

# Determinación de fósforo y cafeína en bebidas de cola

Norma C. Cavazos Rocha,<sup>1</sup> Lydia Zárate Rivera,<sup>1</sup> Esperanza Torres de Navarro<sup>1</sup>

## Abstract (*Phosphorus and caffeine determination and quantification in soft cola drinks*)

We present two methods for phosphorus and caffeine determination and quantification in soft cola drinks that are quick and easy to perform. We think they will catch the student's interest.

## Resumen

Presentamos dos métodos para la determinación y cuantificación de cafeína y fósforo respectivamente en bebidas de cola, los cuales son rápidos, fáciles de realizar y creemos que despertarán el interés entre los estudiantes.

## Introducción

México es el primer lugar *per cápita* en consumo de refresco en el mundo. Según encuestas realizadas en 1993, los países con mayor consumo *per cápita* eran: Estados Unidos con 200 litros/año, México con 140 litros/año, Canadá con 110 litros/año, y a partir de 1989 se han incrementado estas cifras de 5 a 30%, lo que ha llevado a nuestro país a ser el número uno. Según datos de la Cámara Nacional de la Industria de la Leche y de la Asociación Nacional de Productores de Refrescos el consumo de refrescos casi duplica al de la leche, aun cuando los primeros son más caros. (Internet).

En general, se piensa que los refrescos de cola son bebidas relativamente inofensivas y que un excesivo consumo de estos productos no causa más daño que caries dental y aumento de peso debido al alto contenido de azúcar. Sin embargo, los daños pueden ir más allá. Además de azúcar, un refresco de cola tiene ácido fosfórico, cafeína y nuez de cola, y estos elementos pueden llegar a causar diferentes trastornos al organismo. El fósforo está íntimamente relacionado con el calcio tanto en la nutrición humana como en la absorción de este mineral. Un aporte

alto de fósforo impide la absorción de calcio y aumenta la cantidad de hormona paratiroidea, la cual puede disminuir la formación de huesos (Fariás, 1988). La cafeína, por su parte, es la droga psicotrópica de mayor consumo en el mundo. Tiene efectos sobre el sistema nervioso central con síntomas como insomnio, inquietud y excitación, entre otros; también, un exceso de cafeína afecta el aparato digestivo produciendo vómito, diarrea y dolor gástrico. Es capaz de aumentar la diuresis. Además existe el síndrome de abstinencia por la supresión de cafeína a dosis tan bajas como 100 mg/ día, que expresado en términos de alimentos equivaldría a una taza de café, dos de té o tres refrescos de cola (Nutrición, 1996). El síntoma más característico de abstinencia de cafeína es la cefalea. Finalmente, la nuez de cola produce cambios en la actividad motriz.

Un grupo importante de consumidores de productos de cola es el de la población universitaria. Con la información dada anteriormente sobre estos productos de cola y sus posibles efectos sobre la salud creemos que el realizar la determinación de fósforo y cafeína y conocer la cantidad de estos productos que se ingiere por bebida consumida sería un tema que lograría captar el interés de los estudiantes. Consideramos que la labor de un docente no sólo es la de transmitir los conocimientos sino que hay que hacerlo de una manera práctica y atractiva, buscando con esto que el alumno comprenda, retenga los conocimientos y finalmente actúe, es decir, aplique lo aprendido y lo relacione con su entorno. Para lograr este fin, las prácticas de laboratorio son, sin duda, una gran ayuda ya que representan la oportunidad para demostrar, aplicar y complementar lo aprendido en el aula. Además, en ellas el alumno adquiere habilidades y destrezas y aprende a evaluar la calidad de su trabajo, lo que le permitirá desarrollarse al máximo en el ejercicio de su profesión.

Por lo anterior, en este trabajo se propone la determinación y cuantificación de fósforo y cafeína contenidos en muestras de consumo popular, como lo son los refrescos de cola, como tema para desarrollar y practicar los métodos de espectrofotometría UV-Vis y cromatografía de líquidos de alta resolución dentro de un programa de prácticas de laboratorio.

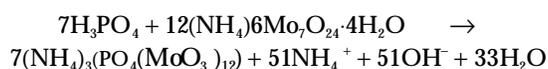
<sup>1</sup> Departamento de Química Analítica. Facultad de Medicina. UANL. Av. Madero y Dr. Eduardo Aguirre Pequeño. A.P. 1565. Monterrey, N.L. México.

Recibido: 8 de abril de 1999; aceptado: 1 de junio de 2000.

