



FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
CARRERA PROFESIONAL DE NUTRICIÓN Y DIETÉTICA

“ANÁLISIS DEL CONTENIDO DE CAFEÍNA, TEOBROMINA Y
TEOFILINA POR HPLC-DAD EN BEBIDAS COMÚNMENTE
COMERCIALIZADAS EN LIMA”

Tesis para optar el título profesional de:
Licenciada en Nutrición y Dietética

Presentado por:

Karolinhe Alicia Gonzales Yépez (0000-0001-6270-8053)

Asesor:

Oscar Reátegui Arévalo (0000-0001-9773-2176)

Lima - Perú

2021

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Lima, 19 de abril de 2021.

Los integrantes del Jurado de tesis:

Presidente: Mg. Erika Paola Espinoza Rado	<input type="checkbox"/>
Miembro: Mg. Galo Armando Viccina Linares	
Miembro: Mg. Lorena María Saavedra García	

Se reúnen para evaluar la tesis titulada:

“Análisis del contenido de cafeína, teobromina y teofilina por HPLC-DAD en bebidas comúnmente comercializadas en Lima”

Presentada por el bachiller:

- Karolinhe Alicia Gonzales Yépez

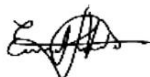
Para optar el Título Profesional de Licenciada en Nutrición y Dietética

Asesorado por: Mg. Oscar Reátegui Arévalo

Luego de haber evaluado el informe final de tesis y evaluado el desempeño del estudiante de la carrera de Nutrición y Dietética en la sustentación, concluyen: de manera unánime (x) por mayoría simple () calificar a:

Tesis: Karolinhe Alicia Gonzales Yépez			Nota (en letras): 17 (diecisiete)	
Aprobado ()	Aprobado - Muy buena (x)	Aprobado - Sobresaliente ()	Desaprobado ()	

Los miembros del jurado firman en señal de conformidad.



Mg. Erika Paola Espinoza Rado
Presidente del Jurado



Mg. Oscar Reátegui Arévalo
Asesor



Mg. Galo Armando Viccina Linares
Miembro 1



Mg. Lorena María Saavedra García
Miembro 2

Agradecimientos

Le agradezco ante todo a Dios por haberme guiado y acompañado durante este proceso a lo largo de mi carrera, por ser mi camino y sostenerme para que siga adelante, gracias por cada día que me da lleno de alegría y salud.

Agradezco a mis padres Edwin y Yolanda por siempre estar junto a mí y apoyarme, por haberme dado la vida, ser mi soporte en todo momento, brindarme su amor y ser mi ejemplo a seguir. A mis hermanos, Leonardo y Dominic por ser mis mejores amigos y llenarme de alegría cada día. A mis abuelos, por darme su guía, su apoyo, su fe, amor incondicional y protección. Y a toda mi familia, que me dio su confianza y apoyo cuando más lo necesitaba.

Le agradezco la confianza, paciencia y dedicación de su tiempo al profesor Óscar Reátegui, por haber compartido conmigo sus conocimientos, brindarme la oportunidad de crecer profesionalmente, y brindarme su amistad.

Gracias a mi universidad por haberme dado la bienvenida y las incomparables oportunidades para seguir con mis estudios y formarme para ser una buena profesional.

Resumen

El propósito de este estudio fue determinar el contenido de cafeína, teobromina y teofilina por HPLC-DAD en las bebidas que se consumen comúnmente en Lima. Las muestras se dividieron en 6 grupos (bebidas a base de té, café en polvo, leches chocolatadas, gaseosas, bebidas rehidratantes y bebidas energéticas); cada uno con las cinco bebidas más consumidas. Analizadas por un método de cromografía líquida de alto rendimiento, rápido y selectivo (HPLC-DAD). Se pudo observar que entre los grupos gaseosas y bebidas energizantes se identificó principalmente la cafeína, siendo las bebidas energéticas el segundo grupo de mayor nivel de cafeína (10.38 ± 0.01 a 95.50 ± 3.48 mg/L). En las bebidas a base de té, el contenido más alto identificado fue el de cafeína (0.47 ± 0.01 a 4.91 ± 0.05 mg/L), a pesar de que la teofilina es un compuesto característico de la hoja de té. En las bebidas rehidratantes se obtuvo un nivel muy bajo de cafeína (0.03 ± 0.01 a 0.05 ± 0.01 mg/L) y de teobromina (0.48 ± 0.01 a 6.00 ± 0.02 mg/L). En las cinco marcas comerciales de leche con chocolate evaluadas se encontró cafeína (4.09 ± 0.01 a 5.70 ± 0.01 mg/L) y teobromina (1.70 ± 0.01 a 12.24 ± 0.01 mg/L), siendo esta última la de mayor concentración. Por último, en el grupo de bebidas de café en polvo se encontró el nivel más alto de contenido de cafeína (492.5 ± 0.24 a 9644.0 ± 4.93 mg/L). Los resultados obtenidos en este estudio proporcionan información fiable sobre la composición y cuantificación de metilxantinas en las bebidas más consumidas en Lima. También, un impacto en el conocimiento de los consumidores.

Palabras claves

Cafeína, teobromina, teofilina, bebidas, metilxantinas.

Abstract

The purpose of this study was to determine the content of caffeine, theobromine and theophylline by HPLC-DAD in beverages commonly consumed in Lima. The samples were divided into 6 groups (herbal teas, coffee powder, chocolate milks, soft drinks, sports drinks and energy drinks); each with the five most commonly consumed beverages. Analyzed by a high performance, fast and selective liquid chromatography method (HPLC-DAD). It could be observed that among the groups of soft drinks and energy drinks, caffeine was mainly identified, with energy drinks having a more significant caffeine value (10.38 ± 0.01 to 95.50 ± 3.48 mg/L). In herbal teas, the highest content identified was caffeine (0.47 ± 0.01 to 4.91 ± 0.05 mg/L), despite the fact that theophylline is a characteristic compound of the tea leaf. With sports drinks, a very low level of caffeine (0.03 ± 0.01 to 0.05 ± 0.01 mg/L) and theobromine (0.48 ± 0.01 to 6.00 ± 0.02) was obtained. In the five commercial brands of chocolate milk evaluated, caffeine (4.09 ± 0.01 to 5.70 ± 0.01 mg/L) and theobromine (1.70 ± 0.01 to 12.24 ± 0.01 mg/L) were found, being the last one with the highest concentration. And in the group of coffee powder samples had the highest level of caffeine content (492.5 ± 0.24 to 9644.0 ± 4.93 mg/L). The results obtained in this study provide reliable information on the composition and quantification of methylxanthines in the most consumed beverages in Lima. Also, an impact on the knowledge of the consumers.

Keywords

Caffeine, Theobromine, Theophylline, Beverages, Methylxanthines.

Determination of caffeine, theobromine, and theophylline by HPLC-DAD in beverages commonly consumed in Lima-Peru

Karolinhe A. Gonzales¹

¹School of Nutrition and Dietetics, Universidad Científica del Sur, Lima, Perú

1. Introduction

Over the last decades, some research has focused on the study of biologically active ingredients, particularly alkaloids in beverages, for their possible beneficial effects on human health (1). One of those alkaloids are methylxanthines, compounds commonly present in food (2). Montero et al. (3) noted that both animals and plants naturally produce these compounds, being caffeine (CF), theobromine (TB) and theophylline (TF) the most studied ones. These compounds are mainly found in food such as coffee beans, cocoa beans and tea leaves (4).

These three methylxanthines are chemically very similar (5). According to De Sena et al. (6), they share stimulating effects on the central nervous system, as well as on other systems such as the gastrointestinal, cardiovascular, renal and respiratory systems.

Caffeine, for example, one of the best known and most studied substances, has a stimulating effect on the central nervous system, increasing alertness, improving long-term memory and concentration, as well as may improve physical performance in athletes (7, 8 and 9). There is even a debate about the neuro-protective effects against certain types of degenerative diseases such as Alzheimer's and Parkinson's (10). According to data reviewed by Canadian scientists (11), they concluded that for the healthy adult population, a moderate daily caffeine intake of up to 400 mg per day is not associated with adverse health

effects. Likewise, it was indicated by the FDA (Food and Drug Administration) as a safe dose of up to 400mg of caffeine per day in the healthy adult population, varying according to the sensitivity of the person or vulnerable group (pregnant or breastfeeding or those with any special health condition) (12). However, excessive consumption may be related with hypertension, anxiety, hyperactivity and headaches (7).

Theobromine, which is present in high concentrations in cocoa, has not been studied as much (13). According to Martinez-Pinilla, the main mechanisms of action are inhibition of phosphodiesterases and blockade of adenosine receptors (13). Another clinical study suggests that theobromine could be the main active component of cocoa responsible for the effect of increasing HDL cholesterol (14). As for their safe or lethal daily dose, there is no specific and/or conclusive information.

And theophylline, which has similar pharmacological and toxicological properties as caffeine (2). According to Dolder (15), can be found mainly in tea, and in asthma medication used as a bronchodilator. Although there is no precise information on a recommended dose, Corey et al.(16) point out that inadequate consumption may cause toxic effects, and may cause tachycardia, hypertension, nausea, vomiting, diarrhea.

Last years, it can observe that there is a greater scope and access to a huge variety of products (17), such as the group of beverages (ready-to-drink, coffee powders, soft drinks, energy drinks, sport drinks, herbal teas). Products that are commonly marketed in our locality, most of which in their nutritional labeling do not indicate with certainty their concentration in certain compounds that they contain. So, this information is often unknown to the consumer public.

Therefore, the aim of this study was to determine the content of caffeine, theobromine and theophylline by HPLC-DAD and antioxidant capacity in beverages commonly consumed in Lima.

2. Material and methods

2.1. Chemicals

All solvents and reagents were analytical grade with deionized water (Mili-Q quality) (4). The standards of caffeine, theobromine and theophylline were purchased from Sigma-Aldrich (Merck Peruana, Lima). Acetonitrile and methanol (HPLC Grade) were also obtained from Sigma-Aldrich (Merck Peruana, Lima).

2.2. Sample collection

The samples were divided into six groups: herbal teas (HT), sports drinks (SD), chocolate milk (CM), soft drinks (SOD), energy drinks (ED) and coffee powder (CP). Each one with the five most consumed beverages, obtained by non-probabilistic convenience sampling, based on a survey of consumers in Lima (Anexo 5). Samples were obtained through their purchase in three supermarkets in Lima Metropolitana. The nutritional labels of each sample analyzed were reviewed to corroborate their declared composition.

In the case of herbal teas, they are ready-to-drink cold drinks that are marketed as herbal infusions with an added value (e.g. fruit flavors or various properties), which can be highly appreciated by a certain sector of the national and international market (18). Sports drinks provide carbohydrates, electrolytes and liquids to the body, helping the body hydrate before, during and after physical activity (19).

Chocolate milks is a mixture based on milk, sucrose, cocoa and/or cocoa powder and some hydrocolloids, which are added to improve the consistency and avoid the sedimentation of the cocoa particles (20).

On the other hand, soft drinks are flavored drinks, which are produced by adding CO₂ gas directly to the drink, diluted with sucrose, and depending on the drink may or may not contain caffeine (21).

Energy drinks are used to provide an extra burst of energy, as well as to promote wakefulness, increase attention span, maintain alertness, and improve athletic performance (22).

In the case of coffee powder, is a drink prepared with coffee beans in powder form (23), having caffeine as its main compound. All coffee powder samples were prepared.

For this research, there were no samples sweetened with non-caloric sweeteners.

2.3. Total polyphenol measurement

The content of total phenolics was determined according to Singleton and Rossi (24). Briefly, 1 mL of 10% Folin-Ciocalteu reagent was mixed with 0.1 mL of sample for 5 min at room temperature, then 1 mL of 5% sodium carbonate was added and the mixture was placed in a water bath at 45°C for 15 min. All samples were analyzed in triplicate. Absorbance was read on a spectrophotometer at 725 nm. The results were expressed in mg galic acid equivalent/100mL (mg GAE/100mL).

