

**Determinação de cafeína, teofilina e harmol
em refrigerantes, cafés e chás adquiridos em
*retail market***

Versão Final após defesa

Valdimiro Mango Paulo António

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em

Bioquímica

2º ciclo de estudos

Orientador: Professora Doutora Ana Cristina Mendes Dias Cabral

Co-orientadora: Professora Doutora María Eugenia Gallardo Alba

Abril 2025

Declaração de Integridade

Eu, Valdimiro Mango Paulo António, que abaixo assino, estudante com o número de inscrição M11337 de Bioquímica da Faculdade de Ciências, declaro ter desenvolvido o presente trabalho e elaborado o presente texto em total consonância com o **Código de Integridades da Universidade da Beira Interior**.

Mais concretamente afirmo não ter incorrido em qualquer das variedades de Fraude Académica, e que aqui declaro conhecer, que em particular atendi à exigida referência de frases, extratos, imagens e outras formas de trabalho intelectual, e assumindo assim na íntegra as responsabilidades da autoria.

Universidade da Beira Interior, Covilhã 08 /04 /2025

Valdimiro M. P. António

Dedicatória

Para minha filha Miriam António, ver você tão pequena, a lutar pela vida, foi como uma flecha de fé para mim e a restauração dos meus sonhos. Você me deu forças para lutar por aquilo que almejo. Que esta realização seja um exemplo de perseverança e que te motive a lutar sempre pelos teus sonhos.

Agradecimentos

Às minhas orientadoras, Prof.^a Dr.^a Cristina e Prof.^a Dr.^a Eugénia,

Gostaria de expressar a minha mais profunda gratidão pelo apoio, paciência e confiança demonstrados ao longo desta jornada de mestrado. Mesmo nos momentos em que falhei e me atrasei, vocês nunca desistiram de mim, oferecendo sempre palavras de incentivo e orientação que foram fundamentais para a conclusão deste trabalho.

Este percurso não teria sido possível sem o vosso compromisso e dedicação, e é graças ao vosso exemplo que me sinto motivado a continuar a trilhar este caminho com ainda mais determinação.

Muito obrigado por acreditarem em mim.

Agradeço também a minha parceira Madalena Machado, pelo amor, paciência e força inabalável em todos os momentos desta jornada. À minha mãe Elizabeth Paulo, que sempre foi o meu maior exemplo de dedicação e resiliência, e ao meu irmão Emanuel Mendes, pelo companheirismo e suporte constantes.

Resumo

A cafeína e a teofilina são metilxantinas amplamente presentes em diversas bebidas comercializadas, reconhecidas pela sua atividade biológica que melhora o aroma e o sabor, além de proporcionar efeitos estimulantes e terapêuticos. O harmol, por sua vez, é um alcaloide beta-carbolínico com grande potencial terapêutico, nomeadamente pelas suas propriedades antidepressivas, antioxidantes e anticancerígenas. Estas substâncias estão frequentemente presentes em matrizes alimentares complexas, o que requer métodos analíticos sensíveis para a sua identificação e quantificação.

Neste estudo, cujo objetivo foi validar e aplicar um método cromatográfico para a determinação simultânea de cafeína, teofilina e harmol em amostras de bebidas adquiridas no mercado português, recorreu-se à cromatografia líquida de alta eficiência com detetor de arranjo de díodos (HPLC-DAD). O método desenvolvido foi validado de acordo com critérios internacionais, demonstrando elevada linearidade, seletividade, exatidão e precisão, com coeficientes de determinação superiores a 0,99.

O método foi aplicado a 27 amostras de bebidas, das quais 21 correspondiam a cafés e 6 a chás adquiridos em superfícies comerciais e estabelecimentos de retalho. Os resultados mostraram que a cafeína é o composto predominante em todas as amostras analisadas, enquanto as concentrações de teofilina e harmol variaram em função do tipo de bebida e da matriz analisada. Este estudo permitiu concluir que o método desenvolvido é adequado para a monitorização destas substâncias em diferentes matrizes alimentares, contribuindo para um melhor entendimento do consumo de metilxantinas e harmol pela população portuguesa e promovendo avanços no controlo analítico de compostos bioativos.

Palavras-chave

Metilxantinas; Cafeína; Teofilina; Harmol; HPLC-DAD; *retail market*

Abstract

Caffeine and theophylline are methylxanthines widely present in various commercial beverages, recognised for their biological activity, which enhances flavour and aroma, as well as providing stimulating and therapeutic effects. Harmol, on the other hand, is a beta-carboline alkaloid with significant therapeutic potential, particularly due to its antidepressant, antioxidant, and anticancer properties. These substances are often found in complex food matrices, requiring sensitive analytical methods for their identification and quantification.

This study aimed to validate and apply a chromatographic method for the simultaneous determination of caffeine, theophylline, and harmol in beverage samples acquired from the Portuguese market, using high-performance liquid chromatography with a diode array detector (HPLC-DAD). The developed method was validated according to international criteria, demonstrating high linearity, selectivity, accuracy, and precision, with determination coefficients exceeding 0.99.

The method was applied to 27 beverage samples, comprising 21 coffees and 6 teas purchased from commercial establishments and retail outlets. The results showed that caffeine was the predominant compound in all analysed samples, while the concentrations of theophylline and harmol varied depending on the type of beverage and the matrix analysed. This study concluded that the developed method is suitable for monitoring these substances in different food matrices, contributing to a better understanding of the consumption of methylxanthines and harmol by the Portuguese population and promoting advancements in the analytical control of bioactive compounds.

Keywords

Methylxanthines; Caffeine; Theophylline; Harmol; HPLC-DAD; retail market

Índice

Lista de Figuras	xvi
Lista de Tabelas	xviii
Lista de Acrónimos	xx
Capítulo 1 – Xantinas e Harmol	1
1.1. Resenha Histórica	1
1.2. Características das xantinas	3
1.2.1. Propriedades físico-químicas.....	3
1.2.2. Farmacocinética.....	6
1.3 Ocorrência natural, síntese e função das metilxantinas	8
1.3.1 Ocorrência natural e síntese	9
1.3.2 Mecanismo de ação das metilxantinas.....	10
1.3.2.1 Inibição da enzima fosfodiesterase	10
1.3.2.2 Antagonismo dos recetores de adenosina	11
1.3.2.3 Regulação do nível de cálcio intracelular	12
1.3.2.4 Modulação dos recetores GABA	13
1.4 Xantinas presentes nos alimentos naturais e processados	13
1.5 Xantinas na saúde e na Doença	14
1.5.1 Atividade anti parkinsonismo e anti Alzheimer.....	15
1.5.2 Atividade anticancerígena.....	15
1.5.3 Atividade antiasmática.....	16
1.5.4 Atividade antidiabética	16
1.5.5 Atividade antidepressiva e ansiolítica.....	17
1.5.6 Atividade analgésica e anti-inflamatória	17
1.5.7 Atividade diurética	18
1.5.8 Atividade anti-obesidade	18
1.5.9 Atividade antimicrobiana e anti-tuberculose.....	18
1.6 Harmol – propriedades físico-químicas, farmacocinética e mecanismo de ação	18
1.7 Metodologias utilizadas para a determinação de metilxantinas e harmol	19
1.8 Consumo de bebidas e ingestão de xantinas e harmol – uma relação a estudar	21

Capítulo 2 – Objetivo do estudo	23
Capítulo 3 – Parte experimental	25
3.1. Materiais e Métodos	25
3.1.1. Material e Instrumentação	25
3.1.2. Reagentes e padrões analíticos.....	25
3.2. Sistema cromatográfico e condições cromatográficas	25
3.3. Preparação de soluções	26
3.3.1. Soluções padrão	26
3.3.2. Outras soluções	26
3.4 Preparação das amostras	27
Capítulo 4 – Resultados e discussão	29
4.1. Otimização das condições cromatográficas	29
4.2. Validação do método analítico	30
4.2.1. Seletividade	31
4.2.2. Linearidade e limites de detecção e quantificação	33
4.2.3. Exatidão e precisão.....	36
Capítulo – 5 Aplicação do método em amostras reais	39
Capítulo 6 – Conclusões	43
Referências Bibliográficas	44

Lista de Figuras

Figura 1: Estrutura das metilxantinas	3
Figura 2: Metabolismo hepático da cafeína em seus metabolitos principais	7
Figura 3: Xantina.....	9
Figura 4: Inibição de fosfodiesterases pela teofilina	11
Figura 5: Antagonismo dos recetores de adenosina.....	12
Figura 6: Estrutura dos recetores de rianodina (RyR) por micrografias eletrônicas, as setas azuis indicam a mudança da região citoplasmática do estado fechado para aberto.	13
Figura 7: Harmol	19
Figura 8: Cromatogramas relativos à teofilina (tempo de retenção de 15,56 minutos), cafeína (tempo de retenção de 20,5 minutos) e harmol (tempo de retenção de 23,3 minutos), respetivamente. A concentração utilizada foi 100µg/mL.....	30
Figura 9 Cromatograma obtido para o padrão puro da teofilina a 0,1 mg/mL. $\lambda=290$ nm $tR=15,56$ mi	32
Figura 10: Cromatograma obtido para o padrão puro de cafeína a 0,1 mg/mL. $\lambda=273$ nm $tR=20,5$ min	32
Figura 11: Cromatograma obtido para o padrão puro de harmol a 0,1 mg/mL. $\lambda=246$ nm $tR=23,6$ min	33
Figura 12: Exemplo de uma curva de calibração de um dos dias em estudo.	35
Figura 13: Cromatograma relativo à amostra de café número 1	40

Lista de Tabelas

Tabela 1: Propriedades físico-químicas das metilxantinas	5
Tabela 2: Quantidade estimada de xantinas em alimento naturais e processados.....	14
Tabela 3: Metodologias utilizadas para a determinação de metilxantinas e harmol.....	20
Tabela 4: Condições cromatográficas.....	26
Tabela 5: Quantidade de café (em gramas) presente no interior das cápsulas.....	27
Tabela 6: Tempo de retenção e comprimento de onda dos analitos em estudo.	31
Tabela 7: Linearidade dos compostos em estudo (n=5).....	34
Tabela 8: Avaliação dos limites de detecção (n=7)	35
Tabela 9: Estudo da precisão e exatidão intradia (n=5)	36
Tabela 10: Estudo da precisão e exatidão interdia (n=5).....	37
Tabela 11: Estudo da precisão e exatidão intermedia (n=15).....	37
Tabela 12: Quantidade de cafeína presente nos diferentes cafés analisados.	39
Tabela 13: Quantidade de cafeína, teofilina e harmol presente nos diferentes chás/infusões analisados.....	40

Lista de Acrónimos

A ₂ A	Subtipo de Recetor de Adenosina A ₂ A
A ₂ B	Subtipo de Recetor de Adenosina A ₂ B
AICC	Associação Industrial e Comercial do Café
AFMU	Acetilamino Formilamino Metiluracil
ATP	Trifosfato de Adenosina
Bcl2	Proteína Reguladora de Apoptose Bcl
cAMP	Adenosina Monofosfato Cíclico
cGMP	Guanosina Monofosfato Cíclico
CYP1A ₂	Isoforma do Citocromo P
DAD	Detetor de Arranjo de Diodos
DMSO	Dimetilsulfóxido
GABA	Ácido Gama Aminobutírico
GC	Cromatografia Gasosa
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
HSL	Lipase Hormono Sensível
IL	Interleucina
IP	Inositol Trifosfato
LLOQ	Limite Inferior de Quantificação
logP	Coefficiente de Partição Octanol Água Logarítmico
MAO	Monoamina Oxidase
NAT	N Acetiltransferase
ONU	Organização das Nações Unidas
P450 oxidase	Oxidase do Citocromo P450
pK _a	Constante de Dissociação Ácida
PKA	Proteína Quinase A
PDE	Fosfodiesterase
QCs	Controles de Qualidade
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RyR	Recetores de Rianodina
TNF alfa	Fator de Necrose Tumoral Alfa

Capítulo 1 – Xantinas e Harmol

1.1. Resenha Histórica

As xantinas são pseudoalcalóides cíclicos que derivam dos nucleótidos de purina, produzidos naturalmente por plantas e animais e desempenham um papel importante na história do consumo humano. Desde os primeiros séculos que o ser humano usa plantas e outros produtos de origem natural para o seu consumo e terapias medicinais, destacando-se as metilxantinas, pertencentes à classe dos constituintes psicoativos mais abundantes nestes produtos (1). As metilxantinas mais estudadas são a cafeína, a teobromina e a teofilina, produzidas como metabolitos secundários em algumas espécies do reino vegetal, incluindo grãos de café (*Coffea sp.*), folhas de chá (*Camellia sinensis L.*), grãos de cacau (*Theobroma cacao L.*), bagas de guaraná (*Paulina cupana*) e sementes de cola (cola nítida) (2,3).

O café, uma das principais fontes de cafeína, tem uma longa história de uso que reflete a interação humana com estas substâncias. Inicialmente os grãos de café eram mastigados e consumidos como aperitivo, só depois é que começaram a ser triturados e combinado com uma pasta de gordura que servia como lanche usado em longas viagens (4). A prática de preparar infusões com água fervente surgiu por volta do ano 1000 D.C., foi iniciada pelos povos indígenas na península Arábica (Sudoeste da Ásia e Nordeste da África), tornando-se parte integrante da cultura (4). O cultivo inicial do café deu-se na província de Kaffa na Etiópia a partir de culturas simples.

No século XVI foi introduzido na Europa pelos barcos venezianos que realizavam trocas comerciais no mediterrâneo, o seu consumo difundiu-se rapidamente por todo continente, tendo a primeira casa de café europeia sido inaugurada na praça de São Marcos em Veneza. Posteriormente, várias cafetarias foram abertas nas ruas a volta do canal, tornando-se os cafés clubes de encontro para intelectuais, artistas e comerciantes (4,5). Hoje em dia o café é cultivado em vários países do mundo (4).

O chá, uma das principais fontes de teofilina, foi usado como planta medicinal pela primeira vez na China há mais de 1500 a.c. Os relatos antigos já destacavam os efeitos desintoxicantes e elevação do humor causados pela ingestão das infusões de chá (6). Com o tempo, as propriedades terapêuticas e estimulantes do chá tornaram-se amplamente conhecidas, transformando-o numa bebida social. Foram descobertos novos tipos de chás verdes e pretos, fermentados e não fermentados, o que levou a um aumento

considerável no número de plantações e trocas comerciais. O consumo de chá começou então a difundir-se para todos os continentes do mundo, tornando-se num elemento cultural de diversos países. Portugal terá sido provavelmente o primeiro país da Europa a ter contacto com o chá em meados do século XVI, o seu consumo era restringido a grupos sociais privilegiados e só mais tarde é que se difundiu a todas as camadas sociais (7).

Atualmente o consumo de chá em Portugal ainda é um costume, apesar de ser inferior quando comparado com o de café. Além das folhas de chá, a teofilina também pode ser encontrada noutras plantas, como as bagas de guaraná (*Paulina cupana*) e o mate (*Ilex paraguariensis*) (3,8).

Atualmente o consumo das metilxantinas dá-se em todo mundo, são parte integrante da rotina diária e cultura de muitas populações. A cafeína e a teofilina têm sido ingredientes funcionais muito usados, principalmente na produção de refrigerantes e bebidas energéticas devido a sua constituição biologicamente ativa que contribuem para a melhoria do aroma e sabor das bebidas, diminuição da fadiga e aumento de atenção do consumidor (5).