## MÉTODO

### Método espectrofotométrico para fósforo

Los ácidos molibdicos formados cuando un exceso de molibdato reacciona en solución ácida con fosfato, silicato, arsenato, germanato y otros oxo-aniones son la base de métodos sensibles utilizados para la determinación del elemento correspondiente (Sandell, 1978). Para la determinación de fósforo la reacción es la siguiente:



El complejo de fosfomolibdato tiene una mezcla de  $\text{Mo}^{+5}$  y  $\text{Mo}^{+6}$ , su composición es indefinida. Este complejo es reducido a un compuesto azul soluble cuya absorbancia es medida espectrofotométricamente y es proporcional a la cantidad de fósforo presente en la muestra. Varios agentes reductores se han utilizado para este fin, entre ellos el cloruro estanoso, agentes reductores orgánicos como el ácido 1-amino-2-naftol-4-sulfónico + sulfito e hidroquinona. Recientemente se ha utilizado el ácido ascórbico con buenos resultados (Egan, 1988; Sandell, 1978).

En el presente trabajo se aplicó un método espectrofotométrico basado en la reacción del fósforo, presente en la muestra, con molibdato de amonio para producir el complejo de color azul de fosfomolibdato; como agente reductor se utilizó el ácido ascórbico.

Las muestras fueron adquiridas en diferentes comercios de la zona metropolitana.

#### Reactivos

- Fosfato diácido de potasio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )
- Molibdato de amonio
- Ácido ascórbico
- Agua desionizada
- $\text{H}_2\text{SO}_4$

Todos los reactivos utilizados fueron grado analítico.

#### Soluciones

- *Solución stock de  $\text{P}_2\text{O}_5$*   
Pesar 0.1915 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  seco. Disolver con agua desionizada y aforar a 1000 mL. Esta solución contiene 100 ppm de  $\text{P}_2\text{O}_5$ .
- *Solución de trabajo*  
Diluir la solución anterior a una concentración final de 4 ppm de  $\text{P}_2\text{O}_5$

#### • Solución reductora

Se compone de tres reactivos: a) 0.7800 g de molibdato de amonio en 39 mL de agua; b) 1.056 g de ácido ascórbico en 60 mL de agua; c) 11 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado en 125 mL de agua. Mezclar a, b y c, y aforar a 250 mL con agua desionizada.

Todo el material utilizado fue lavado previamente con agua desionizada.

#### Equipo

Espectrofotómetro Turner Modelo 390 con celdas cilíndricas de 1 cm de trayecto óptico.

#### Procedimiento experimental

##### • Preparación de la curva de calibración

Se prepararon 5 estándares en matraces de aforación de 10 mL correspondientes a 0.4, 0.8, 1.2, 1.6 y 2 ppm. A cada matraz se añadieron 1, 2, 3, 4 y 5 mL respectivamente de solución de trabajo, 4 mL de solución reductora y se aforaron a 10 mL con agua desionizada. Se incubaron durante 45 minutos a  $50^\circ\text{C}$ . Después del tiempo de incubación se leyó la absorbancia a 830 nm frente a un blanco. Se graficaron los valores de absorbancia contra concentración (figura 1).

##### • Preparación de la muestra

Se trabajó con refrescos de cola (Coca-Cola, Pepsi-Cola y Coca-Cola Light, Pepsi Light y Pepsi Max) los cuales fueron desgasificados con vacío y agitación constante. Se tomó 1 mL de refresco desgasificado y se aforó a 50 mL. De esta solución se tomó 1 mL, se añadieron 4 mL de solución reductora y se aforó a 10 mL con agua desionizada. Se trabajaron seis muestras de cada refresco y las

Curva de calibración para fósforo

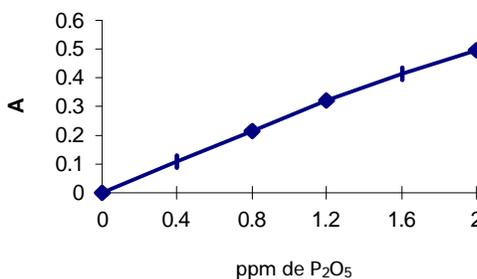


Figura 1. Curva de calibración para fósforo.

**Tabla 1.** Curva de calibración para la determinación de fósforo.

Concentración ppm	Absorbancia promedio a 830 nm
0.4	0.107
0.8	0.217
1.2	0.320
1.6	0.414
2.0	0.494

\* Concentración expresada como P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>.

determinaciones se realizaron por triplicado. Se calculó el promedio y el coeficiente de variación para evaluar la reproducibilidad del método.