2.4. Total flavonoid measurement

Total flavonoid measurement was performed according to Wolfe et al. (25). To 0.250 mL of sample was added 0.075 mL of 5% sodium nitrite and allowed to react for 5 min, then 0.150mL of aluminum chloride was added, and the mixture could stand for 5min. Finally, 0.275 mL sodium hydroxide (1 M) was added to the mixture and it was left to react for 15 min. All samples were analyzed in triplicate. The reading was performed at 510 nm in a spectrophotometer. The results were expressed in μg catechin equivalent/100mL (μg CE/100mL).

2.5. Antioxidant capacity by ferric reducing antioxidant power (FRAP)

Antioxidant activity evaluated by the FRAP assay was performed according to the methodology proposed by Benzie and Strain (26). Briefly, 1 mL of distilled water and 1 mL of the FRAP reagent were added to 0.1mL of sample, the mixture was placed in a 37 °C water bath and allowed to react for 10 min. The reading was made in a spectrophotometer (Pharo 300, Spectroquant, USA) at 593 nm. A standard curve was prepared using different concentrations of Fe^{2+} ranged from 15 to 75 mM. All samples were analyzed in triplicate. The results were expressed in μM Fe^{2+} /100mL (μM Fe^{2+} /100mL).

2.6. Chromatographic conditions

HPLC analyses of caffeine, theobromine and theophylline were performed according to Srdjenovic et al. (4), with slight modifications. Briefly, a VWR HITACHI Chromaster 600 HPLC with a diode array detector (DAD CM 5430), autosampler and a reversed phase purospher STAR RP-8 column (5 μm particle size, i.d. 4.6 x 150 mm) was performed in a isocratic elution mode with the mobile phase water-THF(A) (0.1% THF in water, pH 8)-acetonitrile (B) (90:10, v/v). The pH was adjusted with 0.1 M NaOH. The mobile phase and all the solutions were

filtered (0.45- μm x 47mm Millipore nylon filter), and the run time was 5 min, with a flow rate of 0.8 mL/min. The column temperature of 25°C and the analytes were detected at 273nm. All samples were run in triplicate for each analysis.

2.7. Sample preparation

The herbal teas and sports drinks were filtered through a 0.22 μm nylon filter. Ten milliliters of the filtrate, were adjusted to pH 8 with 0.1 M NaOH (4).

The chocolate milks (25mL) containing suspended particles were filled up to 200mL with water in a separate container and extracted for 30 minutes at 60 ° C in the ultrasonic bath. The extracted sample was filtered through filter paper to remove solids. Then, 10 mL of the filtrate was adjusted to pH 8 with a 0.1M NaOH solution (4).

The soft drinks and energy drinks samples were degassed for 15 minutes to release CO₂. Before analysis, the samples were adjusted to pH 8 with a 0.1M NaOH solution and filtered through a 0.22- μm x 33mm Millipore Millex-GN nylon filter.

The coffee powder samples were weighed (5g) and extracted with boiling water (200 mL), mixed in a thermal flask for 5 min on the magnetic stirrer (4). The extracts were then filtered and 10 mL of the filtrate was adjusted to pH 8 with 0.1M NaOH.

2.8. Cleanup procedure

According to Srdjenovic et al. (4), the Supelclean LC-18 SPE cartridges were conditioned with 2 x 6 mL of methanol, followed by 2 x 6 mL of ultra-pure deionized water. The extracts from each sample were then passed through the SPE cartridges, followed by washing with 6 mL of ultra-pure deionized water. They were air dried under vacuum for 10 min and the fluids were discarded. Last,

CF, TB and TF were extracted from the SPE cartridges with 10 mL of chloroform. The solution was evaporated until dryness. The residue of all samples was reconstituted in 1 mL of pH 8 water, with the exception of chocolate milk, which was reconstituted in 2 mL. Samples were filtered through a 0.22 μm nylon filter and injected into the HPLC (4).

2.9. Statistical analysis

The results of each analysis were presented in tables and the statistical analyses of each test were presented as “mean \pm standard deviation” using SPSS version 22 for Windows (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA).

3. Results and Discussion

3.1. Bioactive compounds and Antioxidant capacity

Total polyphenols content, total flavonoids content and FRAP of the six groups of beverages are presented in Table I. As can be seen, the total polyphenols content in beverages varies according to the group. Decreases, according to the results found, in the following order CP > ED > HT > CM > SOD > SD (Table II). This is because coffee contains numerous phenolic compounds, 3.57 ± 0.17 to 19.97 ± 0.17 mg GAE/100mL, compared to the other samples studied. In fact chlorogenic acid is attributed more potential benefits of coffee, which has been shown to contribute to the prevention of Alzheimer's disease-induced cognitive dysfunction (27).

However, can be noted that in the group of herbal teas, a notable difference in polyphenol content was found between the infusions based on black tea (HT-3, 4, and 5): 0.06 ± 0.01 to 0.40 ± 0.01 mg GAE/100mL, and green tea (HT-1 and

HT-2): 4.08 ± 0.27 to 4.74 ± 0.18 mg GAE/100mL. Consistently with Horžić et al. (1), the green tea is the richest source of total phenols.

In the results of total flavonoids content, it was found that the coffee powder (CP) and chocolate milks (CM) presented the highest levels of concentration in these results (Table II): 57445.07 ± 25969.47 $\mu\text{g CE}(+)/100\text{mL}$ and 20785.92 ± 7315.11 $\mu\text{g CE}(+)/100\text{mL}$ respectively, compared to the other groups.

Besides that, according to the results, the group with the lowest flavonoid content was the herbal teas. There are no similar studies comparing these groups of beverages, as to establish a factor explaining why teas have lower flavonoid content. On the other hand, within this group of tea beverages, it is conceivable that the catechin content may vary according to tea variety, origin, time of harvest, and sun exposure (1), which would be factors to be considered in future research. Further, for FRAP, it can be observed that coffee powder (CP) have a high antioxidant capacity, 29.51 ± 0.29 to 228.88 ± 1.60 $\mu\text{moles Fe}(2+)/100\text{mL}$, well above the other samples, such as soft drinks (SOD), which show a very low or almost no antioxidant capacity.

As can be seen, based on these results, the group of powdered coffee drinks predominates in the majority of the tests carried out, being the group of drinks that has the greatest antioxidant capacity, due to its bioactive compounds such as chlorogenic acid. The other groups vary, in relation to the ingredients of each sample.

Table I. Total polyphenols, flavonoids and FRAP results of most consumed beverages from Lima*

BEVERAGE SAMPLES	FOUND VALUES					
	Total polyphenols (mgGAE/100mL)		Total flavonoids ($\mu\text{g CE}(+)/100\text{mL}$)		FRAP ($\mu\text{moles Fe}^{2+}/100\text{mL}$)	
SOD-1	1.12	\pm 0.04	2718.31	\pm 70.42	3.59	\pm 0.10
SOD-2	0.19	\pm 0.01	915.49	\pm 70.42	<LOD	
SOD-3	0.08	\pm 0.01	887.32	\pm 42.25	<LOD	
SOD-4	0.46	\pm 0.04	971.83	\pm 42.25	<LOD	
SOD-5	1.85	\pm 0.01	2647.89	\pm 28.17	6.17	\pm 0.15
ED-1	1.58	\pm 0.02	3732.39	\pm 42.25	15.63	\pm 0.10
ED-2	5.19	\pm 0.10	4126.76	\pm 70.42	17.04	\pm 0.05
ED-3	0.57	\pm 0.10	2723.00	\pm 70.89	6.21	\pm 0.29
ED-4	2.16	\pm 0.04	3859.15	\pm 28.17	8.58	\pm 0.15
ED-5	0.49	\pm 0.02	2971.83	\pm 79.42	3.06	\pm 0.05
HT-1	4.74	\pm 0.18	4.00	\pm 0.40	6.55	\pm 0.05
HT-2	4.08	\pm 0.27	7.33	\pm 0.61	38.98	\pm 0.05
HT-3	0.40	\pm 0.01	9.20	\pm 0.40	7.91	\pm 0.05
HT-4	0.06	\pm 0.01	<LOD		5.08	\pm 0.06
HT-5	0.12	\pm 0.03	37.40	\pm 0.60	4.85	\pm 0.10
SD-1	0.53	\pm 0.03	2873.24	\pm 56.34	0.74	\pm 0.06
SD-2	0.11	\pm 0.02	3070.42	\pm 84.51	<LOD	
SD-3	0.58	\pm 0.06	4225.35	\pm 56.34	2.23	\pm 0.10
SD-4	0.38	\pm 0.01	3436.62	\pm 56.34	7.43	\pm 0.05
SD-5	1.76	\pm 0.05	2323.94	\pm 79.42	9.66	\pm 0.05
CM-1	0.38	\pm 0.01	21647.89	\pm 211.27	86.60	\pm 0.42
CM-2	0.74	\pm 0.02	14859.15	\pm 14.08	47.91	\pm 0.34
CM-3	0.76	\pm 0.28	14774.65	\pm 211.27	4.95	\pm 0.10
CM-4	1.80	\pm 0.03	32676.06	\pm 281.69	62.77	\pm 0.53
CM-5	1.69	\pm 0.03	19971.83	\pm 169.01	1.41	\pm 0.05
CP-1	3.57	\pm 0.17	51154.93	\pm 225.35	29.51	\pm 0.29
CP-2	5.09	\pm 0.16	78971.83	\pm 1478.87	54.08	\pm 0.39
CP-3	15.92	\pm 0.24	89478.87	\pm 70.42	167.86	\pm 0.49
CP-4	19.97	\pm 0.17	38873.24	\pm 647.89	228.88	\pm 1.60
CP-5	9.23	\pm 0.28	28746.48	\pm 1450.70	103.20	\pm 0.97

*(LOD) level of detail, (SOD) soft drinks, (ED) energy drinks, (HT) herbal teas, (SD) sport drinks, (CM) chocolate milks, (CP) coffee powder.

Table II. Descriptive statistics of polyphenols, flavonoids and FRAP results of the most consumed beverages from Lima.

BEVERAGES	Total polyphenols (mgGAE/100mL)		Total flavonoids ($\mu\text{g CE}(+)/100\text{mL}$)		FRAP ($\mu\text{moles Fe}^{+2}/100\text{mL}$)	
	Mean \pm	Standard deviation	Mean \pm	Standard deviation	Mean \pm	Standard deviation
Soft drinks	0.74 \pm	0.74	1628.17 \pm	963.82	1.95 \pm	2.82
Energy drinks	2.00 \pm	1.92	3482.63 \pm	603.53	10.10 \pm	6.04
Herbal Teas	1.88 \pm	2.32	11.59 \pm	14.85	12.67 \pm	14.76
Sport drinks	0.67 \pm	0.64	3185.91 \pm	706.64	4.01 \pm	4.29
Chocolate milks	1.07 \pm	0.63	20785.92 \pm	7315.11	40.73 \pm	36.97
Coffee powders	10.76 \pm	7.03	57445.07 \pm	25969.47	116.71 \pm	82.02

3.2. Results methylxanthines (CF, TB, TF) measurement

The content of CF, TB and TF obtained by the HPLC-DAD method (Fig. 1) in the different beverage samples are shown in Table III. Also, between the declared and determined values of these methylxanthines in the analysis of the beverages by HPLC-DAD.

3.2.1. Soft drinks and Energy drinks

Both groups had no detectable amounts of theobromine or theophylline. This group was characterized by caffeine as the most predominant methylxanthine. The mean content of caffeine in soft drinks was 7.20 ± 0.02 mg/L, with the lowest value in the SOD-3 sample with 0.54 ± 0.01 mg/L and the highest value in the SOD-2 sample with 16.68 ± 0.01 mg/L. Energy drinks presented mean caffeine content of 57.26 ± 0.73 mg/L, almost 8 times more than the soft drinks analyzed. In comparison with a study in Serbia (4), where energy drinks, with a minimum value of 237 mg/L and a maximum of 348.7 mg/L, have 2 to 3 times more caffeine content than soft drinks with a minimum value of 106.7 mg/L and a maximum of

119.1 mg/L. Therefore, although the ratio of caffeine content between energy drinks and soft drinks seems to be higher in this study, their values are lower.

According to some researchers (28), caffeine is one of the most widely used psychoactive substances in the world, often used as an additive in soft drinks (29) and energy drinks (30).

