo cada logro.

ÍNDICE

1. <i>Introducción</i>	
1.1 <i>Suplementos dietarios</i>	4
1.1.1 <i>Suplementos dietarios que contienen Guaraná</i>	6
1.2 <i>Cafeína y Teobromina</i>	9
1.2.1 <i>Contenido de cafeína en Guaraná</i>	11
1.3 <i>Métodos analíticos para la extracción de cafeína</i>	15
1.3.1 <i>Extracción sólido-líquido asistida por ultrasonido</i>	16
1.4 <i>Métodos analíticos para la determinación de cafeína</i>	17
1.4.1 <i>Determinación de cafeína mediante HPLC en suplementos dietarios</i>	17
2. <i>Objetivos del trabajo</i>	19
3. <i>Parte experimental</i>	
3.1 <i>Reactivos y soluciones</i>	20
3.2 <i>Instrumentación y dispositivos</i>	20
3.3 <i>Muestras comerciales de suplementos dietarios</i>	21
3.4 <i>Procedimiento para la extracción de cafeína de las muestras de suplemento dietario</i>	21
3.5 <i>Determinación de cafeína por HPLC</i>	23
4. <i>Resultados y discusión</i>	
4.1 <i>Estudios preliminares</i>	24
4.2 <i>Optimización de las condiciones de extracción</i>	26
4.3 <i>Determinación de cafeína por HPLC</i>	28
5. <i>Conclusiones</i>	31

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Suplementos dietarios

Se entiende por suplemento dietario, a aquel producto dietético cuyo fin principal es aportar los nutrientes que conforman la ingesta diaria habitual y balanceada de manera concentrada, para aquellas personas sanas que presenten deficiencias o necesidades superiores dietarias básicas. No obstante, la persona debe realizar una dieta variada, ya que implementar suplementos dietarios no implica reemplazar una dieta equilibrada¹.

Para ser aprobada su comercialización y su posterior uso, un suplemento dietario debe contener nutrientes u otros ingredientes con rol nutricional y/o fisiológico, ya sea procedentes de una fuente natural o sintética. En el último caso, el ingrediente debe presentar características idénticas a las que presenta en su fuente natural. Los nutrientes pueden ser carbohidratos, fibra, proteínas, vitaminas, minerales, entre otros. Por otro lado, los ingredientes deben:

- presentarse naturalmente en los alimentos descritos en el Código Alimentarios Argentino (CAA);
- sus especificaciones de identidad, pureza y composición deben estar establecidas en alguna entidad reconocida, tal como el Codex Alimentarius, la Comisión Nacional de Alimentos (CONAL), la Farmacopea Argentina, Food Chemicals Codex (FCC), entre otras;
- evidenciar su rol fisiológico y/o nutricional, pero no terapéutico.

Los suplementos pueden presentarse en diversas formas como en cápsulas, comprimidos, polvo, granulados o en forma de gotas; y deben ser consumidos únicamente en forma oral, bajo las indicaciones que presenta el rótulo. Dicho rótulo debe incluir, no sólo la composición del producto, sino también su ingesta diaria, su modo de uso, población destino del producto y la situación adecuada para su consumo².

En la **Tabla 1** se observa una clasificación posible para los suplementos dietarios según la Administración de Alimentos y Medicamentos (Food and Drug Administration, FDA) de los Estados Unidos.

Tabla 1: Clasificación de los suplementos dietarios según la FDA³

Suplemento dietario	Funciones biológicas	Ejemplos
---------------------	----------------------	----------

¹ Código Alimentario Argentino. Capítulo XVII. Alimentos de régimen o dietéticos.

² Directrices para la aplicación del art. 1381: suplementos dietarios. CONAL.2021.

³ "Introducción básica a los suplementos dietarios" (2022) Food and Drug Administration (FDA), <https://www.fda.gov/consumers/articulos-para-el-consumidor-en-espanol/introduccion-basica-los-suplementos-dieteticos>. Último acceso: 6/11/2024.

Vitaminas	Funcionan como antioxidantes y anticoagulantes ⁴ . Fortalecen el sistema inmunológico, al aumentar la ingesta de nutrientes, de manera tal que se previenen enfermedades crónicas. ⁵	Vitaminas hidrosolubles (Vitaminas A, C y E) y liposolubles (todo el complejo vitamínico B, vitamina D y vitamina K), tanto individuales, como en forma de complejos multivitamínicos.
Minerales	Fortalecen los huesos y el sistema inmunitario. Mantienen la temperatura y el peso corporal ⁶ . Previenen la alta presión, la anemia ⁷ , la hipocalcemia y los cálculos renales ⁸ . Combaten la osteoporosis, la diabetes, el cáncer y trastornos gastrointestinales ⁹ .	Hierro, calcio, magnesio, potasio.
Hierbas	Facilitan la digestión ¹⁰ , concilian el sueño, mejoran la nutrición de la piel ¹¹ y actúan como analgésicos, antiinflamatorios, estimulantes y relajantes. Combaten enfermedades crónicas, la hipertensión, migrañas y la constipación ¹² .	Equinácea, ajo, manzanilla, canela, sello de oro, ginseng y jengibre
Productos y	Ayudan a mejorar la	Cafeína, ginseng, curcumina, aloe

⁴ “¿Qué son los suplementos alimenticios?” (2021) American Cancer Society. <https://www.cancer.org/es/cancer/como-sobrellevar-el-cancer/tipos-de-tratamiento/medicina-complementaria-e-integral/suplementos-alimenticios/que-son-los-suplementos-alimenticios.html>. Último acceso: 6/11/2024.

⁵ ¿Qué son los multivitamínicos y para qué sirven?. (2023). Clínica Alemana. <https://www.clinicaalemana.cl/articulos/detalle/2023/que-son-los-multivitaminicos-y-para-que-sirven>. Último acceso: 6/11/2024.

⁶ “Calcium and Health”. Calcium Fact Sheet for Health Professionals. National Institutes of Health. Office of Dietary Supplements. <https://ods.od.nih.gov/factsheets/Calcium-HealthProfessional/>. Último acceso: 6/11/2024.

⁷ “What happens if I don't get enough Iron?”. Iron Fact Sheet for Health Professionals. National Institutes of Health. Office of Dietary Supplements. <https://ods.od.nih.gov/factsheets/Iron-Consumer/>. Último acceso: 6/11/2024.

⁸ “What happens if I don't get enough Potassium?”. Potassium Fact Sheet for Health Professionals. National Institutes of Health. Office of Dietary Supplements. <https://ods.od.nih.gov/factsheets/Potassium-Consumer/>. Último acceso: 6/11/2024.

⁹ “Magnesium Deficiency”. Magnesium Fact Sheet for Health Professionals. National Institutes of Health. Office of Dietary Supplements. <https://ods.od.nih.gov/factsheets/Magnesium-HealthProfessional/>. Último acceso: 6/11/2024.

¹⁰ Suplementos dietéticos de origen botánico. National Institutes of Health (NIH). <https://ods.od.nih.gov/factsheets/BotanicalDietarySupplements-DatosEnEspanol/>. Último acceso: 6/11/2024.

¹¹ “What are the different dietary supplements?”. Dietary and Herbal Supplements. University of Rochester. Medical Center. <https://www.urmc.rochester.edu/encyclopedia/content.aspx?ContentTypeID=85&ContentID=P07183>. Último acceso: 6/11/2024.

¹² “Dietary Supplements (Herbal Medicines and Natural Products)”. PeaceHealth. <https://www.peacehealth.org/medical-topics/id/aa104596spec>. Último acceso: 6/11/2024.

compuestos botánicos	concentración, la resistencia física y la memoria, contribuyen a la pérdida de peso, y combaten el estreñimiento, ansiedad, cirrosis y enfermedades gastrointestinales. ¹³	vera, sello de oro, naranja agria.
Aminoácidos	Actúan como analgésicos, cumplen funciones ergogénicas, combaten la fatiga y mejoran el metabolismo ¹⁴ . Fortalecen los músculos, mejoran el rendimiento deportivo, mantienen los niveles de glucosa, mejoran la nutrición de la piel ¹⁵ .	Triptófano, lisina, arginina, aspartato y glutamina
Microorganismos vivos	Benefician la salud gastrointestinal, combaten los virus patógenos y mejoran el sistema inmunitario	Probióticos

1.1.1 Suplementos dietarios que contienen Guaraná

Paullinia Cupana o Guaraná es una planta originaria de Sudamérica, que se encuentra principalmente en la región del Amazonas. Ésta se presenta como un arbusto cuyo fruto negro está envuelto en un pericarpio rojo o anaranjado, y tiene un arilo blanco que permite el crecimiento del fruto a través de sus semillas¹⁶. Una vez completado el proceso de maduración, el fruto se abre dejando expuestas las semillas (**Figura 1**). Las semillas son la parte más usada de la planta de Guaraná, las cuales tienen forma redondeada y son oscuras y brillantes¹⁷.

¹³“Suplementos Dietarios Botánicos”. National Toxicology Program.US Department of Health and Human Services.

<https://ntp.niehs.nih.gov/whatwestudy/topics/botanical>. Último acceso :6/11/2024.

¹⁴ “Dietary Supplements and Sports Performance: Amino Acids”. Journal of the International Society of Sports Nutrition.

¹⁵ Jacob, D. “What are the Benefits and Risks of Taking Amino Acids Supplements”. Medicine Net.

https://www.medicinenet.com/benefits_and_risks_of_taking_amino_acid_supplement/article.htm. Último acceso: 6/11/2024.

¹⁶ Schimpl, F. C., da Silva, J. F., de Carvalho Gonçalves, J. F., & Mazzafera, P. (2013). Guarana: revisiting a highly caffeinated plant from the Amazon. Journal of ethnopharmacology, 150(1), 14-31.



Figura 1: Planta de Paullinia Cupana (Guaraná)¹⁷.

Para obtener el extracto de Guaraná, se limpian los frutos y se les quitan las semillas, las cuales se someten a un secado, tostado y triturado para obtenerlas en forma de polvo (**Figura 2**)¹⁸. Este extracto es muy útil para ser utilizado en la producción de suplementos dietarios, ya que las semillas de Guaraná tienen propiedades medicinales, estimulantes y energéticas¹⁸. Estas semillas están compuestas por un gran porcentaje de metilxantinas, particularmente, cafeína y teobromina; y otros compuestos tales como los taninos, los cuales actúan como agentes oxidantes. También aportan minerales como el calcio, potasio, fósforo y hierro, vitaminas A, B y E y aceites esenciales, como los monoterpenoides, sesquiterpenoides, entre otros¹⁷.