O harmol é um alcaloide β -carbolina derivado do metabolismo do triptofano, é conhecido pela sua presença em diversas espécies vegetais, especialmente em plantas da família *Fabaceae*. Este composto apresenta propriedades biológicas interessantes, como atividade antioxidante, neuroprotetora e psicotrópica, o que chamou a atenção de diversas culturas e da ciência moderna (9).

Historicamente, o harmol tem sido utilizado em contextos etnomedicinais e espirituais. Ele foi identificado como um dos compostos ativos em plantas como *Peganum harmala* (ruda síria), utilizada há milénios por povos do Oriente Médio e da Ásia Central. Nessas culturas, o harmol e seus compostos associados eram empregues em rituais religiosos, servindo como incenso ou chá, devido às suas propriedades psicoativas e supostos poderes protetores contra maus espíritos. Além disso, na medicina tradicional dessas regiões, era também usado no tratamento de condições como febres, inflamações e doenças infecciosas. Os alcaloides extraídos da planta, incluindo o harmol, eram reconhecidos pelas suas propriedades antissépticas e tranquilizantes. O interesse científico pelo harmol e outros alcaloides β -carbolina emergiu no final do século XIX, quando químicos europeus isolaram estes compostos de plantas medicinais tradicionais, demonstrando que o harmol apresentava efeitos no sistema nervoso central. Esta descoberta impulsionou o seu estudo nas áreas de neurociência e farmacologia (9,10).

1.2. Características das xantinas

Para entender a diversidade de efeitos das xantinas no corpo humano, bem como a sua importância em contextos clínicos e farmacológicos é fundamental conhecer as suas propriedades físico-químicas, que influenciam diretamente a sua interação com sistemas biológicos e a sua farmacocinética no organismo.

1.2.1. Propriedades físico-químicas

As xantinas são consideradas pseudoalcaloides porque se formam como metabolitos secundários de espécies vegetais sem a inclusão de aminoácidos na sua síntese biológica, dão origem a compostos orgânicos metilados conhecidos como metilxantinas, que são compostos heterocíclicos com anéis de pirimidina fundidos (2,11). Na **figura 1**, temos a representação das metilxantinas mais abundantes na natureza que incluem a cafeína (1,3,7-trimetilxantina), a teofilina (1,3-dimetilxantina), a teobromina (3,7-dimetilxantina) e a paraxantina (1,7-dimetilxantina) que é, especialmente em humanos, um derivado dimetilado do metabolismo da cafeína e isômero da teobromina e teofilina. A estrutura da cafeína é constituída por 3 grupos metilos nas posições 1, 3 e 7, o que lhe atribui propriedades eletrofílicas. As restantes metilxantinas apresentadas na **figura 1** apresentam 2 grupos metilos na sua estrutura.

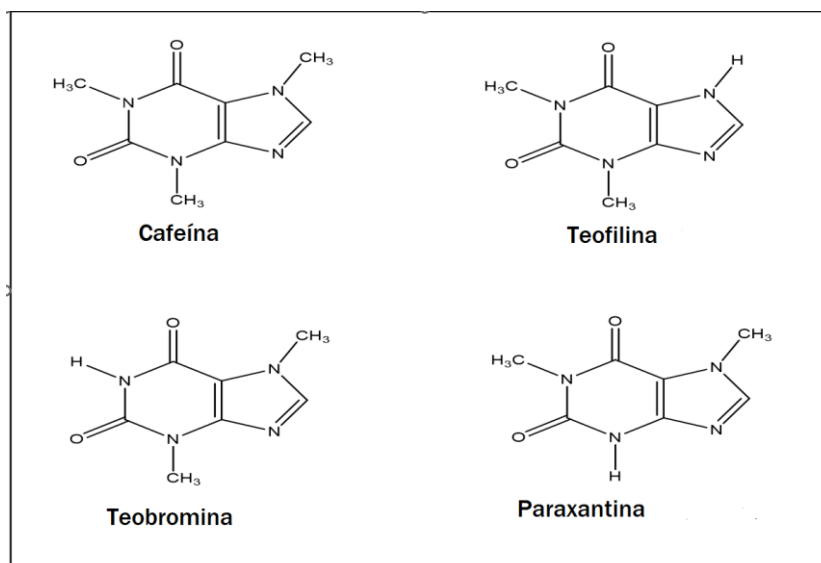


Figura 1: Estrutura química das metilxantinas, desenhadas utilizando o software ACD Labs ChemSketch.

As metilxantinas comportam-se como alcalóides, em condições normais são pós, inodoros, de sabor amargo e apresentam caráter anfotérico, ou seja, podem comportar-se tanto como ácido ou base fracas (**tabela 1**). Excepcionalmente a cafeína apresenta um caráter mais básico pelo facto de ser trimetilada e não formar enóis. As metilxantinas são solúveis em água, ácidos, bases, etanol, amónia e na maioria dos solventes orgânicos em que os alcaloides se dissolvem. O comprimento de onda do máximo de absorção para cafeína, teobromina e teofilina está na região de 269-278 nm (λ_{max} : ~274 nm) com um coeficiente de absorção de 9700 em solução aquosa (12).

A cafeína é um sólido de cor branca amargo, ligeiramente solúvel em água, quando aquecida a temperaturas altas, apresenta um comportamento relativamente comparável ao do gelo seco, pode sublimar passando da fase sólida para fase gasosa sem antes passar pela fase líquida com um ponto de sublimação de 178 °C (**tabela 1**) (13,14).

A teofilina caracteriza-se como sendo um pó de cor branca quase cristalino, pouco solúvel em água e etanol, com muito boa solubilidade em ácidos ou bases diluídos, o seu pKa é 8,81 (**tabela 1**), e pode existir nas formas anidra e monoidratada, sendo a anidra mais comum (15).

A teobromina pura é um pó cristalino branco, inodoro que sublima sem fusão a 200 °C (**tabela 1**), também tem um ponto de sublimação significativamente mais alto que a cafeína e a teofilina. De sabor amargo, tem a sua solubilidade elevada em extrato aquoso ácido ou básico, mas em geral é muito menos solúvel que a cafeína (16).

A paraxantina é um metabolito da cafeína e isómero da teofilina e da teobromina, entre as metilxantinas é a menos estudada, é um sólido branco e cristalino, solúvel em solventes orgânicos como o etanol, DMSO e no dimetilformaldeído, o seu ponto de fusão é entre 294 – 296 °C (**tabela 1**) (17).

Tabela 1: Propriedades físico-químicas das metilxantinas

Metilxantinas	Nome IUPAC	Fórmula molecular	Massa molar/ g mol ⁻¹	Ponto de fusão (°C)	Solubilidade	logP	pK _a	pK _b
cafeína (1,3,7-trimetilxantina)	1,3,7-trimetil-3,7-di-hidropurina-2,6-diona	C ₈ H ₁₀ N ₄ O ₂	194.19	235 – 238	Solúvel em clorofórmio e água quente, parcialmente solúvel em água fria e etanol	-0.1	14	14.2
teofilina (1,3-dimetilxantina)	1,3-dimetil-3,7-di-hidro-purina-2,6-diona	C ₇ H ₈ N ₄ O ₂	180.16	270 – 274	Ligeiramente solúvel em água fria, solúvel em água quente, ácidos, bases e amónia.	-0.2	8.8	14.2
teobromina (3,7-dimetilxantina)	3,7-dimetil-3,7-di-hidro-1H-purina-2,6-diona	C ₇ H ₈ N ₄ O ₂	180.16	290 – 295	A teobromina tem solubilidade limitada em água, solúvel em solventes orgânicos, ácidos e bases	-0.7	10	13.9
paraxantina (1,7-dimetilxantina)	1,7-dimetil-3,7-di-hidro-purina-2,6-diona	C ₇ H ₈ N ₄ O ₂	180.16	294 – 296	Ligeiramente solúvel em álcoois ou éteres, solúvel em água quente.	-0.6	-	-

Adaptado de (18) (logP – parâmetro de hidrofobicidade; constantes de acidez (pK_a) e basicidade (pK_b))

1.2.2. Farmacocinética

Cafeina

A absorção da cafeína ocorre rapidamente após a administração oral ou parental, sendo absorvida no trato gastrointestinal e alcançando o pico de concentração plasmática entre 15 a 60 minutos (19). A quantidade absorvida varia de acordo com o metabolismo individual, dependendo da presença de outros alimentos no organismo e da forma como a cafeína é ingerida (cápsula, líquido, pó etc.). O seu mecanismo de ação inicia-se entre 30-60 minutos após o consumo, e em adultos a biodisponibilidade ultrapassa 90% (20). Outra via de administração possível é a retal, como no caso de supositórios de tartarato de ergotamina com cafeína, usados para terapias de enxaqueca. No entanto, esta via é menos eficiente que a oral com a taxa de biodisponibilidade em torno de ~30-70 % (21).

A distribuição da cafeína no organismo é facilitada pelas suas propriedades hidrofóbicas e a sua solubilidade em água e lípidos, que permitem uma ligação fraca às proteínas do plasma. Isto possibilita a sua passagem pelas membranas das células de vários tecidos e músculos, incluindo a barreira hematoencefálica para o cérebro e a placenta para o fluido amniótico (1% da quantidade de cafeína ingerida pela mãe é transmitida ao feto). Em recém-nascidos, a taxa média de distribuição é de 0,8-0,9 L/Kg enquanto em adultos 0,6 L/Kg(19) .

O metabolismo da cafeína ocorre maioritariamente nas células hepáticas por ação do sistema enzimático P450 oxidase, especificamente pela atuação da isoforma CYP1A2 dando origem a monoxantinas, dimetilxantinas, ácidos monos e dimetilúricos e derivados uracílicos. Conforme representado na **figura 2**, no primeiro passo do metabolismo a cafeína é desmetilada e dá origem a paraxantina como metabolito principal, o que representa cerca de 84% do seu metabolismo (22,23). A N-acetiltransferase-2 (NAT2) converte a paraxantina em 5-acetilamino-6-formilamino-3-metiluracil (AFMU), ou por outras vias pode ser hidroxilada para formar 1,7-ácido metilúrico. Uma outra via metabólica é a desmetilação da paraxantina pela enzima CYP1A2 para formar a 1-metilxantina (22,23). A teobromina e a teofilina também são metabólitos importantes, representando, respetivamente, 12% e 4% do metabolismo da cafeína e são formadas pela remoção de um grupo metilo em posições específicas (posição 1 para a teobromina e posição 7 para a teofilina) (22,23).

O tempo de meia-vida e a eliminação da cafeína dependem de vários fatores tais como: a idade (quanto maior a idade de uma pessoa saudável, mais rápido é o seu metabolismo

e eliminação, para um indivíduo acima dos 9 anos o tempo de meia vida é de aproximadamente 5 horas); tabagismo (em fumadores o tempo de meia vida da cafeína é reduzido até 50%, o tabagismo potencia a atividade biológica da CYP1A2); o uso de medicamentos (algumas drogas alteram o tempo de meia vida da cafeína, podendo diminuir ou retardar); e gravidez (durante a gravidez, o tempo de meia vida da cafeína é alterado, podendo ser superior a 15 horas) (24).

A cafeína e os seus metabolitos são excretados principalmente pela via urinária, com apenas 0,5% a 2% eliminados de forma inalterada, devido a reabsorção nos túbulos renais. café (25).

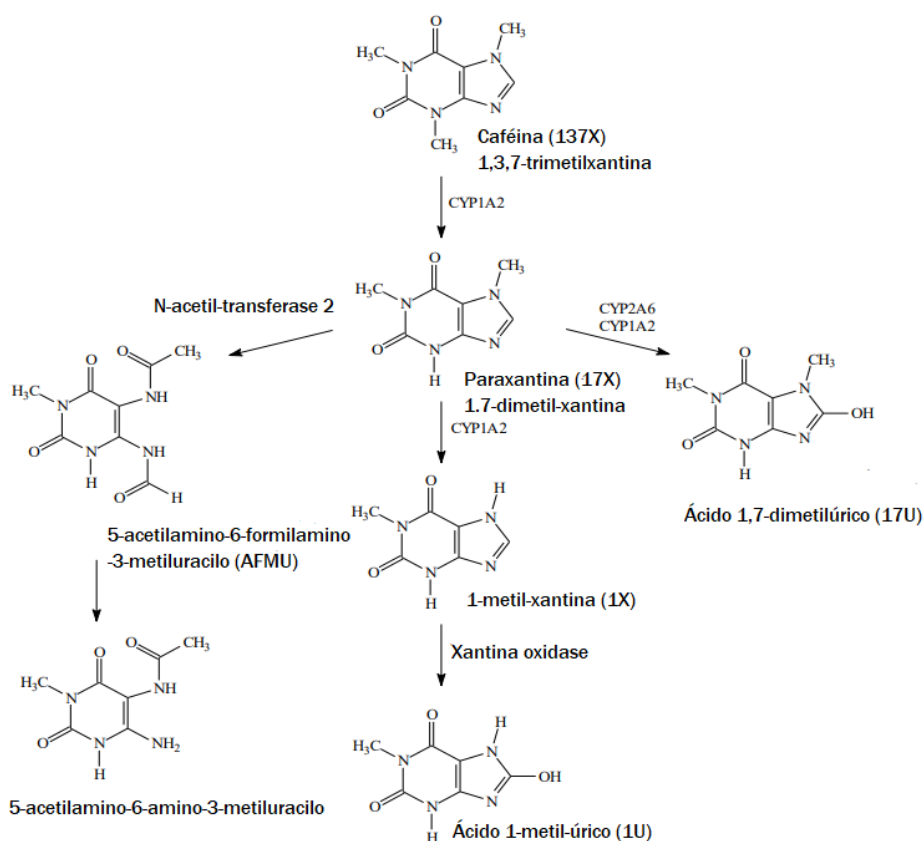


Figura 2: Metabolismo hepático da cafeína em seus metabolitos principais, adaptado de (22)

Teofilina

A farmacocinética da teofilina é semelhante à da cafeína, pode ser absorvida por via oral ou intravenosa, como por exemplo a aminofilina que tem sido usada para o tratamento de asma aguda (26). As concentrações máximas ocorrem até 2 horas, apresentando afinidade média para proteínas do plasma (principalmente a albumina).

O tempo de meia vida é maior quando comparando com a cafeína, cerca de 3 a 9 horas, podendo variar de acordo com o histórico de tabagismo, idade, sexo, asma ou edema pulmonar agudo. O seu metabolismo é hepático, também é mediado pela enzima CYP1A2, originando o ácido 1-metilúrico como metabolito principal (27). A excreção da teofilina e dos seus metabolitos é feita principalmente pela via urinária, cerca de 7 a 13 % é eliminada inalterada na urina (28).

Teobromina

A teobromina está presente em vários alimentos e bebidas da dieta humana ou pode ainda ocorrer no organismo como metabolito da cafeína, é rapidamente absorvida pelo trato gastro intestinal e distribuída nos fluídos corporais (29).

O tempo de meia vida no soro humano pode variar dependendo do organismo, em média a teobromina permanece no corpo entre 6 a 10 horas, é metabolizada no fígado também por ação das enzimas CYP1A2 e CYP2E1 (30,31).

Paraxantina

No organismo humano, 84 % da cafeína ingerida é metabolizada no fígado a paraxantina pelo citocromo P450 e em seguida distribuída aos vários tecidos do corpo. Tal como a cafeína, a paraxantina é metabolizada no fígado dando origem a outros metabólitos como a 7-metilxantina, ácido 1,7-dimetilúrico, 5-acetilamino, 6-formilimanió e 3-metiluracil. Em média permanece no corpo entre 3 a 7 horas e é principalmente eliminada pela urina (32).