On the other hand, most of the commercial brands analyzed in these categories do not declare the total caffeine content of their product. However, it is visible in the list of ingredients on the nutrition label.

Similarly, in both groups these amounts are below the lower limit of consumption, 400mg per day in a healthy adult (11, 12). However, it is emphasized that energy drinks (ED) are the second highest caffeine content group. And only two brands of the five energy drinks (ED) indicate in their nutritional labeling the amount of caffeine that their product contains. Therefore, it becomes important that the consumer has this information through the nutritional labeling of the product and knows how to handle it to control its consumption.

3.2.2. Herbal teas and Sport drinks

Both groups show the presence of only two identified methylxanthines, theobromine and caffeine. In the HT, the highest content identified was caffeine (0.47 ± 0.01 to 4.91 ± 0.05 mg/L). Being tea-based beverages, one would expect to find theophylline, as it is a characteristic and predominant compound in tea leaves (16) and some are marketed precisely because of the beneficial health properties of the tea leaf. However, there is no perceptible trace of this methylxanthine, according to De Paula Lima and Farah (31), it may be due to the fact that these infusion drinks are sweetened, which contributes to the dilution of

the tea solids and a higher content of soluble solids. In addition, many other factors could intervene in the variation of the properties of the product.

The results obtained are consistent with some research (4, 32 and 33), in which different beverages were evaluated, finding in ready-to-drink herbal teas a high content of caffeine and in some samples also of theobromine.

In sports drinks (SD), since that their composition is basically carbohydrates and electrolytes (19), and that their nutritional labeling does not indicate or allude to any ingredient containing caffeine, theobromine or theophylline, they should not present significant values of these methylxanthines. According to the results obtained, a very low trace of only two methylxanthines, caffeine (0.03 ± 0.01 to 0.05 ± 0.01 mg/L) and theobromine (0.48 ± 0.01 to 6.00 ± 0.02 mg/L), almost undetectable values, were found. Thus, their content is confirmed and validated as expected.

3.2.3. Chocolate milks

The chocolate milk (CM) is a mixture based on milk, sucrose, cocoa and/or cocoa powder (21), being the cocoa the ingredient that gives that denomination to be a chocolate milk. Moreover, given the attribution of benefits provided by cocoa, according to researchers (34), it is highlighted that it is rich in two methylxanthines, predominantly theobromine and then caffeine.

In the five commercial brands of chocolate milk evaluated (Table IV), theobromine was identified in greater quantity (5.45 ± 0.01 mg/L) followed by caffeine (5.11 ± 0.01 mg/L). According to two studies, one carried out in Serbia (4) and the other in Spain (35), the chocolate milks that evaluated had an average theobromine content of 225.8 mg/L and 205.7 mg/L; and an average caffeine content of 5.6 mg/L and 18.4 mg/L, respectively. Thus, the same two methylxanthines

(theobromine and caffeine) can be identified in the same way. However, their values are much higher than those found in the beverages analyzed in this research.

On the other hand, as can be seen in Table III, there is a quite wide difference in the level of theobromine between one of the brands of chocolate milk (CM-5), compared to the others analyzed.

The CM-5 sample has from two to four times more theobromine than the other brands of chocolate milk. According to its nutritional labelling, the CM-5 brand of chocolate milk shows cocoa in second place in its list of ingredients, while in the other brands cocoa appears as the third ingredient. This indicates a difference in the concentration or amount of this ingredient that they incorporate in their drinks, probably causing this wide difference in the theobromine level of their products, as can be seen in the results (Table III).

Therefore, considering this evidence in the results, it is important to understand and know what we are consuming from the products.

3.2.4. Coffee powder

One of the six beverage groups evaluated, in which the three types of methylxanthines (CF, TB and TF) were identified, having the highest level of caffeine ($4629.26 \pm 1.20\text{mg/L}$) compared to the other groups.

The coffee bean is the main source of obtaining caffeine (22), and the main ingredient of the samples evaluated, which corroborates these results found. However, there is a variation in the level of caffeine in each of the five samples studied. This may be due to the variety used by each brand (35) among other factors within its treatment in the process of obtaining this product.

As can be seen, there are two samples of coffee powder (CP-3 and CP-4), which have the highest level of caffeine (9644.0 ± 4.93 and 7781.9 ± 0.61 mg/L, respectively) in comparison to the others. This means that, in this case, considering the highest level of caffeine (9644.0 ± 4.93 mg/L) of the coffee powder sample, a person would be consuming approximately 19.29 mg of caffeine per cup, provided that only 2g of coffee powder is added, as suggested in the nutritional labels of these products. This does not exceed the limit found in several studies (11, 12), where they indicate that an intake of up to 400 mg/day is not associated with adverse health effects. Considering only for this conclusion, one cup per day with that amount of 2g of coffee powder.

Although some people choose to consume this drink for its characteristics and obtain a benefit or simple taste, it must be remembered that an excess is related to negative effects such as hypertension, insomnia, constant agitation, headaches and anxiety (7).

Furthermore, if they are people sensitive to caffeine or non-regular consumers or have a health problem in which caffeine interferes or aggravates their symptoms (31), more care should be taken to limit or restrict their consumption.

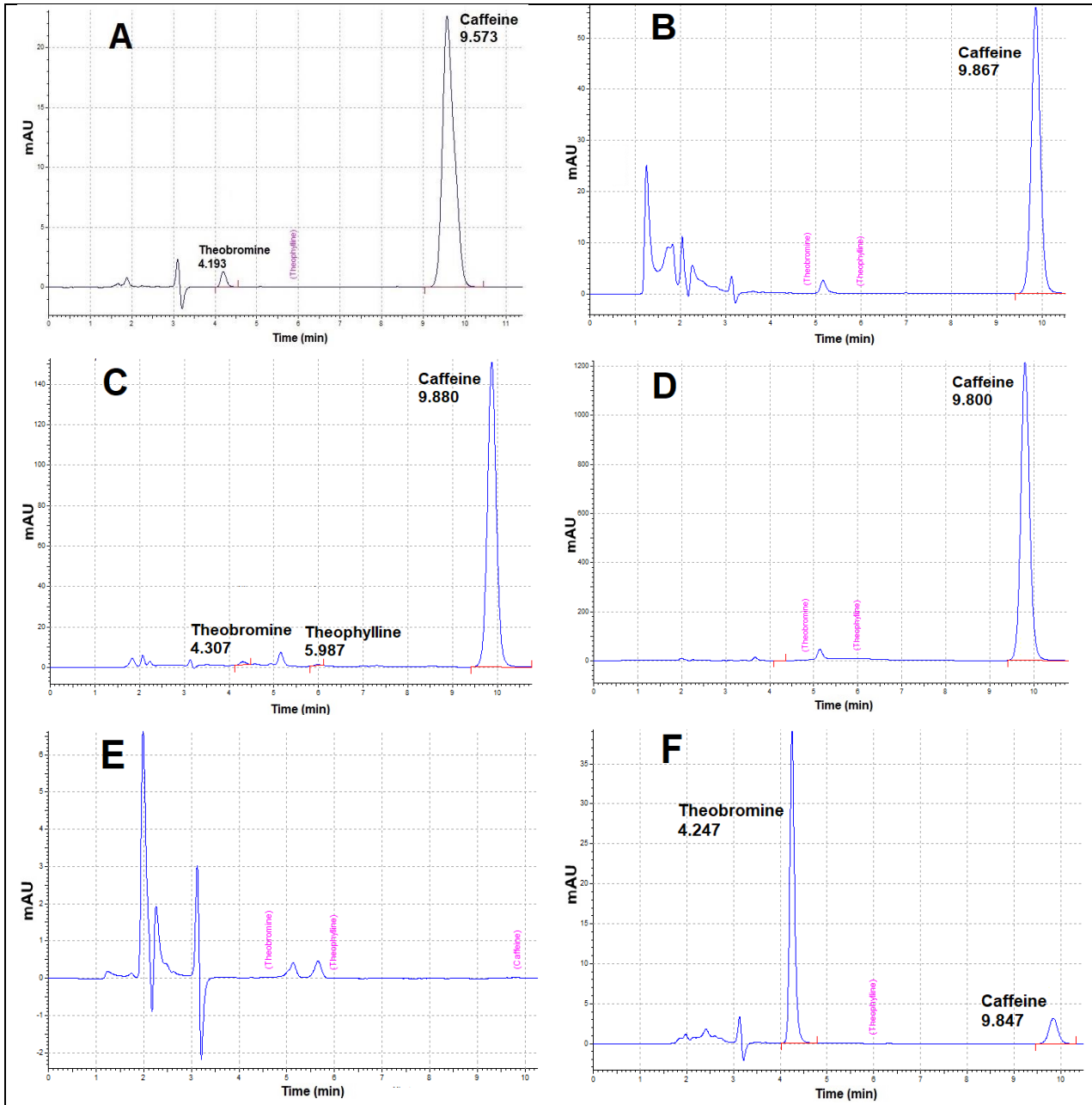


Figure 1. Chromatograms of some real samples by HPLC-DAD: (A) HT-3, (B) SOD-5, (C) CP-1, (D) ED-2, (E) SD-4, (F) CM-5.

Table III. Applications results for most consumed beverages in Lima by HPLC-DAD*							
Beverage samples	Found values			Declared values			
	TB (mg/L)	TF (mg/L)	CF (mg/L)	TB (mg/L)	TF (mg/L)	CF (mg/L)	
SOD-1	<LOD	<LOD	9.34 ± 0.02	n.d	n.d	n.d	
SOD-2	<LOD	<LOD	16.68 ± 0.01	n.d	n.d	n.d	
SOD-3	<LOD	<LOD	0.54 ± 0.01	n.d	n.d	n.d	
SOD-4	<LOD	<LOD	4.63 ± 0.02	n.d	n.d	n.d	
SOD-5	<LOD	<LOD	4.82 ± 0.06	n.d	n.d	n.d	
ED-1	1.17 ± 0.09	<LOD	20.38 ± 0.12	n.d	n.d	n.d	
ED-2	<LOD	<LOD	95.50 ± 3.48	n.d	n.d	≤320	
ED-3	<LOD	<LOD	73.45 ± 0.02	n.d	n.d	n.d	
ED-4	<LOD	<LOD	10.38 ± 0.01	n.d	n.d	≤200	
ED-5	<LOD	<LOD	86.58 ± 0.04	n.d	n.d	n.d	
HT-1	0.31 ± 0.01	0.17 ± 0.01	4.91 ± 0.05	n.d	n.d	n.d	
HT-2	3.64 ± 0.58	<LOD	2.21 ± 0.08	n.d	n.d	n.d	
HT-3	0.07 ± 0.01	<LOD	1.70 ± 0.01	n.d	n.d	n.d	
HT-4	0.03 ± 0.01	<LOD	0.47 ± 0.01	n.d	n.d	n.d	
HT-5	0.09 ± 0.01	<LOD	2.96 ± 0.01	n.d	n.d	n.d	
SD-1	0.05 ± 0.01	<LOD	6.00 ± 0.02	n.d	n.d	n.d	
SD-2	0.03 ± 0.01	<LOD	0.75 ± 0.01	n.d	n.d	n.d	
SD-3	0.04 ± 0.01	<LOD	0.84 ± 0.01	n.d	n.d	n.d	
SD-4	<LOD	<LOD	<LOD	n.d	n.d	n.d	
SD-5	<LOD	<LOD	0.48 ± 0.01	n.d	n.d	n.d	
CM-1	2.92 ± 0.01	<LOD	4.71 ± 0.01	n.d	n.d	n.d	
CM-2	6.43 ± 0.01	<LOD	5.70 ± 0.01	n.d	n.d	n.d	
CM-3	3.96 ± 0.01	<LOD	5.37 ± 0.01	n.d	n.d	n.d	
CM-4	1.70 ± 0.01	<LOD	4.09 ± 0.01	n.d	n.d	n.d	
CM-5	12.24 ± 0.01	<LOD	5.69 ± 0.01	n.d	n.d	n.d	
CP-1	4.50 ± 0.01	7.90 ± 0.01	492.50 ± 0.24	n.d	n.d	n.d	
CP-2	3.00 ± 0.01	9.50 ± 0.01	1330.00 ± 0.07	n.d	n.d	n.d	
CP-3	8.30 ± 0.07	8.70 ± 0.01	9644.00 ± 4.93	n.d	n.d	n.d	
CP-4	8.00 ± 0.01	8.70 ± 0.03	7781.90 ± 0.61	n.d	n.d	n.d	
CP-5	5.80 ± 0.02	<LOD	3897.90 ± 0.13	n.d	n.d	n.d	

*(TB) theobromine, (TF) theophylline, (CF) caffeine, (n.d) not declared, (LOD) level of detail, (SOD) soft drinks, (ED) energy drinks, (HT) herbal teas, (SD) sport drinks, (CM) chocolate milks, (CP) coffee powder.