Es de destacar que la proporción de cafeína que tiene el Guaraná es significativamente mayor a la que se encuentra en otros alimentos y bebidas que la contienen como el café, té, mate y cacao¹⁹.

¹⁷Hamerski, L.;Vieira Somner, G.; Tamaio, N. "Paullinia cupana Kunth (Sapindaceae): A review of its ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology" (2013). Journal of Medicinal Plants Research. Vol. 7(30), pp. 2221-2229.

¹⁸Kuskoski, E.M.;Roseane,F.; García A.A; Troncoso.G; A.M.(2005). "Chemical and Pharmacological Properties of the Fruit Guaraná (*Paullinia cupana*)". Vitae. 12(2). 45-52.

¹⁹ Torres, E. A., Pinaffi-Langley, A. C. D. C., Figueira, M. D. S., Cordeiro, K. S., Negrão, L. D., Soares, M. J., ... & de Camargo, A. C. (2022). Effects of the consumption of guarana on human health: A narrative review. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 21(1), 272-295.



Figura 2: Proceso de la obtención del Guaraná en forma de polvo a partir de su fruto²⁰.

Los suplementos dietarios a base de Guaraná son consumidos, principalmente por deportistas, no sólo para fines estimulantes a la hora de realizar sus actividades, sino también para aumentar su masa muscular²¹, disminuir los desgarros e incrementar

²⁰ Medeiros Marques, L.L; Dias Fiuza Ferreira.E ; Nascimento de Paula, M; Klein, T. ; Palazzo de Mell, J.C. (2017).“Paullinia cupana: a multipurpose plant – a review”. Revista Brasileira de Farmacognosia. 509, 1–34.

²¹ Patrick, M.; Kim, H.A; Oketch-Rabah, H.;Marles, R.J; Roe, A.L; Calderón, A.I.(2019).“Safety of Guarana Seed as a Dietary Ingredient: A Review”.Journal of agricultural and food chemistry.Volume 67 (41).

la resistencia. También fortalece el sistema inmune y ralentiza el estrés oxidativo²², ya que aporta alguno de los nutrientes necesarios (**Figura 3**)^{23 24}.

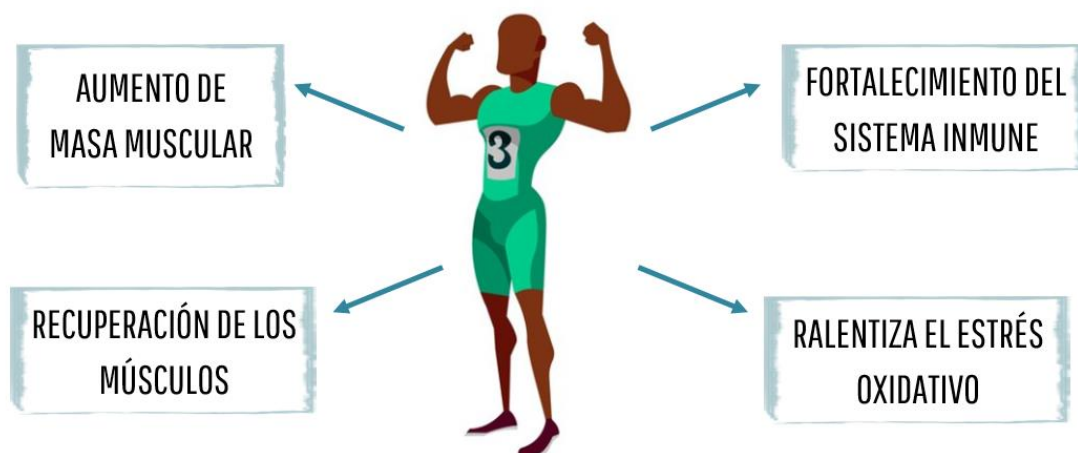


Figura 3: Beneficios del consumo de Guaraná.

1.2 Cafeína y Teobromina

La cafeína es un compuesto orgánico que, en su estado puro, se presenta en forma de cristales de prisma hexagonal o de polvo, siendo inodoro, incoloro y con gusto amargo, ya sea en su forma natural o sintética. Es soluble en agua y en varios solventes orgánicos^{25,26}. En la **Figura 4** se muestra su estructura química.

Se encuentra en productos de consumo habitual, tales como el café, té, mate, cacao y chocolate. Además, se utiliza como agente potenciador del efecto analgésico de ciertos antiinflamatorios, como la aspirina, el ibuprofeno o el paracetamol. También se encuentra en bebidas carbonatadas, energizantes, en bebidas para deportistas y en diferentes suplementos dietarios.

²² D'Angelo, S., Ascione, A.(2020)."Guarana and physical performance: A myth or reality?".Supplementary Issue: Spring Conferences of Sports Science.JOURNAL OF HUMAN SPORT & EXERCISE.VOLUME 15.S539-S551.

²³ D'Angelo,S.;Cusano,P.(2020)."ADHERENCE TO THE MEDITERRANEAN DIET IN ATHLETES".Sport Science 13.Suppl 1: 58-63.

²⁴ Stear, S.J.;Castell, L.M.; Burke, L.M. ; Spriet, L.L.(2010). "BJSM reviews: A–Z of nutritional supplements: dietary supplements, sports nutrition foods and ergogenic aids for health and performance Part 6". Nutritional supplement series.British Journal of Sports Medicine; Volume 44; 297-298.

²⁵ Hoja de seguridad Cafeína. Sigma Aldrich. <https://www.sigmaaldrich.com/AR/es/sds/sial/phr1009?userType=anonymous>. Último acceso: 7/11/2024.

²⁶ Shalmashi, A; Golmohammad, F. (2010)."SOLUBILITY OF CAFFEINE IN WATER, ETHYL ACETATE, ETHANOL, CARBON TETRACHLORIDE, METHANOL, CHLOROFORM, DICHLOROMETHANE, AND ACETONE BETWEEN 298 AND 323 K".Latin American Applied Research.Volume 40 (3).Pages 283-285.

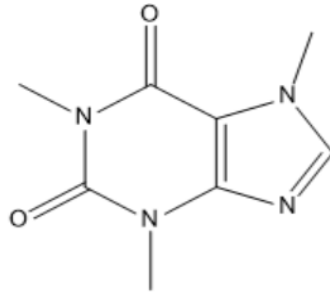


Figura 4: Estructura química de la cafeína

Como beneficios, podemos destacar que eleva el humor, mejora la concentración al contribuir a mantener a la persona en alerta, presenta efectos diuréticos, evita la fatiga y el cansancio, y beneficia tanto el sistema circulatorio (mediante la vasodilatación y el aumento de la actividad cardíaca) como así también el digestivo (mediante la secreción ácida del estómago). Sin embargo, se recomienda no superar los 300 mg por día de su ingesta, ya que, al ser un estimulante del sistema nervioso central (**Figura 5A**), y de los sistemas respiratorio (**Figura 5B**), digestivo (**Figura 5C**) y circulatorio (**Figura 5D**), puede ocasionar insomnio, hiperacidez gástrica, irritabilidad, aumento de volumen de orina, confusión, ansiedad, mareos, taquicardia, contracciones musculares, disminución de los reflejos, hipersensibilidad, agitación psicomotriz e incluso dependencia y hasta la muerte²⁷.

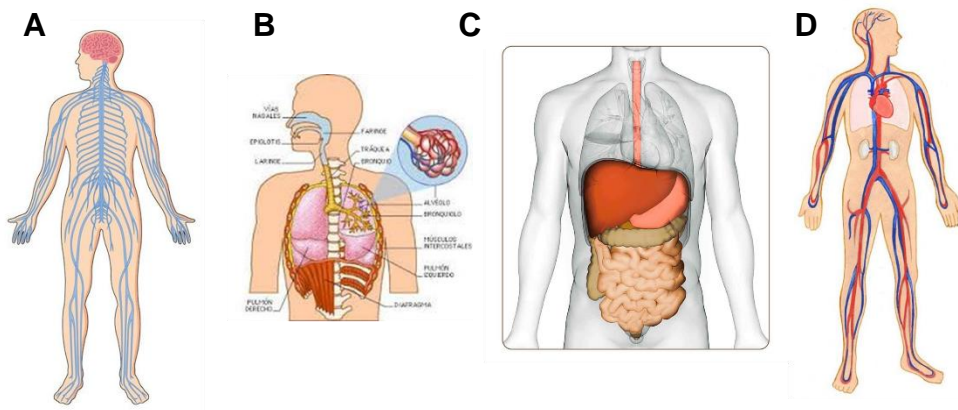


Figura 5: Efectos adversos del consumo excesivo de guaraná sobre los sistemas (A) Nervioso Central, (B) Respiratorio, (C) Digestivo y (D) Circulatorio.

²⁷ Pittler, H.M; K. Schmidt, K.; Ernst, E.(2005). "Adverse events of herbal food supplements for body weight reduction: systematic review". Volume 6(2), Pages 93-111.

Según el CAA, los alimentos que contienen cafeína deben tener en el rótulo del envase las leyendas “Contiene cafeína” y “Evitar en niños/as” (Figura 6).



Figura 6: Rótulo recomendado por el Ministerio de Salud, para todo alimento que contenga cafeína²⁸.

Particularmente, para suplementos dietarios, el CAA establece que no debe superar los 0,20 g de cafeína total, que es la suma de la cafeína proveniente de distintas fuentes que componen el producto y la que contenga naturalmente²⁹.

La teobromina es un compuesto sólido orgánico también perteneciente a la familia de las metilxantinas (Figura 7). Se encuentra presente naturalmente en el cacao, nuez de cola, guaraná, entre otros³⁰. Los principales beneficios son similares a los mencionados para la cafeína²⁹. Sin embargo, no produce dependencia, pero se recomienda moderar su consumo diario ya que, al actuar también como estimulante del sistema nervioso, presenta efectos similares a los de la cafeína si se consume en exceso³¹.