1.3 Ocorrência natural, síntese e função das metilxantinas

Esta secção abordará a ocorrência natural, a síntese e a função das metilxantinas, bem como o seu mecanismo de ação. Inicialmente, serão exploradas as principais fontes naturais onde podem ser encontradas.

De seguida, será discutido o mecanismo de ação das metilxantinas, enfatizando a sua interação com recetores de adenosina, a inibição de fosfodiesterases, a modulação do transporte de cálcio intracelular e a modulação dos recetores GABA. Estes processos bioquímicos explicam os efeitos fisiológicos diversificados das metilxantinas, nomeadamente a estimulação do sistema nervoso central, a broncodilatação e o aumento da força de contração muscular, temas que serão desenvolvidos em detalhe nesta análise.

1.3.1 Ocorrência natural e síntese

As principais fontes naturais de metilxantinas são:

- Grãos de café: o gênero *Coffea spp* é constituído por mais de 103 espécies de plantas que produzem café, das quais a *Coffea arábica L* nativa das terras da Etiópia é a mais importante comercialmente e a mais cultivada em todo mundo, para além de ser a principal fonte natural de cafeína (teor entre 0.8% e 1.4%) também produz baixas quantidades de teofilina (33).
- Folhas de chá: a teofilina é encontrada em concentrações muito baixas nas folhas de chá (*Camellia sinensis*) com o teor entre 0.02% e 0.04%, é menos abundante que a cafeína que também está presente nas folhas de chá (34).
- Grãos de Cacau: a *Theobroma cacao* é a principal fonte natural de teobromina, com um teor de 0,7 á 1,2%, para além dos grãos, a teobromina também está presente nos cotilédones e nas cascas, a concentração em grãos inteiros e nas cascas aumentam durante a fermentação (34,35).

A paraxantina não é comumente encontrada em plantas ou outras fontes naturais como um composto isolado, é o principal metabólito da cafeína em animais e bactérias.

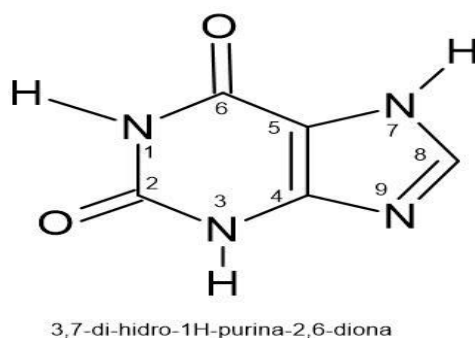


Figura 3: Estrutura química da Xantina, desenhada utilizando o software ACD Labs ChemSketch.

As metilxantinas são sintetizadas através de modificações dos substituintes em diferentes posições nos átomos de nitrogénio (N-1, N-3 e N-7), reações de adição de grupos metil (-CH₃) a molécula de Xantina (Figura 3) dando origem a metilxantinas.

1.3.2 Mecanismo de ação das metilxantinas

Os principais mecanismos alvos das metilxantinas a nível celular têm sido tema de diversos estudos e aplicações terapêuticas, estes incluem: a inibição competitiva da enzima fosfodiesterase e ativação da histona desacetilase (isoenzima tipo II), antagonismo não seletivo dos recetores de adenosina (subtipos A₁, A₂ e A₃) e ação sobre sistema nervoso central, regulação do nível de cálcio intracelular e modulação da ação do recetor GABA, (36,37).

1.3.2.1 Inibição da enzima fosfodiesterase

As fosfodiesterases são enzimas que geralmente degradam os mediadores químicos intracelulares, adenosina monofosfato cíclico (cAMP) e guanosina monofosfato cíclico (cGMP). A capacidade de inibição competitiva fraca da cafeína e da teofilina sobre a atividade das fosfodiesterases foi descoberta pelo grupo de investigação do farmacologista e bioquímico americano Sutherland Jr., que usou estas metilxantinas nos seus estudos sobre a regulação do metabolismo do glicogénio e na lipólise periférica (37). Durante as pesquisas observaram que estas metilxantinas previnem a quebra enzimática do cAMP ao ligar-se aos pontos ativos das fosfodiesterases, impedindo que estas interajam com o nucleótido cíclico, o que leva ao aumento do tempo de meia vida intracelular do cAMP, dando origem a potencialização de vários efeitos fisiológicos (37).

Entre as isoenzimas inibidas pelas metilxantinas, destacam-se a PDE₃ encontrada no músculo liso brônquico (responsável pela quebra cAMP e cGMP) e a PDE₄ que se localiza em várias células inflamatórias, incluindo os mastócitos (com a função de degradar cAMP). Cada isoenzima inibida, desencadeia um efeito fisiológico diferente no corpo humano, por exemplo, a teofilina inibe a PDE₃ no músculo liso (**figura 4**), o que proporciona o aumento intracelular de cAMP e cGMP, levando a estimulação dos canais de Ca⁺, a hiperpolarização da célula e ao relaxamento do musculo. Por este facto a teofilina é usada na terapia de algumas doenças respiratórias (38).

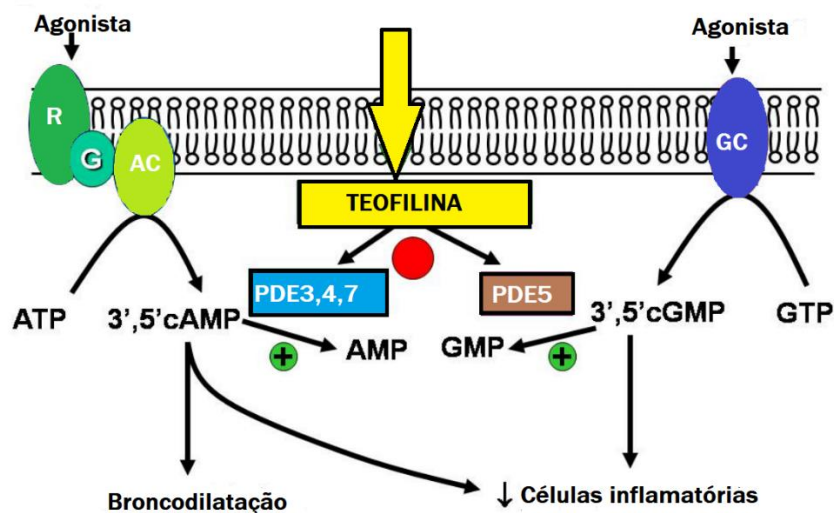


Figura 4: Inibição de fosfodiesterases pela teofilina, adaptado de (25)

1.3.2.2 Antagonismo dos receptores de adenosina

Na década de 70 Burnstock classificou os receptores purinérgicos em P1(adenosina) e P2 (ATP), os receptores P1 são bloqueados pelas metilxantinas. Os receptores P1 dividem-se em: A1-adenosina (inibidores da adenilciclase), A2-adenosina (estimulantes da adenilciclades), por outro lado os receptores A2 subdividem-se em A2a que apresentam alta afinidade com os agonistas e A2b que apresentam baixa afinidade. Posteriormente em 1992 foi descoberto o recetor A3-adenosina que para além de inibir a adenilciclase como os receptores A1, estimula a fosfolipase – C (39). No ano a seguir, Sawynok publica um artigo de revisão onde é descrito o efeito bloqueador da cafeína nos receptores de adenosina para a produção do AMPc, cujos primeiros estudos tiveram início em 1969 (39).

A cafeína e outras metilxantinas têm ação inibitória em todos receptores de adenosina, sobretudo no A1 e A2, esses bloqueios promovem a libertação de hormonas como a norepinefrina, dopamina e serotonina, levando à estimulação do sistema nervoso central o que melhora o desempenho mental e o estado de alerta (40).

A cafeína possui uma estrutura molecular semelhante à da adenosina, o que lhe permite ligar-se aos receptores da adenosina sem os ativar (impedindo o relaxamento e a sonolência). O mecanismo de ação mais importante para se compreender os efeitos da cafeína envolve o bloqueio dos receptores de adenosina presentes em todo corpo humano (**figura 5**). Acoplados a proteínas G, os receptores de adenosina desencadeiam um sistema de ações em cascata e estimulação positiva ou negativa muito importantes para a fisiologia humana (40). No tecido cardíaco os receptores A1 e A3 encontram-se

acoplados a proteínas Gi (inibidoras da proteína G) e a sua estimulação resulta na diminuição dos níveis intracelulares de AMPc, originado a abertura dos canais de cálcio e hiperpolarização da célula, ao contrário da estimulação dos recetores A2a e A2b acoplados a proteínas Gs que estimulam a adenil ciclase aumentando a concentração de AMPc, a qual activa a proteína quinase que por sua vez estimula os canais de potássio sensíveis ao ATP nas células musculares lisas, levando o relaxamento do musculo liso.

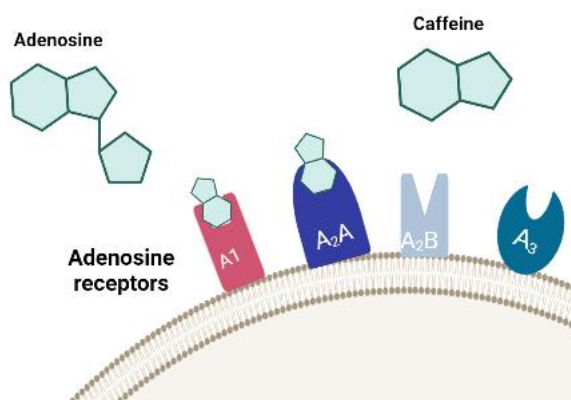


Figura 5: Antagonismo dos recetores de adenosina(40)

1.3.2.3 Regulação do nível de cálcio intracelular

O efeito da ação das metilxantinas nas vias de sinalização do cálcio foi demonstrado pela primeira vez nas células do musculo esquelético. A cafeina atua como um potente agonista dos recetores de rianodina (RyR). O seu mecanismo de ação depende da concentração, sendo que a partir de 1-2 mM reduz o limiar de excitabilidade e prolonga o tempo de contração muscular. Este processo permite que o cálcio atravesse as barreiras da membrana e reticulo sarcoplasmático, aumentando a disponibilidade de cálcio intracelular para a contração muscular (37,41).

Os recetores de rianodina (RyR), canais intracelulares de cálcio localizados em células musculares e neuronais, desempenham um papel central neste mecanismo. São grandes proteínas de canal tetramérico que apresentam uma estrutura semelhante a um trevo de quatro folhas quando observadas por microscopia eletrónica (**figura 6**) (37).

Em células cardíacas, a cafeína e outras metilxantinas como a aminofilina e teofilina, aumentam a atividade basal dos recetores de rianodina (RyRs) ao promover a libertação de reservas internas de cálcio para o citoplasma, e inibem os recetores de inositol trifosfato (IP3) impedindo a reabsorção de cálcio pelo reticulo sarcoplasmático. Este

efeito combinado resulta numa maior disponibilidade de íões cálcio, o que, por sua vez, potencia a força de contração muscular (42).

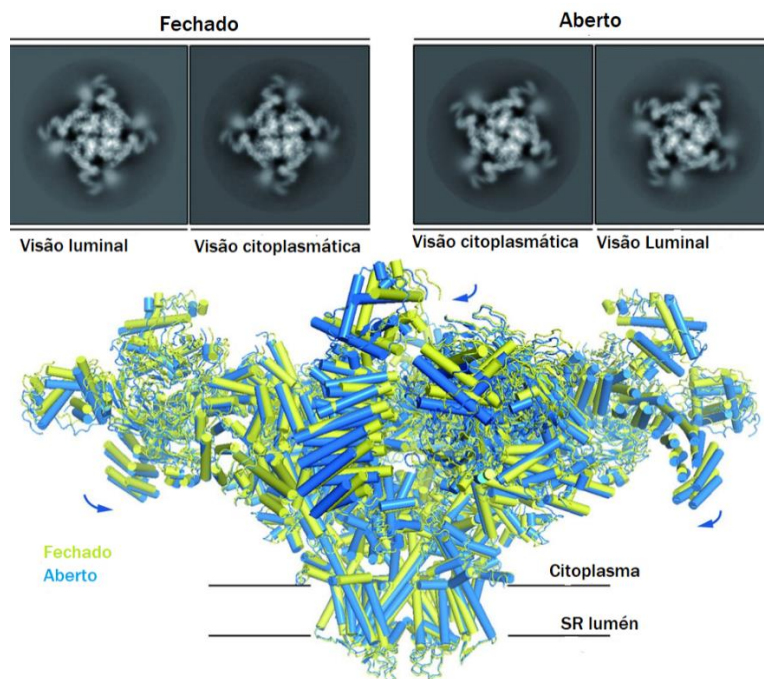


Figura 6: Estrutura dos recetores de rianodina (RyR) por micografias eletrónicas, as setas azuis indicam a mudança da região citoplasmática do estado fechado para aberto, adaptado de (41).

1.3.2.4 Modulação dos recetores GABA

A modulação dos recetores GABA (ácido gama-aminobutírico) e ativação de histonas desacetilases (HDCA) são outros possíveis mecanismos de ação das metilxantinas, que têm sido o tema de alguns estudos. Em alguns contextos, foi observado que as metilxantinas em concentrações que excedem os níveis terapêuticos podem ativar os recetores GABA enquanto em outros estudos as concentrações plasmáticas de metilxantinas provenientes da ingestão alimentar não teve efeito sobre os recetores GABA (3).

1.4 Xantinas presentes nos alimentos naturais e processados

O consumo de xantinas, seja por meio de alimentos naturais ou processados, está associado a diversos benefícios à saúde, como a melhoria da concentração e do desempenho físico. No entanto, o consumo excessivo de xantinas pode também ter

efeitos adversos, como insónia, aumento da tensão arterial e ansiedade. Por isso, é fundamental compreender a presença e o impacto destas substâncias nos alimentos quotidianos para uma alimentação equilibrada e saudável. Na **tabela 2** podemos ter uma noção da sua quantidade estimada tanto em alimentos naturais como processados.

Tabela 2: Quantidade estimada de xantinas em alimentos naturais e processados (43–46).

Xantina	Alimentos naturais	Alimentos processados	Quantidade estimada em alimento
cafeína	grãos de café chá preto chá verde erva mate guaraná grãos de cacau	refrigerantes de cola bebidas energéticas chocolates contendo cacau chás instantâneos	café: 80-120 mg chá preto: 40-70 mg chá verde: 20-45 mg erva mate: 30-50 mg refrigerantes de cola: 20-30 mg bebida energética: 80-100 mg
teofilina	chá preto chá verde erva mate	suplementos alimentares bebidas desportivas	chá preto (200 ml): 1-9 mg chá verde (200 ml): 1-5 mg erva mate (200 ml): 1-4 mg
teobromina	cacau chocolate amargo grãos de cacau chá preto	presente em alimentos processados que contêm chocolate e cacau	chocolate amargo (30 g) : 150-200 mg cacau em pó (1 colher de sopa): 50-60 mg chá preto (200 ml): 5-15 mg

1.5 Xantinas na saúde e na Doença

Conforme descrito na secção anterior, as xantinas (cafeína, teofilina e teobromina) estão presentes em diversos alimentos naturais e processados, estas metilxantinas possuem propriedades com impactos positivos e negativos na saúde, o que tem sido motivo de várias investigações para compreender melhor os efeitos destes compostos e potenciar aplicações terapêuticas para o tratamento de doenças respiratórias, cardiovasculares e

neurológicas entre outras. Seguidamente serão referidas algumas das possíveis aplicações.