Table IV. Descriptive statistics of the results of the most consumed beverages in Lima by HPLC-DAD*.									
Beverages	Theobromine (mg/L)			Theophylline (mg/L)			Caffeine (mg/L)		
	Mean	±	Standard deviation	Mean	±	Standard deviation	Mean	±	Standard deviation
Soft drinks			<LOD			<LOD	7.20	±	6.15
Energy drinks	0.23	±	0.52			<LOD	57.26	±	39.19
Herbal teas	0.83	±	1.58	0.03	±	0.08	2.45	±	1.65
Sport drinks	0.02	±	0.02			<LOD	1.61	±	2.47
Chocolate milks	5.45	±	4.18			<LOD	5.11	±	0.70
Coffee powders	5.92	±	2.27	6.96	±	3.93	4629.26	±	3988.09
*(LOD) level of detail.									

4. Conclusions

The results obtained in this study provide reliable information on the composition and quantification of methylxanthines in the most consumed beverages in Lima, using the HPLC-DAD method.

Coffee powders predominated as the group with the highest antioxidant activity according to the tests carried out. Similarly, it was the group with the highest level of caffeine, which was to be expected since its main active ingredient is the coffee bean.

Theobromine was found predominantly in the group of chocolate milks analyzed. Although the theophylline is mainly found in the tea leaf, there is no detectable or significant value within the group of ready-to-drink herbal teas, and little antioxidant activity is identified. This may be analyzed in future research.

In general, it was observed that caffeine is one of the bioactive compounds present in each of the groups of beverages analyzed,

Therefore, it is a fundamental step to promote the inclusion of this data in the nutritional label of the products. Also, to consolidate this information in a clear and understandable way among consumers, improving the nutritional education of the population and favoring in the purchase decisions.

Acknowledgment

This study was funded by the Universidad Científica del Sur through the Concurso de Fondos para Proyecto de Tesis (N°148-2019-PRE17).

References

1. Horžić D, Komes D, Belščak A, Kovačević K, Iveković D, Karlović D. The composition of polyphenols and methylxanthines in teas and herbal infusions. *Food Chemistry*. 2009; 115 (2):441-448.
2. Martínez-López S, Sarriá B, Gómez-Juaristi M, Goya L, Mateos R, Bravo-Clemente L. Theobromine, caffeine, and theophylline metabolites in human plasma and urine after consumption of soluble cocoa products with different methylxanthine contents. *Food Research International*. 2014; 63 (Part C): 446-455.
3. Monteiro J, Alves M, Oliveira P, Silva B. Structure-bioactivity relationships of methylxanthines: Trying to make sense of all the promises and the drawbacks. *Molecules*. 2016; 21(8): 974.
4. Srdjenovic B, Djordjevic-Milic V, Grujic N, Injac R, Lepojevic Z. Simultaneous HPLC Determination of caffeine, theobromine, and theophylline in food, drinks, and herbal products. *Journal of Chromatographic Science*. 2008; 46 (2): 144-149.
5. Rodriguez A, Costa-Bauza A, Saez-Torres C, Rodrigo D, Grases F. HPLC method for urinary theobromine determination: Effect of consumption of cocoa products on theobromine urinary excretion in children. *Clinical Biochemistry*. 2015; 48 (16-17): 1138-1143.
6. De Sena A, De Assis S, Branco A. Analysis of theobromine and related compounds by reversed phase high-performance liquid chromatography with Ultraviolet Detection: An Update (1992-2011). *Food Technol. Biotechnol*. 2011; 49 (4): 413-423.

7. Gonzalez E, Vinicio M. Impact of caffeine and coffee on our health. Trends in Endocrinology and Metabolism. 2014; 25 (10): 489-492.
8. Olas B, Brys M. Effects of coffee, energy drinks and their components on hemostasis: The hypothetical mechanisms of their action. Food and chemical toxicology. 2019; 127: 31-41.
9. Barreda-Abascal R, Molina L, Haro-Valencia R, Alford C, Verster J. Actualización sobre los efectos de la cafeína y su perfil de seguridad en alimentos y bebidas. Revista Médica del Hospital General de México. 2012; 75 (1): 60-67.
10. Ikram M, Park T, Ali T, Kim M. Antioxidant and neuroprotective Effects of Caffeine against Alzheimer's and Parkinson's Disease: Insight into the Role of Nrf-2 and A2AR Signaling. Antioxidants. 2020; 9: 902.
11. Nawrot P, Jordan S, Eastwood J, et al. Effects of caffeine on human health. Food additives and Contaminants. 2003; 20 (1): 1-30.
12. FDA: How much caffeine is too much? [Internet]. USA: Food & Drug Administration; 2018 [cited 2020 March 29]. Available from: <https://www.fda.gov/consumers/consumer-updates/spilling-beans-how-much-caffeine-too-much>
13. Martínez-Pinilla E, Oñatibia-Astibia A, Franco R. The relevance of theobromine for the beneficial effects of cocoa consumption. Frontiers in Pharmacology. 2015; 30 (6).
14. Neufingerl N, Zebregs Y, Schuring E, Trautwein E. Effect of cocoa and theobromine consumption on serum HDL-cholesterol concentrations: a randomized controlled trial. The American Journal of Clinical Nutrition. 2013; 97: 1201-1209.

15. Dolder L, DVM. Methylxanthines: Caffeine, Theobromine, Theophylline.
En: Peterson M, Talcott P, editors. Small Animal Toxicology (third edition).
Washington US: Elsevier; 2013. p. 647-652.
16. Corey S, Halmer T, Morgan J, Rissmiller B, et al. Theophylline toxicity: An
old poisoning for a new generation of physicians. 2018; 18: 37-39.
17. Mintel. Tendencias Mundiales en Alimentos y bebidas para 2018. Mintel;
2018. Available from:
<https://www.siicex.gob.pe/siicex/documentosportal/alertas/documento/doc/277698773rad83597.pdf>
18. Román A. Infusiones heladas como bebidas alternativas en el mercado
nacional. Perú: Universidad de Piura; 2003. Available from:
https://pirhua.udep.edu.pe/bitstream/handle/11042/1215/ING_401.pdf?sequence=1
19. Simulescu V, Ilia G, Macarie L, Merghes P. Sport and energy drinks
consumption before, during and after training. Science & Sport. 2019; 34
(1): 3-9.
20. Yanes M, Durán L, Costell E. Rheological and optical properties of
commercial chocolate milk beverages. Journal of Food Engineering. 2002;
51: 229-234.
21. Ashurst P. Carbonated Beverages. UK: Reference Module in Food
Science; 2016. Available from: <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.03240-6>
22. Scalese M, Denoth F, Siciliano V, Bastiani L, Cotichini R, Cutilli A, Molinaro
S. Energy Drink and Alcohol mixed Energy Drink use among high school

- adolescents: Association with risk taking behavior, social characteristics. Addictive Behaviors. 2017; 72: 93-99.
23. López E, Giner R. Chocolate, café, té y otros estimulantes: bebidas energéticas avant la lettre (I). Revista Española de Drogodependencias. 2013; 38 (4): 391-409.
24. Singleton V, Rossi J. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. American Journal of Enology and Viticulture. 1965; 16: 144-158.
25. Wolfe K, Liu R. Structure-Activity Relationship of Flavonoids in the Cellular Antioxidant Activity Assay. J Agric. Food Chem. 2008; 56 (18): 8404-8411.
26. Benzie I, Strain J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "Antioxidant power": The FRAP assay. Ana. Biochem. 1996; 239: 70 – 76.
27. Ishida K, Yamamoto M, Misawa K, et al. Coffee polyphenols prevent cognitive dysfunction and suppress amyloid β plaques in APP/PS2 transgenic mouse. Neuroscience Research. 2020; 154: 35-44.
28. Ramirez C, Osorio J. Using caffeine for physical exercise: advantages and risks. Rev. Fac. Med. 2013; 61: 459-468.
29. Keast R, Riddell L. Caffeine as a flavor additive in soft-drinks. Appetite. 2007; 49: 255-259.
30. McCusker R, Goldberger B, Cone E. Caffeine content of energy drinks, carbonated sodas, and other beverages. Journal of Analytical Toxicology. 2006; 30: 112-114.

31. De Paula Lima J, Farah A. Methylxanthines in stimulant foods and beverages commonly consumed in Brazil. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2019; 78: 75-85.
32. Nazri M, Abdul A, Hayati N. Quantification of methylxanthines (theobromine, theophylline and caffeine) in chocolate, tea and coffee-based beverages by HPLC. Malaysia: University of Malaysia Sabah; 2015.
33. Al-Obaidi H, Afzal M. Methylxanthine content in hot drinks consumed in the State of Kuwait. *Journal of Food, Agriculture & Environment*. 2010; 8 (1): 41-43.
34. Langer S, Marshall L, Day A and Morgan M. Flavanols and Methylxanthines in Commercially Available Dark Chocolate: A study of the correlation with Nonfat Cocoa Solids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2011; 59: 8435-8441.
35. Sanchez J. Methylxanthine content in commonly consumed foods in Spain and determination of its intake during consumption. *Foods*. 2017; 6 (109): 1-13.

ANEXOS

Anexo 1. Copia de carta de aprobación académica



Resolución Directoral Académica de Carrera N° 049-DACND-DAFCS-U.CIENTÍFICA-2019

Lima, 27 de agosto del 2019

VISTO:

El informe de revisión independiente académica y la aprobación de un Comité de Ética del proyecto de tesis titulado: **“ANÁLISIS DEL CONTENIDO DE CAFEÍNA, TEOBROMINA Y TEOFILINA EN BEBIDAS COMUNMENTE COMERCIALIZADAS EN LIMA”**, presentado por la Bachiller **Karolinhe Alicia Gonzales Yépez** con código No. 100012126.

CONSIDERANDO:

Que, de acuerdo al Reglamento General de la Universidad Científica del Sur y los reglamentos de pregrado para obtener para obtener el título profesional de Licenciada en Nutrición y Dietética en la Facultad de Ciencias de la Salud, se debe desarrollar un trabajo de investigación.

Que, de acuerdo a la normativa vigente de la Universidad Científica del Sur, en uso de las atribuciones conferidas al Director Académico de la Carrera.

SE RESUELVE:

- ART. 1°** Aprobar e inscribir el proyecto de tesis titulado: **“ANÁLISIS DEL CONTENIDO DE CAFEÍNA, TEOBROMINA Y TEOFILINA EN BEBIDAS COMUNMENTE COMERCIALIZADAS EN LIMA”**, con N° de registro: 148-2019-PRE17 Y establecer el inicio del periodo de ejecución del mencionado proyecto.
- ART. 2°** Nombrar al **Mg. Oscar Reategui Arevalo**, como asesor para el desarrollo de la tesis en cuestión.

Regístrese, comuníquese y archívese.



Dra. MSc. Faviola Jiménez Ramos
Directora Académica
Carrera de Nutrición y Dietética

gmc.

[Faint handwritten signatures and marks at the bottom left of the page]

Anexo 2. Copia de documento de aprobación de comité de ética

COMITÉ INSTITUCIONAL DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN

CIENTÍFICA
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

CONSTANCIA N° 128 -CIEI-CIENTÍFICA-2019

El presidente del Comité Institucional de Ética en Investigación de la Universidad Científica del Sur (CIEI-CIENTÍFICA) da constancia que el proyecto de investigación, cuyos datos se registran a continuación, ha sido **aprobado** por el CIEI-CIENTÍFICA.