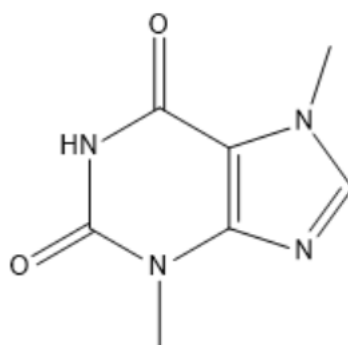


Figura 7: Estructura química de la teobromina

²⁸ Ley de etiquetado frontal. Ley Nacional 27.642 de Promoción de la Alimentación Saludable. “Los sellos de advertencia”. Argentina. Ministerio de Salud. Sellos de Advertencia y Sistema de Perfil de Nutrientes. <https://www.argentina.gob.ar/justicia/derechofacil/leysimple/salud/ley-de-etiquetado-frontal#:~:text=Volver%20al%20%C3%ADndice-Sellos%20de%20advertencia,total%20por%20ning%C3%BAn%20otro%20elemento>. Último acceso: 7/11/2024.

²⁹ Código Alimentario Argentino. Capítulo XVII. “Suplementos Dietarios”. Artículo 1381. Resolución 3/2020. Rotulado. Inciso 5º (2020)

³⁰ “Health benefits and mechanisms of theobromine”. Zhang, M.; Zhang,H.; Jia,L.; Zhang, Y.; Qin,R.; Xu,S. , Mei,Y. (2024).Journal of Functional Foods.

³¹ Franco, R.; Oátibia-Astibia, A.; Martínez-Pinilla, E. (2013) “Health Benefits of Methylxanthines in Cacao and Chocolate”.Nutrients.Frontiers. 5 (10).Pages 4159-4173.

1.2.1 Contenido de cafeína en Guaraná

Como se mencionó anteriormente, el Guaraná aporta cafeína a la ingesta diaria. Por ello, en este trabajo final de carrera se llevó a cabo una encuesta para recabar información y evaluar el nivel de conocimiento de la población acerca del Guaraná, de los suplementos dietarios a base de Guaraná y del contenido de cafeína que aportan a la dieta. La encuesta fue dirigida a un público general mayor a 13 años y fue respondida por 227 personas, en su mayoría, jóvenes de entre 20 y 30 años (**Figura 8**). Dado que el consumo de Guaraná en Argentina no es muy habitual, se observó que si bien el 44% de los encuestados conoce su existencia (**Figura 9A**), la mayoría desconoce que el Guaraná contiene cafeína en su composición (**Figura 9B**).

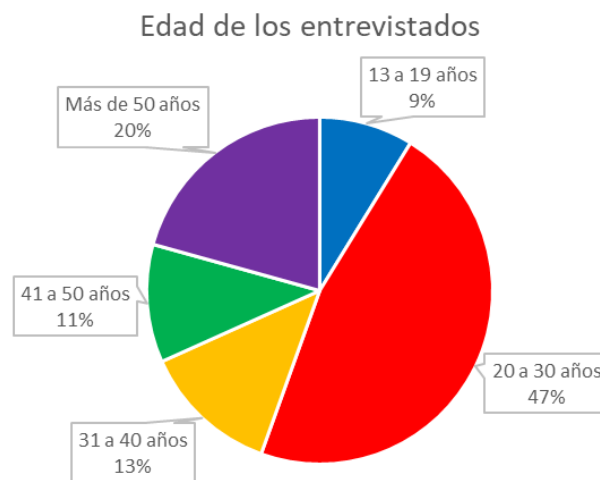


Figura 8: Distribución de las edades de las personas entrevistadas.

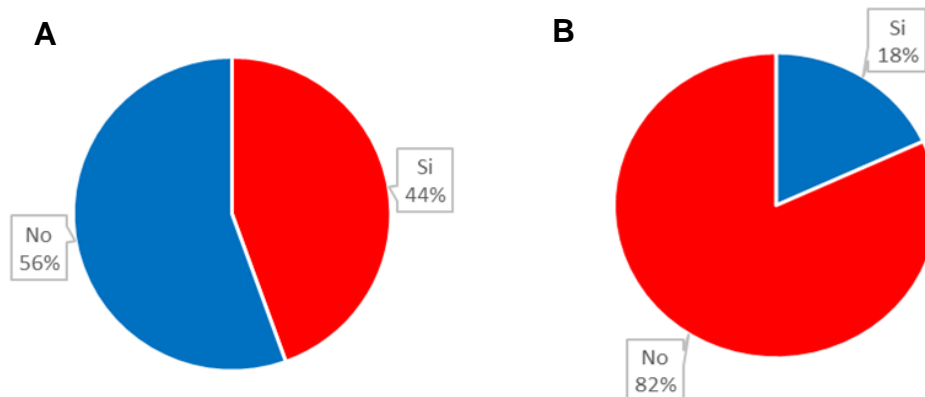


Figura 9: Respuestas a las preguntas (A) ¿Saben qué es el Guaraná? Y (B) ¿Saben que el Guaraná contiene cafeína?

Por otro lado, del total de los encuestados, sólo el 8% consume suplementos dietarios que contienen Guaraná (**Figura 10A**), la mayoría para un mayor rendimiento deportivo, y un menor porcentaje para mejorar rendimiento académico y para recreación (**Figura 10B**), siendo mensualmente la frecuencia con la que más se consume (**Figura 11**).

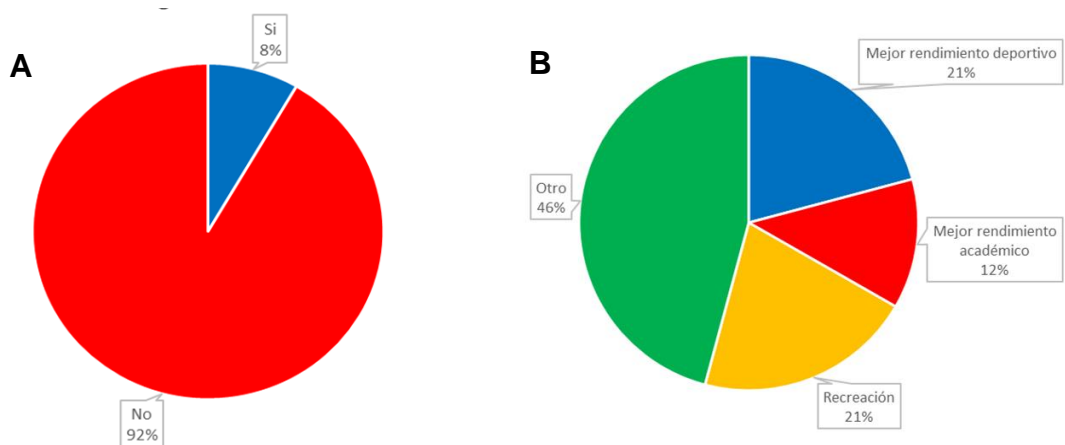


Figura 10: Respuestas por parte de los entrevistados a las preguntas sobre el consumo de los suplementos dietarios (A) y el objetivo que persiguen cuando lo consumen (B).

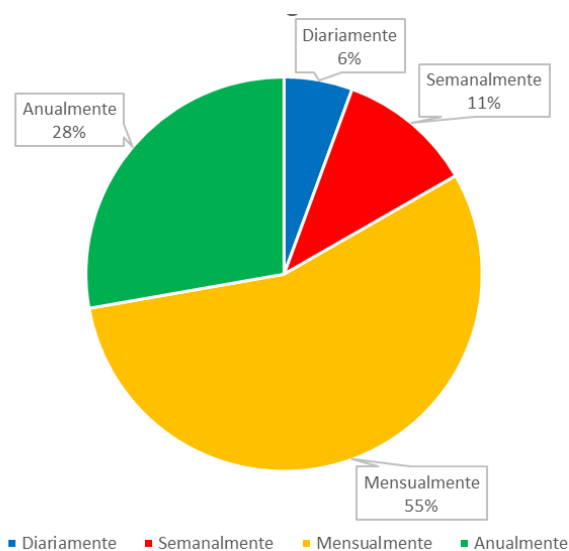


Figura 11: Frecuencia del consumo de suplementos dietarios de Guaraná por parte de los entrevistados.

Es interesante destacar que el 97% de los participantes de la encuesta consume alimentos que contienen cafeína en su vida cotidiana (**Figura 12A**) y el 79% lo hace diariamente (**Figura 12B**). En la **Figura 13** se observa que, en su mayoría, los entrevistados ingieren alimentos con contenido de cafeína en infusiones (café, té, mate) y en bebidas cola.

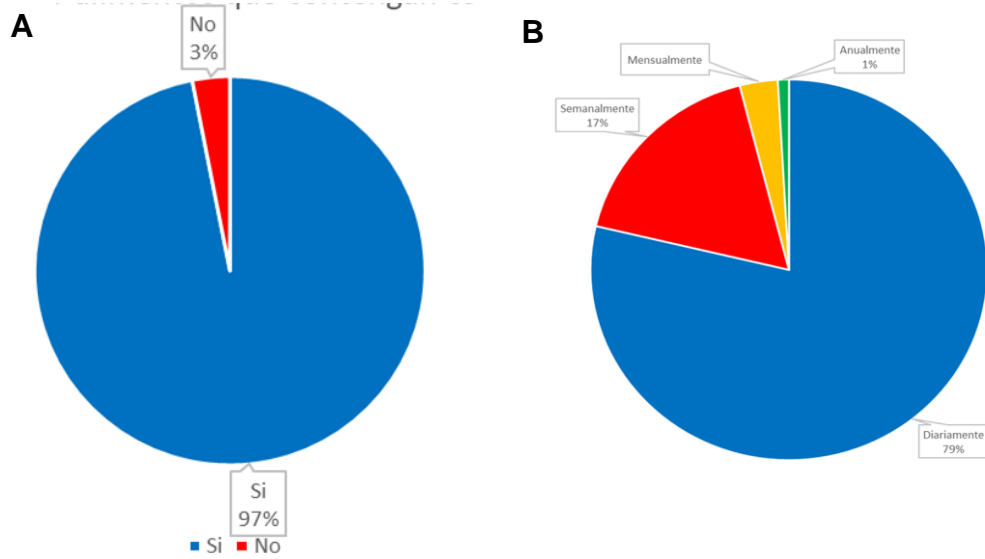


Figura 12: Consumo de alimentos que contienen cafeína (A) y frecuencia con la cual se consumen (B).