1.5.1 Atividade anti parkinsonismo e anti Alzheimer

As doenças de Parkinson e Alzheimer resultam de dano às células cerebrais, no entanto devido a complexidade destas condições ainda não existem terapias definitivas para o tratamento destas doenças (20). O desenvolvimento de inibidores para tratar estes transtornos tem sido uma das opções com maior expectativa, diante disto as investigações têm-se focado em compostos heterocíclicos que contêm nitrogénio na sua estrutura (47,48).

As xantinas, como já referido, são pseudo-alcaloides constituídos por um sistema de anéis fundidos contendo carbono e nitrogénio, que demonstram atividade no sistema nervoso central. Por exemplo, a cafeína bloqueia os recetores de adenosina A2A e progressivamente melhora a transmissão dopaminérgica, resultando no alívio dos sintomas motores de Parkinson (48).

A cafeína também é capaz de prevenir a agregação de péptidos beta-amiloide (um dos principais marcadores da doença de Alzheimer), reduzir a neuroinflamação e melhorar da função cognitiva, fatores que desempenham um papel importante na progressão da doença de Alzheimer (49).

1.5.2 Atividade anticancerígena

Estudos focados em novas terapias para o tratamento de cancro sugerem que as xantinas podem ter propriedades anticancerígenas. Quando combinadas com o metotrexato induzem a apoptose e têm sido usadas para o tratamento de Leucemia linfocítica aguda (50).

In vitro, a teofilina mostrou ser capaz de induzir a apoptose em várias linhas de células cancerígenas humanas, o mecanismo desse efeito envolve a redução dos níveis intracelulares do mediador antiapoptótico Bcl2. Resultados que fornecem uma base sólida para futuros estudos em animais, visando uma compreensão mais aprofundada do potencial anticancerígeno da teofilina (51).

1.5.3 Atividade antiasmática

Os medicamentos xantínicos são clinicamente eficazes no tratamento da asma devido ao efeito broncodilatador, produzem a sua ação inibindo a fosfodiesterase, o que resulta no aumento dos níveis de AMPc, permitindo o relaxamento das células e dilatação dos brônquios facilitando a respiração (50).

A teofilina é a principal xantina antiasmática, para além de inibir competitivamente a fosfodiesterase, também se liga ao recetor A₂B da adenosina e bloqueia a bronconstrição mediada pela adenosina (52).

1.5.4 Atividade antidiabética

A Diabetes melitus (DM) é uma doença séria que afeta o metabolismo dos hidratos de carbono, proteínas e lípidos, caracterizando-se por uma hiperglicemia crónica que resulta de defeitos na secreção da insulina ou sua ação. De acordo com os dados da Organização Mundial da Saúde, mais de 4 milhões de pessoas perdem a vida anualmente por causa da diabetes (53).

A maioria das terapias antidiabéticas disponíveis atualmente aborda os sintomas da doença e não as causas que a geram, esta lacuna ressalta a importância de novos agentes para o tratamento e controle da condição diabética(26). Têm sido exploradas algumas estratégias usando derivados de xantina e formulações de quitosana, esta combinação demonstrou efeitos antidiabéticos promissores por proteger as funções hepáticas, renal e o perfil hematológico que são afetados no distúrbio de diabetes melitus (53).

Os resultados de estudos epidemiológicos também indicam que o consumo habitual e moderado de café está relacionado a uma redução no risco de desenvolvimento de diabetes do tipo 2 ao prevenir a deterioração da função do fígado e das células beta (54).

1.5.5 Atividade antidepressiva e ansiolítica

Os transtornos de saúde mental desempenham um papel central nas grandes transformações sociais e culturais do último século, estando entre as principais causas de incapacidade no mundo (55). As xantinas apresentam efeitos psicotrópicos por inibirem as fosfodiesterases, por apresentarem antagonismo dos recetores de adenosina e terem capacidade de se ligarem aos recetores serotoninérgicos e dopaminérgicos.

A cafeína é a xantina mais estudada e consumida no mundo, possui um leve potencial para o tratamento da depressão, ajudando a melhorar o humor por modulação dos neurotransmissores, e bloqueia os recetores de adenosina A₁ o que permite o aumento da liberação de serotonina nas áreas límbicas e dopamina no córtex pré-frontal, efeito similar ao obtido com uso de antidepressivos. Em contraste, tem-se observado que altas doses de cafeína podem induzir ansiedade devido à sua ação estimulante no sistema nervoso central (55,56).

1.5.6 Atividade analgésica e anti-inflamatória

Os compostos analgésicos e anti-inflamatórios são medicamentos utilizados para o tratamento da dor e inflamação, muitos deles estão associados a efeitos colaterais e toxicidades, por isso surge a necessidade do desenvolvimento de novos agentes baseados em derivados naturais como as xantinas por apresentarem menos efeitos colaterais e toxicidade (57).

A inibição de fosfodiesterases (PDE4 e PDE7) tem sido o foco das terapias atuais para o tratamento da inflamação por estar associada a baixa produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF-alfa e IL-6. Os derivados da xantina apresentam potencial anti-inflamatórios porque são capazes de inibir as fosfodiesterases e bloqueiam os recetores de adenosina que promovem a sensação de dor e inflamação no sistema nervoso central (57,58).

A cafeína tem sido muito usada como um componente adjuvante de muitos analgésicos de venda livre, uteis para o tratamento de dores leves, porém quando utilizada isoladamente, a cafeína tem uma ação analgésica baixa, sendo mais eficaz quando combinada com analgésicos tradicionais (59).

1.5.7 Atividade diurética

A teofilina e a cafeína afetam levemente a função renal, desde o século passado que têm sido usadas para aumentar a produção de urina. Estas metilxantinas são vasodilatadores renais fracos, atuam como antagonistas competitivos contra a vasoconstrição pré glomerular induzida pela adenosina nos rins e aumentam os níveis do AMPc pela inibição da enzima fosfodiesterase, favorecendo a excreção de sódio e água (60).

1.5.8 Atividade anti-obesidade

A obesidade é uma doença crônica causada pela acumulação excessiva de gordura corporal, pode originar doenças cardíacas, certos tipos de cancro e diabetes do tipo 2 (61). Produtos naturais como a cafeína, teofilina e teobromina têm evidenciado o seu potencial preventivo e terapêutico no controle da obesidade devido a capacidade de regularem a adipogênese e estimularem a lipólise no tecido adiposo, promovendo assim a quebra da gordura armazenada, que ocorre pela inibição da fosfodiesterase pelas xantinas e resulta na ativação da proteína quinase A (PKA) que promove a libertação de HSL que é responsável pela degradação da gordura em ácidos gordos livres (61). A cafeína também tem sido amplamente usada para o aumento da performance física, o que contribuiu para uma maior perda de gordura corporal.

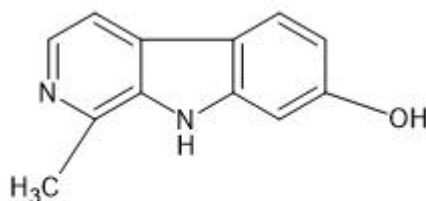
1.5.9 Atividade antimicrobiana e anti-tuberculose

A atividade das xantinas como agente antimicrobiano e antituberculoso são campos de investigação poucos explorados, existe uma escassez de artigos que descrevem este potencial.

1.6 Harmol – propriedades físico-químicas, farmacocinética e mecanismo de ação

O harmol é um alcaloide do grupo das beta-carbolinas, encontrado na *Peganum Harmala L*, uma planta da família *Zygophyllaceae*, de uso medicinal ritualístico nas regiões da Ásia Central e do Oriente Médio (9). Conforme mostra a **figura 7**, é composto por 3 anéis na sua estrutura, apresenta-se como um sólido cristalino de cor branca ou

amarela, é altamente solúvel em compostos orgânicos e tem o ponto de fusão entre 252-253 °C (62).



1-metil-9H-pirido[3,4-b]indol-7-ol

Figura 7: Estrutura química do Harmol, desenhada utilizando o software ACD Labs ChemSketch.

Os poucos estudos farmacocinéticos sobre o harmol sugerem que tal como os outros alcaloides betacarbonílicos (harmina, harmalol e tetrahydroharmina), é rapidamente absorvido e distribuído no organismo incluindo o sistema nervoso central, metabolizado no fígado por ação da enzima co-citocromo P450 e excretado principalmente pela via renal (63).

O seu mecanismo de ação mais conhecido é a inibição da monoamina oxidase (MAO), enzima presente na membrana mitocondrial, podendo estar nos rins, no baço, nos intestinos e em maior quantidade no cérebro, onde degrada neurotransmissores como a serotonina, dopamina, norepinefrina e tiramina, estando ligada a efeitos antidepressivos e ansiolíticos (64). Os outros potenciais de ação do harmol incluem atividade anti tumoral (pode inibir a proliferação e induzir a apoptose de células cancerígenas) e atividade antioxidante (capacidade significativa de neutralizar radicais livres, prevenindo danos celulares) (10,65).

1.7 Metodologias utilizadas para a determinação de metilxantinas e harmol

Os métodos mais comuns para determinar o harmol, são baseados em técnicas cromatográficas, espectroscópicas e eletroquímicas, sendo o HPLC o mais usado (66). Quanto às metilxantinas, podemos encontrar na **tabela 3** as metodologias mais utilizadas para a sua determinação.

Tabela 3: Metodologias utilizadas para a determinação de metilxantinas e harmol

Técnica de análise	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)	Cromatografia Gasosa (GC)	Espectrofotometria UV/ VIS	Voltametria	Imunoensaio (ELISA)	Ressonância Magnética Nuclear (RMN)
Princípio	Separação dos componentes de uma amostra entre as fases móvel e estacionária	Separação em fase gasosa com deteção por ionização de chama ou espectrometria de massas	Quantificação baseada na absorção de luz UV (270-275 nm)	Medição da corrente elétrica gerada pela oxidação/redução das metilxantinas num eléctrodo	Baseado na reação antígeno-anticorpo, com deteção por enzima	Identificação de núcleos atômicos em campos magnéticos fortes para elucidação estrutural
Vantagens	Elevada sensibilidade, e reprodutibilidade	Elevada resolução para concentrações baixas	Custo baixo e simples	Seletividade, baixo custo e alta sensibilidade	Alta sensibilidade e adequado para amostras biológicas	Fornece informações estruturais detalhadas, útil para confirmação de identidade
Desvantagens	Custo alto, requer preparação das amostras	Processo mais laborioso por causa da necessidade de derivatização prévia	Baixa seletividade	Menos utilizada em comparação com as outras técnicas	Custo elevado, necessidade de anticorpos específicos	Equipamento sofisticado e caro, menos utilizado para quantificação
Aplicação	Determinação de metilxantinas em alimentos, fármacos e amostras biológicas	Determinação de metilxantinas após a derivatização em alimentos e bebidas	Determinação de metilxantinas em soluções, por exemplo bebidas (café, chá)	Determinação da cafeína e teofilina em alimentos e fármacos	Monitorização de cafeína em plasma e urina, toxicologia e farmacocinética	Elucidação estrutural de metilxantinas, identificação e caracterização

(18,67–73)

1.8 Consumo de bebidas e ingestão de xantinas e harmol – uma relação a estudar

O consumo de bebidas ricas em xantinas tem-se consolidado como um hábito profundamente enraizado em diversas culturas em redor do mundo. Entre essas bebidas, o café ocupa uma posição de destaque, sendo um dos produtos alimentícios mais comercializados globalmente. A cafeína, principal metilxantina encontrada no café, é também a mais abundante entre os alimentos (11,74). Em Portugal, de acordo com a Associação Industrial e Comercial do Café (AICC), o consumo de café é uma tradição histórica e cultural. O café português distingue-se pela biodiversidade dos seus grãos, pela cor de avelã característica e pelo processo de torra natural e tradicional que realça o aroma e doçura, reduzindo o amargor (75).

Dados recentes da AICC e da *European Coffe Federation* indicam que 80% dos portugueses consomem café, com uma média de 2,5 chávenas por dia. A nível global, o relatório de mercado da *International Coffee Organization*, publicado em janeiro de 2023, mostra que a produção total de café referente ao ano cafeeiro 2021/2022 foi de aproximadamente 167,2 milhões de sacas de 60 kg, enquanto o consumo mundial foi estimado em 170,3 milhões de sacas (75).

A concentração de cafeína no café varia de acordo com o método de preparação. Por exemplo, chávena de café solúvel contém aproximadamente 65 mg de cafeína, enquanto o café torrado e moído pode chegar a 85 mg por chávena. O café expresso, amplamente consumido em Portugal, apresenta entre 50 e 60 mg por dose de 30 ml e 3mg por chávena de café descafeinado. Outras fontes comuns de cafeína incluem refrigerantes à base de cola (25-45 mg por lata) e bebidas energéticas, além de chá e suplementos (2,76).

Além do café, o chá é outra bebida amplamente consumida, sendo a segunda bebida mais popular do mundo, depois da água, segundo a Organização das Nações Unidas (ONU). A cadeia produtiva do chá movimenta anualmente mais de 17 bilhões de dólares (77).

Os diferentes tipos de chá contêm compostos bioativos, incluindo metilxantinas, flavonoídes, polifenóis, catequinas, sais minerais e vitaminas. Estas propriedades têm sido amplamente estudadas devido aos seus benefícios para a saúde, como atividade antioxidante, anti-inflamatória e efeitos neuroprotetores (6).

A cafeína e outras metilxantinas representam a classe de substâncias psicoativas de maior consumo no mundo. Diversos estudos mostram que a ingestão destas

metilxantinas tem efeitos diretos no funcionamento do corpo humano (modulação dos recetores de adenosina, inibição da fosfodiesterase, modulação de recetores GABA e regulação dos níveis de cálcio) (76). Estas ações contribuem para a melhoria da atenção, redução da fadiga e estimulação do sistema nervoso central, o que reforça a relevância científica e social do estudo do consumo dessas substâncias.

Ainda que as metilxantinas sejam amplamente consumidas, há lacunas no conhecimento sobre a ingestão combinada de cafeína, teofilina e outros compostos, como o harmol, especialmente em diferentes matrizes alimentares. O harmol, um alcaloide beta-carbolínico com propriedades antidepressivas, antioxidantes e anticancerígenas, também desperta interesse devido ao seu potencial terapêutico e à sua presença em bebidas e alimentos. Assim, estudar a relação entre o consumo dessas substâncias e os seus efeitos no organismo humano é essencial para compreender melhor sua influência na saúde e no bem-estar, além de embasar estratégias de consumo consciente.

Capítulo 2 – Objetivo do estudo

As xantinas são pseudoalcalóides cíclicos que derivam dos nucleótidos de purina, produzidos naturalmente por plantas e animais. Desde a antiguidade que o ser humano usa plantas e produtos de origem natural para o seu consumo e terapias medicinais. Entre os constituintes psicoativos mais abundantes nestes produtos destacam-se as metilxantinas, nomeadamente a cafeína, a teobromina e a teofilina (78).

Estes compostos, formadas como metabolitos secundários em algumas espécies do reino vegetal, estão presentes em fontes como folhas de chá, grãos café e cacau, bagas de guaraná e sementes de cola (2,3). Recentemente, a cafeína e a teofilina têm-se tornado ingredientes funcionais amplamente utilizados na produção de refrigerantes e bebidas energéticas, devido a sua atividade biológica, que não só contribui para a melhoria do aroma e sabor das bebidas, como também reduz a fadiga e aumenta a atenção dos consumidores (79). Como referido anteriormente, a ingestão de metilxantinas tem efeitos diretos no funcionamento do corpo humano (modulação dos recetores de adenosina, inibição da fosfodiesterase, modulação de recetores GABA e regulação dos níveis de cálcio) (3).