Código de registro: **148-2019-PRE17**
 Título: **Análisis del contenido de cafeína, teobromina y teofilina en bebidas comúnmente comercializadas en Lima**
 Investigador(a): **Karolinhe Alicia Gonzales Yépez**

La aprobación del proyecto de investigación implica que el documento presentado a evaluación cumple con los lineamientos de Universidad en materia de investigación y ética, los cuales se sustentan en la normativa internacional vigente.

En tal sentido, esta aprobación carecerá de valor si es que el proyecto de investigación arriba indicado es modificado de cualquier forma. Toda enmienda, añadido, eliminación o eventualidad (eventos adversos, etc.) posterior a la fecha de aprobación debe ser reportado al CIEI-CIENTÍFICA.

La vigencia de la aprobación de este documento es de dieciocho (18) meses (**hasta el 17 de diciembre del 2020**), periodo en el que puede desarrollarse el proyecto. Cualquier trámite para su renovación deberá ser enviado antes del término de la vigencia de este documento, debiendo suspenderse todo desarrollo hasta que la renovación sea aprobada.

Villa El Salvador, 18 de junio de 2019




Méd. Fernando M. Runzer Colmenares
 Presidente
 Comité Institucional de Ética en Investigación

Anexo 3. Copia de resolución de aprobación del proyecto de tesis

UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

Lima, 08 de mayo de 2019

Señorita tesista,

Karolinhe Alicia Gonzales Yépez

Presente. -

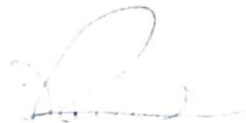
De mi consideración,

Es muy grato dirigirme a usted para indicarle que su proyecto de tesis titulado: "Análisis del contenido de cafeína, teobromina y teofilina en bebidas comúnmente comercializadas en Lima", con N° de registro: N° 148-2019-PRE17, ha sido revisado por la Dirección Académica de la carrera de Nutrición y Dietética y se concluye que el proyecto ha sido:

Aprobado (X) Desaprobado () Requiere solucionar observaciones ()




Es propicia la ocasión para reiterarle mi estima y consideración personal.




Atentamente,



Daniel E. Chávez Bocanegra
Coordinador de investigación Carrera
profesional de Carrera de Nutrición y
Dietética

Anexo 4. Instrumentos usados en la investigación

<p>1. Dispensador de Agua Ultra Pura</p>	
<p>2. HPLC-DAD Hitachi</p>	
<p>3. Agitador y calentador</p>	

<p>4. Bomba SPE</p>	
<p>5. Balanza digital</p>	
<p>6. Espectrofotómetro</p>	

Anexo 5. Encuesta de preferencia de consumo de bebidas por consumidores de Lima Metropolitana

CONSUMO DE BEBIDAS COMERCIALES EN LIMA

GRUPO 1: BEBIDAS CARBONATADAS

Se hace referencias a "Gaseosas"

¿Con qué frecuencia (días) consumes gaseosas? *

5 a más

3-4

1-2

Nada

Menciona 5 marcas más populares que conozcas y/o consumas de gaseosas *

Texto de respuesta largo

GRUPO 2: BEBIDAS A BASE DE INFUSIÓN

Se hace referencias a bebidas comerciales de té o cualquier infusión de marcas comerciales.

¿Con qué frecuencia (días) consumes bebidas de infusión/té comerciales? *

5 a más

3-4

1-2

Menciona 5 marcas más populares que conozcas y/o consumas *

Texto de respuesta largo

GRUPO 3: BEBIDAS ENERGIZANTES

¿Con qué frecuencia (días) consumes bebidas energizantes? *

5 a más

3-4

1-2

Nada

Menciona 5 marcas más populares que conozcas y/o consumas *

Texto de respuesta largo

GRUPO 4: BEBIDAS REHIDRATANTES

¿Con qué frecuencia (días) consumes bebidas rehidratantes? *

- 5 a más
- 3-4
- 1-2
- Nada

Menciona 5 marcas más populares que conozcas y/o consumas *

Texto de respuesta largo

GRUPO 5: BEBIDAS DE CAFÉ

Se hace referencia a bebidas calientes o frías, de marcas de café (instantáneo)

¿Con qué frecuencia (días) consumes estas bebidas? *

- 5 a más
- 3-4
- 1-2
- Nada

Menciona 5 marcas más populares que conozcas y/o consumas *

Texto de respuesta largo

GRUPO 6: BEBIDAS/LECHES CHOCOLATADAS

¿Con qué frecuencia (días) consumes bebidas/leches chocolatadas? *

- 5 a más
- 3-4
- 1-2
- Nada

Menciona 5 marcas más populares que conozcas y/o consumas *

Texto de respuesta largo

Análisis del contenido de cafeína, teobromina y teofilina por HPLC-DAD en bebidas comúnmente comercializadas en Lima-Perú

Karolinhe A. Gonzales¹

¹Carrera de Nutrición y Dietética, Universidad Científica del Sur, Lima, Perú

1. Introducción

En las últimas décadas, los investigadores han prestado especial atención a los ingredientes biológicamente activos, en particular a los alcaloides de las bebidas por sus posibles efectos positivos sobre la salud humana (1). Uno de esos alcaloides son las metilxantinas, compuestos comúnmente presentes en los alimentos (2). Montero et al (3), señalaron que estos compuestos son producidos naturalmente tanto por animales como por plantas, siendo la cafeína (CF), la teobromina (TB) y la teofilina (TF) los más estudiados. Estos compuestos se encuentran principalmente en alimentos como los granos de café, los granos de cacao y las hojas de té (4).

Estas tres metilxantinas son químicamente muy similares (5). Según De Sena et al. (6), comparten efectos estimulantes sobre el sistema nervioso central, así como sobre otros sistemas como el gastrointestinal, cardiovascular, renal y respiratorio.

La cafeína, por ejemplo, una de las sustancias más conocidas y estudiadas, tiene un efecto estimulante sobre el sistema nervioso central, aumentando el estado de alerta, mejorando la memoria a largo plazo y la concentración, así como puede mejorar el rendimiento físico en los deportistas (7, 8 y 9). Incluso existe un debate sobre los efectos neuro-protectores contra ciertos tipos de enfermedades degenerativas como el Alzheimer y el Parkinson (10).

Según los datos revisados por científicos canadienses (11), concluyeron que, para la población adulta sana, una ingesta diaria moderada de cafeína de hasta 400 mg al día no se asocia con efectos adversos para la salud. Asimismo, la FDA (Food and Drug Administration) indicó como dosis segura hasta 400 mg de cafeína al día en la población adulta sana, variando según la sensibilidad de la persona o grupo vulnerable (embarazadas o en periodo de lactancia o con alguna condición especial de salud) (12). Sin embargo, un consumo excesivo puede estar relacionado con la hipertensión, la ansiedad, la hiperactividad y los dolores de cabeza (7).

La teobromina, presente en altas concentraciones en el cacao, no ha sido tan estudiada (13). Según Martínez-Pinilla, los principales mecanismos de acción son la inhibición de las fosfodiesterasas y el bloqueo de los receptores de adenosina (13). Otro estudio clínico sugiere que la teobromina podría ser el principal componente activo del cacao responsable del efecto de aumentar el colesterol HDL (14). En cuanto a su dosis diaria segura o letal, no existe información específica y/o concluyente.

Y la teofilina, que tiene propiedades farmacológicas y toxicológicas similares a las de la cafeína (2). Según Dolder (15), puede encontrarse principalmente en el té, y en la medicación para el asma utilizada como broncodilatador. Aunque no hay información precisa sobre una dosis recomendada, Corey et al. (16) señalan que un consumo inadecuado puede provocar efectos tóxicos, pudiendo causar taquicardia, hipertensión, náuseas, vómitos, diarrea.

Últimamente, se ha logrado observar que hay un mayor alcance y acceso a una enorme variedad de alimentos y productos (17), como el grupo de las bebidas (listas para beber, café en polvo, refrescos, bebidas energéticas, bebidas

deportivas, infusiones). Productos que se comercializan habitualmente en nuestra localidad, la mayoría de los cuales en su etiquetado nutricional no indican con certeza su concentración en determinados compuestos que contienen. Por tanto, esta información suele ser desconocida por el público consumidor.

Por ello, el objetivo de este estudio fue determinar el contenido de cafeína, teobromina y teofilina por HPLC-DAD y la capacidad antioxidante en bebidas comúnmente comercializadas en Lima.

2. Material y métodos

2.1. Reactivos

Todos los disolventes y reactivos eran de grado analítico con agua desionizada (calidad Mili-Q) (4). Los estándares de cafeína, teobromina y teofilina se compraron a Sigma-Aldrech (Merck Peruana, Lima). El acetonitrilo y el metanol (Grado HPLC) también se obtuvieron de Sigma-Aldrech (Merck Peruana, Lima).

2.2. Muestras

Las muestras se dividieron en seis grupos: bebidas a base de té (BT), bebidas rehidratantes (RH), leches chocolatadas (LC), gaseosas (G), bebidas energizantes (BE) y café en polvo (CP). Cada uno con las cinco bebidas de mayor preferencia y/o consumo, obtenidas por muestreo no probabilístico de conveniencia, a partir de una encuesta a consumidores de Lima (Anexo 5). Las muestras se obtuvieron a través de su compra en tres supermercados de Lima Metropolitana. Asimismo, se revisaron los etiquetados nutricionales de cada muestra analizada para corroborar su composición declarada.

En el caso de las bebidas a base de té, se trata de bebidas frías listas para tomar que se comercializan como infusiones con un valor añadido (por ejemplo,

sabores frutales o propiedades diversas), que pueden ser muy apreciadas por cierto sector del mercado nacional e internacional (18).

Las bebidas rehidratantes, aportan hidratos de carbono, electrolitos y líquidos al organismo, ayudando a su hidratación antes, durante y después de la actividad física (19).

Las leches chocolatadas, son una mezcla a base de leche, sacarosa, cacao y/o cacao en polvo y algunos hidrocoloides, que se añaden para mejorar la consistencia y evitar la sedimentación de las partículas de cacao (20).

Por otro lado, las gaseosas son bebidas aromatizadas, que se producen añadiendo gas CO₂ directamente a la bebida, diluido con sacarosa, y dependiendo de la bebida pueden contener o no cafeína (21).

Las bebidas energizantes se utilizan para proporcionar una explosión extra de energía, así como para promover la vigilia, aumentar la capacidad de atención, mantener el estado de alerta y mejorar el rendimiento deportivo (22).

En el caso del café en polvo, es una bebida preparada con granos de café en forma de polvo (23), teniendo la cafeína como su principal compuesto. Todas las muestras de café en polvo fueron preparadas.

Para esta investigación, no hubo muestras endulzadas con edulcorantes no calóricos.

2.3. Medición de Polifenoles totales

El contenido de los compuestos fenólicos totales se determinó según Singleton y Rossi (24). Brevemente, se mezcló 1 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu al 10% con 0.1 mL de la muestra durante 5 minutos a temperatura ambiente, luego se añadió 1 mL de carbonato de sodio al 5% y la mezcla se colocó en un baño de agua a 45°C durante 15 minutos. Todas las muestras fueron analizadas por

triplicado. La absorbancia se leyó en un espectrofotómetro a 725 nm. Los resultados se expresaron en mg de ácido gálico equivalente/100mL de muestra o mg AGE/100mL muestra).

2.4. Medición de Flavonoides totales

La medición del total de flavonoides se realizó según Wolfe et al. (25). A 0.250 mL de muestra se añadieron 0.075 mL de nitrito de sodio al 5% y se dejó reaccionar durante 5 minutos, luego se añadieron 0.150 mL de cloruro de aluminio, y la mezcla pudo mantenerse durante 5 minutos. Finalmente, se añadieron 0.275 mL de hidróxido de sodio (1 M) a la mezcla y se dejó reaccionar durante 15 minutos. Todas las muestras fueron analizadas por triplicado. La lectura se realizó a 510 nm en un espectrofotómetro. Los resultados se expresaron en μg de equivalente de catequina/100mL de muestra ($\mu\text{g CE}/100\text{mL}$ muestra).