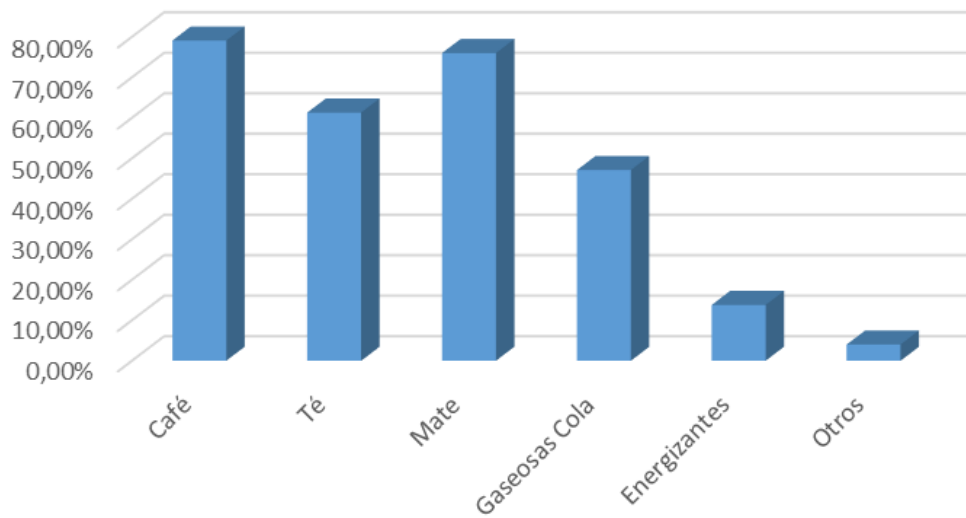


Figura 13: Alimentos que contienen cantidades significativas de cafeína que consumen los entrevistados.

Es interesante comentar que prácticamente la mitad de los entrevistados conoce los efectos adversos que produce la cafeína si es consumida en exceso (Figura 14).

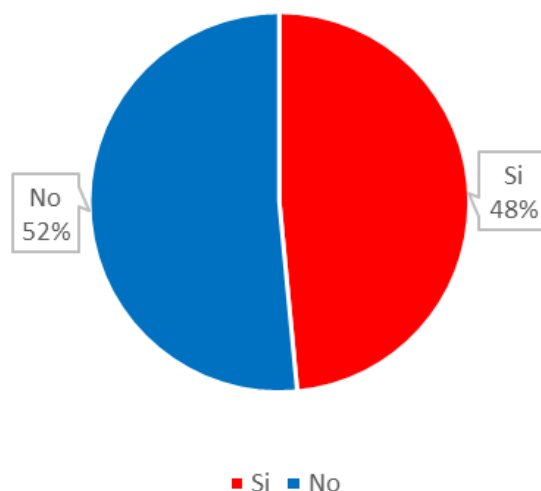


Figura 14: Conocimiento de los efectos adversos del consumo de cafeína en exceso.

1.3 Métodos analíticos para la extracción de cafeína

La extracción sólido-líquido (SLE, de sus siglas en inglés) consiste en separar dos o más componentes presentes en una muestra sólida previamente pulverizada (fase sólida), mediante el empleo de un solvente miscible con el compuesto a extraer (fase líquida)³². En el proceso SLE el solvente atraviesa la superficie del sólido y penetra en la matriz sólida. Luego el analito difunde desde la superficie del sólido hacia el solvente dando lugar al extracto (analito disuelto en el solvente)³³.

La SLE es la técnica convencional para extraer la cafeína de los suplementos dietarios e implica, no sólo el empleo de solventes orgánicos volátiles como diclorometano,³⁴ sino que se requiere utilizar álcalis a elevadas temperaturas para lograr la extracción completa del analito de la matriz de origen³⁵. A pesar de que pueden dar resultados aceptables, como desventaja, podemos decir que es un método muy laborioso y que, al utilizar reactivos y solventes tóxicos e inflamables, son riesgosos tanto para la salud de las personas como para el ambiente. En la **Figura 15** se muestra un esquema del procedimiento convencional.

³² Chanioti, S.; Liadakis, G.; Tzia, C. (2014). "Solid-Liquid Extraction". Food Process Engineering. Food Engineering Handbook. Chapter 6. Pages 254-283.

³³ Priego-Capote, F. (2021). Solid-liquid extraction techniques. In Analytical sample preparation with nano-and other high-performance materials (pp. 111-130). Elsevier.

³⁴ Chaugule, A.; Patil, H.; Pagariya, S.; Ingle, P. (2019) "Extraction of Caffeine". International Journal of Advanced Research in Chemical Science (IJARCS), Volume 6 (9), Pages 11-19.

³⁵ Hulbert, G.J.; Biswal, R.N.; Mehr, C.B.; Walker, T.H.; Collins, J.L. (1998). "Solid/liquid extraction of caffeine from guaraná with methylene chloride". Food Science and Technology International. Volume 4(1). Pages 53-58.

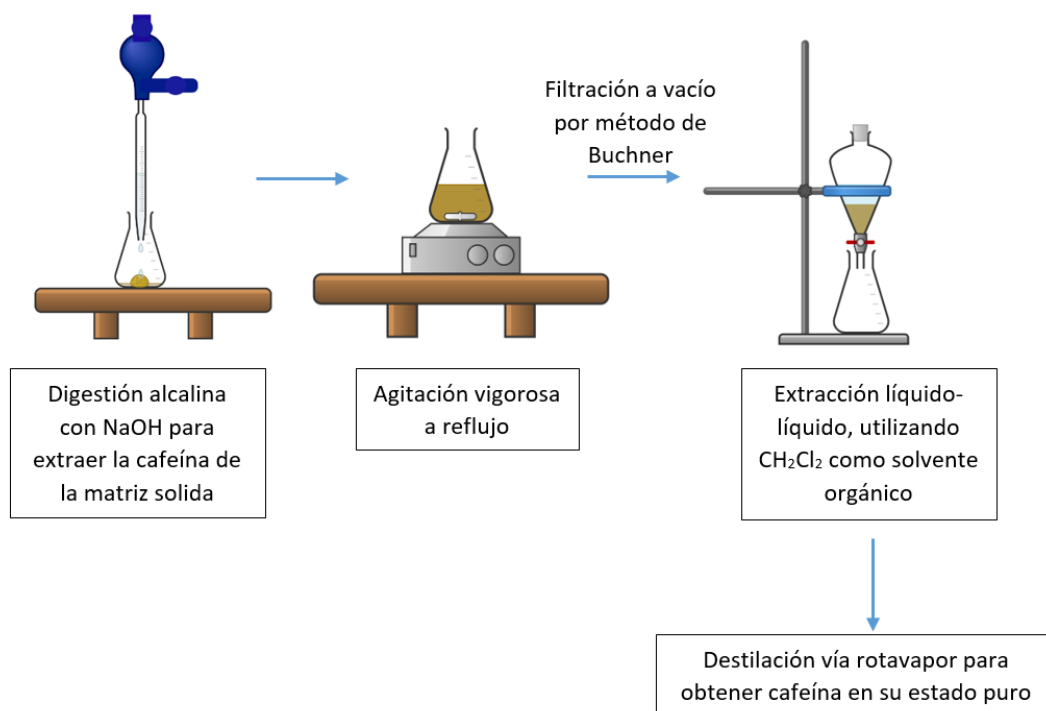


Figura 15: Método convencional para la extracción de cafeína.

Debido al bajo rendimiento de la SLE tradicional, se han implementado diferentes estrategias para mejorar su desempeño. Entre estas estrategias se destacan la aplicación de alta temperatura con alta presión y la asistencia con energías auxiliares, como microondas y ultrasonidos⁴². La implementación de estas alternativas permite, además de la mejora del rendimiento de extracción, reducir el tiempo de extracción y el consumo de disolventes orgánicos⁴¹.

1.3.1 Extracción sólido-líquido asistida por ultrasonido

Como se mencionó anteriormente, las técnicas clásicas utilizadas para la extracción de compuestos con disolventes se basan en la elección correcta del disolvente junto con el uso de calor y/o agitación. El uso de la extracción asistida por ultrasonidos (UAE) se presenta como una alternativa más amigable con el ambiente y menos costosa comparada con la técnica de extracción convencional. El uso de ultrasonido proporciona una mayor penetración del disolvente en las muestras y mejora la transferencia de masa.

Los ultrasonidos se definen como un sonido de frecuencia mayor a la que es capaz de percibir el oído humano, comprendiendo la región de frecuencias entre 20 kHz y 10 MHz. Las frecuencias de ultrasonidos utilizadas en diversas aplicaciones químicas es la zona denominada de baja frecuencia, comprendida entre 20 kHz y 2 MHz³⁶.

Hay dos fenómenos principales que ocurren en la extracción asistida por

³⁶T. J. Mason (ed.), *Sonochemistry: The Uses of Ultrasound in Chemistry*, Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1990

ultrasonido. Por un lado, las ondas de ultrasonido se propagan a través de un medio, desde el piezoeléctrico, el cual transforma la energía eléctrica en mecánica, haciendo que ocurra la cavitación; y, por otro lado, mediante estas ondas hay una transferencia de energía hacia las partículas vecinas, causando la vibración. Esto hace que el tamaño de las partículas de la matriz sólida disminuya, aumentando la velocidad de extracción del analito, y por ende una mayor transferencia de masa sin cambiar la estructura ni la función de los extractos³⁷.

1.4 Métodos analíticos para la determinación de cafeína

La determinación espectrofotométrica mediante absorción molecular UV-Vis es una de las técnicas instrumentales más empleada y menos costosa para la cuantificación de cafeína. Se han desarrollado numerosos métodos analíticos para su determinación empleando esta técnica³⁸. Las desventajas de los métodos espectrales consisten en una preparación de la muestra más compleja, que requiere mucho tiempo, así como una sensibilidad de análisis menor si no se realiza un paso de preconcentración.

Por otro lado, también se han desarrollado diferentes métodos electroquímicos que ofrecen ventajas como la simplicidad de operación, buena sensibilidad, amplio intervalo lineal de concentración y posibilidad de miniaturización³⁹.

También son muy utilizadas diferentes técnicas de separación en el desarrollo de métodos para determinar cafeína con excelente sensibilidad, selectividad y límite de detección, como la cromatografía de gases con espectrometría de masas⁴⁰ y la cromatografía líquida empleando espectrometría UV-Vis y espectrometría de masas⁴¹

1.4.1 *Determinación de cafeína mediante HPLC en suplementos dietarios*

Se han propuesto diversos métodos analíticos para determinar cafeína en suplementos dietarios. La técnica más utilizada es la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detección UV, tanto en la industria alimentaria como farmacéutica. Esta técnica permite separar la cafeína de las demás sustancias presentes en el suplemento y lograr su identificación a la longitud de onda característica

³⁷ Wen,C.; Zhang, J.; Zhang, H.; Dzah,C.S.; Zandile,M.; Duan,Y.; Ma,H.; Luo,X. (2018).“Advances in ultrasound assisted extraction of bioactive compounds from cash crops-A review”. *Ultrasonics-Sonochemistry*. Volume 48. Pages 538-549

³⁸ Ahmad Bhawani, S., Fong, S. S., & Mohamad Ibrahim, M. N. (2015). Spectrophotometric analysis of caffeine. *International journal of analytical chemistry*, 2015(1), 170239.

