

Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Departamento de Agroindustria Alimentaria
Ingeniería en Agroindustria Alimentaria



Proyecto Especial de Graduación

**Validación de método analítico para detección y cuantificación de
cafeína en bebidas energéticas mediante Cromatografía Líquida de Alta
Eficacia (HPLC)**

Estudiante

Katherine Michell De Frías Castro

Asesores

Luis F. Maldonado, Ph.D.

Ligia Elizabeth Luna Jarrín, M.Sc.

Honduras, octubre 2024

Autoridades

SERGIO ANDRÉS RODRÍGUEZ ROYO

Rector

ANA M. MAIER ACOSTA

Vicepresidenta y Decana Académica

ADELA M. ACOSTA MARCHETTI

Directora Departamento de Agroindustria Alimentaria

JULIO NAVARRO

Secretario General

Agradecimientos

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento al Ing. Jaime Zelaya por su apoyo durante la recolección de datos y su disposición para ayudarme en cada etapa de la investigación. Mi gratitud también se extiende a la Lic. Tatiana Degrandez por su colaboración significativa en el desarrollo de este trabajo.

Contenido

Agradecimientos	3
Índice de Cuadros.....	5
Índice de Figuras	6
Índice de Anexos	7
Resumen	8
Abstract.....	9
Introducción.....	10
Materiales y Métodos	14
Localización del Estudio	14
Materiales	14
Otros Insumos.....	14
Equipos.....	14
Metodología.....	15
Diseño Experimental	15
Desarrollo.....	16
Fase I. Descripción, Características del Método y Preparación de Materiales.....	17
Fase II. Definición y Selección de Parámetros	18
Resultados y Discusión.....	22
Conclusiones	30
Recomendaciones.....	31
Referencias.....	32
Anexos.....	35

Índice de Cuadros

Cuadro 1	Esquema Experimental para el Análisis de Repetibilidad en la Medición de Cafeína por HPLC.	16
Cuadro 2	Esquema Experimental para el Análisis Global de Precisión Intermedia en la Medición de Cafeína.	16
Cuadro 3	Parámetros de Ajuste Lineal de Curva de Calibración de Cafeína	23
Cuadro 4	Resultados del ANDEVA para la Detección y Cuantificación de Cafeína en la Bebida n°1.	24
Cuadro 5	Resultados del ANDEVA para la Detección y Cuantificación de Cafeína en la Bebida n°2.	25
Cuadro 6	Resultados del ANDEVA para la Detección y Cuantificación de Cafeína en la Bebida n°3.	25
Cuadro 7	Determinación del Límite de Detección según la Curva de Calibrado.....	26
Cuadro 8	Determinación del Límite de Cuantificación según la Curva de Calibrado.	27
Cuadro 9	Prueba de T-student de los Tiempos de Retención entre el Estándar de Cafeína y Cafeína en las bebidas.....	28
Cuadro 10	Análisis Estadístico de los Factores Evaluados en la Validación del Método.	29

Índice de Figuras

Figura 1 Curva Estándar de Cafeína	22
--	----

Índice de Anexos

Anexo A Cromatograma de Cafeína de la Muestra Estándar.	35
Anexo B Cromatograma de Cafeína de la Bebida n°1.....	36
Anexo C Cromatograma de Cafeína de la Bebida n°2.....	37
Anexo D Cromatograma de Cafeína de la Bebida n°3.	38
Anexo E Áreas de la Curva de Calibración.	39

Resumen

La cafeína es un alcaloide natural presente en diversas plantas, la cual es ampliamente consumida por sus propiedades estimulantes. El objetivo del presente estudio fue validar un método analítico para identificar y cuantificar cafeína en bebidas energéticas mediante Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC). Para ello, se utilizó agua desionizada y metanol con ácido fosfórico al 0.1% (50:50) como fase móvil, una columna C18 como fase estacionaria y un detector DAD. Se evaluaron parámetros como linealidad, repetibilidad, precisión intermedia, límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ). Para determinar la repetibilidad y precisión intermedia se analizaron 3 bebidas con la participación de tres analistas. El diseño experimental consistió en parcelas divididas, dividido en tres parcelas (analistas), con tres subparcelas por analista (bebidas) y con 7 repeticiones de cada subparcela. Los resultados demostraron que el método es preciso y confiable, con una linealidad > 0.999 en el rango de 5 a 100 $\mu\text{g/mL}$. La cuantificación de cafeína fue similar entre los tres analistas, evidenciando alta precisión intermedia, con un coeficiente de variación (CV) inferior al 5%, lo que también indica buena repetibilidad. Los límites de detección y cuantificación fueron de 1.59 y 5.33 $\mu\text{g/mL}$ (ppm), respectivamente, confirmando la sensibilidad del método para cuantificar cafeína en concentraciones bajas. Se recomienda determinar la reproducibilidad del método para la cuantificación de cafeína en bebidas energéticas.

Palabras clave: Límite de cuantificación, límite de detección, linealidad, precisión intermedia, repetibilidad.

Abstract

Caffeine is a natural alkaloid present in various plants, which is widely consumed for its stimulant properties. The aim of the present study was to validate an analytical method to identify and quantify caffeine in energy drinks using High Performance Liquid Chromatography (HPLC). For this purpose, deionized water and methanol with 0.1% phosphoric acid (50:50) were used as mobile phase, a C18 column as stationary phase and a DAD detector. Parameters such as linearity, repeatability, intermediate precision, limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) were evaluated. To determine the repeatability and intermediate precision, 3 drinks were analyzed with the participation of three analysts. The experimental design consisted of split plots, divided into three plots (analysts), with three subplots per analyst (drinks) and with seven repetitions of each subplot. The results demonstrated that the method is accurate and reliable, with a linearity > 0.999 in the range of 5 to 100 $\mu\text{g/mL}$. Caffeine quantification was similar among the three analysts, showing high intermediate precision, with a coefficient of variation (CV) less than 5%, which also indicates good repeatability. The detection and quantification limits were 1.59 and 5.33 $\mu\text{g/mL}$ (ppm), respectively, confirming the sensitivity of the method to quantify caffeine at low concentrations. It is recommended to determine the reproducibility of the method for the quantification of caffeine in energy drinks.

Keywords: detection limit, intermediate precision, linearity, quantification limit, repeatability.

Introducción

La cafeína es un alcaloide natural perteneciente al grupo de las xantinas, ampliamente consumido a nivel mundial por sus efectos estimulantes sobre el sistema nervioso central. Este compuesto se encuentra de forma natural en más de 60 especies de plantas, incluidas el café (*Coffea arabica*), el té (*Camellia sinensis*), el cacao (*Theobroma cacao*), el guaraná (*Paullinia cupana*), y la nuez de cola (*Cola acuminata*) (Pardo Lozano et al., 2007). Además de su presencia en estas fuentes naturales, la cafeína también está presente en una amplia gama de productos procesados, tales como bebidas carbonatadas y energizantes, convirtiéndola así en un ingrediente común en la dieta moderna (Melgarejo, 2004).