2.5. Capacidad antioxidante (FRAP)

La actividad antioxidante evaluada por el ensayo FRAP se realizó según la metodología propuesta por Benzie y Strain (26). Brevemente, se añadió 1 mL de agua destilada y 1 mL del reactivo FRAP a 0.1 mL de muestra, se colocó la mezcla en un baño de agua a 37 °C y se dejó reaccionar durante 10 min. La lectura se hizo en un espectrofotómetro (Pharo 300, Spectroquant, USA) a 593 nm. Se preparó una curva estándar utilizando diferentes concentraciones de Fe^{2+} que oscilaban entre 15 y 75 mM. Todas las muestras fueron analizadas por triplicado. Los resultados se expresaron en $\mu\text{M Fe}^{2+}/100\text{mL}$ de muestra ($\mu\text{M Fe}^{2+}/100\text{mL}$ muestra).

2.6. Condiciones cromatográficas

Los análisis de cafeína, teobromina y teofilina con HPLC se realizaron según Srdjenovic et al. (4), con ligeras modificaciones. En resumen, se empleó el sistema de HPLC, Chromaster 600, marca VWR Hitachi, con un detector de red de diodos (DAD CM 5430), un autosampler y una columna STAR RP-8 de purificación de fase inversa (tamaño de las partículas de 5 μm , es decir, 4.6 x 150 mm) en modo de elución isocrática con la fase móvil agua-THF(A) (0.1% THF en agua, pH 8)-acetonitrilo (B) (90:10, v/v). El pH se ajustó con 0.1 M de NaOH. La fase móvil y todas las soluciones fueron filtradas (filtro de nylon Millipore de 0.45- μm x 47mm), y el tiempo de funcionamiento fue de 5 minutos, con un flujo de 0.8 mL/min. La temperatura de la columna de 25°C y los analitos se detectaron a 273nm. Todas las muestras se analizaron por triplicado.

2.7. Preparación de la muestra

Las bebidas a base de té y las bebidas rehidratantes fueron filtradas a través de un filtro de nylon de 0.22 μm . Diez mililitros del filtrado, se ajustaron a pH 8 con 0.1 M de NaOH (4).

Las leches chocolatadas (25mL), que contenían partículas en suspensión, se procedieron a llenar hasta 200mL con agua en un recipiente separado y se extrajeron por baño de ultrasonido durante 30 minutos a 60 °C. La muestra extraída se filtró a través de un papel de filtro para eliminar los sólidos. Luego, 10 mL del filtrado se ajustaron a pH 8 con una solución de NaOH de 0.1M (4).

Las muestras de gaseosas y bebidas energizantes se desgasificaron durante 15 minutos para liberar CO₂. Antes del análisis, las muestras se ajustaron a pH 8 con una solución de NaOH 0.1M y se filtraron a través de un filtro de nylon Millipore Millex-GN de 0.22- μm x 33mm.

Las muestras de café en polvo se pesaron (5 g) y se extrajeron con agua caliente (200 mL), se mezclaron en un matraz térmico durante 5 minutos en el agitador magnético (4). Luego, se filtraron los extractos y se ajustaron 10 mL del filtrado a pH 8 con 0.1 M de NaOH.

2.8. Proceso de limpieza (Cleanup)

De acuerdo a Srdjenovic et al. (4), los cartuchos Supelclean LC-18 SPE fueron acondicionados con 2 x 6 mL de metanol, seguidos de 2 x 6 mL de agua desionizada ultrapura. Los extractos de cada muestra se pasaron luego por los cartuchos SPE, seguidos de un lavado con 6 mL de agua desionizada ultrapura. Se secaron al vacío durante 10 minutos y los fluidos se desecharon. Por último, la CF, TB y TF se extrajeron de los cartuchos SPE con 10 mL de cloroformo. La solución se evaporó hasta que se secó. El residuo de todas las muestras se reconstituyó en 1 mL de agua con pH 8, a excepción de las leches chocolatadas, que se reconstituyó en 2 mL. Las muestras se filtraron a través de un filtro de nylon de 0.22 μm y se inyectaron en el HPLC (4).

2.9. Análisis estadístico

Los resultados de cada análisis fueron presentados en tablas y los análisis estadísticos de cada prueba se presentaron como “media \pm desviación estándar (DS)”, empleando el programa SPSS versión 22 para Windows (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA).

3. Resultados y discusión

3.1. Compuestos bioactivos y capacidad antioxidante

El contenido total de polifenoles, el contenido total de flavonoides y el FRAP de los seis grupos de bebidas se presentan en la Tabla I. Como se puede observar, el contenido de polifenoles totales en las bebidas varía según el grupo. Disminuye, según los resultados encontrados, en el siguiente orden CP > BE > BT > LC > G > RH (Tabla II). Esto se debe a que el café contiene numerosos compuestos fenólicos, de 3.57 ± 0.17 a 19.97 ± 0.17 mg AGE/100mL, en comparación con las otras muestras estudiadas. De hecho, al ácido clorogénico se le atribuyen más beneficios potenciales del café, que ha demostrado contribuir a la prevención de la disfunción cognitiva inducida por la enfermedad de Alzheimer (27).

Sin embargo, se puede observar que, en el grupo de bebidas de té se encontró una notable diferencia en el contenido de polifenoles entre las infusiones a base de té negro (BT-3, 4 y 5) con 0.06 ± 0.01 a 0.40 ± 0.01 mg GAE/100mL, y té verde (BT-1 y BT-2) con 4.08 ± 0.27 a 4.74 ± 0.18 mg GAE/100mL. De acuerdo con Horžić et al. (1), el té verde es la fuente más rica en fenoles totales.

En los resultados del contenido total de flavonoides, se encontró que el café en polvo (CP) y las leches chocolatadas (LC) presentaron los niveles más altos de concentración en estos resultados (Tabla II) con 57445.07 ± 774.65 μ g CE(+)/100mL y 20785.92 ± 177.46 μ g CE(+)/100mL respectivamente, en comparación con los otros grupos.

Además, según los resultados, el grupo con menor contenido de flavonoides fue el de las bebidas de té. No existen estudios similares que comparen estos grupos de bebidas como para establecer un factor que explique por qué las infusiones

tienen menor contenido de flavonoides. Por otra parte, dentro de este grupo de bebidas de té, es concebible que el contenido de catequinas pueda variar según la variedad de té, el origen, el momento de la cosecha y la exposición al sol (1), que serían factores a tener en cuenta en futuras investigaciones.

Además, para el FRAP, se puede observar que el café en polvo (CP) tiene una alta capacidad antioxidante, 29.51 ± 0.29 a 228.88 ± 1.60 $\mu\text{moles Fe}^{2+}/100\text{mL}$, muy por encima de las otras muestras, como de las gaseosas (G), que muestran una capacidad antioxidante muy baja o casi nula.

Como se puede observar, en base a estos resultados, el grupo de bebidas de CP predomina en la mayoría de los ensayos realizados, siendo el grupo de bebidas que mayor capacidad antioxidante tiene, debido a sus compuestos bioactivos como el ácido clorogénico. Los demás grupos varían, en relación con los ingredientes de cada muestra.

Tabla I. Resultados de los polifenoles totales, flavonoides y capacidad antioxidantes (FRAP) en bebidas comúnmente comercializadas en Lima*

Muestra de bebida	Valores encontrados				
	Polifenoles totales (mgAGE/100mL)		Flavonoides totales ($\mu\text{g CE}(+)/100\text{mL}$)		FRAP ($\mu\text{moles Fe}^{2+}/100\text{mL}$)
G-1	1.12	\pm 0.04	2718.31	\pm 70.42	3.59 \pm 0.10
G-2	0.19	\pm 0.01	915.49	\pm 70.42	<ND
G-3	0.08	\pm 0.01	887.32	\pm 42.25	<ND
G-4	0.46	\pm 0.04	971.83	\pm 42.25	<ND
G-5	1.85	\pm 0.01	2647.89	\pm 28.17	6.17 \pm 0.15
BE-1	1.58	\pm 0.02	3732.39	\pm 42.25	15.63 \pm 0.10
BE-2	5.19	\pm 0.10	4126.76	\pm 70.42	17.04 \pm 0.05
BE-3	0.57	\pm 0.10	2723.00	\pm 70.89	6.21 \pm 0.29
BE-4	2.16	\pm 0.04	3859.15	\pm 28.17	8.58 \pm 0.15
BE-5	0.49	\pm 0.02	2971.83	\pm 79.42	3.06 \pm 0.05
BT-1	4.74	\pm 0.18	4.00	\pm 0.40	6.55 \pm 0.05
BT-2	4.08	\pm 0.27	7.33	\pm 0.61	38.98 \pm 0.05
BT-3	0.40	\pm 0.01	9.20	\pm 0.40	7.91 \pm 0.05
BT-4	0.06	\pm 0.01	<ND		5.08 \pm 0.06
BT-5	0.12	\pm 0.03	37.40	\pm 0.60	4.85 \pm 0.10
RH-1	0.53	\pm 0.03	2873.24	\pm 56.34	0.74 \pm 0.06
RH-2	0.11	\pm 0.02	3070.42	\pm 84.51	<ND
RH-3	0.58	\pm 0.06	4225.35	\pm 56.34	2.23 \pm 0.10
RH-4	0.38	\pm 0.01	3436.62	\pm 56.34	7.43 \pm 0.05
RH-5	1.76	\pm 0.05	2323.94	\pm 79.42	9.66 \pm 0.05
LC-1	0.38	\pm 0.01	21647.89	\pm 211.27	86.60 \pm 0.42
LC-2	0.74	\pm 0.02	14859.15	\pm 14.08	47.91 \pm 0.34
LC-3	0.76	\pm 0.28	14774.65	\pm 211.27	4.95 \pm 0.10
LC-4	1.80	\pm 0.03	32676.06	\pm 281.69	62.77 \pm 0.53
LC-5	1.69	\pm 0.03	19971.83	\pm 169.01	1.41 \pm 0.05
CP-1	3.57	\pm 0.17	51154.93	\pm 225.35	29.51 \pm 0.29
CP-2	5.09	\pm 0.16	78971.83	\pm 1478.87	54.08 \pm 0.39
CP-3	15.92	\pm 0.24	89478.87	\pm 70.42	167.86 \pm 0.49
CP-4	19.97	\pm 0.17	38873.24	\pm 647.89	228.88 \pm 1.60
CP-5	9.23	\pm 0.28	28746.48	\pm 1450.70	103.20 \pm 0.97

*(ND) nivel de detalle, (G) gaseosas, (BE) bebidas energizantes, (BT) bebidas de té, (RH) bebidas rehidratantes, (LC) leches chocolatadas, (CP) café en polvo.

Tabla II. Estadística descriptiva de resultados de polifenoles, flavonoides y FRAP de las bebidas comúnmente comercializadas en Lima*

Muestra de bebidas	Polifenoles totales (mgAGE/100mL)		Flavonoides totales (µg CE(+)/100mL)		FRAP (µmoles Fe ²⁺ /100mL)	
	Media ±	Desviación estándar	Media ±	Desviación estándar	Media ±	Desviación estándar
Gaseosas	0.74 ±	0.74	1628.17 ±	963.82	1.95 ±	2.82
Bebidas energizantes	2.00 ±	1.92	3482.63 ±	603.53	10.10 ±	6.04
Bebidas de té	1.88 ±	2.32	11.59 ±	14.85	12.67 ±	14.76
Rehidratantes	0.67 ±	0.64	3185.91 ±	706.64	4.01 ±	4.29
Leches chocolatadas	1.07 ±	0.63	20785.92 ±	7315.11	40.73 ±	36.97
Café en polvo	10.76 ±	7.03	57445.07 ±	25969.47	116.71 ±	82.02

3.2. Resultado de las metilxantinas (CF, TB, TF)

El contenido de CF, TB y TF obtenido por el método HPLC-DAD (Fig. 1) en las diferentes muestras de bebidas se muestra en la Tabla III. También, entre los valores declarados y determinados de estas metilxantinas en el análisis de las bebidas por HPLC-DAD.