³⁹ Švorc, L. (2013). Determination of caffeine: a comprehensive review on electrochemical methods. *International Journal of Electrochemical Science*, 8(4), 5755-5773.

⁴⁰ Peng, X., Brown, M., Bowdler, P., & Honeychurch, K. C. (2020). Extraction-Free, Direct Determination of Caffeine in Microliter Volumes of Beverages by Thermal Desorption-Gas Chromatography Mass Spectrometry. *International Journal of Analytical Chemistry*, 2020(1), 5405184.

⁴¹ Rabbani, I., Armin, F., & Rasyid, R. (2021). A Review: The Use of Chromatographic Methods in Caffeine Analysis during 2000-2020. *IOSR Journal Of Pharmacy And Biological Sciences (IOSR-JPBS)*, 16(1), 14-21.

(272 nm)⁴².

HPLC es una técnica analítica separativa en la que se determinan y se identifican simultáneamente uno o más componentes presentes en una determinada muestra, a los tiempos de retención característicos de cada uno de éstos⁴³. El modo de HPLC más utilizado es cromatografía de reparto, que puede clasificarse en:

- *Fase Normal*: Se emplea una fase estacionaria polar, y como fase móvil un solvente menos polar que la fase estacionaria. Es comúnmente utilizada para separar y determinar compuestos polares.
- *Fase Reversa*: la fase estacionaria es no polar y la fase móvil es un solvente o mezcla de solventes más polar que la fase estacionaria. Es utilizado para separar compuestos apolares o moderadamente polares⁴⁴. En este trabajo, se decidió emplear cromatografía líquida en fase reversa, debido a las características de los analitos⁴⁵. En la **Figura 16** se muestra un diagrama de una separación cromatográfica empleando cromatografía líquida en fase reversa.

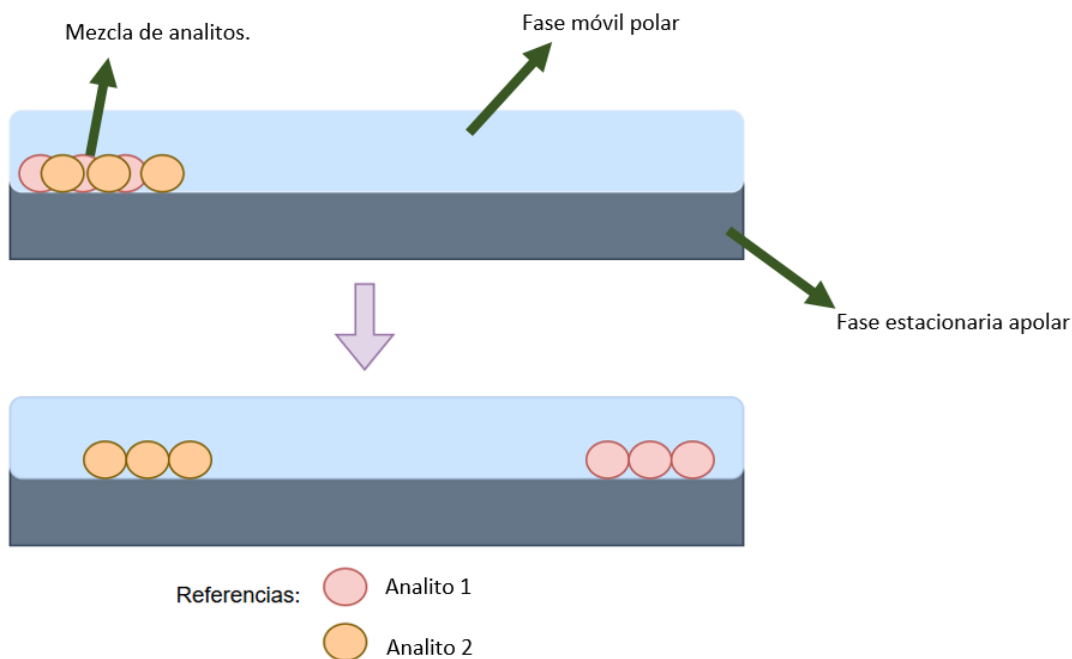


Figura 16: Separación de dos compuestos en cromatografía líquida.

⁴² Kalisz, O., Studzińska, S., & Bocian, S. (2023). A Determination of the Caffeine Content in Dietary Supplements According to Green Chemistry Principles. *Foods*, 12(13), 2474.

⁴³ Novaki, L.P.; Chinelatto, A.M.; Silva, V.A. B. B.; El Seoud, O.A. (2021). "Analysis of Consumer Products: Demonstrating the Power of LC-MS/MS for the Simultaneous Analysis of Caffeine and Other Methylxanthines in Guaraná Fruit Powder Extract". *Journal of Chemical Education*. Volume 98 (6). Pages 2083-2089.

⁴⁴ Vitha, M. F. (2016). *Chromatography: principles and instrumentation* (Vol. 185). John Wiley & Sons.

⁴⁵ Soto, C., Ponce-Rodríguez, H. D., Verdú-Andrés, J., Herráez-Hernández, R., & Campíns-Falcó, P. (2022). Determination of caffeine in dietary supplements by miniaturized portable liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1664, 462770.

2 OBJETIVOS DEL TRABAJO

OBJETIVO GENERAL

- Determinar la cantidad de cafeína que aportan los suplementos dietarios que contienen Guaraná a la ingesta diaria.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Optimizar la extracción de cafeína de muestras de suplementos dietarios que contienen Guaraná.
- Cuantificar el compuesto de interés mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución.
- Establecer qué cantidad de cafeína aportan estos suplementos a la ingesta diaria de este compuesto.

3 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Reactivos y soluciones

Todas las soluciones empleadas fueron preparadas con drogas y reactivos de calidad analítica y con agua ultrapura utilizando un sistema de purificación de agua B-pure.

- Metanol “Sintorgan”, grado HPLC.
- Etanol absoluto “Sintorgan” para análisis A.C.S.
- Ácido fosfórico “Mallinckrodt” 85%.
- Extracto seco de Guaraná (Parafarm).
- Cafeína (Parafarm).
- Teobromina (Parafarm).
- Solución patrón de cafeína de 1640 mg L⁻¹.
- Solución patrón de teobromina 190 mg L⁻¹.

3.2 Instrumentación y dispositivos

- Espectrofotómetro Hewlett Packard 8452A con arreglo lineal de diodos y ancho de banda espectral de 2 nm. 150V. Frecuencia 50-60 Hz.
- Celda de cuarzo de 10 mm de paso óptico (1,3 mL) (NSG Precision Cells, Inc.).
- Centrifuga Rolco modelo 2036.
- Baño de ultrasonido Cole Parmer. Voltaje: 70 W. Frecuencia: 42 KHz.
- Balanza analítica OHAUS. Model AS120.
- Cromatógrafo líquido-líquido HPLC Waters 600 (**Figura 17**).
- Filtros de nylon 0.22 µm.



Figura 17: Cromatógrafo líquido HPLC con detector de arreglo lineal de diodos.

3.3 Muestras comerciales de suplementos dietarios

Para este trabajo, se analizaron 5 muestras comerciales de Suplementos Dietarios a base de Guaraná de diferente composición (**Figura 18**).



Figura 18: Muestra de Suplementos Dietarios de Guaraná. (A) Guaraná (Natufarma); (B) Energinat (Natufarma); (C) Arriba (Natufarma); (D) Bagó + Energía (Bagó); y (E) Ginseng+Guaraná (Pharmamerican).

En la **Tabla 2** se muestra la composición de cada una de las muestras a analizar.

Tabla 2. Composición de las muestras de suplementos dietarios que contienen Guaraná

Muestra	Composición
Guaraná Natufarma	Extracto seco de Guaraná (400 mg), Polen (80 mg) y Vitamina E (13,44 mg).
Bagó + Energía	Extracto seco de Guaraná (25 mg), Cafeína (25 mg), Ginseng (100 mg) y Vitaminas B1 (13 mg), B6 (13 mg) y B12 (250 mg).
Vitamin Way Ginseng + Guaraná con Magnesio	Extracto seco de Guaraná (136 mg), Magnesio (130 mg), Ginseng siberiano (200 mg) y Ginseng rojo coreano (200 mg).
Arriba Energía Diaria	Extracto seco de Guaraná (100 mg), Yerba mate (100 mg), Ácido Aspártico (111 mg), Lecitina de soja en polvo (60 mg), Ginseng (50 mg), Zinc (7 mg) y Vitaminas B1 (1,2 mg), B2 (1,3 mg) y B6 (1,3 mg).
Energinat	Extracto seco de Guaraná (400 mg), Ginseng (200 mg) y Magnesio (168 mg).

3.4 Procedimiento para la extracción de cafeína de las muestras de suplemento dietario

Para extraer la cafeína de las muestras de suplemento dietario que contienen

extracto de guaraná, se empleó una extracción sólido-líquido asistida por ultrasonido⁴⁶
⁴⁷. Para la optimización de las variables de extracción, se eligió la muestra Guaraná (Natufarma) que contiene 400 mg de extracto seco de Guaraná por cada 4 comprimidos. En la **Figura 19** se observa un esquema del procedimiento propuesto. En primer lugar, se pesaron 4 comprimidos de la muestra (0,2425 g) y se pulverizaron. Luego se pesó aproximadamente 0,0100 g de la muestra en un tubo Falcon y se agregó 10,00 mL de una mezcla metanol/agua 15:85 (v/v). Se colocó el tubo en el baño de ultrasonido y se sonicó durante 20 min. Una vez finalizado este tiempo, se centrifugó durante 5 minutos y se extrajo el sobrenadante lentamente para evitar tomar la muestra sólida. Luego, se llevó a un volumen de 50,00 mL con la mezcla metanol/agua 15:85 (v/v). Este procedimiento se repitió con todas las muestras, por triplicado. Para la optimización de las variables de extracción se empleó la técnica de absorción molecular UV-Vis. Para llevar a cabo la curva de calibrado y el análisis de las muestras, se empleó HPLC con detección UV, midiendo la señal de la cafeína a 272 nm.