A nivel químico, la cafeína (1,3,7-trimetilxantina) es un compuesto de bajo peso molecular con propiedades lipofílicas, lo que le permite atravesar rápidamente las membranas celulares, incluyendo la barrera hematoencefálica, generando efectos casi inmediatos tras su consumo. (Manrique et al., 2018) afirman que actúa principalmente como antagonista de los receptores de adenosina en el cerebro, lo que reduce la sensación de fatiga y promueve un estado de vigilia. Debido a estas propiedades, la cafeína se ha convertido en uno de los estimulantes más consumidos a nivel global.

El contenido de cafeína varía considerablemente dependiendo de la fuente, con concentraciones particularmente altas en productos como el café, el té y las bebidas energéticas (Naveen et al., 2018). Las bebidas energéticas, se han convertido en una opción popular para muchas personas que buscan un impulso rápido de energía y alerta. Son bebidas no alcohólicas, a menudo carbonatadas, estas suelen combinar la cafeína con otros ingredientes como la taurina, vitaminas del grupo B, guaraná y extractos de plantas, lo que las convierte en matrices químicamente complejas y, por tanto, en un reto para la determinación precisa de sus componentes (Coura et al., 2021).

La cafeína, un ingrediente clave, actúa como un estimulante del sistema nervioso central, aumentando la vigilancia y reduciendo la fatiga (Ferre et al., 1991). El consumo de estas bebidas ha

generado un creciente interés tanto en el ámbito científico como en el público en general, especialmente en lo que respecta a su contenido de cafeína y sus posibles efectos en la salud.

En los últimos años, el consumo de bebidas energéticas ha crecido de manera exponencial en América Latina, generando preocupaciones sobre sus efectos en la salud, especialmente entre los jóvenes. Diversos estudios han señalado que estas bebidas pueden provocar problemas cardiovasculares, trastornos del sueño y dependencia (Osada Liy et al., 2008). En respuesta a estos riesgos, varios países latinoamericanos han comenzado a implementar regulaciones. Por ejemplo, en México, la Secretaría de Salud ha emitido recomendaciones para limitar la venta de bebidas energéticas a menores, y en algunas ciudades se han establecido restricciones en su comercialización (Secretaria de la salud, 2012). En Perú, se han propuesto iniciativas legislativas para prohibir la venta de estas bebidas a menores de edad, argumentando que su consumo excesivo puede afectar el desarrollo físico y mental de los adolescentes (Domínguez Yucra, 2021). Asimismo, en Argentina, varias provincias han discutido la necesidad de regular su distribución en escuelas, citando estudios que vinculan el consumo de estas bebidas con un aumento en la incidencia de problemas de salud (Maidana Petersen et al., 2011). Debido a su amplia expansión a nivel global, varios países han implementado regulaciones sobre el consumo de estas bebidas.

En este contexto, el Congreso Nacional de Honduras aprobó una ley que prohíbe la venta de bebidas energéticas a menores de 18 años. Esta normativa, sancionada el 6 de junio del presente año, tiene como finalidad proteger la vida y la salud de los menores en el país.

La validación se define, como el conjunto de procesos desarrollados para asegurar el cumplimiento de los requisitos para el uso específico de métodos analíticos mediante examen y confirmación obteniendo evidencia objetiva (Falcón et al., 2015).

La validación de métodos analíticos para la determinación precisa y confiable de cafeína en bebidas energéticas se convierte en un aspecto crucial. La cromatografía líquida, en particular, ha demostrado ser una técnica eficaz y ampliamente utilizada para este propósito, ofreciendo una alta

sensibilidad y selectividad en la separación e identificación de compuestos específicos en una muestra (Saito et al., 2007).

La cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) se ha consolidado como una herramienta analítica preferida por numerosos investigadores para la cuantificación de cafeína en diversas matrices alimentarias, debido a su versatilidad, exactitud y precisión. No obstante, esta técnica implica un costo considerable y requiere capacitación especializada para su correcta implementación. El HPLC permite realizar tanto análisis cualitativos (identificación de la cafeína) como análisis cuantitativos mediante la integración de las áreas bajo las curvas de los picos cromatográficos. Para llevar a cabo un análisis cuantitativo preciso, es esencial preparar curvas de calibración, lo que a su vez requiere el uso de estándares externos (Fuentes López et al., 2018).

La cuantificación de la cafeína en las bebidas energéticas es esencial no solo para identificar su presencia, sino también para asegurar que se mantenga dentro de los límites máximos permitidos. Según la Administración de Alimentos y Medicamentos de EE. UU. (FDA) y la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), un consumo de hasta 400 mg de cafeína al día es generalmente seguro para la mayoría de los adultos, mientras que para mujeres embarazadas se recomienda no exceder los 200 mg diarios (Domínguez Yucra, 2022). Exceder estos límites puede tener efectos adversos en la salud, como insomnio, nerviosismo y problemas cardiovasculares. Por lo tanto, esta técnica no solo contribuye a un mejor entendimiento de los componentes químicos en estas bebidas, sino que también juega un papel crucial en la promoción de la salud pública al ayudar a prevenir el consumo excesivo de cafeína. Al establecer métodos analíticos robustos, se facilita la investigación sobre los efectos de estas sustancias en la salud pública, lo que es crucial para la formulación de políticas y regulaciones adecuadas (Browne et al., 2019).

Dentro del marco del Sistema de Gestión de Calidad implementado en el Laboratorio de Análisis de Alimentos Zamorano (LAAZ), y siguiendo la norma ISO 17025:2017, se pretende validar un método para la cuantificación de cafeína utilizando cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC). Esta

norma establece los criterios que deben cumplir los laboratorios de ensayo y calibración para garantizar la calidad de sus procesos, asegurando que son técnicamente competentes y capaces de producir resultados válidos (Masharipov et al.).

La aprobación de métodos analíticos es esencial para los laboratorios, ya que les permite demostrar la competencia técnica y la fiabilidad de sus resultados. Al validar sus métodos, un laboratorio puede asegurar que sus procedimientos cumplen con los requisitos específicos de calidad y precisión, lo que es crucial para mantener la confianza de los clientes y cumplir con las regulaciones del sector (Taverniers et al., 2004). La norma ISO 17025 proporciona un marco que no solo respalda la calidad de los resultados, sino que también mejora la eficiencia operativa al identificar áreas de mejora en los procesos. En un mercado cada vez más competitivo, la validación se convierte en una ventaja estratégica que permite a los laboratorios diferenciarse y ofrecer servicios de alta calidad, lo que puede traducirse en una mayor satisfacción del cliente y oportunidades de negocio más amplias.

De este modo, proporciona una base sólida para futuros estudios sobre la cafeína y otras sustancias presentes en las bebidas energéticas, con el fin de promover un consumo informado y responsable de estos productos.

Este estudio tiene como objetivos evaluar la linealidad del método cromatográfico líquido para la cuantificación precisa y confiable de diferentes concentraciones de cafeína en bebidas energéticas. Además, analizar la repetibilidad analítica y la precisión intermedia en la cuantificación de cafeína en tres marcas distintas de estas bebidas. Por último, se establecieron los límites de detección y cuantificación del método de cromatografía líquida, en función de la curva de calibración.

Materiales y Métodos

Localización del Estudio

El estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Análisis de Alimentos Zamorano (LAAZ), de la Escuela Agrícola Panamericana Zamorano, ubicada en el Valle del Yegüare, km 30 carretera de Tegucigalpa a Danlí, departamento de Francisco Morazán, Honduras, C.A.