O harmol, por sua vez, é um alcaloide beta-carbolínico com grande potencial terapêutico, conhecido pela sua ação antidepressiva, ansiolítica e antioxidante. Também atua como um indutor de apoptose e autofagia em células cancerígenas, tornando-se um alvo de interesse em diversos estudos e aplicações biológicas(10,65).

A cafeína, teofilina e o harmol compartilham estruturas heterocíclicas e efeitos no sistema nervoso central, sendo espécies químicas que exigem métodos analíticos sensíveis para a sua deteção. Facto que ressalta a necessidade de se desenvolver de um método cromatográfico robusto, como o HPLC-DAD, capaz de identificar e quantificar estas substâncias em simultâneo.

Por outro lado, a quantidade destas metilxantinas e harmol consumidas pela população ainda não é amplamente conhecida. Por isso, no presente trabalho pretende-se também determinar o teor de cafeína, teofilina e harmol em produtos adquiridos no mercado português.

Tendo em conta o contexto referido, o principal objetivo desta dissertação de mestrado é a determinação da cafeína, teofilina e harmol em bebidas refrigerantes, cafés e chás

adquiridos no mercado português, através de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

Para alcançar o objetivo principal, foram definidas as seguintes tarefas de investigação:

- ✓ Desenvolver e validar um método por cromatografia líquida acoplada a um detetor de foto-díodos para determinação de cafeína, teofilina e harmol;
- ✓ Identificar e quantificar a cafeína, teofilina e harmol nas amostras recolhidas através do método desenvolvido;
- ✓ Estimar as quantidades de cafeína, teofilina e harmol nos produtos mais comuns do mercado português;

Este estudo busca contribuir para o entendimento do consumo destas substâncias na dieta da população portuguesa, além de promover avanços na análise e monitorização de compostos bioativos em alimentos e bebidas.

Capítulo 3 – Parte experimental

3.1. Materiais e Métodos

3.1.1. Material e Instrumentação

- Balança analítica Sartorius S.A. (Via Athena, Sacavém, Portugal);
- Micropipetas automáticas de 20µL, 200µL e 1000µL Eppendorf (Madrid, Espanha);
- Vórtex Mixer da labnet International – modelo 230V (Via Athena, Sacavém, Portugal);
- Filtro 0,22µm acetato de celulose, Enzymatic (Lisboa, Portugal);
- Material corrente de laboratório;
- Sistema de purificação de água Milli-Q Advantage A10® system da Milipore (Algés, Portugal).

3.1.2. Reagentes e padrões analíticos

Para a análise da cafeína, teofilina e harmol a fase móvel foi constituída por metanol, obtido da Fischer Chemical (Loughborough, Reino Unido) ácido fórmico com 99,9% de pureza adquirido da SigmaAldrich (Sintra, Portugal) e a água desionizada foi obtida de um sistema Milli Q (Milipore Billerica MA EUA). Os padrões de cafeína, harmol e teofilina usados foram adquiridos à Sigma Aldrich (Sintra, Portugal).

3.2. Sistema cromatográfico e condições cromatográficas

O sistema de cromatografia líquida de elevada eficiência acoplado a um detetor de arranjo de diodos (HPLC-DAD) (utilizado para desenvolver e validar o método de análise foi o modelo 1200 *infinity series* da Agilent Technologies (Soquimica, Lisboa, Portugal). Este sistema estava equipado com uma coluna analítica YMC-Triart PFP (150 x 4.6 mm.LD S-5 µm, 12nm) (Solítica, Arruda dos Vinhos, Portugal).

Na **tabela 4** encontram-se apresentadas as condições que foram utilizadas para o desenvolvimento do método cromatográfico.

Tabela 4: Condições cromatográficas.

Parâmetros		
Eluente A	Metanol com 0,1% de ácido fórmico	
Eluente B	Água com 0,1% de ácido fórmico	
Volume de injeção	20 µL	
Fase móvel (modo gradiente)	Tempo (min) Percentagem do solvente (%)	
		Fase móvel A Fase móvel B
	0	40% 60%
	12	42,3% 57,7%
14	40% 60%	
Temperatura da coluna	25 °C	
Temperatura do injetor	4 °C	
Fluxo da fase móvel	1,5 mL/min	
Comprimentos de onda (λ)	290nm (teofilina), 273nm (cafeína), 246nm (harmol)	
Tempo total da corrida cromatográfica	14 minutos	

Utilizando estas condições foi possível obter a identificação inequívoca dos compostos em estudo.

3.3. Preparação de soluções

3.3.1. Soluções padrão

Foram preparadas soluções padrão em metanol de todos os compostos em estudo, à concentração de 1000 µg/mL. Todas as soluções foram armazenadas, até à sua utilização, em recipiente fechado ao abrigo da luz e a uma temperatura de 4 °C.

3.3.2. Outras soluções

A fase móvel consistiu numa mistura de metanol com 0,1% de ácido fórmico e 0,1% de ácido fórmico em água. Para a preparação da solução de metanol com 0,1% de ácido

fórmico, foi pipetado, para um balão volumétrico de 1000 mL, 1 mL de ácido fórmico, sendo que se fez o restante volume com metanol. Para a preparação da solução de 0,1% de ácido fórmico em água, foi pipetado, para um balão volumétrico de 1000 mL, 1 mL de ácido fórmico, sendo que se fez o restante volume com água Milli-Q.

3.4 Preparação das amostras

Neste estudo foram analisadas 21 amostras de cafés e 6 amostras de chás/infusão de marcas comerciais encontradas nos supermercados portugueses. De entre as amostras de café, 13 eram café em cápsulas e 8 de café moído e solúvel. A primeira etapa foi pesar as amostras de café de forma a saber qual a quantidade de café que estava presente na cápsula, como tal numa balança analítica de precisão pesaram-se as cápsulas de café fechadas, depois de fazer o café na máquina foi vaziado o conteúdo e foram pesadas as cápsulas vazias (**tabela 5**).

Tabela 5: Quantidade de café (em gramas) presente no interior das cápsulas.

	Quantidade de café presente no interior das cápsulas (g)
Café 1	6,73
Café 2	5,95
Café 3	7,06
Café 4	6,19
Café 5	5,82
Café 6	6,35
Café 7	5,35
Café 8	5,86
Café 9	5,00
Café 10	5,01
Café 11	5,61
Café 12	4,93
Café 13	5,61

No caso do café moído e solúvel, foi avaliada qual a massa que levava um porta-filtro de uma máquina de café industrial. A massa do café em pó foi de 5,8 gramas (n=10). Depois de pesar, o passo a seguir foi a extração dos cafés utilizando uma máquina de cafés expresso (para o café moído e solúvel) e uma máquina de cápsulas (para os cafés em cápsula). O volume final de cada café foi de 25mL (volume medio de um café expresso

em Portugal). O último passo antes das amostras serem injetadas no sistema cromatográfico foi proceder à filtração com um filtro de acetato de celulose de 0,22 μ m. O volume final recolhido foi de 1mL.

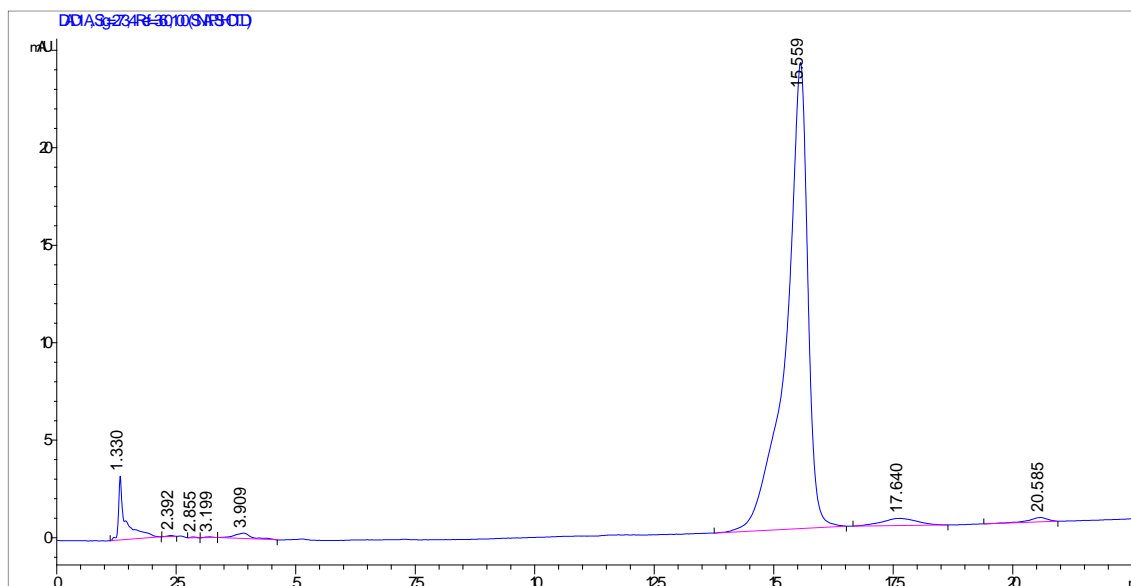
Relativamente às amostras de chá/infusão, foram analisados chás e infusões comercializados em forma de saquetas. As 6 amostras de chá/infusão foram pesadas (chá1 – 1,70g, infusão 2 – 0,78g, chá 3 – 2,17g, infusão 4 – 0,89g, chá 5 - 1,69g, chá 6 - 2,25g) em seguida colocou-se num copo com 200 mL de água quente (100°C; temperatura controlada) durante 5 minutos e no final as amostras foram filtradas com um filtro de acetato de celulose de 0,22 μ m. Foi considerado um volume de 200mL por ser o volume médio utilizado no consumo de uma chávena de chá/infusão. O volume final recolhido foi de 1mL.

Capítulo 4 – Resultados e discussão

4.1. Otimização das condições cromatográficas

Antes de alcançar o método final, foi realizada a otimização de diferentes etapas, incluindo o desenvolvimento do método cromatográfico. As condições iniciais foram baseadas em um método previamente desenvolvido pela equipa de investigação. Foram injetados 20µL de cada padrão dos analitos em estudo, utilizando as condições descritas a seguir:

Composição inicial da fase móvel: 0,1% ácido fórmico em metanol (linha A) + 0,1% ácido fórmico em água (linha B): 5:95 (v/v). Usando estas condições foi possível identificar os analitos em estudo. Contudo, devido ao facto de apresentarem tempos de retenção muito elevados (**figura 8**) foi decidido alterar a proporção da composição inicial para 60:40 (v/v) como anteriormente descrito. Utilizando estas condições os tempos de retenção foram 15,56 minutos para a teofilina, 20,5 minutos para cafeína e 23,3 minutos para o harmol.



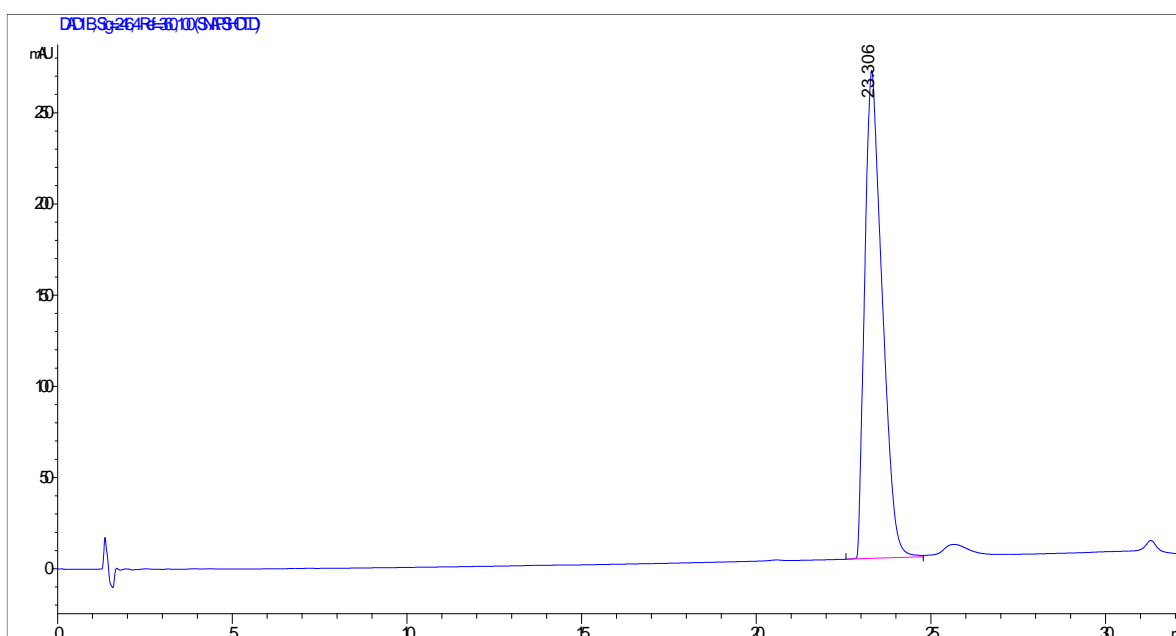
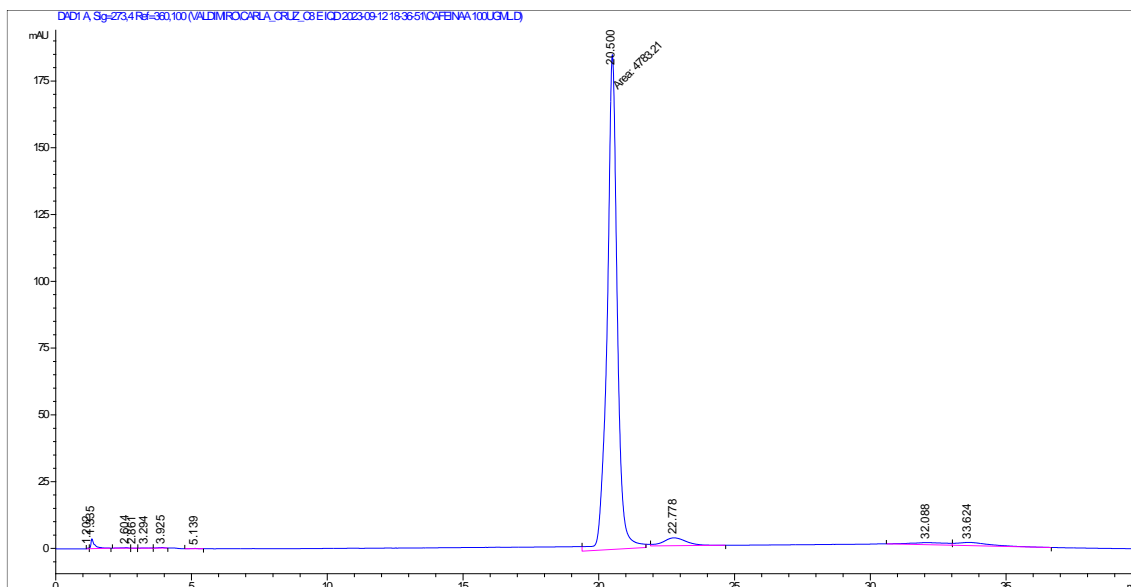


Figura 8: Cromatogramas relativos à teofilina (tempo de retenção de 15,56 minutos), cafeína (tempo de retenção de 20,5 minutos) e harmol (tempo de retenção de 23,3 minutos), respectivamente. A concentração utilizada foi 100µg/mL.