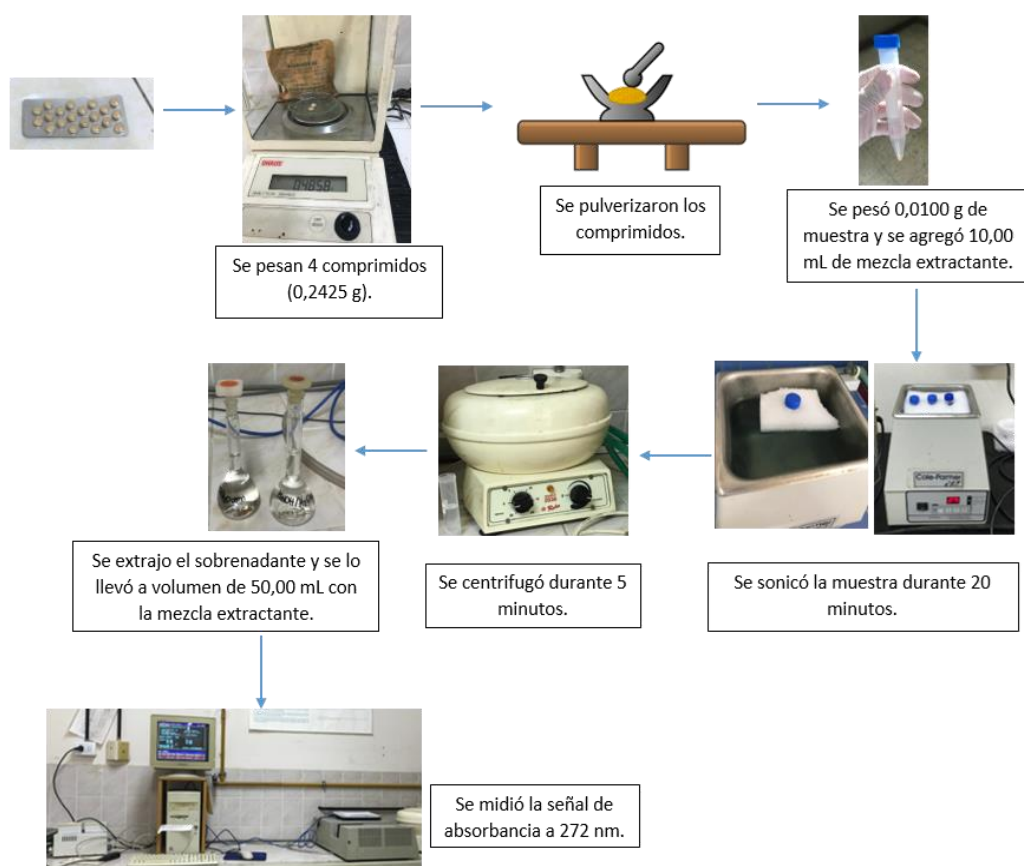


Figura 19: Procedimiento para llevar a cabo la extracción sólido-líquido asistida por ultrasonido.

⁴⁶Machado, K.N.; Alves de Freitas,A.; Cunha,L.H.; Gomes Faraco,A.A.; de Pádua, R.M.;Castro Braga,F.; Duarte Vianna-Soares,C.; Oliveira Castilho, R (2018) "A rapid simultaneous determination of methylxanthines and proanthocyanidins in Brazilian guaraná (*Paullinia cupana* Kunth). Running title: A rapid determination of guaraná constituents".Food Chemistry. Volume 239. Pages 180-188.

⁴⁷ "Development and validation of a fast and simple HPLC-UV method to determine caffeine in guarana (*paullinia cupana*) food supplements". J.C. Pereira Coura, C. Aparecida de Oliveira e Silva, E. Santos Silva, S. Araújo Valladão, M. G. Resende Duarte- 2021.

3.5 Determinación de cafeína por HPLC

Para llevar a cabo la curva de calibrado y el análisis de las muestras, se empleó HPLC con detección UV. La separación se realizó en un cromatógrafo líquido HPLC Waters 600 (Waters, EE. UU.) que tiene como detector un arreglo lineal de diodos. La cafeína se separó del resto de los componentes de las muestras utilizando una columna Zorbax C18 (150 mm × 4,6 mm, 5 µm, Agilent), en modo isocrático. Para la fase móvil, se utilizó metanol y agua ultrapura en una relación 45:55 (v/v) y se detectó a 272 nm. El volumen de inyección y el flujo fueron de 50 µL y 0,5 mL min⁻¹, respectivamente.

Las muestras se prepararon según se indicó en la Sección 3.4. Tanto las muestras como las soluciones testigo se filtraron con un filtro de jeringa y se inyectaron en el cromatógrafo para su análisis.

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Estudios preliminares

En este trabajo se planteó la determinación del contenido de cafeína en suplementos dietarios que contienen Guaraná. Como se mencionó anteriormente, el Guaraná está compuesto por cafeína y también por teobromina. Por ello, en un principio, con el objetivo de extraer sólo cafeína de las muestras, se compararon las solubilidades de ambos compuestos en agua, en etanol y en metanol. Se observó que la teobromina es poco soluble en agua, y menos soluble que la cafeína en metanol y etanol.

Sin embargo, la teobromina aumenta considerablemente su solubilidad en agua acidulada pH 3,0⁴⁵.

Tabla 3: Solubilidad de la cafeína y teobromina en los distintos solventes ^{48 49 50}.

Analitos de interés	Solubilidad en agua	Solubilidad en Metanol	Solubilidad en Etanol
Cafeína	21 mg/mL	0,39 g/mL	0,20 mg/mL
Teobromina	3×10^{-6} mg/mL	0,19 g/mL	0,08 mg/mL

Para llevar a cabo la comparación de los posibles solventes extractantes, se utilizó la muestra Guaraná (Natufarma) por ser la muestra con menor cantidad de componentes activos. Se pesó 0,0100 g de la muestra y se realizó el procedimiento de extracción según se encontró en bibliografía⁴⁵ y se muestra en la **Figura 20**.

⁴⁸ Shalmashi, A; Golmohammad,F. (2010).“Solubility of caffeine in water, ethyl acetate, ethanol, carbon tetrachloride, methanol, chloroform, dichloromethane, and acetone between 298 and 323 K”. Latin American Applied Research.Volume 40(3), 283-285.

⁴⁹ Paruta, A.N; Irani, S.A. (1966). “Solubility Profiles for the Xanthines in Aqueous Alcoholic Mixtures I”. Journal of Pharmaceutical Sciences.Volume 55(10), 1055-1059.

⁵⁰ Zhong,J.; Tang,N.; Asadzadeh,B; Yan,W. (2017).“Measurement and Correlation of Solubility of Theobromine, Theophylline, and Caffeine in Water and Organic Solvents at Various Temperatures”. Journal of Chemical & Engineering Data”.Volume 62(9), 2570-2577.

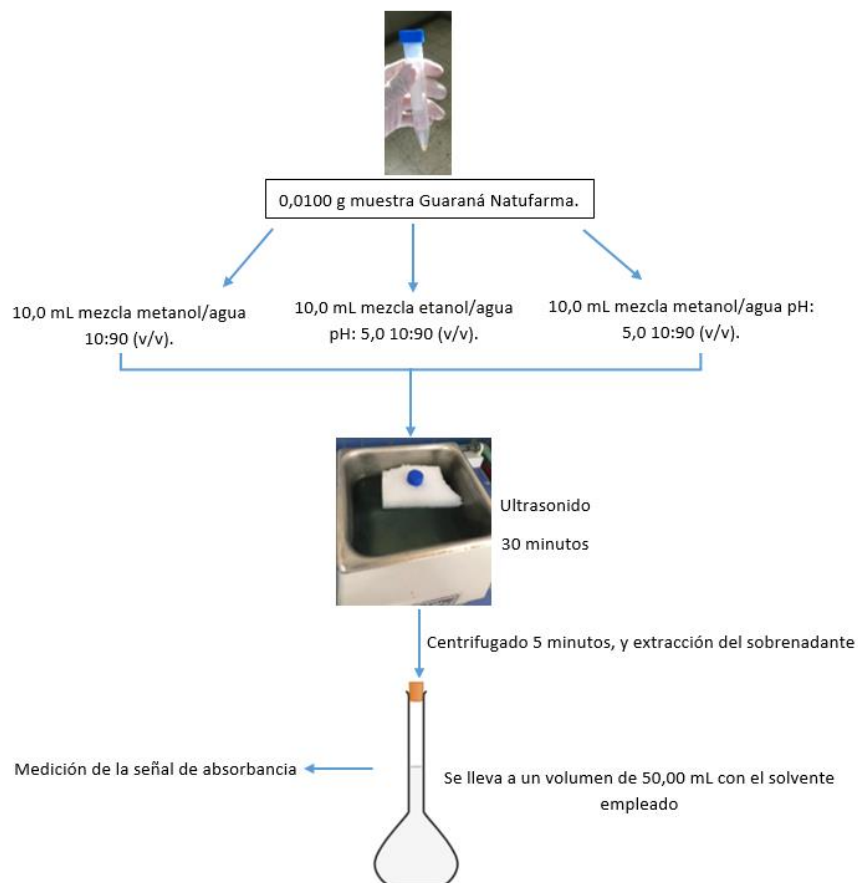


Figura 20: Esquema del procedimiento de extracción realizado para la muestra Guaraná y para el extracto seco puro de Guaraná.

Por otro lado, se llevó a cabo el análisis de la muestra Guaraná (Natufarma) por HPLC según se describió en la Sección 3.5 para verificar que cuando se realiza la extracción, se extrae la cafeína, pero no la teobromina. En la **Figura 21** se compara el cromatograma obtenido para una solución estándar de cafeína y teobromina, ambas en una concentración de 15 mg L^{-1} , con el extracto obtenido. Como se puede observar, aparece un único pico al tiempo de retención de la cafeína ($t_R=4,69$).