Materiales

Bebidas carbonatadas

Reactivos y solventes

Agua desionizada

Solución estándar de cafeína preparada a 120 partes por millón (ppm)

Solución de Agua desionizada con metanol (CH₃OH) al 10%

Agua desionizada con 0.1% ácido fosfórico (H₃PO₄)

Metanol (CH₃OH) grado HPLC con 0.1% ácido fosfórico (H₃PO₄)

Otros Insumos

Filtros de acrodiscos 0.2 µm (Nylon)

Vial ámbar de 2 mL HPLC

Jeringa 3-5 mL

Tubos de centrifugación de 50 mL.

Pipeta graduada 1 mL

Beaker de 250 mL

Gafas de plásticos

Guantes de nitrilo

Equipos

Plancha y agitador magnético.

Balanza analítica.

Centrífuga VWR®.

Cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC) Agilent Technologies, con los siguientes módulos:

Desgasificador. Modelo: G1379A. 1100 Series.

Bomba cuaternaria. Modelo: G1311A. 1100 Series.

Inyector automático. Modelo: G1329A. 1100 Series.

Columna analítica. Zorbax Eclipse Plus XDB-C18 4.6 x 150 mm, 5 µm.

Detector de arreglo de Diodos, DAD. Modelo: G1315B. 1100 Series.

Metodología

La validación se llevó a cabo mediante una serie de pruebas estandarizadas y experimentales, conforme a lo indicado en la Guía de Armonización de la Conferencia Internacional (ICH, 2023). El cumplimiento de estos criterios fue necesario para asegurar que el método analítico es adecuado para el objetivo establecido.

Diseño Experimental

Para evaluar la repetibilidad, se utilizó un diseño completamente al azar (DCA) para el análisis estadístico, considerando tres bebidas energéticas, un analista y siete repeticiones por cada analista, lo que resultó en un total de 21 unidades experimentales. Para cada bebida evaluada, se aplicó un ANDEVA con un nivel de significancia del 95% ($P \leq 0.05$) y se utilizó la prueba de Duncan para determinar diferencias significativas. En el Cuadro 1 se incluye el esquema experimental para el análisis de repetibilidad en la medición de cafeína por HPLC.

Cuadro 1

Esquema Experimental para el Análisis de Repetibilidad en la Medición de Cafeína por HPLC.

Analista	Bebidas	Repetición
1	1	7
	2	7
	3	7
Total		21 unidades experimentales

Además, se realizó un T-test pareado para comparar los tiempos de retención entre las bebidas y el estándar de cafeína.

Finalmente, para evaluar la precisión intermedia se implementó un diseño de parcelas divididas, donde la parcela correspondió al analista y la subparcela a la bebida. Este diseño consideró tres analistas, tres bebidas y siete repeticiones, sumando un total de 63 unidades experimentales en el análisis. Este enfoque permitió evaluar la interacción entre los analistas y las diferentes bebidas de manera global (Cuadro 2).

Cuadro 2

Esquema Experimental para el Análisis Global de Precisión Intermedia en la Medición de Cafeína.

Analista	Bebidas	Repetición
1	1	7
	2	7
	3	7
2	1	7
	2	7
	3	7
3	1	7
	2	7
	3	7
Total		63 unidades experimentales

Desarrollo

Las fases para llevar a cabo una validación de un método analítico suelen incluir:

Definición y selección de parámetros.

Desarrollo del protocolo.

Ejecución de pruebas.

Análisis e interpretación de resultados

Documentación y revisión

(ICH, 2005/4)

Fase I. Descripción, Características del Método y Preparación de Materiales.

Preparación de Soluciones Utilizadas.

Solución de metanol al 10%: Para preparar la solución de metanol al 10%, se midió 100 mL de metanol utilizando un cilindro graduado y se transfirió a una botella para HPLC. Luego, se agregó agua desionizada y filtrada cinco veces, hasta alcanzar un volumen total de 1 litro. Se realizó una mezcla manual para asegurar una homogeneización adecuada.

Solución de metanol al 0.1% de ácido fosfórico: En la preparación de una solución de metanol con 0.1% de ácido fosfórico, primero se midieron 100 mL de metanol y se colocó en un vaso de precipitados. Se calculó el volumen necesario de ácido fosfórico concentrado, que resultó ser aproximadamente 1 mL para un litro de solución. Este volumen se añadió lentamente al metanol, agitando suavemente la mezcla para facilitar la disolución del ácido. Posteriormente, se completó la solución con metanol hasta aforar a 1 litro.

Solución de agua filtrada al 0.1% de ácido fosfórico: Para preparar agua filtrada con 0.1% de ácido fosfórico, se midió 1 mL de ácido fosfórico concentrado y se agregó a 999 mL de agua desionizada y filtrada, en un vaso de precipitados. Se agitó la mezcla para asegurar que el ácido se disolviera completamente en el agua. Esta solución se almacenó en una botella de HPLC de 1 litro.

Preparación del estándar: En primer lugar, se pesaron 9 mg de cafeína (Cafeína \geq 99.0 %, C0750, Sigma-Aldrich, EE. UU.) y disolvieron en 75 mL de una solución de metanol grado HPLC diluido al 10%, creando así una solución madre de 120 ppm. Luego, se preparó una curva estándar con

concentraciones de 5, 10, 20, 40, 60, 80 y 100 ppm ($\mu\text{g}/\text{mL}$), utilizando la solución madre como base. Es crucial homogeneizar cada solución estándar mediante el uso de un vortex durante unos 15 segundos antes de su preparación. Finalmente, se filtraron las soluciones con acrodiscos y se colocan en viales ámbar de 2 mL HPLC.

Preparación de las muestras de extracto acuoso: Antes de la preparación de las muestras, se colocaron 100 mL de cada bebida en un beaker de 250 mL. Las muestras se agitaron durante 10 minutos en un agitador magnético para eliminar el CO_2 presente, lo cual fue esencial para evitar interferencias en la medición del volumen. Luego, se midió un mililitro de las bebidas carbonatadas o energéticas y se transfirió a tubos cónicos de centrifugación de 50 mL, agregando 24 mL de una solución de metanol al 10%. La mezcla se homogeneizó utilizando un vortex durante 15 segundos y se centrifugó a 3500 rpm durante 10 minutos. Posteriormente, el sobrenadante se filtró mediante acrodiscos de Nylon de 0.2 μm . El filtrado obtenido se depositó en viales de 2 mL para su posterior análisis mediante HPLC, utilizando una columna analítica Zorbax Eclipse Plus XDB-C18 (4.6 x 150 mm, 5 μm). La fase estacionaria se mantuvo a temperatura ambiente para asegurar la correcta separación.

Preparación de la fase móvil: La fase móvil consistió en eluyentes A y B; donde el eluyente A fue agua desionizada con un 0.1% de ácido fosfórico, y el eluyente B fue metanol también con un 0.1% de ácido fosfórico. La mezcla de ambos eluyentes se preparó en proporciones iguales, es decir, 50% de eluyente A y 50% de eluyente B (isocrática). La detección se llevó a cabo utilizando un detector DAD ajustado a una longitud de onda de 272 nm. El flujo del sistema se mantuvo constante a 0.35 mL/min, con un tiempo total de corrida de 5 minutos. Se inyectó un volumen de 10 μL y la temperatura se mantuvo en un nivel ambiente durante todo el proceso.

