



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013
13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

DETERMINAÇÃO DE TAURINA EM ENERGÉTICOS POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE) UTILIZANDO FENILISOTIOCIANATO (PITC) COMO REAGENTE DERIVATIZANTE

Marina Pipolo de **Camargo**^{2a}, Fabiana da **Silva**^{3c}, Vera Sônia **Nunes da Silva**^{1c}, Maria Teresa **Bertoldo Pacheco**^{1c}, Aparecida Sônia de **Souza**^{1b}

¹ Instituto de Tecnologia de Alimentos, Química/Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos; ² PUC - Campinas; ³ Faculdade de Engenharia de Alimentos – Unicamp

Nº 13237

RESUMO - A taurina é um dos aminoácidos mais abundantes no cérebro, músculo esquelético, leucócitos, retina, coração, resultante do metabolismo da metionina e cisteína. Entretanto, os seres humanos têm capacidade limitada em sintetizá-la. A ingestão alimentar das principais fontes de taurina desempenha um papel importante na regulação do pool de aminoácidos no organismo. Dentro deste contexto, o objetivo deste estudo foi estabelecer um método para determinação de taurina em alimentos, em especial em bebidas energéticas, que a partir de 2006 seu consumo teve um crescimento superior 300%. As análises foram realizadas com reação pré-coluna com Fenilisotiocianato (PITC) e quantificação em CLAE fase reversa (C18; 250x4,6mm; 5 µM) em modo gradiente com solução de acetato de sódio e acetonitrila na vazão de 1,0 mL/min; com padrão interno (ácido α-aminobutírico) e detecção em UV a 254 nm. A curva padrão elaborada com cinco concentrações apresentou $R^2=0,99968$. Os resultados apresentados revelaram um bom desempenho do método para as amostras que não foram submetidas a hidrólise ácida prévia, como também para as hidrolisadas previamente. Somente 45,5% dos energéticos comerciais avaliados estavam de acordo com as especificações descritas nos rótulos.

Palavras-chave: Taurina, energético, aminoácidos, derivatização, padrão interno.

^a Bolsista CNPq: Graduação em Biologia, PUC, Campinas - SP, marinapipolo@yahoo.com.br

^b Orientador, Pesquisador, CCQA/ITAL, Campinas-SP, sonia.souza@ital.sp.gov.br

^c Colaborador, Pesquisador, CCQA/ITAL, Campinas – SP, vera.silva@ital.sp.gov.br

^c Colaborador, estudante, Graduação em Eng. de Alimentos, FEA/UNICAMP, Campinas – SP



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013
13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

ABSTRACT - *Taurine is one of the most abundant amino acids in brain, skeletal muscle, white blood cells, retina, heart resulting from the metabolism of methionine and cysteine. However, humans have limited ability to synthesize it. The food intake of the main sources of taurine plays an important role in regulating the body amino acid pool. The purpose of research design was to establish a method for determination of taurine in foods, especially in energy drinks, which from 2006 consumption grew more than 300%. The analyzes were performed with pre-column reaction with phenylisothiocyanate (PITC) and reverse phase HPLC quantitation (C18, 250x4.6 mm, 5 μ M) in gradient mode with a solution of sodium acetate and acetonitrile at a flow rate of 1.0 mL / min, internal standard (α -aminobutyric acid) and UV detection at 254 nm. The standard curve prepared with five concentrations showed $R^2 = 0.99968$. The results presented reveal a good performance of the method for samples that were not subjected to prior acid hydrolysis but also to the previously hydrolysed. Only 45.5% of energy drinks were according to the specifications described on the labels.*

Key-words: *Taurine, energy, amino acids, derivatization, internal standard.*

1 INTRODUÇÃO

A taurina é um β -aminoácido que não incorpora uma proteína, possui o grupo sulfônico (SO_3H) em sua estrutura em substituição ao grupo carboxila (COOH) presente nos demais aminoácidos (HUXTABLE, 1992; BRITO; VOLP, 2008). Possui uma estrutura química única que é responsável por diversas e importantes funções fisiológicas. É um dos aminoácidos livres mais abundantes no cérebro, músculo esquelético, leucócitos, retina, coração. No fígado, a taurina conjuga-se com ácidos biliares para formar sais biliares, que são detergentes naturais solúveis em água e atuam na emulsificação de lipídeos e vitaminas lipossolúveis (HUXTABLE, 1992).