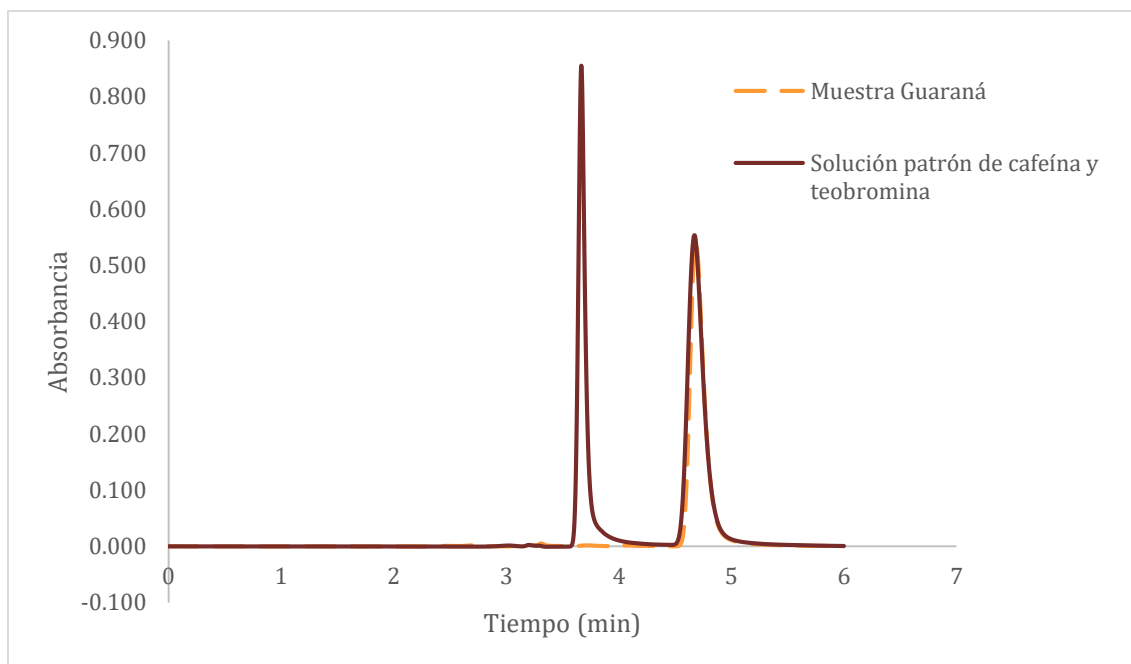


Figura 21: Comparación de los cromatogramas obtenidos para una solución estándar de teobromina ($t_R= 3,68$) y cafeína ($t_R=4,69$) (15 mg L^{-1}) y para el extracto obtenido de la muestra Guaraná (Natufarma)

4.2 Optimización de las condiciones de extracción

- Optimización del modo de extracción

Según el trabajo realizado por Pereira Coura y colaboradores⁴⁵, es más efectivo llevar a cabo la extracción de cafeína mediante 3 extracciones sucesivas que en un único paso de extracción. Por ello, para optimizar esta variable, se realizó la comparación de la extracción de la muestra mediante 3 extracciones sucesivas y mediante una única extracción. Para la extracción sucesiva, se pesó aproximadamente 0,0100 g de muestra y se le agregó 10,00 mL de la mezcla metanol/agua 10:90 (v/v) y se sonicó durante 10 min. Se extrajo el sobrenadante y se repitió este procedimiento dos veces más. Luego, se juntó el sobrenadante en un matraz de 50,00 mL y se llevó a volumen con la mezcla de solvente. Para la extracción en un único paso, se pesó aproximadamente la misma cantidad de muestra, se le agregó 10,00 mL de la mezcla metanol/agua 10:90 (v/v) y se sonicó durante 30 minutos. Las determinaciones se realizaron por triplicado. En la **Figura 22** se muestran los espectros obtenidos para cada extracto. Como se puede observar, no hay diferencia significativa entre ambos procedimientos de extracción. Por esta razón, se continuó trabajando con un único paso de extracción.

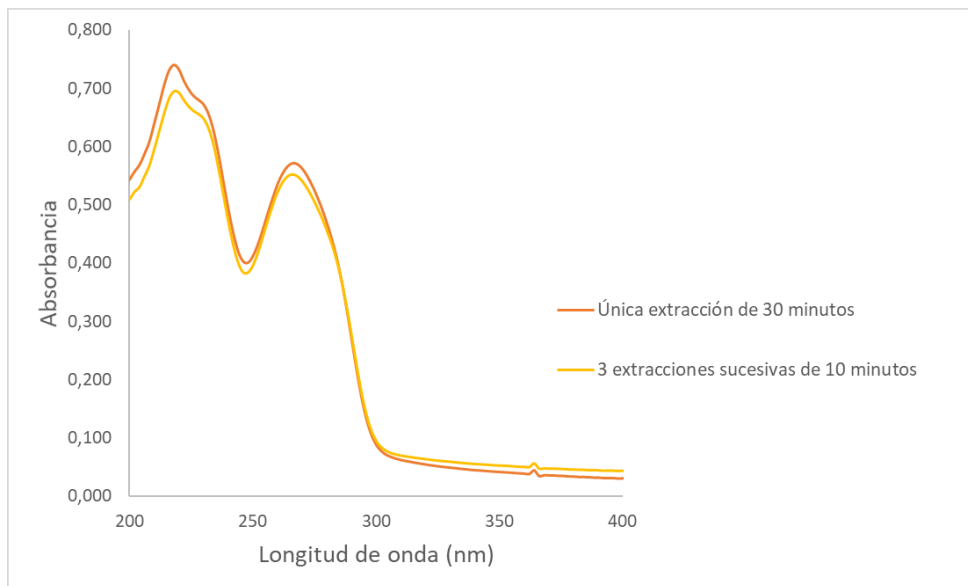


Figura 22: Comparación de los espectros obtenidos para la extracción de cafeína mediante extracciones sucesivas o en un único paso.

- Optimización del porcentaje de metanol en la mezcla extractante

Una vez optimizado el modo de extracción, se realizó la optimización del porcentaje de metanol, entre 10% (v/v) y un 20% (v/v), en la mezcla metanol/agua. En la **Figura 23** se muestra un gráfico de la señal de absorbancia obtenida para cada mezcla. Se puede observar que, al aumentar el porcentaje de metanol en la mezcla de 5% a 10%, la señal de absorbancia disminuye. Luego, se observa un aumento de la señal cuando el porcentaje de metanol aumenta a 15%, para luego disminuir ligeramente cuando este es del 20%. Se seleccionó como valor óptimo un porcentaje de metanol del 15%. Las determinaciones se realizaron por triplicado.

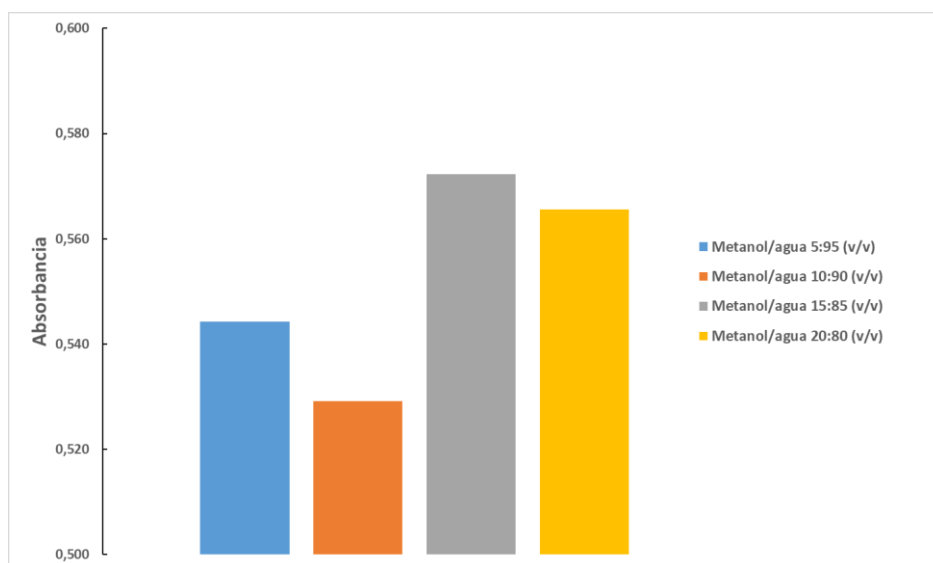


Figura 23: Optimización del porcentaje de metanol en la mezcla de metanol/agua

- Optimización del tiempo de extracción del analito.

Una vez optimizado el porcentaje de metanol en la mezcla extractante, se varió el tiempo de extracción entre 10 y 40 minutos (**Figura 24**). Para ello, se pesó la muestra y se le agregó 10,00 mL de la mezcla metanol/agua 15:85 (v/v). Se observó que la señal de absorbancia aumentó cuando se sonicó durante 20 minutos, y luego descendió ligeramente. Por lo tanto, se seleccionó 20 minutos como tiempo óptimo. Las determinaciones se realizaron por triplicado.

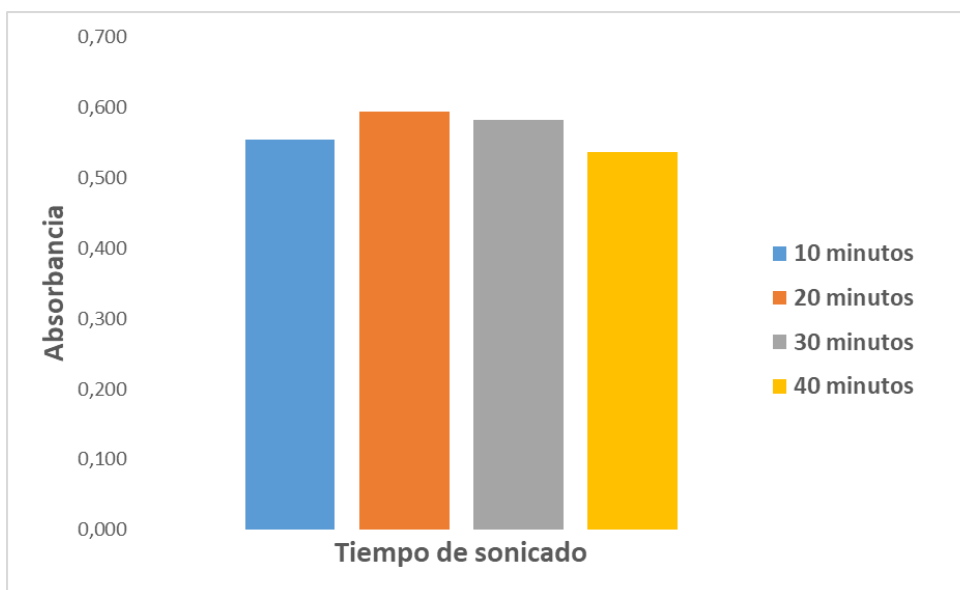


Figura 24: Optimización del tiempo de extracción del analito de la matriz sólida.