#### Método por CLAR para determinación de cafeína

Las llamadas bebidas ligeras que tienen sabor de cola contienen cafeína puesto que están elaboradas con las semillas del árbol *cola acuminata*. Estas semillas llamadas nueces de cola contienen aproximadamente 2% de cafeína. (Goodman 1991). Este alcaloide estimula la corteza cerebral, produce un pensamiento rápido y claro, y aleja la pesadez y la fatiga.

La cafeína es determinada por cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) utilizando fase inversa octadecilsilano con una mezcla metanol-agua como fase móvil.

#### Reactivos

- Cafeína grado analítico
- Agua filtrada por el sistema Milli-Q
- Metanol grado cromatográfico

#### Soluciones

- Solución de cafeína 1 mg/mL en agua desionizada.

#### Equipo

Cromatógrafo de líquidos Beckman System Gold con bomba binaria modelo 126. Detector UV-Vis con arreglo de díodos modelo 168.

#### Procedimiento experimental

- *Preparación de la curva de calibración*  
Se prepararon 5 estándares a una concentración final de 0.0625, 0.125, 0.25 y 0.5 mg/mL a partir de la solución de 1 mg/mL. Con estas cinco concentraciones se realizó una curva de calibra-

**Tabla 2.** Resultados del contenido de fósforo en bebidas de cola\*.

Refresco	Contenido promedio ppm	C.V. %
Coca-Cola	215	1.78
Pepsi-Cola	223	1.14
Coca-Cola Light	199	0.79
Pepsi Light	186	1.32
Pepsi Max	201	3.00

\* n = 6

ción y se graficaron los valores de altura de pico en función de la concentración.

- *Preparación de la muestra*

La muestra fue desgasificada y filtrada con el kit para muestras con un filtro millipore de 0.45 µm de diámetro. El filtrado obtenido se inyectó directamente en el cromatógrafo en donde se trabajó con una columna de fase inversa octadecilsilano de 150 × 4.6 mm y con un tamaño de partícula de 5 µm. Como fase móvil se utilizó metanol-agua en una proporción 40/60 a una velocidad de flujo de 1 mL/min. Se inyectaron 20 µL. La detección fue por UV a 254 nm.

## RESULTADOS

#### Para fósforo

Se obtuvo la linealidad de la *curva de calibración* en un rango de 0.4 a 2 ppm de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>.

Con los datos obtenidos y aplicando mínimos cuadrados se llegó a la ecuación  $Y = 0.2428 X - 0.0191$  con un coeficiente de correlación ( $r$ ) de 0.999. Las lecturas obtenidas se muestran en la tabla 1.

Las lecturas promedio de absorbancia obtenidas para las muestras analizadas se interpolaron en la curva de calibración para obtener la concentración de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>.

Para encontrar el fósforo presente en el refresco, tomando en cuenta la dilución realizada, se hizo el siguiente cálculo:

$$\text{ppm de P} = X \text{ ppm de P}_2\text{O}_5 \times 50 \times 10 \times \frac{62\text{g de P}}{142\text{g de P}_2\text{O}_5}$$

El contenido de este elemento en los refrescos analizados se muestra en la tabla 2.

#### Para cafeína

En la figura 2 se observa el cromatograma obtenido para un estándar de 0.5 mg/mL de cafeína. El pico