A taurina é importante no metabolismo da insulina, por estar presente em altas concentrações e estimular os receptores de insulina (BUSTAMANTE et al., 1998; NAKAYA, 2000). Além disso, a taurina aumenta a síntese de glicogênio e a captação de glicose, reduz a taxa de apoptose (MEREZAK et al., 2001; OPRESCU et al., 2007). Animais suplementados com taurina apresentaram maior tolerância à glicose, possivelmente mediada pela expressão de genes envolvidos na secreção e sensibilidade periférica da insulina (CARNEIRO et al., 2009). No organismo, as necessidades diárias de taurina podem ser alcançadas através da síntese da metionina e cisteína (HUXTABLE, 1992). Na principal via metabólica a cisteína é oxidada a ácido sulfínico através da enzima cisteína desoxigenase (JACOBSON & SMITH, 1968). Em indivíduos



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013

13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

saudáveis, a dieta é a principal fonte de taurina, altas concentrações são encontradas em frutos do mar, carnes escuras de aves. As necessidades diárias recomendadas para este aminoácido ainda não foi estabelecida, mas estudos utilizando suplementação com taurina sugerem doses variando entre 3g/dia (IKEDA, 1977; AZUMA, 1994; AZUMA; SAWAMURA; AWATA, 1992). Entretanto, as bebidas energéticas surgiram na década de 60 na Ásia, em resposta a procura dos consumidores por suplemento alimentar que promovesse aumento de energia. Uma das primeiras marcas de bebidas energéticas foi a lipovitan D lançada pela empresa japonesa denominada Taishio farmacêutica (REISSIG, 2009). Nos anos 80, o austríaco Dietrich Mateschitz, em viagem de negócios na Tailândia, conheceu compostos energéticos, até então desconhecido na Europa, que eram populares no país por causar sensação de alívio aos consumidores. O mercado europeu se expandiu rapidamente e, hoje a bebida marca presença em mais de 140 países. No Brasil, o Red Bull passou a ser comercializado a partir de 1996 e desde então, tanto o mercado brasileiro como o mercado mundial de bebidas energéticas estão em constante expansão (REISSIG, 2009).

Segundo dados da ABIR (Associação Brasileira das Indústrias de Refrigerantes e de bebidas Não Alcoólicas), o consumo de bebidas energéticas no período de 2006 a 2010 teve um crescimento de 325%. Esse sucesso pode estar relacionado com a funcionalidade do produto, criado para incrementar a resistência física, aumentar o estado de alerta mental, estimular o metabolismo, evitar o sono, proporcionar reações mais rápidas, sensação de bem estar e ajudar a eliminar substâncias nocivas ao corpo. As bebidas energéticas possuem em sua composição: carboidratos (cerca de 11g/dl), taurina (cerca de 400mg/dl), cafeína (cerca de 32mg/dl), glucoronolactona (cerca de 240mg/dl), inositol (cerca de 20mg/dl) e vitaminas do complexo B (40% a 100% das necessidades diárias) (DALL' AGNOL, 2006). Dentro deste contexto, o presente trabalho tem como objetivo principal estabelecer o método por HPLC para determinação de taurina em bebidas energéticas e avaliar algumas marcas disponíveis comercialmente.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Matéria-prima: O padrão de taurina marca SIGMA com 99% de pureza. Foram escolhidas aleatoriamente 11 bebidas energéticas comercializadas na região de Campinas - SP.

2.2. Métodos: A determinação da curva da taurina foi baseada na determinação de aminoácidos totais (HAGEN, et. al. 1989; WHITE; HART; FRY, 1988).