4.3 Determinación de cafeína por HPLC

Para llevar a cabo la determinación de cafeína en las muestras de suplemento dietario, se empleó la técnica de HPLC en las condiciones descritas en la Sección 3.5. Estas condiciones fueron optimizadas teniendo en cuenta la composición de todas las muestras a analizar. Para ello, se realizó la extracción de las muestras y se inyectaron en el cromatógrafo. Se ajustó la composición de la fase móvil para asegurar que el pico de la cafeína quede separado del resto de los componentes de la muestra que también se extraen con la mezcla extractante seleccionada.

Una vez optimizadas las condiciones cromatográficas, se prepararon los testigos según se muestra en el esquema de la **Figura 25** y luego se realizó la curva de calibrado en el intervalo de concentraciones entre 2,0 y 30,0 mg L⁻¹ (**Figura 26**).

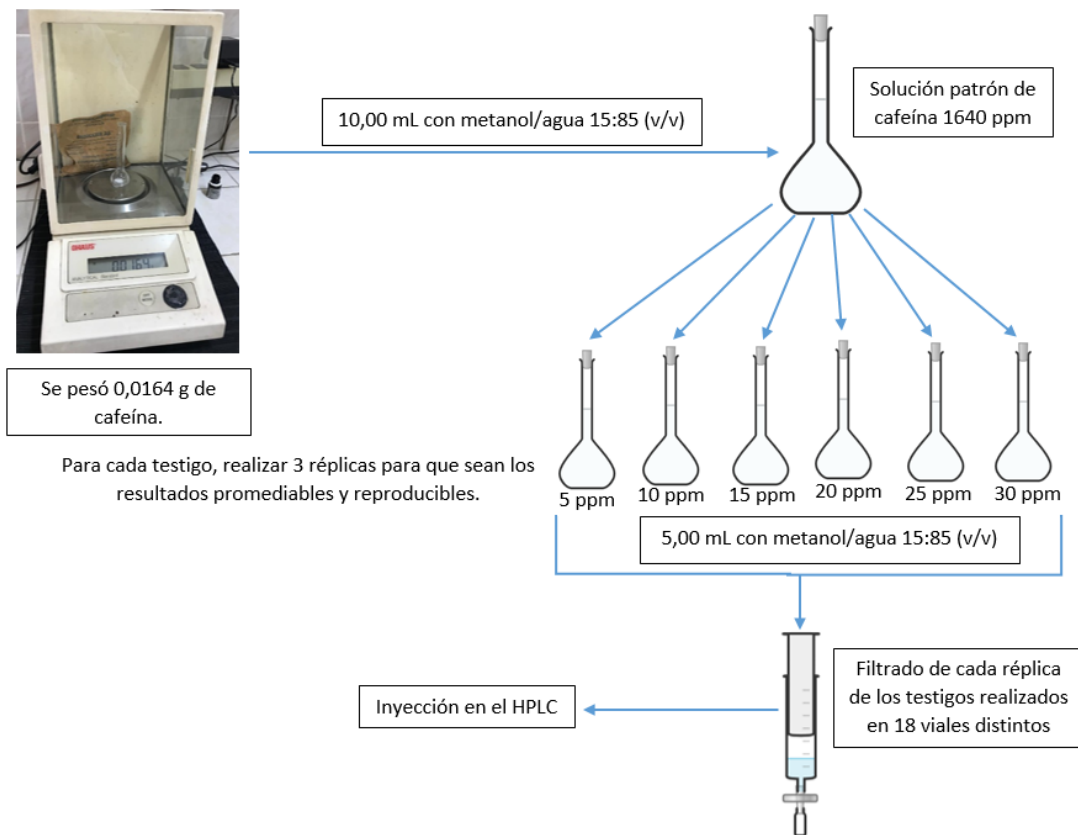


Figura 25: Esquema de la preparación de las soluciones testigo de cafeína y posterior determinación por HPLC.

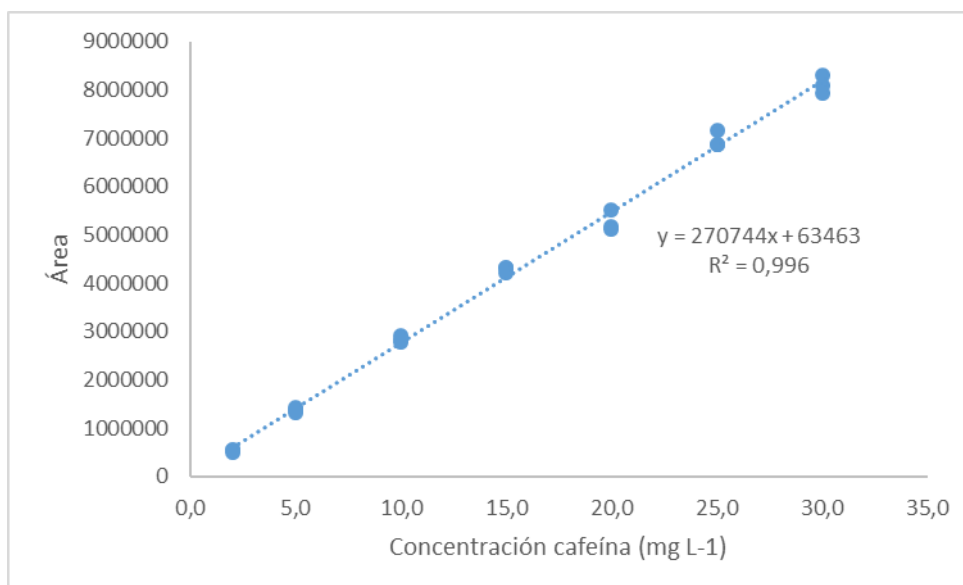


Figura 26: Curva de calibrado para la determinación de cafeína

Luego, se llevó a cabo la cuantificación de cafeína en las muestras seleccionadas. En la **Tabla 4** se muestran los resultados obtenidos. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

Tabla 4. Concentración de cafeína en las muestras analizadas.

Muestra	Concentración cafeína (mg cafeína L ⁻¹)	Concentración cafeína por comprimido (g cafeína/ comprimido)
Guaraná Natufarma	(17,07 ± 0,47)	(0,022 ± 0,001)
Bagó + Energía	(14,01 ± 0,39)	(0,026 ± 0,001)
Ginseng + Guaraná	(2,53 ± 0,44)	(0,007 ± 0,001)
Arriba Energía Diaria	(15,95 ± 0,39)	(0,064 ± 0,002)
Energinat	(9,69 ± 0,40)	(0,025 ± 0,001)

En la **Figura 27** se muestran los cromatogramas obtenidos para cada muestra y se comparan con la solución estándar de cafeína y teobromina. Como se puede observar todas las muestras presentan el pico característico de la cafeína a un tiempo de retención de 4,69 minutos.

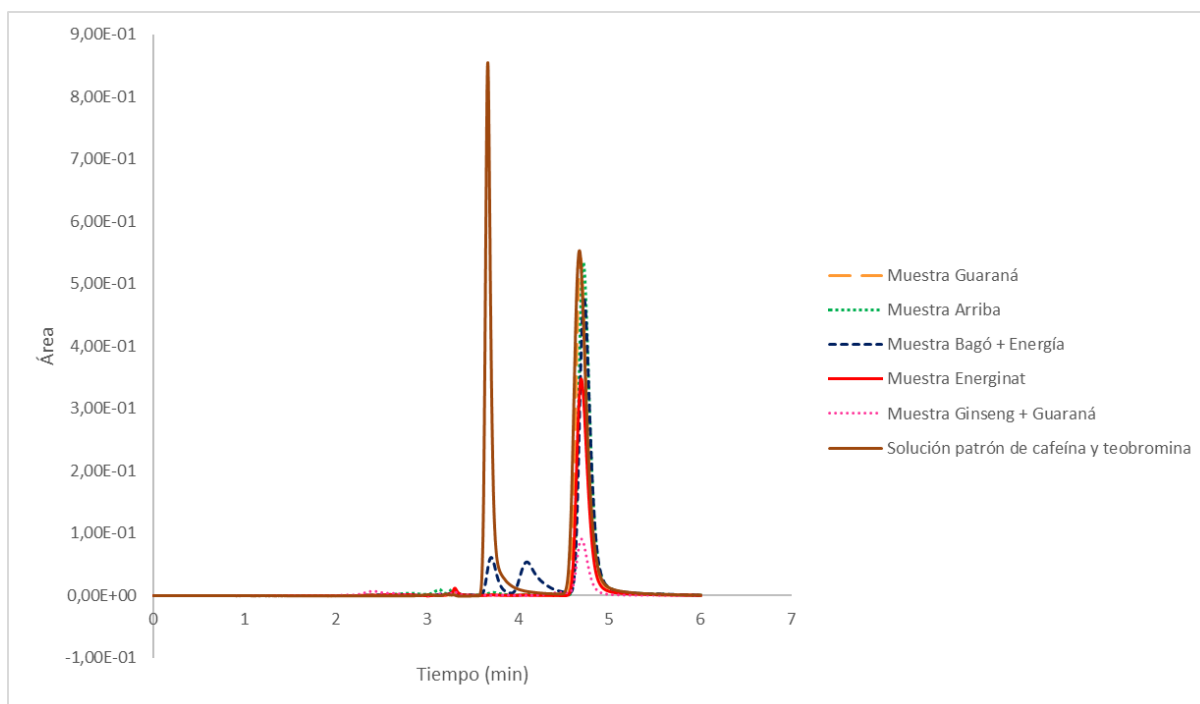


Figura 27: Comparación del cromatograma obtenido para una solución estándar de cafeína y teobromina (15 mg L⁻¹) y de los cromatogramas obtenidos para cada muestra.

Para la muestra Bago+Energía, se observa un pico al tiempo de retención de la teobromina. Sin embargo, el espectro obtenido a ese tiempo no corresponde a este analito por lo que se infiere que debe ser de algún otro componente activo presente en el suplemento dietario y que se extrajo con la cafeína

5 CONCLUSIONES

En este trabajo de tesina se logró realizar y optimizar la extracción de cafeína de muestras comerciales de suplementos dietarios de Guaraná, mediante el uso de la técnica de extracción sólido-líquido asistida por ultrasonidos.

Por otro lado, se optimizó el método de separación para llevar a cabo su cuantificación en las muestras seleccionadas, y se calculó qué cantidad de cafeína aporta cada comprimido de estos suplementos a la ingesta diaria. Teniendo en cuenta lo que indica el Código Alimentario Argentino, los valores estarían por debajo del máximo establecido.