Fase II. Definición y Selección de Parámetros

La validación se llevó a cabo mediante pruebas normalizadas y experimentales, conforme a las directrices de la Guía de Armonización de la Conferencia Internacional (ICH Q2) (Baber, 1994), y se obtuvieron datos para la determinación de los parámetros como: linealidad, repetibilidad, precisión

intermedia, límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ). Esto se realizó para comprobar que el método analítico es adecuado para su propósito y que si proporciona resultados confiables.

Linealidad: La linealidad se definió como la capacidad del método para obtener resultados que son directamente proporcionales a la concentración de cafeína en un rango específico. Para determinar la linealidad, se preparó una solución estándar de cafeína en diversas concentraciones. Las respuestas, medidas en términos de área bajo la curva de cada pico de cafeína identificado; se graficaron frente a las concentraciones, y se determinó la ecuación de regresión lineal. La correlación se evaluó utilizando el coeficiente de determinación (R^2) para confirmar la linealidad en el rango estudiado (Harpaz et al., 2017).

Repetibilidad: La repetibilidad se evaluó mediante la realización de múltiples mediciones de las muestras de cada bebida energética en condiciones idénticas y por un mismo analista. Se llevaron a cabo siete (7) repeticiones para cada bebida, asegurando que se mantuvieran constantes tanto el procedimiento como las condiciones experimentales. Los datos obtenidos se analizaron utilizando el coeficiente de variación (CV), que es una medida estadística que expresa la dispersión de los resultados en relación con la media. Un CV bajo indica que las mediciones son consistentes y que el método es capaz de proporcionar resultados confiables en condiciones repetidas. Esta evaluación de la repetibilidad es crucial para validar la precisión del método HPLC, ya que garantiza que las variaciones observadas en los resultados no se deban a fluctuaciones aleatorias, sino a la estabilidad del procedimiento analítico utilizado. Se estableció un valor máximo de 5% de CV como criterio de una repetibilidad adecuada. Además, se compararon las medias de concentraciones de cafeína obtenidas por cada analista a través de un diseño completamente al azar. Se realizó un ANDEVA con un nivel de significancia del 95% ($P \leq 0.05$), además de una prueba de Duncan para identificar diferencias significativas entre las medias de las repeticiones de cada analista.

Precisión Intermedia: La precisión se refiere al grado de concordancia entre los resultados obtenidos en condiciones repetidas dentro de un mismo espacio (Maroto et al., 2001). Para evaluar

la precisión intermedia, las muestras de cada bebida energética se prepararon con tres analistas diferentes, cada uno realizando siete repeticiones de la bebida en las mismas condiciones, dando un total de 21 repeticiones por cada bebida. Con los datos obtenidos se hizo un ANDEVA con un nivel de significancia del 95% ($P \leq 0.05$), además de una prueba de Duncan para identificar diferencias significativas entre las medias de las repeticiones de cada analista. Este enfoque estadístico no solo permite determinar si existe variabilidad significativa en los resultados, sino que también proporciona un análisis detallado de la consistencia del método en manos de diferentes analistas. Al obtener intervalos de confianza y comparaciones múltiples, se asegura que cualquier discrepancia observada en la cuantificación de cafeína pueda ser atribuida a factores controlables, lo que refuerza la validez del método analítico aplicado en el estudio.

Límite de detección (LOD): El límite de detección (LOD) se estableció utilizando la curva de calibración generada a partir de las mediciones de soluciones estándar de cafeína en diversas concentraciones. La Ecuación 1 muestra la recta de calibrado, que define una representación gráfica entre la variable independiente y una variable dependiente.

$$y = mx + b \quad [1]$$

Donde:

y = Valor predicho de la variable dependiente.

m = Pendiente de la recta, que indica la tasa de cambio de y con respecto a x .

x = Valor de la variable independiente.

b = Intersección en el eje y , que es el valor de y cuando $x = 0$.

Al medir las respuestas del detector para cada concentración, se obtuvo una relación lineal que permitió calcular el límite de detección (LOD).

A partir de la curva se determinó:

Ordenada en el origen de la línea de regresión: Y_B

Desviación estándar de la regresión que se calculó a partir de la Ecuación 2.

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum i(y_i - \hat{y}_i)^2}{n - 2}} \quad [2]$$

Donde:

y_i = Valor observado del punto en la ordenada

\hat{y}_i = Valor teórico del punto obtenido por la predicción del modelo de regresión

n = Número de puntos de la curva de calibración ($n \geq 4$)

La señal del Límite de Detección (LOD), se calculó a partir de la Ecuación 3.

$$Y_{LD} = Y_B + 3S_{y/x} \quad [3]$$

Donde:

Y_{LD} = Señal mínima detectable

Y_B = Ordenada en el origen

$S_{y/x}$ = Desviación estándar de la recta de calibrado

Límite de cuantificación (LOQ): El límite de cuantificación (LOQ) se define como la menor concentración de cafeína que puede ser cuantificada con precisión y exactitud aceptables. El límite de cuantificación del método se determinó siguiendo el mismo procedimiento que el usado para el límite de detección, pero finalmente en las expresiones respectivas, el factor 3 en la Ecuación 3, se sustituye por el factor de 10 en la Ecuación 4.

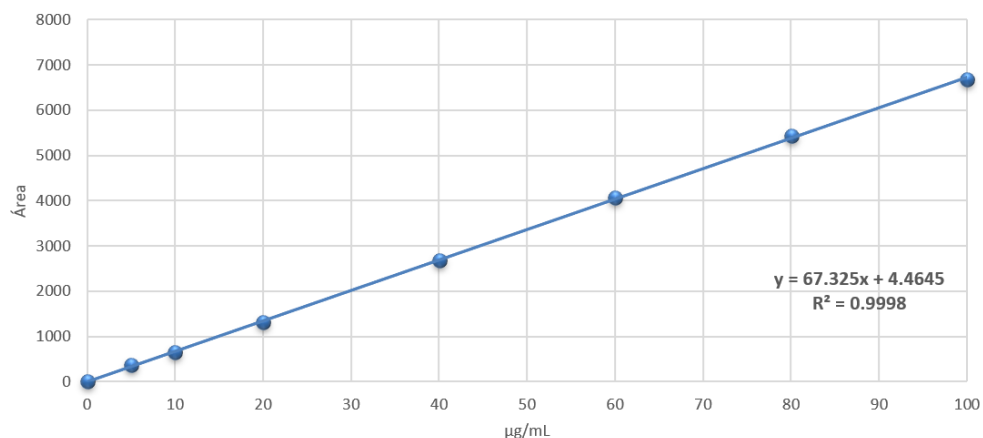
$$Y_{LQ} = Y_B + 10S_{y/x} \quad [4]$$

Resultados y Discusión

Los estándares de cafeína presentaron un tiempo de retención de 1.396 minutos, como se ilustra en el Anexo 1, donde se observan los cromatogramas de los estándares preparados de concentraciones de 5, 10, 20, 40, 60, 80 y 100 $\mu\text{g/mL}$, los cuales a mayor concentración presentan una mayor área de pico. Así, se presentó una correlación lineal entre la concentración (5 a 100 $\mu\text{g/mL}$) y el área de pico obteniendo un coeficiente de determinación (R^2) igual a 0.9998, lo que se observa en la Figura 1.