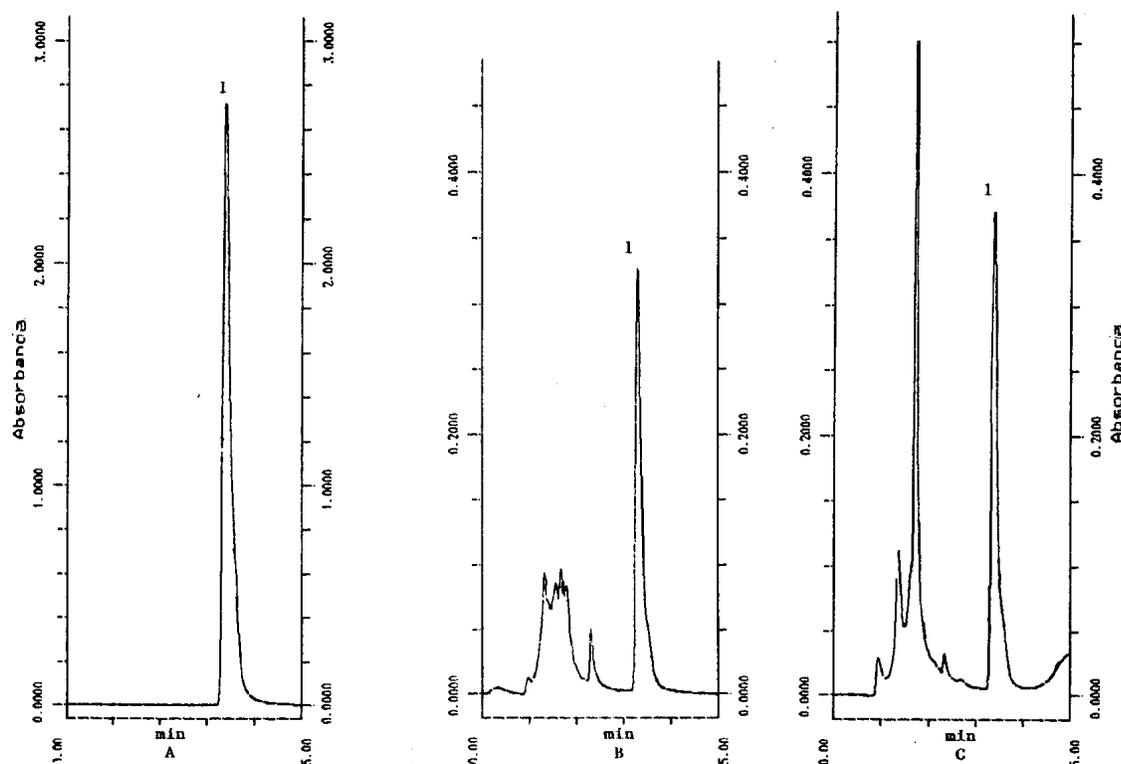


Figura 2. Cromatogramas para: (A) Estándar de cafeína de 0.5 mg/mL; (B) Refresco de cola normal, y (C) Refresco de cola light. En los tres cromatogramas el pico 1 corresponde a la cafeína, con un tiempo de retención de 3.54 min. Las condiciones cromatográficas utilizadas están descritas en el texto.

tuvo un tiempo de retención de 3.54 min. En la figura 2 también se observan los cromatogramas representativos de refrescos de cola normal y light respectivamente. Además del pico de la cafeína se observan otros picos pequeños y uno muy notable, debido probablemente al edulcorante utilizado. La identificación se hizo por el parámetro de tiempo de retención y por coinyección. Tanto para estándares como para muestras el tiempo de retención fue reproducible. No se requirió de dilución del refresco por lo que los resultados se obtuvieron directamente de la curva de calibración tomando como base la altura de pico obtenida del cromatograma de cada una de las muestras analizadas. Los resultados se muestran en la tabla 3.

### Discusión y conclusiones

De entre los diferentes métodos que se reportan para la determinación de fósforo se utilizó el espectrofotométrico del azul de molibdeno con el molibdato de amonio y ácido ascórbico para desarrollar el color, presentando éste las ventajas de que los reactivos se consiguen fácilmente y son rápidos en su

preparación. La solución reductora, una vez preparada, se almacenó máximo durante una semana en refrigeración y oscuridad. La determinación se lleva a cabo de una manera rápida y sencilla y los resultados obtenidos son reproducibles tanto para la curva de calibración como para el análisis de las muestras.

El color del refresco interfiere con el método colorimétrico, por lo que algunos autores (Lozano-Calero, 1996) recomiendan una separación del ácido

Tabla 3. Resultados del contenido de cafeína en bebidas de cola\*.

Refresco	Cafeína mg/mL	C.V. %
Coca-Cola	0.158	0.50
Coca-Cola Light	0.169	1.65
Pepsi-Cola	0.139	1.58
Pepsi-Cola Light	0.170	2.23
Pepsi Max	0.150	5.20

\* n = 6

fosfórico del resto de los componentes de la muestra por cromatografía de intercambio iónico antes de realizar la determinación. Se probó esta técnica de separación pero en nuestro caso se observó que la muestra eluida conservaba el color del refresco. A la par se realizó una dilución 1 a 50 directa de la muestra. Se determinó el fósforo en las muestras "limpias" y en las muestras directas con el procedimiento descrito anteriormente y se compararon los resultados observándose que no había diferencia entre ellos por lo que se decidió excluir la cromatografía.