4.2. Validação do método analítico

O desenvolvimento de métodos cromatográficos quantitativos com uma abordagem multifuncional e contextualizada, que permita uma aplicação flexível e fiável em contextos de elevado volume de trabalho, assume-se, atualmente, como uma estratégia essencial. Nesse sentido, a validação e a manutenção eficaz desses métodos tornam-se indispensáveis para assegurar a política de garantia de qualidade. A validação, em

particular, é crucial para avaliar parâmetros como seletividade, linearidade, limites de detecção e quantificação, exatidão e precisão, garantindo que o método seja robusto, reprodutível e adequado ao fim a que se destina(80–83). O método proposto foi validado conforme os critérios de validação da *Food and Drug Administration* (84). Os parâmetros que foram estudados são os que se descrevem nas linhas a seguir.

4.2.1. Seletividade

A seletividade de um método analítico é a capacidade do mesmo distinguir com precisão o analito na presença de outros constituintes na matriz analisada, é um parâmetro importante para garantir que a quantificação da espécie de interesse não seja afetada pela presença de outras substâncias, o que permite obter resultados mais precisos e confiáveis (85–87).

Com base nas condições cromatográficas apresentadas acima os padrões puros foram injetados isoladamente e em conjunto à concentração de 100 µg/mL. Com base no tempo de retenção (t_R) foi possível identificar cada analito, verificando que não existe coeluição entre os analitos em estudo o que nos permite observar a seletividade do método (**tabela 6 e figuras 9,10 e 11**).

Tabela 6: Tempo de retenção e comprimento de onda dos analitos em estudo.

Composto	Tempo de retenção (t_R)	λ (nm)
Teofilina	3,2 min	290
Caféina	4,87 min	273
Harmol	5,6 min	246

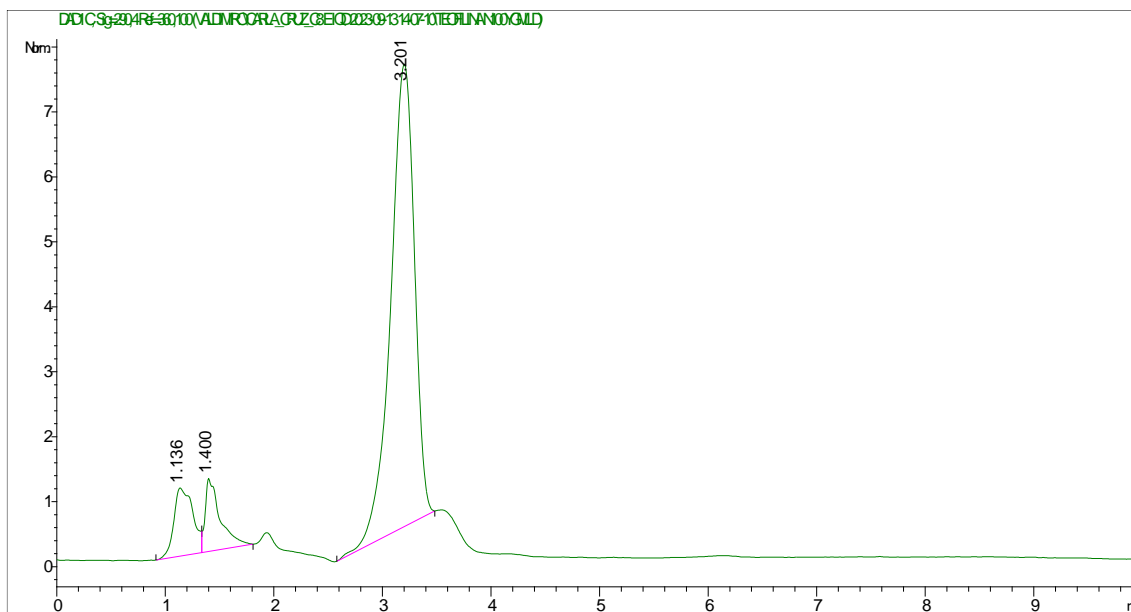


Figura 9 Cromatograma obtido para o padrão puro da teofilina a 0,1 mg/mL. $\lambda=290$ nm tR=3,2 min

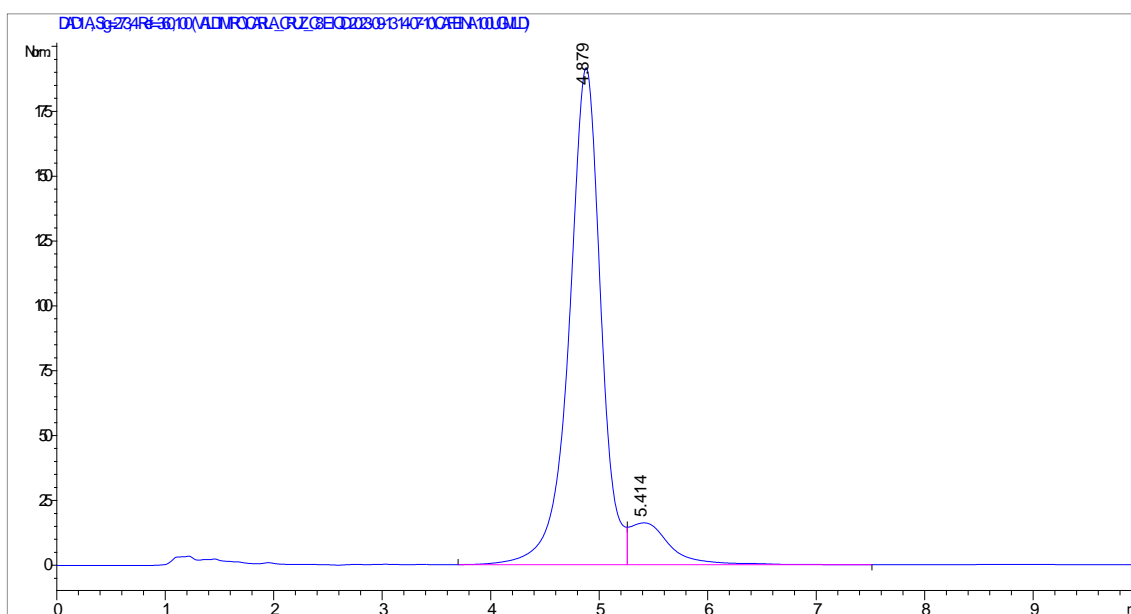


Figura 10: Cromatograma obtido para o padrão puro de cafeína a 0,1 mg/mL. $\lambda=273$ nm tR=4,87 min

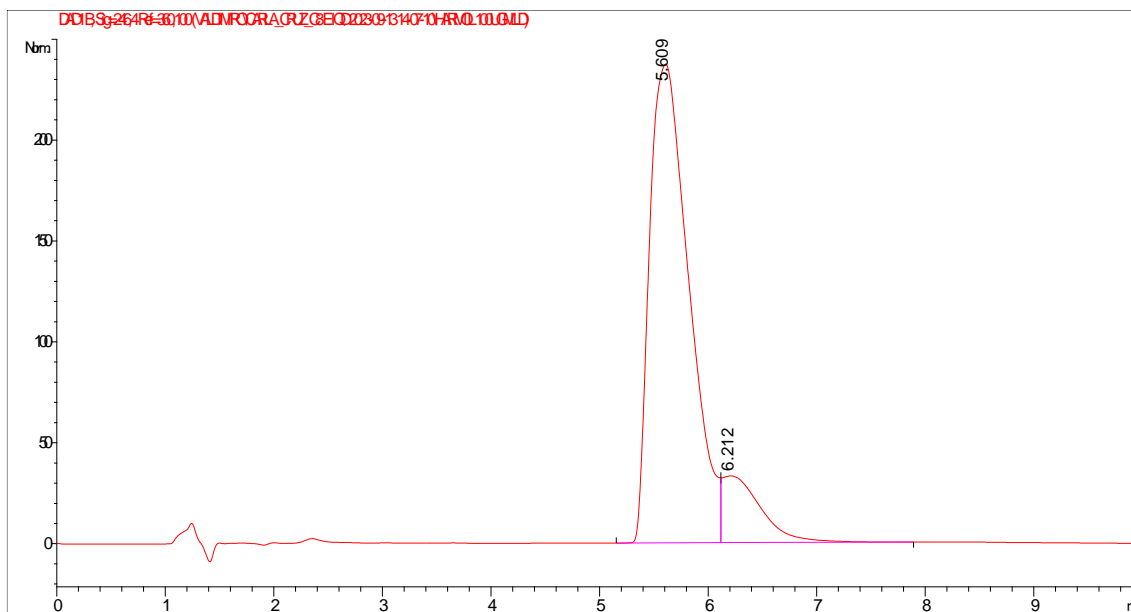


Figura 11: Cromatograma obtido para o padrão puro de harmol a 0,1 mg/mL. $\lambda=246$ nm tR=5,6 min

4.2.2. Linearidade e limites de detecção e quantificação

Para prever a concentração de uma amostra desconhecida, utiliza-se um modelo matemático chamado curva de calibração, que relaciona a resposta instrumental obtida com as concentrações conhecidas de padrões, dentro de uma faixa que inclua o analito. Isto permite conhecer o limite de detecção e o limite de quantificação (88,89). Para que a relação entre a concentração e a resposta experimental seja devidamente estabelecida, é essencial utilizar um número suficiente de padrões de calibração, com concentrações variáveis dentro de uma gama pretendida.

No sentido de averiguar a relação entre a concentração teórica de cada analito e as áreas dos picos cromatográficos obtidos para cada um dos analitos, foram realizados estudos de linearidade ($n=5$) utilizando concentrações crescentes de cada analito. Para construir a curva de calibração, é necessário ter em consideração o intervalo esperado de valores analíticos e a natureza da relação entre o analito/resposta do estudo. Para que este parâmetro seja considerado aceitável, os valores obtidos para cada concentração (erro relativo médio ou BIAS) devem estar incluídos entre $\pm 15\%$ da concentração teórica, exceto para o limite inferior de quantificação (LLOQ) em que a variação pode ser até $\pm 20\%$. Para cada analito foram utilizados, no mínimo, sete calibradores equitativamente distribuídos uniformemente numa gama de concentrações entre 0,39-200 $\mu\text{g/mL}$ para o harmol e cafeína e de 0,78-200 $\mu\text{g/mL}$ para a teofilina (tabela 7).

Além de avaliar o erro relativo médio de cada calibrador, como anteriormente descrito, foram preparados um mínimo de 4 *quality control samples* (QCs), cada um em triplicado (n=3), nas concentrações do LLOQ (0,39 e 0,78 µg/mL), baixa (1,56 µg/mL), intermédia (12,50 µg/mL) e alta (100 µg/mL). Os QCs permitem validar cada corrida individualmente para que se possam utilizar os dados recolhidos, mas também permitem avaliar a robustez do método. Foram estudados 4 QCs para todos os compostos em estudo, tendo em conta o intervalo de linearidade.

A curva de calibração seguiu um modelo linear (**figura 12**) é apresentada na forma de equação: $y=mx+b$

Em que:

- y – Sinal medido no detetor
- m – Declive da curva de calibração
- x – Concentração do analito
- b – Interseção com o eixo y (ordenada na origem)

A análise do BIAS ou erro médio relativo permite avaliar o erro sistemático em cada concentração. Este é calculado pela seguinte equação:

$$\text{BIAS} = \frac{\text{concentração calculada} - \text{concentração teórica}}{\text{concentração teórica}} \times 100$$

Na seguinte tabela (**tabela 7**) são apresentados os dados da linearidade.

Tabela 7: Linearidade dos compostos em estudo (n=5)

Composto	Modelo de linearidade	Intervalo de linearidade (µg/mL)	Linearidade		Coeficiente de determinação (r ²)	LLOQ (µg/mL)
			Declive (Média ± desvio padrão)	Ordenada na origem (Média ± desvio padrão)		
Cafeína	Linear	0,39 - 200	18,7421 ± 6,9295	-26,1933 ± 27,3440	0,9983 ± 0,0025	0,39
Teofilina	linear	0,78 - 200	1,5520 ± 2,0382	-0,2304 ± 4,0670	0,9967 ± 0,0034	0,78
Harmol	Linear	0,39 - 200	73,6454 ± 39,9488	-171,4910 ± 207,9683	0,9977 ± 0,0027	0,39

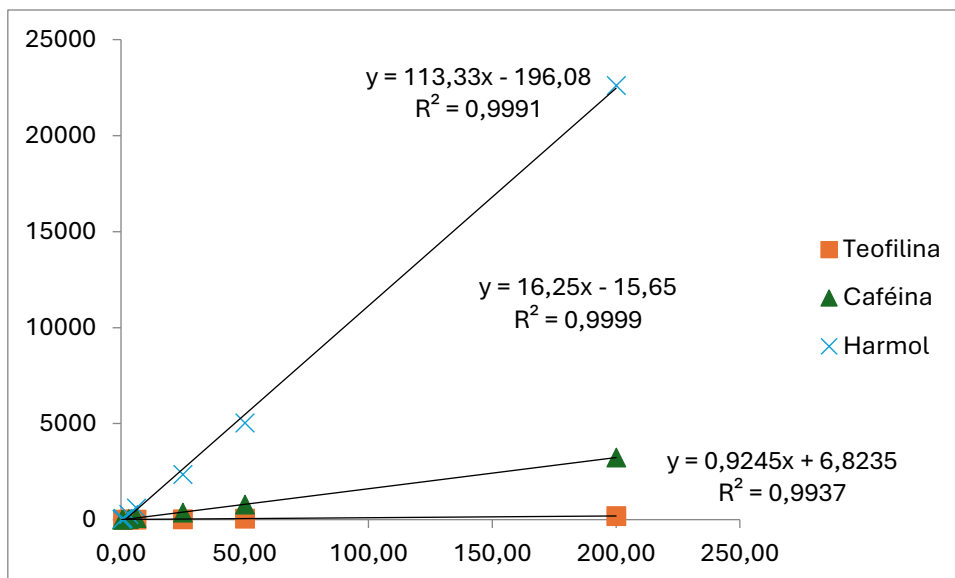


Figura 12: Exemplo de uma curva de calibração de um dos dias em estudo.

Todos os gráficos obtidos foram lineares e os valores do coeficiente de determinação (r^2) foram inferiores a 0,99, convergindo com os critérios de aceitação para linearidade o que demonstrou um bom ajuste da curva.

O limite de detecção é a concentração mais baixa que pode ser detectado pelo método observando-se uma relação ruído/sinal de 3,3. A concentração mínima de analito quantificável que apresente os critérios de precisão e exatidão adequados, ou seja, que apresente coeficiente de variação (CV) inferior a 20% e *BIAS* entre $\pm 20\%$, define-se como LLOQ (84). No presente trabalho os valores de LLOQ foram de 0,39 µg/mL para a cafeína e para o harmol e de 0,78 µg/mL para a teofilina (**tabela 7**).

Relativamente ao limite de detecção, este parâmetro foi avaliado experimentalmente até obter um sinal ruído 3,3 vezes superior ao sinal obtido numa injeção de fase móvel. Foi avaliado o CV após a análise de 7 injeções independentes, obtendo-se um valor de CV inferior a 17% (**tabela 8**). O valor do limite de detecção foi considerado igual ao do LLOQ.