Figura 1

Curva Estándar de Cafeína



El Cuadro 3, ilustra los parámetros de calidad evaluados a partir de la curva de calibración. En este sentido, se ha demostrado una sensibilidad de 67.325. El rango lineal de 5 a 100 $\mu\text{g/mL}$ muestra una buena linealidad que corresponde a un R^2 de 0.9998. Un coeficiente de determinación mayor a 0.99 asegura que los datos experimentales se ajustan casi perfectamente a la línea de calibración, lo que minimiza el error en la cuantificación y garantiza que los resultados obtenidos sean precisos y reproducibles (González-Pérez y Cantillo, 2006).

Cuadro 3*Parámetros de Ajuste Lineal de Curva de Calibración de Cafeína.*

Parámetros	Valor
Pendiente	67.33 ± 0.36
Intercepto	4.46 ± 19.13
Rango lineal (µg/mL)	5 - 100
Coefficiente de determinación (R ²)	0.9998

Nota. µg: miligramos. mL: mililitros. R²: medida estadística que indica la proporción de la variación en la variable dependiente que puede ser explicada por la variable independiente en un modelo de regresión.

Los resultados obtenidos para el parámetro de linealidad, derivados de la curva estándar de calibración, indican una relación directa y consistente entre las concentraciones del analito y las respuestas medidas. Esta linealidad confirma la eficacia del método analítico empleado, lo que refuerza la validez y confiabilidad de los datos obtenidos en este estudio.

Los resultados del ANDEVA presentados en el Cuadro 4, 5 y 6 permitieron evaluar los parámetros de precisión intermedia y repetibilidad, lo que facilitó la identificación de variaciones en los resultados obtenidos por cada analista. No se encontró diferencia significativa entre los Analistas, lo cual indica que estos presentaron una alta repetibilidad (CV < 5%) y una precisión intermedia aceptable (P > 0.05). Con estos resultados se aseguró que las mediciones de cafeína fueron fiables y reproducibles.

Cuadro 4

Resultados del ANDEVA para la Detección y Cuantificación de Cafeína en la Bebida n°1.

Bebida n°1 (mg/100 mL)			
Repeticiones	Analista 1	Analista 2	Analista 3
1	24.56	25.09	24.94
2	24.22	23.68	24.72
3	24.46	24.44	24.49
4	25.38	23.87	*
5	24.94	24.29	24.58
6	24.42	24.15	24.94
7	*	24.08	24.57
C.V %	1.72	1.88	0.78
C.V% global	1.56		
Probabilidad	0.0691		

Nota. *Dato atípico por prueba de Grubbs. %C.V.: Coeficiente de Variación. Probabilidad: $P > 0.05$ indica que no hay diferencias significativas entre analistas.

Los resultados del análisis de varianza (ANDEVA) en el Cuadro 3, indican que no hay diferencias estadísticamente significativas en las concentraciones de cafeína de la Bebida n°1 medidas por los tres analistas, además de que existe una alta precisión intermedia, lo que sugiere que el método de HPLC utilizado es consistente y confiable. A pesar de las variaciones en las mediciones individuales, el bajo coeficiente de variación global de 1.56% refleja una buena repetibilidad en los resultados por cada analista en la bebida. Esto implica que las diferencias observadas en las concentraciones pueden atribuirse a variaciones aleatorias en lugar de a errores sistemáticos en la técnica de análisis. La repetibilidad es especialmente importante en la cuantificación de compuestos como la cafeína, ya que garantiza que el método es confiable y que los valores obtenidos en mediciones sucesivas son estables y precisos (Portuondo Paisan y Portuondo Moret, 2010).

Cuadro 5

Resultados del ANDEVA para la Detección y Cuantificación de Cafeína en la Bebida n°2.

Bebida n°2 (mg/100 mL)			
Repeticiones	Analista 1	Analista 2	Analista 3
1	28.23	29.03	30.32
2	29.06	29.82	28.44
3	29.50	27.26	28.29
4	28.49	27.50	28.20
5	29.30	28.88	26.84
6	29.00	30.14	29.14
7	28.02	27.37	28.02
C.V %	1.94	4.19	3.75
C.V% global	3.43		
Pr>F	0.8097		

Nota. %C.V.: Coeficiente de Variación. Probabilidad: $P > 0.05$ indica que no hay diferencias significativas entre analistas.

Al igual que el Cuadro 4, en el Cuadro 5 no se observan diferencias significativas en las concentraciones de cafeína entre los tres analistas, con un coeficiente de variación (CV) global de 3.43% y un valor de Pr>F de 0.8097. Esto indica que, el método es consistente y confiable para la medición de cafeína en la bebida energética en la Bebida n°2.

Cuadro 6

Resultados del ANDEVA para la Detección y Cuantificación de Cafeína en la Bebida n°3.

Bebida n°3 (mg/100 mL)			
Repeticiones	Analista 1	Analista 2	Analista 3
1	29.51	29.47	27.90
2	29.36	28.54	28.58
3	29.2	28.28	29.48
4	29.25	29.82	29.77
5	28.72	29.35	29.11
6	28.31	28.79	28.56
7	29.08	29.07	29.12
C.V %	1.42	1.88	2.18
C.V% global	1.85		
Pr>F	0.8860		

Nota. %C.V.: Coeficiente de Variación. Probabilidad: $P > 0.05$ indica que no hay diferencias significativas entre analistas.

En el análisis de las concentraciones de la bebida n°3 (mg/100mL), se observaron promedios cercanos: 29.16 mg/100mL para el Analista 1, 28.94 mg/100mL para el Analista 2 y 28.76 mg/100mL

para el Analista 3. Los coeficientes de variación (CV) fueron de 1.42%, 1.88% y 2.18%, respectivamente, indicando una variabilidad baja en las mediciones, siendo el Analista 3 el que mostró mayor dispersión. A pesar de estas diferencias en los promedios y la variabilidad, el valor de $Pr>F$ fue de 0.8860, lo que sugiere que no hay diferencias significativas entre los resultados de los analistas. Esto implica que, a pesar de las variaciones observadas, las mediciones son consistentes y confiables, respaldando la validez de los resultados obtenidos en este estudio.

El Cuadro 7 presenta los resultados del Límite de Detección (LOD) para la cafeína, donde se usó la ecuación de la recta de calibrado indicando una buena sensibilidad y consistencia en las mediciones. Se obtuvo un LOD de 1.59 ppm, lo que indica que el método es capaz de detectar la cafeína en concentraciones relativamente bajas de manera efectiva. Un LOD bajo es esencial, ya que permite identificar y medir concentraciones que podrían ser relevantes para la seguridad y eficacia de los productos consumidos.

Cuadro 7

Determinación del Límite de Detección según la Curva de Calibrado.

Límite de detección (LOD)	
Ecuación de la recta de calibrado	$y = 67.325x + 4.4645$
Desviación estándar de la recta de calibrado	$S_{y/x} = 35.86$
Señal de detección	$Y_{LD} = 4.4645 + 3(35.86) = 112.04$
Sustitución en la ecuación de la recta de calibrado.	$112.04 - 4.4645 = 67.325x$ $x = 1.59 \text{ ppm}$

Nota. ppm.: partes por millón.