2.3. Testes para preparo do padrão

2.3.1. Solubilidade da taurina em função de suas propriedades físico-químicas: A solubilidade da taurina em água é de 125,5 partes de água a 12°C, porém é insolúvel em álcool puro, sendo que somente 0,004 partes de taurina a 17°C são solúveis em 100 partes de álcool 95%. Foram



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013 13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

feitos ensaios para solubilização da taurina com o solvente (tempo de ultra-som, uso de temperatura, agitação, etc.). Portanto, em ácido clorídrico 0,1M foi totalmente solubilizada, este ácido já é o indicado para o procedimento de solubilização e hidrólise da amostra para análise de aminoácidos totais. Sendo assim foi elaborada uma solução padrão de taurina com ácido clorídrico para a curva padrão com cinco pontos, com concentrações definidas de taurina ideal para a sua quantificação.

2.3.2. Solução Padrão de Taurina: A amostra de taurina foi pesada com precisão ($31,3 \pm 0,05$ mg) e transferida quantitativamente para um balão volumétrico de 100 mL e dissolvida em ácido clorídrico 0,1M para obtenção de uma solução-mãe com concentração 2,5 mmol/L. Para a curva padrão de 5 pontos, foram utilizadas massas referentes a 0,0610g; 0,1540; 0,3060g; 0,7640 e 1,5320g, as quais foram adicionadas em balões volumétricos com capacidade para 5 mL, foram adicionados também 0,5 mL de padrão interno o ácido α -aminobutírico nos cinco pontos da curva.

2.3.3. Derivatização pré-coluna do padrão: Com auxílio de uma microseringa foi transferida uma alíquota de 40 μ L para um tubo de vidro para o procedimento da derivatização (reação pré-coluna com Fenilisotiocianato - PITC). O tubo foi colocado no *vial* de secagem. Posteriormente, adicionado 22 μ L de solução de re-secagem, a amostra então, foi homogeneizada e seca novamente. Depois de seco, adicionou-se 22 μ L de solução derivatizante. As três concentrações do padrão foram homogeneizadas e permaneceram em repouso por 20 min., e posteriormente foram secas por trinta minutos. Em seguida, foram adicionados 500 μ L de diluente, e levadas ao ultrassom por dez minutos e posteriormente homogeneizadas em *vortex* e centrifugadas por 5 minutos a 3.000 rpm., e finalmente transferidas para frascos de injeção específicos para CLAE (HAGEN; FROST; AUGUSTIN, 1989).

2.4. Parâmetros Cromatográficos: A temperatura da coluna foi de 50°C. A fase móvel foi composta por: acetonitrila:acetato de sódio. A fase móvel foi filtrada através de um sistema de filtração Millipore vácuo equipado com um filtro de 0,45 μ M, e desgaseificada em ultrason. O detector UV foi ajustado para 254 nm (WHITE; HART; FLY, 1988).

2.5. Determinação de taurina nos energéticos: Foram utilizadas 11 marcas de energéticos disponíveis comercialmente na região de Campinas-SP. As amostras utilizadas no estudo foram analisadas em triplicatas como aminoácidos livres (sem hidrólise ácida) e como aminoácidos totais



(com hidrólise ácida) antes da *derivatização*. As amostras de energéticos foram denominadas pelas letras (**A, B, C, D, E, F, G, H, I, J e K**), pois as marcas avaliadas não foram reveladas no estudo.

2.6. Análise estatística: Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e ao teste de Tukey (Pimentel Gomes, 2009), para determinação da diferença significativa entre as médias (nível de significância de $p \leq 0,05$), utilizando o programa SAS – *Statistical Analysis System* (SAS, Cary, USA).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os cromatogramas dos padrões injetados foram integrados utilizando o software do computador acoplado ao equipamento, obtendo, assim, as áreas dos picos em cada concentração do aminoácido (Figuras 1, 2 e 3). Dando origem a curva de calibração (Figura 4) da taurina, baseado na equação da reta ($y = ax + b$). As concentrações dos componentes do padrão em 5 níveis foram calculadas como: $C_{(g/100\text{ mL ou }100g)} = 2,50 \times 10^{-4} \times PM \times \text{massa do padrão (g)} / \text{vol(g)}$. O PM refere-se ao peso molecular da taurina. A curva padrão elaborada com cinco concentrações apresentou $R^2 = 0,99968$.