Tabela 8: Avaliação dos limites de detecção (n=7)

	Teofilina	Cafeína	Harmol
Média do sinal	2,89	1,71	28,09
Desvio padrão	0,32	0,28	2,10

CV (%)	11,03	16,38	7,47
---------------	-------	-------	------

4.2.3. Exatidão e precisão

A exatidão refere-se à proximidade das médias dos resultados obtidos pelo método em relação ao verdadeiro valor de concentração dos analitos na amostra, expressa por meio dos valores de BIAS. Estes devem estar compreendidos entre $\pm 15\%$ do valor nominal, ou $\pm 20\%$ se for o LLOQ. A precisão indica o grau de concordância entre medições individuais de um analito quando o procedimento é repetido em múltiplas alíquotas de um mesmo volume homogêneo da matriz. Este parâmetro é avaliado através do CV. Os valores de CV devem ser inferiores a 15% para todas as concentrações, exceto para o LLOQ, onde é permitido até 20%.

Durante a fase de validação, foram investigadas três formas de precisão: intradia (ou repetibilidade), interdia (ou reprodutibilidade) e intermediária. A precisão intradia avalia a repetibilidade dos resultados do método sob as mesmas condições de preparação (por exemplo, mesmo dia, equipamento, laboratório e operador). Para isso, foram realizadas cinco réplicas de um mínimo de três calibradores do intervalo de linearidade analisadas, seguindo o procedimento descrito anteriormente.

A precisão interdia, ou reprodutibilidade, envolve a variação de certas condições previamente definidas, tais como diferentes dias, analistas ou equipamentos. Assim, foram estudadas todas as concentrações relativas aos calibradores ao longo de cinco dias. A precisão intermediária permite avaliar se o método é afetado pelo analista, material utilizado, reagentes ou laboratório, representando a robustez do método. Para isso, realizaram-se trinta e seis réplicas de cada QC em dias diferentes e por analistas diferentes. Nas **tabelas 9,10 e 11**, apresentam-se os dados relativos à precisão intradia, interdia e intermedia, respetivamente, para todos os compostos do estudo.

Tabela 9: Estudo da precisão e exatidão intradia (n=5)

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Precisão intradia (CV %)			Exatidão (bias %)		
	teofilina	cafeina	harmol	teofilina	cafeina	harmol
0,39		5,32	3,75		11,13	8,25
0,78	11,25			-12,28		

1,56	10,28	6,27	10,07	12,53	11,73	10,58
12,5	21,76	7,47	7,23	26,93	10,42	12,85
100	9,88	8,07	2,09	15,76	11,06	1,83

Tabela 10: Estudo da precisão e exatidão interdia (n=5)

Concentração (µg/mL)	precisão interdia (CV %)			Exatidão (bias %)		
	teofilina	cafeina	harmol	teofilina	cafeina	harmol
0,39		11,89	10,74		-8,41	-10,64
0,78	8,20			-2,11		
6,25	7,03	11,66	16,18	-5,99	-5,67	7,38
50	15,03	7,66	14,10	-13,01	-8,83	-15,67
200	8,29	4,05	5,24	4,83	0,00	-4,65

Tabela 11: Estudo da precisão e exatidão intermedia (n=15)

concentração (ug/mL)	precisão intermedia (CV %)			Exatidão (bias %)		
	teofilina	cafeina	harmol	teofilina	cafeina	harmol
0,39		12,33	14,54		7,98	6,32
0,78	11,23			-11,25		
1,56	15,24	1,99	2,33	13,09	3,44	2,26
12,5	13,60	5,84	5,12	-13,13	-8,40	-4,74
100	13,15	7,89	2,02	15,98	11,28	3,21

Relativamente à recuperação esta não foi avaliada já que foi a injeção direta das amostras sem proceder a nenhum tipo de extração com recurso a solventes orgânicos.

Capítulo – 5 Aplicação do método em amostras reais

De forma a demonstrar a eficácia do método descrito, este foi aplicado a amostras de café recolhidas de produtos comercializados. Recolheram-se amostras de café em cápsulas (13 amostras), café moído e solúvel (8 amostras) e chás/infusões (6 amostras). As amostras foram tratadas pelo procedimento descrito em 3.3. e posteriormente inseridas no sistema cromatográfico e de deteção para proceder à sua análise. Nas **tabelas 12 e 13** apresentam-se os resultados obtidos.

Tabela 12: Quantidade de cafeína presente nos diferentes cafés analisados.

	Amostras	Quantidade expressa em mg de cafeína em 25 mL (equivalente 1 chávena)	Quantidade expressa em mg cafeína/g café
Café em cápsulas	1	285,23	1,70
	2	277,62	1,87
	3	9,77	0,06
	4	276,17	1,78
	5	131,49	0,90
	6	267,43	1,68
	7	227,70	1,70
	8	241,78	1,65
	9	209,54	1,68
	10	169,34	1,35
	11	275,12	1,96
	12	258,26	2,10
	13	242,88	1,73
Café moído e solúvel	14	298,65	2,06
	15	318,26	2,31
	16	311,97	2,15
	17	302,75	2,09
	18	184,30	1,76
	19	317,46	2,19
	20	309,16	2,13

	21	312,26	2,73
--	-----------	--------	------

Em nenhuma das amostras de café foi detetado harmol.

Tabela 13: Quantidade de cafeína, teofilina e harmol presente nos diferentes chás/infusões analisados.

	Concentração teofilina (mg/chávena)	Concentração cafeína (mg/chávena)	Concentração harmol (mg/chávena)	Concentração teofilina (mg/g folha seca)	Concentração cafeína (mg/g folha seca)	Concentração harmol (mg/g folha seca)
chá 1	164,45	122,65	1,15	0,48	0,36	0,003
Infusão 2						
chá 3	940,56	94,91	1,04	2,17	0,22	0,002
Infusão 4						
chá 5	159,13	183,54	1,60	0,47	0,54	0,005
chá 6	1207,00	113,68	1,12	2,68	0,25	0,002

A título de exemplo apresenta-se um cromatograma de uma das bebidas (**figura 13**).

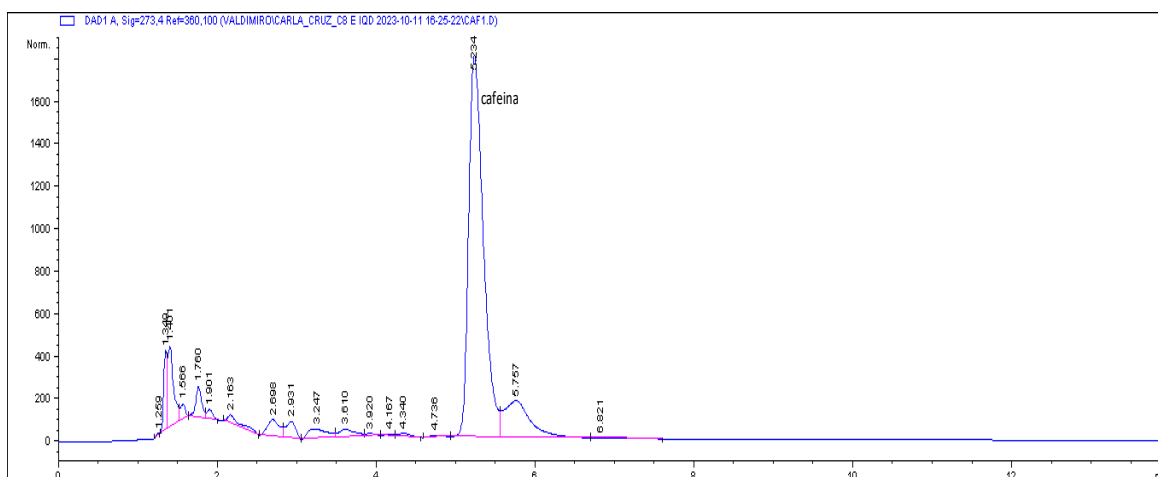


Figura 13: Cromatograma relativo à amostra de café número 1

Quando analisamos os resultados obtidos com outros encontrados na literatura científica, verificamos que a concentração de cafeína expressa em mg/chávena foi maior para o café moído e solúvel (~ 294,3 mg/chávena) em comparação ao café em cápsulas (~220,9 mg/chávena) e significativamente mais baixa nas amostras de chá (~128,6 mg/chávena). Esses valores corroboram com o estudo de Alan e Michael que relataram concentrações mais altas de cafeína para o café solúvel (90).

Nas amostras de chás e infusões analisadas foram detetadas maiores concentrações de teofilina (~617,785 mg/chávena) em relação à cafeína (~128,695 mg/chávena).

O trabalho de Nascimento Silva et al. determinou as concentrações de cafeína em amostras de chá branco, preto e verde da espécie *Camellia sinensis*. Os resultados indicaram que o chá preto apresentou o maior teor de cafeína (0,106 mg/g), seguido pelo chá branco (0,082 mg/g) e pelo chá verde (0,067 mg/g)(91). No entanto, os valores encontrados estavam abaixo dos reportados em estudos anteriores, que indicaram concentrações entre 14,3 e 40,0 mg/g de cafeína nas folhas de chá. Os resultados apresentados na presente dissertação divergem da literatura existente, que indica a cafeína como a metilxantina predominante nos chás, embora estes sejam uma das principais fontes de teofilina. Esta discrepância pode ser explicada por diversos fatores, como a variedade genética, as condições ambientais de cultivo, o processamento dos chás, o método de análise, a preparação das soluções, o tempo e a temperatura de infusão, ou ainda possíveis interferências ou contaminações (92–95). Estas diferenças nos resultados reforçam a necessidade de investigações futuras para compreender melhor os fatores que influenciam a determinação dos componentes bioativos nos chás.

Foram detetadas Concentrações muito baixas de harmol (~1,227 mg/mL) nas amostras de chá. Estes valores confirmam a ausência significativa deste alcaloide nos chás e infusões analisados neste estudo, em conformidade com a literatura, que identifica a *Peganum harmala L.* como a principal fonte de harmol.

Capítulo 6 – Conclusões

- Foi desenvolvido um método cromatográfico com recurso a HPLC-DAD para a identificação de teofilina, cafeína e harmol.
- O método foi validado conforme critérios internacionais obtendo-se linearidade entre 0,39-200 µg/mL para o harmol e cafeína e de 0,78-200 µg/mL para a teofilina, com coeficientes de determinação superiores a 0,99. Os restantes parâmetros de validação cumpriram todos os critérios estabelecidos.
- O método foi aplicado a 27 amostras (21 cafés e 6 chás) adquiridos em superfícies comerciais e pequeno retalho em Portugal. As concentrações de cafeína oscilaram em média 220,9 mg/chávena para os cafés apresentados em formato cápsula, ~ 294,3 mg/chávena para os cafés apresentados em forma de café moído. No caso da teofilina, xantina presente em chás, as concentrações médias foram de 617,7mg/chávena. Relativamente ao harmol, foi detetado unicamente nas amostras de chá na concentração média de 1,22 mg/chávena.
- Quando comparamos os resultados apresentados nesta dissertação com os encontrados na literatura verificamos que as concentrações de cafeína convergiram com os valores presentes na literatura e as concentrações de teofilina nos chás foram superiores aos valores descritos em estudos anteriores.

Referências Bibliográficas

1. Stasolla C, Katahira R, Thorpe TA, Ashihara H. Purine and pyrimidine nucleotide metabolism in higher plants. *J Plant Physiol*. Novembro de 2003;160(11):1271–95.
2. Zrenner R, Stitt M, Sonnewald U, Boldt R. Pyrimidine and purine biosynthesis and degradation in plants. *Annu Rev Plant Biol*. 2006;57:805–36.
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*. 27 de Julho de 2016;21(8):974.
4. Ukers WH. *All About Coffee*. Vol. 1. Ney York; 1922.
5. Sanchez JM. Methylxanthine Content in Commonly Consumed Foods in Spain and Determination of Its Intake during Consumption. *Foods*. 4 de Dezembro de 2017;6(12).
6. Elisa F Braibante, M, da Silva D, Schmitz Braibante Maurícius Selvero Pazinato HT. *Química e Sociedade* [Internet]. Vol. 00. São Paulo-SP; 2014 Abr [citado 28 de Janeiro de 2025]. Disponível em: <http://qnesc.s bq.org.br/online/prelo/QS-47-13.pdf>
7. Silva RME da. *O chá em Portugal: História e Hábitos de Consumo*. Dissertação de mestrado. Universidade do Minho. 2014.
8. Zrenner R, Stitt M, Sonnewald U, Boldt R. Pyrimidine and purine biosynthesis and degradation in plants. *Annu Rev Plant Biol*. 2006;57:805–36.
9. Herraiz T, González D, Ancín-Azpilicueta C, Arán VJ, Guillén H. beta-Carboline alkaloids in *Peganum harmala* and inhibition of human monoamine oxidase (MAO). *Food Chem Toxicol*. Março de 2010;48(3):839–45.
10. Moura DJ, Richter MF, Boeira JM, Pêgas Henriques JA, Saffi J. Antioxidant properties of beta-carboline alkaloids are related to their antimutagenic and antigenotoxic activities. *Mutagenesis*. Julho de 2007;22(4):293–302.
11. LIMA J de PFA. *Contribuição de alimentos fonte para a ingestão dietética habitual estimada de metilxantinas no Brasil e no município do Rio de Janeiro*. Diss Instituto de Nutrição, Universidade Federal do Rio de Janeiro. 2014;
12. Johnson IM, Prakash H, Prathiba J, Raghunathan R, Malathi R. Spectral analysis of naturally occurring methylxanthines (theophylline, theobromine and caffeine) binding with DNA. *PLoS One*. 2012;7(12):e50019.
13. Motora KGBTT. Determination of caffeine in raw and roasted coffee beans of ilu abba bora zone, South West Ethiopia. *Indo Am J Pharm Res*. 2017;7.9(463–70).
14. O’neil MJ, et al. *TMI. An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals*. Merck and Co Inc: Whitehouse Station, NJ, USA. 2006;1204.
15. Barbosa EJ. *Avaliação da goma gelana como aglutinante em formulações de pellets contendo teofilina*. Universidade de São Paulo. 2017;

16. Rodrigues AAS. Aplicação de diferentes metodologias para extração da teobromina e cafeína em amostras de chocolates com distintas percentagens de cacau por cromatografia líquida. Universidade Tecnológica Federal do Paraná; 2022.
17. Szlapinski SK, Charrette A, Guthrie N, Hilmas CJ. Paraxanthine safety and comparison to caffeine. *Frontiers in toxicology*. 2023;5:1117729.
18. Andreeva EY, Dmitrienko SG, Zolotov YA. Methylxanthines: properties and determination in various objects. *Russian Chemical Reviews*. 31 de Maio de 2012;81(5):397–414.
19. Kong H, Jones PP, Koop A, Zhang L, Duff HJ, Chen SRW. Caffeine induces Ca²⁺ release by reducing the threshold for luminal Ca²⁺ activation of the ryanodine receptor. *Biochem J*. 15 de Setembro de 2008;414(3):441–52.
20. Arnaud MJ. The pharmacology of caffeine. Em: *Progress in Drug Research/Fortschritte der Arzneimittelforschung/Progrès des recherches pharmaceutiques*. Basel: Birkhäuser Basel; 1987. p. 273–313.
21. Evans J RJBA. StatPearls. 2024. Caffeine. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 Jan-. [cited 2024 Oct. 15] Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK519490/>.
22. Liguori A, Hughes JR, Grass JA. Absorption and subjective effects of caffeine from coffee, cola and capsules. *Pharmacol Biochem Behav*. Novembro de 1997;58(3):721–6.
23. Perrone D, Farah A. Analysis of Caffeine by Mass Spectrometry. Em: Victor Preedy, editor. *Food and Nutritional Components in Focus* Edition: 1 [Internet]. Royal Society of Chemistry; 2012 [citado 28 de Janeiro de 2025]. p. 97–124. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/259331371_Analysis_of_Caffeine_by_Mass_Spectrometry
24. White JR, Padowski JM, Zhong Y, Chen G, Luo S, Lazarus P, et al. Pharmacokinetic analysis and comparison of caffeine administered rapidly or slowly in coffee chilled or hot versus chilled energy drink in healthy young adults. *Clin Toxicol (Phila)*. 2016;54(4):308–12.
25. Institute of Medicine (US) Committee on Military Nutrition Research. *Caffeine for the Sustainment of Mental Task Performance: Formulations for Military Operations*. National Academic Press. 2001;
26. Barnes PJ. Theophylline. *Pharmaceuticals (Basel)*. 18 de Março de 2010;3(3):725–47.
27. Zhang ZY, Kaminsky LS. Characterization of human cytochromes P450 involved in theophylline 8-hydroxylation. *Biochem Pharmacol*. Julho de 1995;50(2):205–11.
28. Ogilvie RI. Clinical Pharmacokinetics of Theophylline. *Clin Pharmacokinet*. 1978;3(4):267–93.