Se observó que los refrescos de dieta contienen una mayor cantidad de cafeína y una menor cantidad de fósforo que los normales. De acuerdo con nuestros resultados 355 mL de un refresco de cola proporcionarían entre 66 y 85 mg de fósforo y entre 49 y 60 mg de cafeína. Podría pensarse que tal vez estas dosis sean muy bajas y no causen daño a la salud.\* Existen datos en donde se menciona que en escolares, la ingestión de cuatro refrescos de 355 mL a la semana se asocia con hipocalcemia, mientras que una dosis de cafeína de sólo 32 mg puede afectar la conducta, que un solo trago es suficiente para iniciar el daño en los dientes, etcétera (Amato, 1995). De aquí que no es conveniente el declarar que el tomar una cierta cantidad de refresco sea seguro y/o no cause efectos en el organismo. Lo que deberá tomarse en cuenta es que los riesgos a la salud provocados por la ingesta de refrescos depende de qué grupo de la población lo esté tomando pero sobre todo de la frecuencia con que lo haga. Los posibles daños son muy diversos de manera que vale la pena difundir esta información y recomendar ser prudente con el consumo de estos productos sobre todo cuando se trata de lactantes y niños.

Consideramos estas dos prácticas interesantes, ya que, por un lado, se cumple el objetivo del desarrollo de dos de las técnicas instrumentales más importantes aplicadas en el análisis de alimentos, particularmente bebidas, en donde el tratamiento de la muestra es sencillo. Los dos métodos desarrollados por el alumno son sencillos y rápidos pero a la vez requieren de actividad y atención constante. Por otro lado, con la información que se ofrece acerca de los posibles efectos de estos productos en nuestro organismo, sobre todo cuando son consumidos en

forma excesiva, tal vez pueda favorecerse una conducta más responsable entre los consumidores universitarios. ■

### Bibliografía

- Anderson S. Cockayne S. *Química Clínica*. Ed. Interamericana-Mc Graw Hill. México 1995. p. 528-537.
- AOAC International. *Food Additives Analytical Manual. Volume I*. Edited by Warner C., Modderman J. U.S. Food and Drug Administration. 1983.
- Amato D., Maravilla A., García-Contreras, Paniagua R. Los refrescos y la salud, *Rev. Invest. Clin.* **49**, 387-95 (1997).
- Cuadernos de Nutrición*, **19**[4] julio-agosto (1996).
- Current Awareness. U. S. Dairy Export Council*<sup>TM</sup> **10** [1] enero 1 (1997).
- Egan H., Kirk R., Sawyer R. *Análisis Químico de Alimentos de Pearson*. Cía. Editorial Continental, SA de CV, México. Quinta reimpresión, 1987. p. 41-42.
- Fariás M. *Química Clínica*. Editorial El Manual Moderno SA de CV, México. 1988. p. 535-545.
- Goodman L. Gilman A. *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. Editorial Médica Panamericana. Octava edición, 1991. p. 606-615.
- Helrich K. *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. Association of Official Analytical Chemists, Inc. 1990.
- Internet. Datos obtenidos de la red de información.
- Lozano-Calero D., Martín-Palomeque P., Madueño-Loriguillo S. Determination of Phosphorus in Cola Drinks, *J. Chem. Educ.*, **73** [12] 1173-1174 (1996).
- Lozano-Calero D., Martín-Palomeque P., Madueño-Loriguillo S. Chromatographic Separation of Phosphoric Acid from Cola Beverages, *J. Chem. Educ.*, **73**[12] 1172 (1996).
- Lussi A., Jaeggi T., Jaeggi-Scharer. Prediction of the erosive potential of some beverages, *Caries Res.* **29**[5] 349-354 (1995).
- Peterson M., Johnson A. *Encyclopedia of Food Technology and Food Science*. The Avi Publishing Company, Inc. **3** (1978). p. 616-618.
- Richterich R., Colombo, J.P., *Química Clínica. Teoría, práctica e interpretación*. Salvat Editores, México. p. 411-419.
- Sandell E., Onish H. *Photometric Determination of Traces of Metals*. John Wiley and Sons Inc. USA. 1978. **3**. p. 249-250.

\* Las cifras normales de fósforo sérico inorgánico en los adultos son entre 2.8 y 4 mg/100 mL y la excreción por la orina de fosfatos obtenidos de una dieta normal es de aproximadamente 70%. Anderson, 1995).