3.1. Curva padrão de taurina

Na Figura 1 estão apresentados os cromatogramas referentes às concentrações de taurina e a curva padrão gerada, a qual apresentou $R^2 = 0,99968$; sendo, portanto este valor um indicativo da qualidade da curva analítica.

3.2. Resultados do teor de taurina nos energéticos

Na Figura 2 estão apresentados os resultados de Taurina encontrado nas 11 marcas avaliadas, sendo especificado no rótulo a concentração de Taurina equivalente a 400 mg/100 mL de bebida. O valor encontrado está de acordo com o especificado no rótulo em apenas 5 marcas (**A, B, E, H e J**), ou seja, apenas 45,5% estão dentro dos valores especificados nos rótulos e não apresentaram diferença estatística entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). As marcas que apresentaram teores de taurina abaixo do declarado, não apresentaram diferença estatística ($p < 0,05$) entre as marcas **C** e **G**. Já as marcas **D, F e K** estavam bem abaixo dos limites declarados, porém estatisticamente iguais entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). A marca **I** foi a que apresentou o menor teor de taurina.



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013 13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

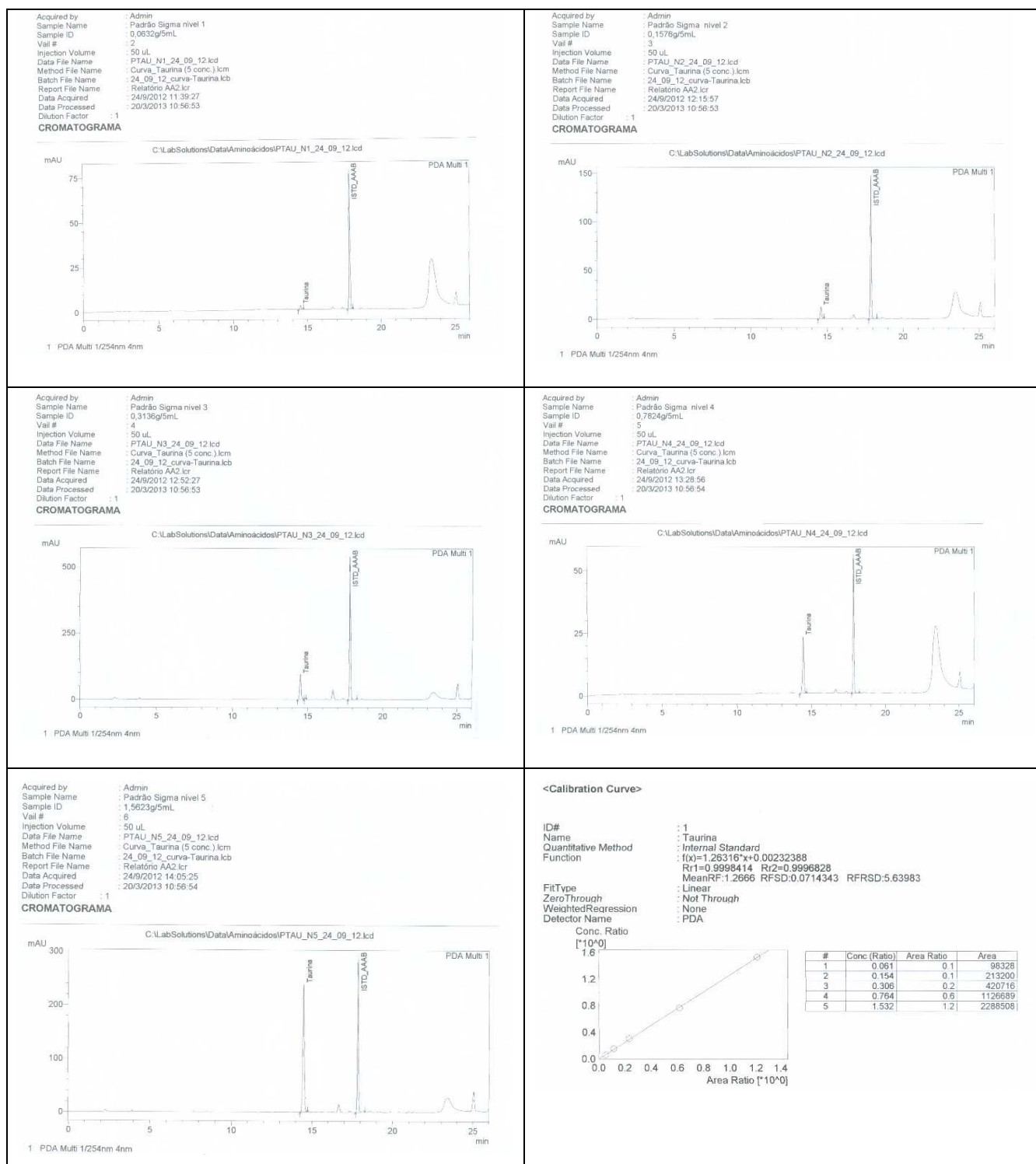


Figura 1. Cromatogramas das concentrações de taurina nos cinco níveis (1, 2, 3, 4 e 5) e a curva padrão da taurina.