El Cuadro 8 muestra el resultado del límite de cuantificación (LOQ) para cafeína. En este caso se obtuvo un valor aproximado de 5.33 ppm según la ecuación de la recta de calibrado. Este valor indica que cualquier concentración de cafeína igual o superior a este, puede ser medida con precisión y exactitud, permitiendo así obtener resultados significativos en estudios analíticos. Por debajo de este límite, los resultados pueden no ser confiables o pueden estar sujetos a un alto grado de incertidumbre.

Cuadro 8

Determinación del Límite de Cuantificación según la Curva de Calibrado.

Límite de cuantificación (LOQ)	
Ecuación de la recta de calibrado	$y = 67.325x + 4.4645$
Desviación estándar de la recta de calibrado	$S_{y/x} = 35.86$
Señal de detección	$Y_{LD} = 4.4645 + 10 (35.86) = 363.06$
Sustitución en la ecuación de la recta de calibrado.	$363.06 - 4.4645 = 67.325x$ $x = 5.33 \text{ ppm}$

Nota. ppm.: partes por millón.

Si el LOQ es demasiado alto, pueden pasarse por altas concentraciones relevantes, lo que podría afectar las decisiones regulatorias y de calidad (Quino et al., 2007).

Los resultados de la prueba T-student pareada en el Cuadro 9, indican que no hubo diferencias significativas entre los tiempos de retención de la cafeína de un estándar y la cafeína extraída de las bebidas energéticas. La diferencia de las medias fue de 0.0014 minutos u 84 milisegundos. Además, la prueba de igualdad de varianzas mostró un valor-p de 0.5292, lo que refuerza la conclusión que no hubo diferencia entre los tiempos de retención, apoyando así la validez de los resultados obtenidos.

Cuadro 9

Prueba de T-student de los Tiempos de Retención entre el Estándar de Cafeína y Cafeína en las bebidas.

Tiempos de retención de cafeína (estándar/ bebidas)		
Repeticiones	Estándar (min)	Bebidas (min)
1	1.407	1.384
2	1.388	1.386
3	1.380	1.389
4	1.386	1.392
5	1.389	1.387
6	1.382	1.392
7	1.408	1.392
8	1.386	1.401
9	1.396	1.398
10	1.397	1.392
11	1.395	1.400
12	1.399	1.407
13	1.399	1.398
14	1.394	1.397
15	1.406	1.404
16	1.408	1.400
17	1.398	1.408
18	1.400	1.405
19	1.399	1.401
20	1.392	1.401
21	1.400	1.405
Promedio	1.396	1.397
Desviación estándar	0.008	0.007
CV (%)	0.590	0.511
DM (min)		0.0014
Pr>F		0.5292

Nota. CV (%) = coeficiente de variación. DM = diferencia entre las medias de los tiempos de retención. min = minutos. Pr>F bajo

(generalmente menor a 0.05) sugiere que hay diferencias significativas.

El Cuadro 10 muestra los resultados de una prueba de parcelas divididas, el análisis de varianza (ANDEVA) indica que el factor "bebida" tuvo un efecto significativo en la variable dependiente, con un valor P> menor a 0.0001. Esto indica que al menos una bebida presentó una concentración media de cafeína diferente a las demás. En contraste, el factor "analista" no mostró un efecto significativo, con un valor P> de 0.5296, lo que indica que los resultados obtenidos por un

analista no fueron diferentes a los obtenidos por los demás. Esto es un indicativo que se controló la incertidumbre de la preparación de la muestra, extracción y medición de la cafeína utilizando el método por HPLC, además que los analistas no tuvieron influencia en las diferencias de concentración de cafeína encontradas entre las bebidas. La interacción entre "analista" y "bebida" también resulta no significativa, con un valor $P >$ de 0.7739, lo que implica que la combinación de estos factores no afecta de manera notable la variable dependiente. Indicando así que el tipo de bebida es el principal determinante de las diferencias observadas en la variable dependiente.

Cuadro 10

Análisis Estadístico de los Factores Evaluados en la Validación del Método.

Factores	Valor $P >$ F
Analistas	0.5296
Bebidas	<.0001
Analistas*Bebidas	0.7739

Nota. $P >$ F bajo (generalmente menor a 0.05) sugiere que hay diferencias significativas.

Conclusiones

La evaluación de la linealidad del sistema cromatográfico demuestra que el método HPLC es capaz de cuantificar la cafeína en bebidas energéticas de manera precisa y confiable. Esto sugiere que la curva de calibración obtenida es adecuada para el análisis de cafeína, lo que permite obtener resultados consistentes en diferentes concentraciones.

La cuantificación de cafeína fue similar entre los tres analistas para las tres bebidas evaluadas, lo cual, demuestra una alta precisión intermedia del método. Asimismo, los resultados de cada analista presentaron un coeficiente de variación (CV) inferior al 5%, indicando una repetibilidad adecuada del método validado.

Los límites de detección y cuantificación determinados para el equipo HPLC fueron de 1.59 y 5.33 ppm, respectivamente; siendo estos fundamentales para garantizar que el método fue sensible y adecuado para la identificación y cuantificación de cafeína en concentraciones bajas.

Recomendaciones

Incluir controles de calidad internos para asegurar la precisión y confiabilidad de cada corrida analítica.

Realizar ensayos de recuperación con muestras fortificadas para evaluar la exactitud del método en diferentes tipos de bebidas energéticas.

Se sugiere evaluar la congruencia entre la cantidad de cafeína declarada en la etiqueta y los resultados obtenidos por HPLC. Además, sería útil investigar el impacto del consumo de estas concentraciones de cafeína en la salud, considerando variables como dosis recomendada, frecuencia de consumo y efectos en diferentes grupos de edad.

Realizar ensayos en diferentes días para establecer la reproducibilidad del método.

Verificar la robustez del método variando ligeramente las condiciones, como la temperatura y el pH de la fase móvil, para evaluar la consistencia de los resultados.

Analizar otras matrices de bebida que contengan cafeína, para identificar posibles interferencias y asegurar que el método continúe siendo el adecuado.

Se recomienda realizar un estudio de blancos para definir el LOD y LOQ a partir de la señal de fondo, asegurando una detección confiable sin depender únicamente de la curva de calibración.

