

Verificação da presença de compostos fenólicos com propriedades antioxidantes em amostras de café

Verification of the presence of phenolic compounds with antioxidant properties in coffee samples

ABSTRACT

SILVA, D. C. F.; NASCIMENTO, M. A.; MOREIRA, A. V. B. Verification of the presence of phenolic compounds with antioxidant properties in coffee samples. *Nutrire: rev. Soc. Bras. Alim. Nutr.* = J. Brazilian Soc. Food Nutr., São Paulo, SP, v. 32, n. 1, p. 41-58, abr. 2007.

The mechanism and consequences of oxidation by free radicals in foods and biological systems have been involved in the occurrence of chronic diseases. Phenolic compounds in foods and beverages like coffee have become outstanding as antioxidant substances able to reduce the oxidation process. The aim of the present study was to verify the presence of phenolic compounds in coffee samples in different preparations and the antioxidant effect of the samples. Thin Layer Chromatography (TLC) was carried out for detection of phenolic compounds with antioxidant activity. In vitro antioxidant activity was tested in an aqueous oxidative system using β -carotene/linoleic acid. A kinetic study was also carried out using the method of the tangents to obtain factor 1 (F1) and factor 2 (F2). All samples showed stains developed by both β -carotene ($R_f = 0.72-0.81$) and ferric chloride/ferricianide ($R_f = 0.75-0.85$), thus evidencing the presence of phenolic compounds with antioxidant activity. Instant coffee in a volume of 20 μ L (64ppm) was the sample that showed the best protection against the oxidation process (71.3%) and no significant statistic difference ($p > 0.05$) was observed when compared to larger volumes. The kinetic assay verified best effectiveness in breaking the initiation phase of the oxidative chain ($F1 < 1$) for all samples, except the instant and that prepared using fabric filter in 200 μ L, which indicates a potential to block the propagation of the oxidative chain ($F2 < 1$). The in vitro results indicated coffee as a source of phenolic compounds acting in the protection against oxidative processes.

Keywords: Coffee. Antioxidants.
Chlorogenic acid.

DÉBORA CRISTINA
FERNANDES DA SILVA¹,
MARIA APARECIDA DO
NASCIMENTO², ANA
VLÁDIA BANDEIRA
MOREIRA³

¹Nutricionista pela
Universidade Federal do
Rio Grande do Norte;
²Técnica de Nível Superior
do Depto. de Análises
Clínicas e Toxicológicas/
UFRN;

³Profa. Dra. do
Departamento de Nutrição
da UFRN.

Endereço para correspondência:

Débora Cristina F. da Silva
Rua Theodorico
Guilherme, 11
Morro Branco,
CEP 59056-410
Natal/ RN.
Fone. (84) 8841-5234.
e-mail:

deb_cfs@yahoo.com.br
Trabalho de Conclusão de
Curso (Graduação em
Nutrição) – Curso de
Nutrição, Universidade
Federal do Rio Grande do
Norte, Natal, 2006.

Apoio financeiro:
PIBIC/ CNPq.

RESUMEN

El mecanismo y las consecuencias de la oxidación por radicales libres en alimentos y en sistemas biológicos ha sido implicado en el origen de enfermedades crónicas. Los compuestos fenólicos, presentes en alimentos y bebidas, como café presentan capacidad antioxidante que puede inhibir esos procesos. En este estudio verificamos la presencia de compuestos fenólicos y estimamos la capacidad antioxidante de muestras de café en diferentes formas de preparación. La Cromatografía en Capa Delgada (CCD) fue utilizada para detección de compuestos fenólicos con actividad antioxidante. Esta fue cuantificada in vitro, en sistema oxidativo acuoso utilizando β -caroteno/ácido linoléico. El estudio cinético utilizando el método de las tangentes para la obtención del factor 1 (F1) y factor 2 (F2). Todas las muestras presentaron bandas reveladas en CCD, tanto para el sistema revelador β -caroteno (R_f de 0,72-0,81) cuanto a ferricianuro/cloruro férrico (AF de 0,75-0,85) identificando la presencia de compuestos fenólicos con actividad antioxidante. El café soluble en el volumen de 20 μ L (64ppm) fue la muestra que presentó mejor protección contra la oxidación (71,3%), sin diferencia estadística ($p>0,05$) para los volúmenes subsiguientes. El estudio cinético verificó mayor efectividad en bloquear la fase de iniciación de las reacciones de oxidación ($F1<1$) para todos los extractos, con excepción del soluble y el preparado en filtro de paño a 200 μ L, indicando capacidad de inhibir la propagación de la cadena oxidativa ($F2<1$). Los resultados obtenidos in vitro sugieren el café como fuente de compuestos fenólicos, actuando en la protección de procesos oxidativos.