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013
13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

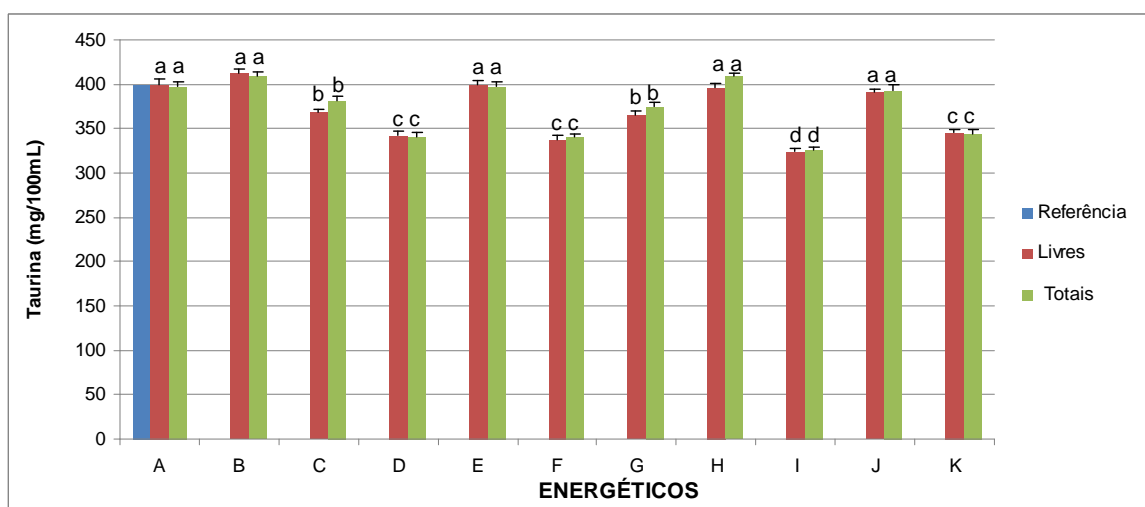


Figura 2. Valores médios \pm desvio padrão das análises em triplicata, dos teores de taurina encontrados em diferentes marcas de energéticos. As letras iguais não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

O Tipo de tratamento prévio efetuado na amostra, ou seja, sem hidrólise (Livres) e com hidrólise ácida (Totais), não influenciou na resposta analítica, apresentando-se estatisticamente iguais entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). A amostra “Referência” representada na Figura 2 (1ª coluna) refere-se a quantidade equivalente (400 mg/100mL) de taurina declarada no rótulo pelos fabricantes.

4 AGRADECIMENTOS

Ao CNPQ – PIBIT, pela bolsa concedida.

Ao CCQA – ITAL, pela oportunidade de estágio.

5 CONCLUSÃO

Os resultados apresentados revelaram um bom desempenho do método tanto para as amostras analisadas sem e com hidrólise ácida. Porém, somente 45,5% dos energéticos comerciais avaliados estavam de acordo com as especificações descritas nos rótulos.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIR – Associação Brasileira das Indústrias de Refrigerantes e de Bebidas Não Alcoólicas. Disponível em: <http://www.abir.org.br/> Acesso: 08 de fevereiro de 2013.