Referencias

- Baber, N. (1994). International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use (ICH). *British Journal of Clinical Pharmacology*, 37(5), 401–404. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.1994.tb05705.x>
- Browne, J., Coffey, B., Cook, K., Meiklejohn, S. y Palermo, C. (2019). A guide to policy analysis as a research method. *Health Promotion International*, 34(5), 1032–1044. <https://doi.org/10.1093/heapro/day052>
- Coura, J., Silva, C., Silva, E., Valladão, S. y Duarte, M. (2021). Development and validation of a fast and simple hplc-uv method to determine caffeine in guarana (Paullinia Cupana) food supplements. *Química Nova*. Publicación en línea avanzada. <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170774>
- Domínguez Yucra, P. (2021). *Cumplimiento de límites establecidos y declaración de información de aditivos alimentarios en el etiquetado nutricional de bebidas energizantes expendidas en supermercados de Lima Metropolitana: Tesis para optar el título profesional de Licenciada en Nutrición Humana* [Tesis]. Universidad Norbert Wiener, Perú. https://repositorio.uwiener.edu.pe/bitstream/handle/20.500.13053/8271/T061_42442850_T.pdf?sequence=1&isAllowed=y#:~:text=Para%20la%20variable%20de%20cumplimiento,%3B%20para%20taurina%20fueron%3A%20%E2%80%9C%ADmite
- Domínguez Yucra, P. (2022). *Cumplimiento de Límites Establecidos y Declaración de Información de Aditivos Alimentarios en el Etiquetado Nutricional de Bebidas Energizantes Expendidas en Supermercados de Lima Metropolitana, 2022* [, Universidad Privada Norbert Wiener; PE]. repositorio.uwiener.edu.pe. <https://repositorio.uwiener.edu.pe/handle/20.500.13053/8271>
- Falcón, D., Lozano, O., García, L. y García, E. (2015). Validación de un método cromatográfico para la determinación de cafeína en muestras acuosas de la Industria Farmacéutica. *Revista Cubana De Farmacia*, 49(2), 219–231. <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?idarticulo=64734>
- Ferre, S., Euler, G. von, Johansson, B., Fredholm, B. B. y Fuxe, K. (1991). Stimulation of high-affinity adenosine A2 receptors decreases the affinity of dopamine D2 receptors in rat striatal membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(16), 7238–7241. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.16.7238>
- Fuentes López, A., García Martínez, E. y Fuentes López, C. (2018). *Determinación de cafeína en café mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)* [Tesis]. Universitat Politècnica de València, España. <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/104563/Fuentes%3BFuentes%3BGarc%3ADa%20-%20Determinaci%3Bn%20de%20cafe%3ADna%20en%20caf%3A9%20mediante%20cromatograf%3ADa%20l%3ADquida%20de%20alta%20...pdf?sequence=1>
- González-Pérez, I. y Cantillo, A. (2006). Linealidad, algo más que r²: un ejemplo práctico. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 37(2), 87–92. <https://www.redalyc.org/pdf/1812/181220540004.pdf>

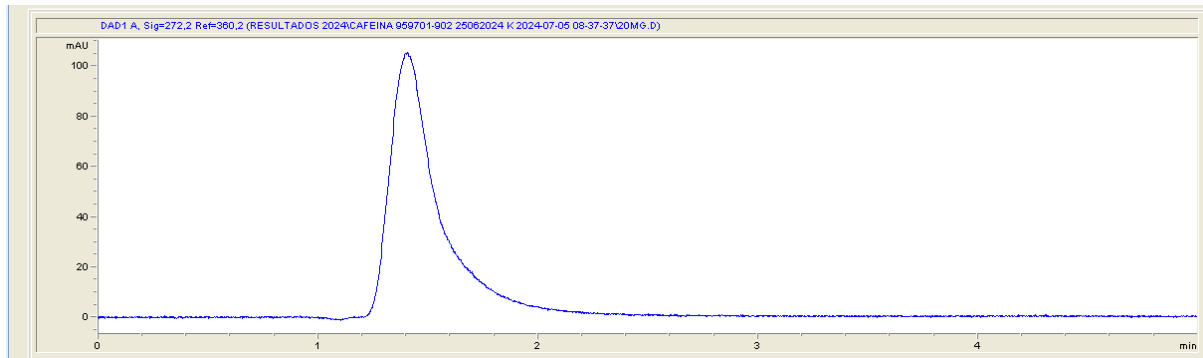
- Harpaz, E., Tamir, S., Weinstein, A. y Weinstein, Y. (2017). The effect of caffeine on energy balance. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*, 28(1), 1–10. <https://doi.org/10.1515/jbcpp-2016-0090>
- Validation of analytical procedures: text and methodology (2005 y rev. 4). [https://www.gmp-compliance.org/files/guidemgr/Q2\(R1\).pdf](https://www.gmp-compliance.org/files/guidemgr/Q2(R1).pdf)
- Validations of analytical procedures (2023). https://database.ich.org/sites/default/files/ICH_Q2%28R2%29_Guideline_2023_1130.pdf
- Maidana Petersen, M., Zannier, M.S. M. y Williner, M. (2011). Bebidas energizantes comercializadas en la ciudad de Santa Fe (Argentina): cuantificación de sus componentes y cumplimiento de la legislación. *Revista FABICIB*, 15, 35–46. <https://bibliotecavirtual.unl.edu.ar/publicaciones/index.php/FABICIB/article/download/879/1307/2259>
- Manrique, C. I., Arroyave-Hoyos, C. L. y Galvis-Pareja, D. (2018). Bebidas cafeínadas energizantes: efectos neurológicos y cardiovasculares. *IATREIA*, 31(1), 65–75. <https://doi.org/10.17533/udea.iatreia.v31n1a06>
- Maroto, A., Boqué, R., Riu, J. y Rius, F. (2001). *Incertidumbre y precisión*. <https://skat.ihmc.us/rid=1gxhhs8wm-1rt2c3h-2ln/incertidumbre%20y%20precisi%c3%b3n.pdf>
- Masharipov, S. M., Mavlyanov, M. A. y Abdumajidov, I. B. Metrological requirements of international standard ISO/IEC 17025:2017 and experimental study questions on metrological traceability of measurement results. En *Proceedings os the 2nd International 2024* (p. 60043). <https://doi.org/10.1063/5.0182431>
- Melgarejo, M. (2004). El verdadero poder de las bebidas energéticas. *Revista Enfasis Alimentación*(6). https://www.academia.edu/27877661/_El_verdadero_poder_de_las_bebidas_energ%C3%A9ticas_
- Naveen, P., Lingaraju, H. B., Deepak, M., Medhini, B. y Prasad, K. S. (2018). Method Development and Validation for the Determination of Caffeine: An Alkaloid from Coffea arabica by High-performance Liquid Chromatography Method. *Pharmacognosy Research*, 10(1), 88–91. https://doi.org/10.4103/pr.pr_79_17
- Osada Liy, J. E., Rojas Villegas, M. O., Rosales Vásquez, C. E. y Vega, D. (2008). Consumo de cafeína en estudiantes de medicina y su coexistencia con sintomatología ansiosa y depresiva. *Rev Med Hered*, 19(3), 102–107. <http://www.scielo.org.pe/pdf/rmh/v19n3/v19n3ao3.pdf>
- Pardo Lozano, R., Alvarez García, Y., Barral Tafalla, D. y Farré Albaladejo, M. (2007). Cafeína: un nutriente, un fármaco, o una droga de abuso. *Adicciones*, 19(3), 225–238. <https://www.redalyc.org/pdf/2891/289122084002.pdf>
- Portuondo Paisan, Y. y Portuondo Moret, J. (2010). Redalyc. La repetibilidad y reproducibilidad en el aseguramiento de la calidad de los procesos de medición. *Revista Química*, 30(2), 117–121. <https://www.redalyc.org/pdf/4455/445543770014.pdf>
- Quino, I., Ramos, O. y Guisbert, E. (2007). Determinación del límite de detección instrumental y límite de cuantificación instrumental en elementos traza de agua subterránea. *Revista Boliviana De Química*, 24(1), 53–57. <https://www.redalyc.org/pdf/4263/426339669010.pdf>