29. Baggott MJ, Childs E, Hart AB, de Bruin E, Palmer AA, Wilkinson JE, et al. Psychopharmacology of theobromine in healthy volunteers. *Psychopharmacology (Berl)*. Julho de 2013;228(1):109–18.
30. Drouillard DD, Vesell ES, Dvorchik BH. Studies on theobromine disposition in normal subjects; Alterations induced by dietary abstention from or exposure to methylxanthines. *Clin Pharmacol Ther*. 4 de Março de 1978;23(3):296–302.
31. Lelo A, Birkett D, Robson R, Miners J. Comparative pharmacokinetics of caffeine and its primary demethylated metabolites paraxanthine, theobromine and theophylline in man. *Br J Clin Pharmacol*. 26 de Agosto de 1986;22(2):177–82.
32. Guerreiro S, Toulorge D, Hirsch E, Marien M, Sokoloff P, Michel PP. Paraxanthine, the primary metabolite of caffeine, provides protection against dopaminergic cell death via stimulation of ryanodine receptor channels. *Mol Pharmacol*. Outubro de 2008;74(4):980–9.
33. Fernando Missio R, Teixeira Caixeta E, Zambolim EM, Zambolim L, Damião Cruz C, Sakiyama NS. Polymorphic information content of SSR markers for *Coffea* spp. Brazilian Society of Plant Breeding. Printed in Brazil Polymorphic information content of SSR markers for *Coffea* spp [Internet]. Vol. 10, *Crop Breeding and Applied Biotechnology*. 2010. [cited 2024 Oct. 15] Disponível em: www.gramene.org/
34. Monografias da IARC sobre a avaliação de riscos cancerígenos para humanos, nº 51. Grupo de Trabalho da IARC sobre Avaliação de Riscos Carcinogênicos para Humanos. Lyon (FR): Agência Internacional de Investigação sobre o Cancro. 1991;
35. Mazzafera P. Catabolism of caffeine in plants and microorganisms. *Frontiers in Bioscience*. 2004;9(1–3):1348.
36. Gottwalt B TP. Methylxanthines. . [Updated 2022 Jul 4] In: *StatPearls* [Internet] Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; Janeiro de 2023;
37. Nehlig A, Daval JL, Debry G. Caffeine and the central nervous system: mechanisms of action, biochemical, metabolic and psychostimulant effects. *Brain Res Brain Res Rev*. 1992;17(2):139–70.
38. Waller DG, Sampson AP. Asthma and chronic obstructive pulmonary disease. Em: *Medical Pharmacology and Therapeutics*. Elsevier; 2018. p. 193–209.
39. Tavares CSRK. Cafeína para el Tratamiento del Dolor. *Rev Bras Anesthesiol*. 2012;62:394–401.
40. Daly JW, Shi D, Nikodijevic O, Jacobson KA. The role of adenosine receptors in the central action of caffeine. *Pharmacopsychologia*. 1994;7(2):201–13.
41. Peng W, Shen H, Wu J, Guo W, Pan X, Wang R, et al. Structural basis for the gating mechanism of the type 2 ryanodine receptor RyR2. *Science* (1979). 21 de Outubro de 2016;354(6310).
42. Guerreiro S, Marien M, Michel PP. Methylxanthines and ryanodine receptor channels. *Handb Exp Pharmacol*. 2011;(200):135–50.

43. Zhao T, Li C, Wang S, Song X. Green Tea (*Camellia sinensis*): A Review of Its Phytochemistry, Pharmacology, and Toxicology. *Molecules*. 18 de Junho de 2022;27(12).
44. Rocha PL de A, Lima ALC, Saunders B, Reis CEG. Development of a Caffeine Content Table for Foods, Drinks, Medications and Supplements Typically Consumed by the Brazilian Population. *Nutrients*. 21 de Outubro de 2022;14(20).
45. Ahluwalia N, Herrick K. Caffeine intake from food and beverage sources and trends among children and adolescents in the United States: review of national quantitative studies from 1999 to 2011. *Adv Nutr*. Janeiro de 2015;6(1):102–11.
46. Carlo Agostoni RBCSFT. Scientific Opinion on the safety of caffeine. *EFSA Journal*. Maio de 2015;13(5).
47. Armstrong MJ, Okun MS. Diagnosis and Treatment of Parkinson Disease. *JAMA*. 11 de Fevereiro de 2020;323(6):548.
48. Kasabova-Angelova A, Tzankova D, Mitkov J, Georgieva M, Tzankova V, Zlatkov A, et al. Xanthine Derivatives as Agents Affecting Non-dopaminergic Neuroprotection in Parkinson's Disease. *Curr Med Chem*. 23 de Abril de 2020;27(12):2021–36.
49. Flaten V, Laurent C, Coelho JE, Sandau U, Batalha VL, Burnouf S, et al. From epidemiology to pathophysiology: what about caffeine in Alzheimer's disease? *Biochem Soc Trans*. Abril de 2014;42(2):587–92.
50. Kapri A, Pant S, Gupta N, Nain S. Recent Advances in the Biological Significance of Xanthine and its Derivatives: A Review. *Pharm Chem J*. 13 de Julho de 2022;56(4):461–74.
51. Hisham M, Youssif BGM, Osman EEA, Hayallah AM, Abdel-Aziz M. Synthesis and biological evaluation of novel xanthine derivatives as potential apoptotic antitumor agents. *Eur J Med Chem*. Agosto de 2019;176:117–28.
52. Jilani TN PCSS. StatPearls Publishing. 2025. Theophylline. [Updated 2023 May 1]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL).
53. Lupascu FG, Giusca SE, Caruntu ID, Anton A, Lupuşoru CE, Profire L. The safety profile of new antidiabetic xanthine derivatives and their chitosan based formulations. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. Janeiro de 2019;127:71–8.
54. Kolb H, Martin S, Kempf K. Coffee and Lower Risk of Type 2 Diabetes: Arguments for a Causal Relationship. *Nutrients*. 31 de Março de 2021;13(4).
55. Szopa A, Poleszak E, Wyska E, Serefko A, Wośko S, Wlaź A, et al. Caffeine enhances the antidepressant-like activity of common antidepressant drugs in the forced swim test in mice. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. Fevereiro de 2016;389(2):211–21.
56. Hughes RN, Hancock NJ, Henwood GA, Rapley SA. Evidence for anxiolytic effects of acute caffeine on anxiety-related behavior in male and female rats tested with and without bright light. *Behavioural Brain Research*. Setembro de 2014;271:7–15.

57. McCarty MF, O'Keefe JH, DiNicolantonio JJ. Pentoxifylline for vascular health: a brief review of the literature. *Open Heart*. 2016;3(1):e000365.
58. Kollias D KG. Papel do TNF/TNFR na autoimunidade: bloqueio específico do receptor TNF pode ser vantajoso para tratamentos anti-TNF. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2002;
59. Boppana SH, Peterson M, Du AL, Kutikuppala LVS, Gabriel RA. Caffeine: What Is Its Role in Pain Medicine? *Cureus*. Junho de 2022;14(6):e25603.
60. Osswald H, Schnermann J. Methylxanthines and the kidney. *Handb Exp Pharmacol*. 2011;(200):391–412.
61. Carrageta DF, Dias TR, Alves MG, Oliveira PF, Monteiro MP, Silva BM. Anti-obesity potential of natural methylxanthines. *J Funct Foods*. Abril de 2018;43:84–94.
62. PubChem [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 2004-. PubChem Compound Summary for CID 68094, Harmol; [cited 2024 Oct. 15]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Harmol>.
63. Pang KS, Koster H, Halsema IC, Scholtens E, Mulder GJ. Aberrant Pharmacokinetics of harmol in the perfused rat liver preparation: sulfate and glucuronide conjugations. *J Pharmacol Exp Ther*. Outubro de 1981;219(1):134–40.
64. Xu J, Ao YL, Huang C, Song X, Zhang G, Cui W, et al. Harmol promotes α -synuclein degradation and improves motor impairment in Parkinson's models via regulating autophagy-lysosome pathway. *NPJ Parkinsons Dis*. 6 de Agosto de 2022;8(1):100.
65. Dellal H, Boulahtouf A, Alaterre E, Cuenant A, Grimaldi M, Bourguet W, et al. High Content Screening Using New U2OS Reporter Cell Models Identifies Harmol Hydrochloride as a Selective and Competitive Antagonist of the Androgen Receptor. *Cells*. 16 de Junho de 2020;9(6).
66. Kartal M, Altun ML, Kurucu S. HPLC method for the analysis of harmol, harmalol, harmine and harmaline in the seeds of *Peganum harmala* L. *J Pharm Biomed Anal*. Fevereiro de 2003;31(2):263–9.
67. Tzanavaras PD, Zacharis CK, Themelis DG. Rapid determination of methylxanthines in real samples by high-performance liquid chromatography using the new FastGradient® narrow-bore monolithic column. *Talanta*. Junho de 2010;81(4–5):1494–501.
68. Aqel A, Almulla A, Al-Rifai A, Wabaidur SM, ALOthman ZA, Badjah-Hadj-Ahmed AY. Rapid and Sensitive Determination of Methylxanthines in Commercial Brands of Tea Using Ultra-High-Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *Int J Anal Chem*. 2019;2019:2926580.
69. López-Martínez L, López-de-Alba PL, García-Campos R, De León-Rodríguez LM. Simultaneous determination of methylxanthines in coffees and teas by UV-Vis spectrophotometry and partial least squares. *Anal Chim Acta*. Setembro de 2003;493(1):83–94.

70. Farias PAM, Castro AA. Determination of xanthine in the presence of hypoxanthine by adsorptive stripping voltammetry at the mercury film electrode. *Anal Chem Insights*. 2014;9:49–55.
71. Battelli MG, Abbondanza A, Musiani S, Buonamici L, Strocchi P, Tazzari PL, et al. Determination of xanthine oxidase in human serum by a competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Clinica Chimica Acta*. Março de 1999;281(1–2):147–58.
72. Nicolau C, Hildenbrand K. ¹³C-Nuclear Magnetic Resonance Investigations of Xanthine and Some of its N-Methylated Derivatives. *Zeitschrift für Naturforschung C*. 1 de Outubro de 1974;29(9–10):475–8.
73. Baek GH, Yang SW, Yun CI, Lee JG, Kim YJ. Determination of methylxanthine contents and risk characterisation for various types of tea in Korea. *Food Control*. Fevereiro de 2022;132:108543.
74. Lima J de PFA. Comparação dos teores de metilxantinas no café e em outras bebidas estimulantes comumente consumidas no Brasil. Universidade Federal do Rio de Janeiro. 2013;
75. AICC - Associação Industrial e Comercial do Café. Portuguese coffee – a blend of stories [Internet]. AICC; [citado 23 de Janeiro de 2025]. Disponível em: <http://aicc.pt/apresentacao/>.
76. Monteiro JP, Alves MG, Oliveira PF, Silva BM. Structure-Bioactivity Relationships of Methylxanthines: Trying to Make Sense of All the Promises and the Drawbacks. *Molecules*. Outubro de 2016;21(8).
77. Mair VH, & HE. *The True History of Tea*. London: Thames & Hudson. 2009;
78. Stasolla C, Katahira R, Thorpe TA, Ashihara H. Purine and pyrimidine nucleotide metabolism in higher plants. *J Plant Physiol*. Outubro de 2003;160(11):1271–95.
79. Sanchez JM. Methylxanthine Content in Commonly Consumed Foods in Spain and Determination of Its Intake during Consumption. *Foods*. Outubro de 2017;6(12).
80. Sahu PK, Ramiseti NR, Cecchi T, Swain S, Patro CS, Panda J. An overview of experimental designs in HPLC method development and validation. *J Pharm Biomed Anal*. 5 de Janeiro de 2018;147:590–611.
81. Moreno AMJ, Navas MJ, Asuero AG. HPLC-DAD determination of CNS-acting drugs in human blood, plasma, and serum. *Crit Rev Anal Chem*. 2014;44(1):68–106.
82. Silva PD MASM. Determinação de compostos fenólicos por HPLC. Universidade da Beira Interior. 2012;
83. Alladio E, Amante E, Bozzolino C, Seganti F, Salomone A, Vincenti M, et al. Effective validation of chromatographic analytical methods: The illustrative case of androgenic steroids. *Talanta*. 1 de Agosto de 2020;215:120867.
84. Food and Drug Administration Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry 2018. [Internet]. [cited 2024 Oct. 15] Disponível em:

<https://www.fda.gov/files/drugs/published/Bioanalytical-Method-Validation-Guidance-for-Industry.pdf>

85. Cassiano NM, BJC, MLRR, ORV, & CQB. Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas. *Química Nova*, 32, 1021-1030. 2009;
86. Bezerra PG, CJJ, GKS, & RSADN. Validação de método cromatográfico acoplado ao purge and trap para análises ambientais. Universidade Federal Da Bahia. 2011;
87. Paschoal JAR, RS, AFPDS, & RFG. Validação de métodos cromatográficos para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos. *Química Nova*, 31, 1190-1198. 2008;
88. Peters HL, Hou X, Jones BT. Multi-analyte calibration curve for high-performance liquid chromatography with an inductively coupled plasma carbon emission detector. *Appl Spectrosc*. Setembro de 2003;57(9):1162–6.
89. Oliveira EC de; APF de. Validação da metodologia da avaliação de incerteza em curvas de calibração melhor ajustadas por polinômios de segundo grau. *Química Nova*, 32: 1571-1575. 2009;
90. Lean MEJ, Crozier A. Coffee, caffeine and health: what's in your cup? *Maturitas*. Julho de 2012;72(3):171–2.
91. Nascimento Silva D, Flaviane de Carvalho Pimentel M, Ângelo Macena D, Marques Gomes V. concentração de cafeína em *camellia sinensis*. *colloquium exactarum*. 1 de Setembro de 2018;10(3):09–15.
92. Dufresne CJ, Farnworth ER. A review of latest research findings on the health promotion properties of tea. *J Nutr Biochem*. Julho de 2001;12(7):404–21.
93. Cabrera C, Artacho R, Giménez R. Beneficial effects of green tea--a review. *J Am Coll Nutr*. Abril de 2006;25(2):79–99.
94. Langley-Evans SC. Antioxidant potential of green and black tea determined using the ferric reducing power (FRAP) assay. *Int J Food Sci Nutr*. Maio de 2000;51(3):181–8.
95. Thomas JB, Yen JH, Schantz MM, Porter BJ, Sharpless KE. Determination of caffeine, theobromine, and theophylline in standard reference material 2384, baking chocolate, using reversed-phase liquid chromatography. *J Agric Food Chem*. 2 de Junho de 2004;52(11):3259–63.