3.2.1. Gaseosas y bebidas energizantes

Ambos grupos no muestran cantidades detectables de teobromina o teofilina. Este grupo se caracterizó por tener a la cafeína como la metilxantina más predominante. El contenido medio de cafeína en las gaseosas fue de 7.20 ± 0.02 mg/L, con el valor más bajo en la muestra G-3 con 0.54 ± 0.01 mg/L y el valor más alto en la muestra G-2 con 16.68 ± 0.01 mg/L. Las bebidas energizantes presentaron un contenido medio de cafeína de 57.26 ± 39.19 mg/L, casi 8 veces más que del grupo de gaseosas analizadas.

En comparación con un estudio realizado en Serbia (4), en el que las bebidas energizantes, con un valor mínimo de 237 mg/L y un máximo de 348.7 mg/L, tienen un contenido de cafeína entre 2 y 3 veces superior al de los refrescos, con

un valor mínimo de 106.7 mg/L y un máximo de 119.1 mg/L. Por lo tanto, aunque la proporción del contenido de cafeína entre las bebidas energizantes y las gaseosas parece ser mayor en este estudio, sus valores son más bajos.

Según algunos investigadores (28), la cafeína es una de las sustancias psicoactivas más utilizadas en el mundo, a menudo empleada como aditivo en gaseosas (29) y bebidas energéticas (30).

Por otra parte, la mayoría de las marcas comerciales analizadas en estas categorías, no declaran el contenido total de cafeína de su producto. Sin embargo, está visible en la lista de ingredientes de la etiqueta nutricional.

Asimismo, en ambos grupos estas cantidades están por debajo del límite inferior de consumo, 400 mg al día en un adulto sano (11, 12). Sin embargo, se destaca que las BE, son el segundo grupo con mayor contenido de cafeína. Y solo dos marcas de las cinco bebidas energizantes indican en su etiquetado nutricional la cantidad de cafeína que contiene su producto. Por ello, se vuelve importante que el consumidor disponga de esta información a través del etiquetado nutricional del producto y sepa cómo manejarlo e identificarlo para controlar su consumo.

3.2.2. Bebidas a base de té y bebidas rehidratantes

Ambos grupos muestran la presencia de solo dos metilxantinas identificadas, la teobromina y la cafeína. En el grupo de BT, el mayor contenido identificado fue la cafeína (0.47 ± 0.01 a 4.91 ± 0.05 mg/L). Al tratarse de bebidas a base de té, cabría esperar encontrar teofilina, ya que es un compuesto característico y predominante en las hojas de té (16) y algunas se comercializan precisamente por sus propiedades beneficiosas para la salud. Sin embargo, no hay rastros perceptibles de esta metilxantina. Según De Paula Lima y Farah (31), puede deberse a que estas bebidas de infusión están endulzadas, lo que contribuye a

la dilución de los sólidos del té y a un mayor contenido de sólidos solubles. Además, muchos otros factores podrían intervenir en la variación de las propiedades del producto.

Los resultados obtenidos son consistentes con algunas investigaciones (4, 32 y 33), en las que se evaluaron diferentes bebidas, encontrando en las infusiones listas para beber un alto contenido de cafeína y en algunas muestras también de teobromina, pero no valores detectables de teofilina.

En las bebidas rehidratantes (RH), dado que su composición es básicamente de hidratos de carbono y electrolitos (19), y que su etiquetado nutricional no indica ni alude a ningún ingrediente que contenga cafeína, teobromina o teofilina, no se debería de presentar valores significativos de estas metilxantinas. De acuerdo con los resultados obtenidos, se encontró una traza muy baja de solo dos metilxantinas, la cafeína (0.03 ± 0.01 a 0.05 ± 0.01 mg/L) y la teobromina (0.48 ± 0.01 a 6.00 ± 0.02 mg/L), valores casi indetectables. Por lo tanto, su contenido se confirma y valida como se esperaba.

3.2.3. Leches chocolatadas

La leche chocolatada (LC) es una mezcla a base de leche, sacarosa, cacao y/o cacao en polvo (21), siendo el cacao el ingrediente que le da esa denominación de ser una leche chocolatada. Además, dada la atribución de beneficios que aporta el cacao, según los investigadores (34), se destaca que es rico en dos metilxantinas, predominantemente la teobromina y luego la cafeína.

En las cinco marcas comerciales de leches chocolatadas evaluadas (Tabla IV), se identificó la teobromina en mayor cantidad (media: 5.45 ± 4.18 mg/L) seguida de la cafeína (media: 5.11 ± 0.70 mg/L). De acuerdo a dos estudios, uno realizado en Serbia (4) y otro en España (35), las leches chocolatadas que

evaluaron tenían un contenido medio de teobromina de 225.8 mg/L y 205.7 mg/L; un contenido medio de cafeína de 5.6 mg/L y 18.4 mg/L, respectivamente. Por lo que, del mismo modo se logra identificar a las mismas dos metilxantinas (teobromina y cafeína). No obstante, sus valores son muy superiores a los encontrados en las bebidas analizadas en esta investigación.

Por otra parte, se puede observar en la Tabla III, que existe una diferencia bastante amplia en el nivel de teobromina entre una de las marcas de leche chocolatada (LC-5), en comparación con las demás analizadas.

La muestra LC-5 tiene de 2 a 4 veces más teobromina que las otras marcas de leche chocolatada. Según su etiquetado nutricional, la marca de leche chocolatada LC-5, muestra el cacao en segundo lugar en su lista de ingredientes, mientras que en las otras marcas el cacao aparece como tercer ingrediente. Esto podría indicar una diferencia en la concentración o cantidad de ese ingrediente en el producto, lo que probablemente provoca esta amplia diferencia en el nivel de teobromina, tal y como se muestra en los resultados (Tabla III).

Por lo tanto, teniendo en cuenta esta evidencia en los resultados, es importante entender y conocer lo que estamos consumiendo de los productos.

3.2.4. Café en polvo

Uno de los seis grupos de bebidas evaluadas, en el que se identificaron los tres tipos de metilxantinas (CF, TB y TF), presentando el mayor nivel de cafeína ($4629.26 \pm 1.20\text{mg/L}$) en comparación con los otros grupos analizados.

El grano de café es la principal fuente de obtención de cafeína (22), y el principal ingrediente de las muestras evaluadas, lo que corrobora estos resultados encontrados. Sin embargo, existe una variación en el nivel de cafeína en cada una de las cinco muestras estudiadas. Esto puede deberse a la variedad utilizada por cada marca (35) entre otros factores dentro de su tratamiento en el proceso de obtención de este producto.

Como se puede observar, hay dos muestras de café en polvo (CP-3 y CP-4), que tienen el mayor nivel de cafeína (9644.0 ± 4.93 y 7781.9 ± 0.61 mg/L, respectivamente) en comparación con las demás. Esto significa que, en este caso, considerando el nivel más alto de cafeína (9644.0 ± 4.93 mg/L) de la muestra de café en polvo, una persona estaría consumiendo aproximadamente 19.29 mg de cafeína por taza, siempre que se añadan sólo 2g de café en polvo, como se sugiere en las etiquetas nutricionales de estos productos. Esto no supera el límite encontrado en varios estudios (11, 12), donde indican que una ingesta de hasta 400 mg/día no se asocia con efectos adversos para la salud. Considerando sólo para esta conclusión, una taza al día con esa cantidad de 2g de café en polvo.

A pesar de que algunas personas optan por consumir esta bebida dada sus características o por simple gusto, hay que recordar que un exceso se relaciona con efectos negativos como hipertensión, insomnio, agitación constante, dolores de cabeza y ansiedad (7).

Además, si se trata de personas sensibles a la cafeína o de consumidores no habituales o con un problema de salud en el que la cafeína interfiere o agrava sus síntomas (31), se debe tener más cuidado en limitar o restringir su consumo.

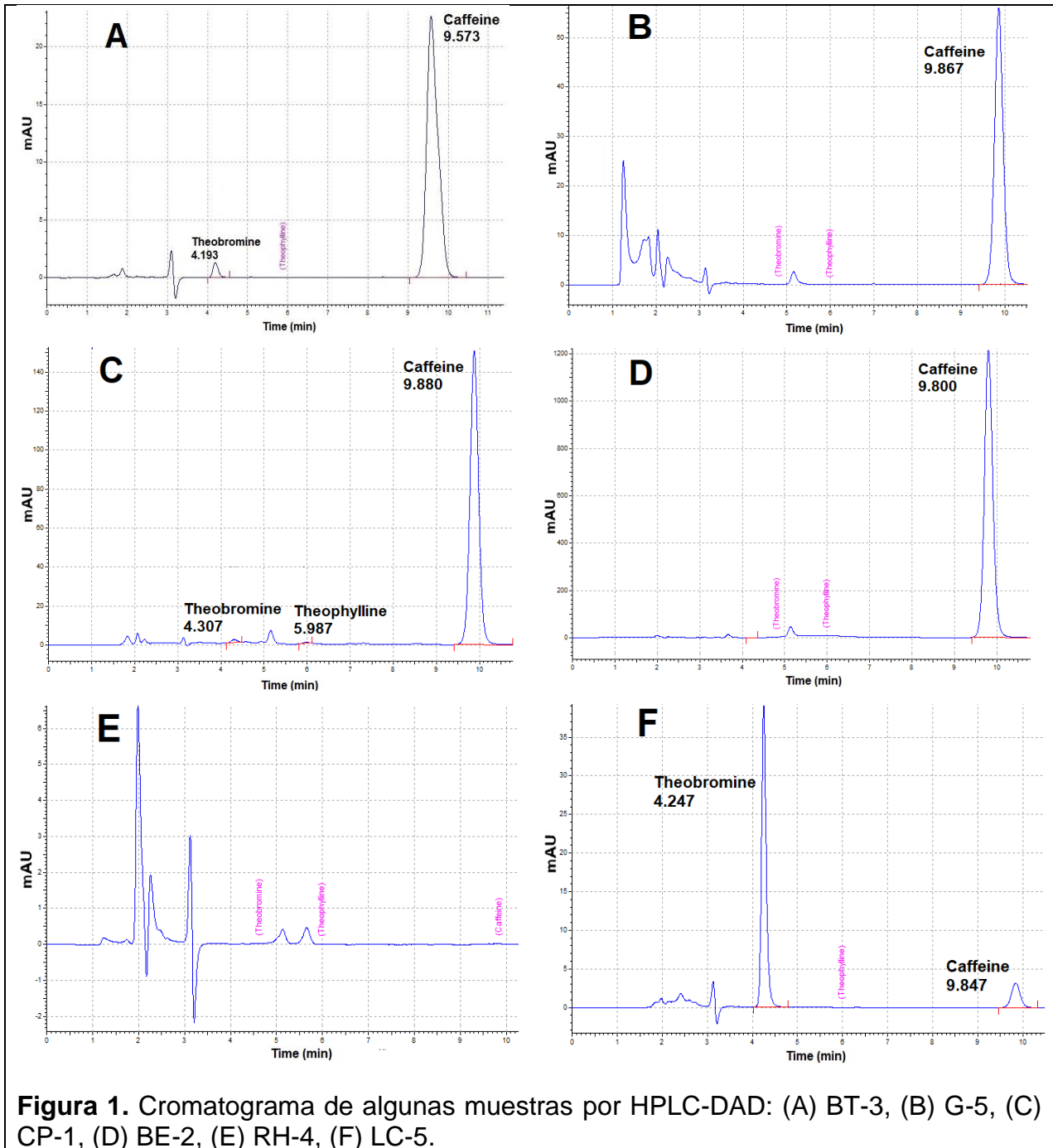


Tabla III. Resultados de metilxantinas en bebidas comúnmente comercializadas en Lima por HPLC-DAD*