- Saito, S., Feliz, P. y Gosmann, G. (2007). Validación completa de un método simple para la determinación de catequinas y cafeína en té verde brasileño (*Camellia sinensis* var. *assamica*) mediante hplc. *Cromatographia*, 65(9), 607–610. <https://link.springer.com/article/10.1365/s10337-007-0190-1>
- Secretaria de la salud (2012, 26 de junio). *Norma Oficial Mexicana NOM-218-SSA1-2011, Productos y servicios*. <https://dof.gob.mx/normasOficiales/4643/salud/salud.htm>
- Taverniers, I., Loose, M. de y van Bockstaele, E. (2004). Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 23(8), 535–552. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2004.04.001>

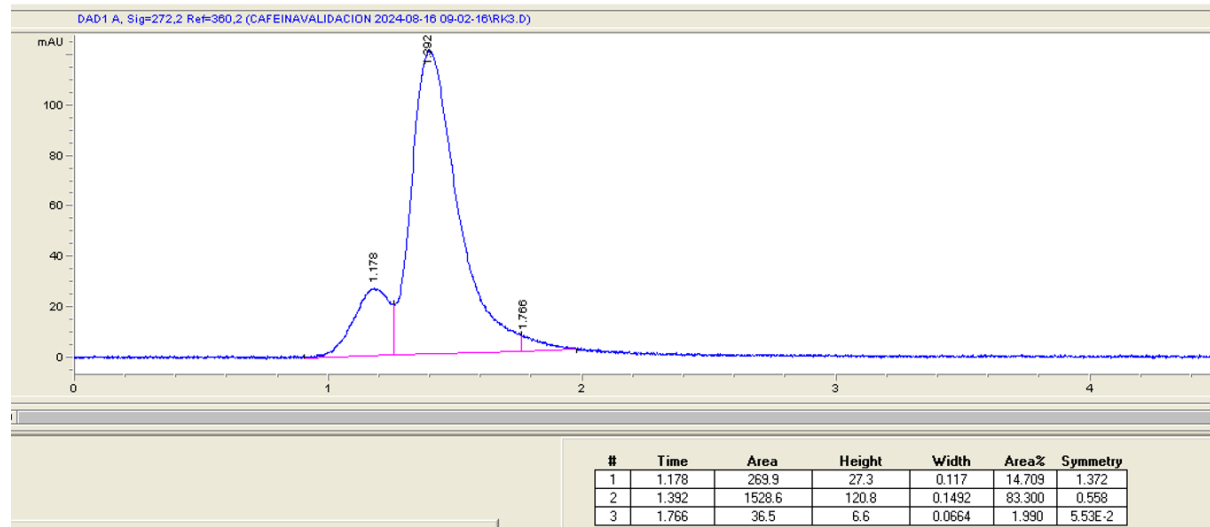
Anexos

Anexo A

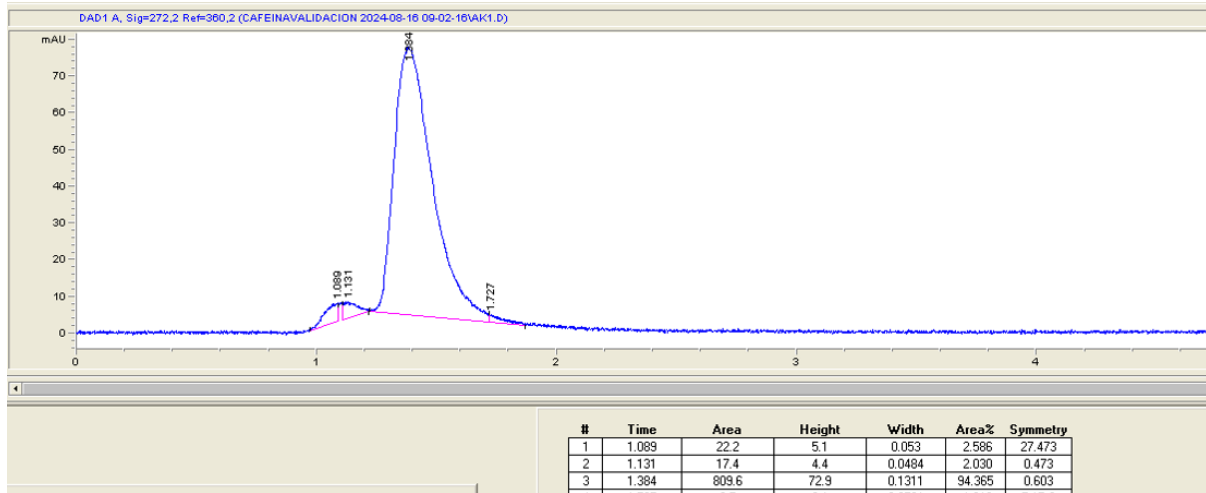
Cromatograma de Cafeína de la Muestra Estándar.



Nota. Elaborado a partir del software de HPLC.

Anexo B**Cromatograma de Cafeína de la Bebida n°1.**

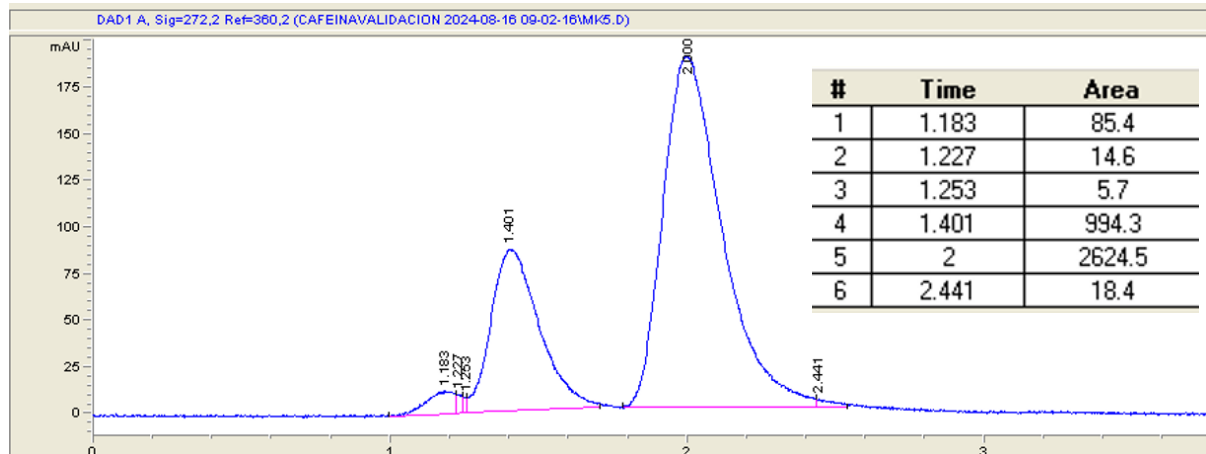
Nota. Elaborado a partir del software de HPLC.

Anexo C**Cromatograma de Cafeína de la Bebida n°2.**

Nota. Elaborado a partir del software de HPLC.

Anexo D

Cromatograma de Cafeína de la Bebida n°3.



Nota. Elaborado a partir del software de HPLC.

Anexo E

Áreas de la Curva de Calibración.

CURVA DE CALIBRACION		
No.	ÁREA (Y)	CONCENTRACION, ug/mL (X)
1	0	0
2	371.667	5
3	659.233	10
4	1322.33	20
5	2683.9	40
6	4078.87	60
7	5436.1	80
8	6690.97	100

Nota. Elaboración propia