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013

13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

AZUMA, J. Long-term effect of taurine in congestive heart failure: preliminary report. **Advances in Experimental Medicine and Biology**. v.359, p.425-433, 1994.

AZUMA, J.; SAWAMURA, A.; AWATA, N. Usefulness of taurine in chronic congestive heart failure and its prospective application. **Japanese Circulation Journal**, v.561, p.95-99, 1992.

BRITO, C. J.; VOLP, A. C. P. Benefícios Funcionais da taurina na saúde do consumidor. **Nutrição em Pauta**, 2008.

BUSTAMANTE, J.; ALONSO, F. J.; LOBO, M. V.; GINE, E.; TAMARIT-RODRIGUEZ, J.; SOLIS, J. M.; MARTÍN DEL RÍO, R. Taurine levels and localization in pancreatic. **Advances in Experimental Medicine and Biology**. v. 442, p. 65-69, 1998.

CARNEIRO, E. M.; LATORRACA, M. Q.; ARAÚJO, E.; OLIVEIRAS, M. B. M. J.; NAVARRO, M.; BERNÁ, G.; VELOSO, L. A.; SORIA, B.; MARTIN, F. Taurine supplementation modulates glucose homeostasis and islet function. **The Journal of Nutrition Biochemistry**. v. 20, n. 7, p.503-511, 2009.

DALL' AGNOL, T. M. **Efeitos fisiológicos agudos da associação de taurina e cafeína contida em uma bebida energética em indivíduos fisicamente ativos**. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação "Stricto Sensu" em Educação Física da Universidade Católica de Brasília para título de mestre. Brasília, 2006.

HAGEN, S. R.; FROST, B.; AUGUSTIN, J. Precolumn phenylisothiocyanate derivatization and liquid chromatography of aminoacids in food. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v. 72, n.6, n. 912-916, Nov.-Dec, 1989.

HUXTABLE, R. J. **Physiological Actions of Taurine**. *Physiological Reviews*, v.72, n.1, p.101-163, 1992.

IKEDA, H. Effects of taurine on alcohol withdrawal. **The Lancet**, v.3, p.509. 1977.

JACOBSON, J.G.; SMITH JR, L.H. Biochemistry and physiology of taurine and taurine derivatives. **Physiol Rev**, v.48, p.424-511, 1968.

MEREZAK, S.; HARDIKAR, A. A.; YAJNIK, C. S.; REMACLE, C.; REUSENS, B. Intrauterine low protein diet increases fetal beta-cell sensitivity to NO and IL-1 beta: The protective role of taurine. **Journal of Endocrinology**, v. 171, n. 2, p. 299-308, 2001.

NAKAYA, Y.; MINAMI, A.; HARADA, N.; SAKAMOTO, S.; NIWA, Y.; OHNAKA, M. TAURINE Improves Insulin Sensitivity: In The Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty Rat, A Model Of Spontaneous Type 2 Diabetes. **The American Journal of Clinical Nutrition**. 71:54–58, 2000.

OPRESCU, A. I.; BIKOPOULOS, G.; NAASSAN, A.; ALLISTER, E. M.; TANG, C.; PARK, E.; UCHINO, H.; LEWIS, G. F.; FANTUS, I. G.; ROZAKIS-ADCOCK, M.; WHEELER, M. B.; GIACCA, A. Free fatty-induced reduction in glucose-stimulated insulin secretion: Evidence for a Role of Oxidative Stress In Vitro and In Vivo. **Diabetes**. v. 56, n. 2, p. 2927-2937, 2007.

PIMENTEL GOMES, F. **Curso de Estatística Experimental**. 15ªed. Piracicaba: FEALQ, 2009.

REISSIG, C.J., STRAIN, E.C., GRIFFITHS, R.R. Caffeinated energy drinks a growing problem. **Drug Alcohol Depend** 99:1–10, 2009.

SAS INSTITUTE INC. **SAS Use's Guide**. Cary: SAS Institute Inc, 1028p., 1983.

WHITE, J.A., R.J. HART AND J.C. FLY: An evaluation of waters pico-tag system for the amino acid analysis of food materials. **Journal of Automatic Chemistry**,v. 8,p.170-177,1988.