Muestra bebidas	Valores encontrados			Valores declarados		
	TB (mg/L)	TF (mg/L)	CF (mg/L)	TB (mg/L)	TF (mg/L)	CF (mg/L)
G-1	<ND	<ND	9.34 ± 0.02	n.d	n.d	n.d
G-2	<ND	<ND	16.68 ± 0.01	n.d	n.d	n.d
G-3	<ND	<ND	0.54 ± 0.01	n.d	n.d	n.d
G-4	<ND	<ND	4.63 ± 0.02	n.d	n.d	n.d
G-5	<ND	<ND	4.82 ± 0.06	n.d	n.d	n.d
BE-1	1.17 ± 0.09	<ND	20.38 ± 0.12	n.d	n.d	n.d
BE-2	<ND	<ND	95.50 ± 3.48	n.d	n.d	≤320
BE-3	<ND	<ND	73.45 ± 0.02	n.d	n.d	n.d
BE-4	<ND	<ND	10.38 ± 0.01	n.d	n.d	≤200
BE-5	<ND	<ND	86.58 ± 0.04	n.d	n.d	n.d
BT-1	0.31 ± 0.01	0.17 ± 0.01	4.91 ± 0.05	n.d	n.d	n.d
BT-2	3.64 ± 0.58	<ND	2.21 ± 0.08	n.d	n.d	n.d
BT-3	0.07 ± 0.01	<ND	1.70 ± 0.01	n.d	n.d	n.d
BT-4	0.03 ± 0.01	<ND	0.47 ± 0.01	n.d	n.d	n.d
BT-5	0.09 ± 0.01	<ND	2.96 ± 0.01	n.d	n.d	n.d
RH-1	0.05 ± 0.01	<ND	6.00 ± 0.02	n.d	n.d	n.d
RH-2	0.03 ± 0.01	<ND	0.75 ± 0.01	n.d	n.d	n.d
RH-3	0.04 ± 0.01	<ND	0.84 ± 0.01	n.d	n.d	n.d
RH-4	<ND	<ND	<ND	n.d	n.d	n.d
RH-5	<ND	<ND	0.48 ± 0.01	n.d	n.d	n.d
LC-1	2.92 ± 0.01	<ND	4.71 ± 0.01	n.d	n.d	n.d
LC-2	6.43 ± 0.01	<ND	5.70 ± 0.01	n.d	n.d	n.d
LC-3	3.96 ± 0.01	<ND	5.37 ± 0.01	n.d	n.d	n.d
LC-4	1.70 ± 0.01	<ND	4.09 ± 0.01	n.d	n.d	n.d
LC-5	12.24 ± 0.01	<ND	5.69 ± 0.01	n.d	n.d	n.d
CP-1	4.50 ± 0.01	7.90 ± 0.01	492.50 ± 0.24	n.d	n.d	n.d
CP-2	3.00 ± 0.01	9.50 ± 0.01	1330.00 ± 0.07	n.d	n.d	n.d
CP-3	8.30 ± 0.07	8.70 ± 0.01	9644.00 ± 4.93	n.d	n.d	n.d
CP-4	8.00 ± 0.01	8.70 ± 0.03	7781.90 ± 0.61	n.d	n.d	n.d
CP-5	5.80 ± 0.02	<ND	3897.90 ± 0.13	n.d	n.d	n.d

*(TB) teobromina, (TF) teofilina, (CF) cafeína, (n.d) no declarado, (ND) nivel de detalle, (G) gaseosas, (BE) bebidas energizantes, (BT) bebidas de té, (RH) bebidas rehidratantes, (LC) leches chocolatadas, (CP) café de polvo.

Tabla IV. Estadística descriptiva de los resultados de las bebidas comúnmente comercializadas en Lima por HPLC-DAD*.

Muestra bebidas	Teobromina (mg/L)			Teofilina (mg/L)			Cafeína (mg/L)		
	Media	±	Desviación estándar	Media	±	Desviación estándar	Media	±	Desviación estándar
Gaseosas	<ND			<ND			7.20	±	6.15
Bebidas energizantes	0.23	±	0.52	<ND			57.26	±	39.19
Bebidas de té	0.83	±	1.58	0.03	±	0.08	2.45	±	1.65
Rehidratantes	0.02	±	0.02	<ND			1.61	±	2.47
Leches chocolatadas	5.45	±	4.18	<ND			5.11	±	0.70
Café en polvo	5.92	±	2.27	6.96	±	3.93	4629.26	±	3988.09

*(LOD) level of detail.

4. Conclusiones

Los resultados obtenidos en este estudio proporcionan información fiable sobre la composición y cuantificación de las metilxantinas en las bebidas más comercializadas en Lima, mediante el método HPLC-DAD.

El café en polvo predominó como el grupo con mayor actividad antioxidante según las pruebas realizadas. Asimismo, fue el grupo con mayor nivel de cafeína, lo cual era de esperar ya que su principal ingrediente activo es el grano de café. La teobromina se encontró predominantemente en el grupo de las leches chocolatadas analizadas.

Aunque la teofilina se encuentra principalmente en la hoja de té, no hay ningún valor detectable o significativo dentro del grupo de infusiones de té listas para beber, y se identifica poca actividad antioxidante. Esto podría analizarse en futuras investigaciones.

En general, se observó que la cafeína es uno de los compuestos bioactivos presentes en cada uno de los grupos de las bebidas analizadas. Por ello, es un paso fundamental promover la inclusión de este dato en la etiqueta nutricional de los productos. Asimismo, consolidar esta información de forma clara y

comprensible entre los consumidores, mejorando la educación nutricional de la población y favoreciendo en las decisiones de compra.

Fuente de financiamiento

Este estudio fue financiado parcialmente por la Universidad Científica del Sur a través del Concurso de Fondos para Proyecto de Tesis (N°148-2019-PRE17).

Referencias bibliográficas

1. Horžić D, Komes D, Belščak A, Kovačević K, Iveković D, Karlović D. The composition of polyphenols and methylxanthines in teas and herbal infusions. *Food Chemistry*. 2009; 115 (2):441-448.
2. Martínez-López S, Sarriá B, Gómez-Juaristi M, Goya L, Mateos R, Bravo-Clemente L. Theobromine, caffeine, and theophylline metabolites in human plasma and urine after consumption of soluble cocoa products with different methylxanthine contents. *Food Research International*. 2014; 63 (Part C): 446-455.
3. Monteiro J, Alves M, Oliveira P, Silva B. Structure-bioactivity relationships of methylxanthines: Trying to make sense of all the promises and the drawbacks. *Molecules*. 2016; 21(8): 974.
4. Srdjenovic B, Djordjevic-Milic V, Grujic N, Injac R, Lepojevic Z. Simultaneous HPLC Determination of caffeine, theobromine, and theophylline in food, drinks, and herbal products. *Journal of Chromatographic Science*. 2008; 46 (2): 144-149.
5. Rodriguez A, Costa-Bauza A, Saez-Torres C, Rodrigo D, Grases F. HPLC method for urinary theobromine determination: Effect of consumption of cocoa products on theobromine urinary excretion in children. *Clinical Biochemistry*. 2015; 48 (16-17): 1138-1143.
6. De Sena A, De Assis S, Branco A. Analysis of theobromine and related compounds by reversed phase high-performance liquid chromatography with Ultraviolet Detection: An Update (1992-2011). *Food Technol. Biotechnol*. 2011; 49 (4): 413-423.

7. Gonzalez E, Vinicio M. Impact of caffeine and coffee on our health. Trends in Endocrinology and Metabolism. 2014; 25 (10): 489-492.
8. Olas B, Brys M. Effects of coffee, energy drinks and their components on hemostasis: The hypothetical mechanisms of their action. Food and chemical toxicology. 2019; 127: 31-41.
9. Barreda-Abascal R, Molina L, Haro-Valencia R, Alford C, Verster J. Actualización sobre los efectos de la cafeína y su perfil de seguridad en alimentos y bebidas. Revista Médica del Hospital General de México. 2012; 75 (1): 60-67.
10. Ikram M, Park T, Ali T, Kim M. Antioxidant and neuroprotective Effects of Caffeine against Alzheimer's and Parkinson's Disease: Insight into the Role of Nrf-2 and A2AR Signaling. Antioxidants. 2020; 9: 902.
11. Nawrot P, Jordan S, Eastwood J, et al. Effects of caffeine on human health. Food additives and Contaminants. 2003; 20 (1): 1-30.
12. FDA: How much caffeine is too much? [Internet]. USA: Food & Drug Administration; 2018 [cited 2020 March 29]. Disponible en: <https://www.fda.gov/consumers/consumer-updates/spilling-beans-how-much-caffeine-too-much>
13. Martínez-Pinilla E, Oñatibia-Astibia A, Franco R. The relevance of theobromine for the beneficial effects of cocoa consumption. Frontiers in Pharmacology. 2015; 30 (6).
14. Neufingerl N, Zebregs Y, Schuring E, Trautwein E. Effect of cocoa and theobromine consumption on serum HDL-cholesterol concentrations: a randomized controlled trial. The American Journal of Clinical Nutrition. 2013; 97: 1201-1209.

15. Dolder L, DVM. Methylxanthines: Caffeine, Theobromine, Theophylline.
En: Peterson M, Talcott P, editors. Small Animal Toxicology (third edition).
Washington US: Elsevier; 2013. p. 647-652.
16. Corey S, Halmer T, Morgan J, Rissmiller B, et al. Theophylline toxicity: An old poisoning for a new generation of physicians. 2018; 18: 37-39.
17. Mintel. Tendencias Mundiales en Alimentos y bebidas para 2018. Mintel; 2018. Disponible en:
<https://www.siicex.gob.pe/siicex/documentosportal/alertas/documento/doc/277698773rad83597.pdf>
18. Román A. Infusiones heladas como bebidas alternativas en el mercado nacional. Perú: Universidad de Piura; 2003. Disponible en:
https://pirhua.udep.edu.pe/bitstream/handle/11042/1215/ING_401.pdf?sequence=1
19. Simulescu V, Ilia G, Macarie L, Merghes P. Sport and energy drinks consumption before, during and after training. Science & Sport. 2019; 34 (1): 3-9.
20. Yanes M, Durán L, Costell E. Rheological and optical properties of commercial chocolate milk beverages. Journal of Food Engineering. 2002; 51: 229-234.
21. Ashurst P. Carbonated Beverages. UK: Reference Module in Food Science; 2016. Disponible en <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.03240-6>
22. Scalese M, Denoth F, Siciliano V, Bastiani L, Cotichini R, Cutilli A, Molinaro S. Energy Drink and Alcohol mixed Energy Drink use among high school

- adolescents: Association with risk taking behavior, social characteristics. Addictive Behaviors. 2017; 72: 93-99.
23. López E, Giner R. Chocolate, café, té y otros estimulantes: bebidas energéticas avant la lettre (I). Revista Española de Drogodependencias. 2013; 38 (4): 391-409.
24. Singleton V, Rossi J. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. American Journal of Enology and Viticulture. 1965; 16: 144-158.
25. Wolfe K, Liu R. Structure-Activity Relationship of Flavonoids in the Cellular Antioxidant Activity Assay. J Agric. Food Chem. 2008; 56 (18): 8404-8411.
26. Benzie I, Strain J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "Antioxidant power": The FRAP assay. Ana. Biochem. 1996; 239: 70 – 76.
27. Ishida K, Yamamoto M, Misawa K, et al. Coffee polyphenols prevent cognitive dysfunction and suppress amyloid β plaques in APP/PS2 transgenic mouse. Neuroscience Research. 2020; 154: 35-44.
28. Ramirez C, Osorio J. Using caffeine for physical exercise: advantages and risks. Rev. Fac. Med. 2013; 61: 459-468.
29. Keast R, Riddell L. Caffeine as a flavor additive in soft-drinks. Appetite. 2007; 49: 255-259.
30. McCusker R, Goldberger B, Cone E. Caffeine content of energy drinks, carbonated sodas, and other beverages. Journal of Analytical Toxicology. 2006; 30: 112-114.

31. De Paula Lima J, Farah A. Methylxanthines in stimulant foods and beverages commonly consumed in Brazil. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2019; 78: 75-85.
32. Nazri M, Abdul A, Hayati N. Quantification of methylxanthines (theobromine, theophylline and caffeine) in chocolate, tea and coffee-based beverages by HPLC. Malaysia: University of Malaysia Sabah; 2015.
33. Al-Obaidi H, Afzal M. Methylxanthine content in hot drinks consumed in the State of Kuwait. *Journal of Food, Agriculture & Environment*. 2010; 8 (1): 41-43.
34. Langer S, Marshall L, Day A and Morgan M. Flavanols and Methylxanthines in Commercially Available Dark Chocolate: A study of the correlation with Nonfat Cocoa Solids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2011; 59: 8435-8441.
35. Sanchez J. Methylxanthine content in commonly consumed foods in Spain and determination of its intake during consumption. *Foods*. 2017; 6 (109): 1-13.