Palabras clave: Café. Antioxidantes. Ácido clorogénico.

RESUMO

O mecanismo e consequência da oxidação por radicais livres em alimentos e em sistemas biológicos têm sido implicado na ocorrência de doenças crônicas. Compostos fenólicos, presentes em alimentos e bebidas, como o café, têm se destacado por serem substâncias antioxidantes capazes de minimizar esse processo. Este estudo verificou a presença de compostos fenólicos e o comportamento antioxidante de amostras de café em diferentes formas de preparo. A Cromatografia em Camada Delgada (CCD) foi utilizada para detecção de compostos fenólicos com atividade antioxidante. A atividade antioxidante in vitro foi testada em sistema aquoso oxidativo utilizando β -caroteno/ácido linoléico. Foi feito estudo cinético utilizando-se o método das tangentes para obtenção do fator 1 (F1) e fator 2 (F2). Todas as amostras apresentaram bandas reveladas em CCD tanto no sistema revelador β -caroteno (R_f de 0,72-0,81) quanto no ferricianeto/cloreto férrico (R_f de 0,75-0,85), identificando a presença de compostos fenólicos com atividade antioxidante. O café solúvel no volume de 20 μ L (64ppm) foi a amostra que apresentou melhor proteção contra a oxidação (71,3%), sem diferença estatística ($p>0,05$) para os volumes subsequentes. O estudo cinético verificou maior efetividade em bloquear a fase de iniciação das reações de oxidação ($F1<1$) para todos os extratos, exceto o solúvel e o preparado em filtro de pano a 200 μ L, o que indica capacidade de inibição da propagação da cadeia oxidativa ($F2<1$). Os resultados in vitro obtidos sugerem o café como fonte de compostos fenólicos, atuando na proteção de processos oxidativos.

Palavras-chave: Café. Antioxidantes. Ácido clorogénico.

INTRODUÇÃO

O café é uma bebida amplamente consumida por povos de todos o mundo (ESTEBAN-DÍEZ; GONZÁLEZ-SÁIZ; PIZARRO, 2004), obtida a partir do grão do café torrado e moído, sendo em geral preparada por infusão em água quente (PHILIPPI, 2003).

Embora existam diversas espécies de café, as espécies *Coffea canephora* (Robusta) e *Coffea arabica* (Arábica) são as de maior importância comercial (PHILIPPI, 2003). Em geral, o café disponível comercialmente é produzido a partir dessas espécies ou de uma mistura de ambas (ESTEBAN-DÍEZ; GONZÁLEZ-SÁIZ; PIZARRO, 2004).

A torrefação, uma das etapas de preparação dos grãos, promove a combinação de centenas de compostos químicos, como os alifáticos, alicíclicos, aromáticos e heterocíclicos, além de compostos fenólicos derivados do ácido clorogênico (ACG) os quais resultam nos atributos sensoriais, como aroma e sabor característicos do café (DE MARIA; MOREIRA; TRUGO, 1999; MOREIRA; TRUGO; DE MARIA, 2000; OLIVEIRA et al., 2005).

A partir do café torrado é produzida uma bebida cujo aroma e sabor são bastante apreciados. Esses atributos característicos do café são decorrentes da combinação de centenas de compostos químicos produzidos em reações que ocorrem durante a torrefação (OLIVEIRA et al., 2005).

O aroma tem sido alvo de estudos sistemáticos em virtude da complexidade dos compostos voláteis produzidos durante a torrefação do café verde, os quais são responsáveis pelo aroma característico da bebida. Cerca de mil componentes já foram identificados e acredita-se que dezenas ainda poderão vir a ser detectados (DE MARIA; MOREIRA; TRUGO, 1999).

Entre esses componentes voláteis, encontram-se os compostos heterocíclicos, tais como *furanos*, oriundos principalmente da degradação de glicídios como a sacarose presente no café; *pirróis*, formados a partir da reação de “Maillard”, da degradação de “Strecker” ou da trigonelina ou ainda da pirólise de aminoácidos; *oxazóis* e *tiazóis*, tiofenos, cuja formação está associada à presença de aminoácidos sulfurados; *pirazinas*; *piridinas*, entre outros, além de compostos alifáticos, alicíclicos e aromáticos (*fenóis*, *aldeídos*, *cetonas*, *álcoois*, *hidrocarbonetos*, etc), os quais contribuem para o aroma final do café (MOREIRA; TRUGO; DE MARIA, 2000).

Esses compostos voláteis juntamente com outros componentes, como os fenólicos, derivados dos ACG resultam nos atributos sensoriais, sabor e aroma, peculiares ao café (DE MARIA; MOREIRA; TRUGO, 1999).

Aos ACG, pertencentes à maior classe de compostos fenólicos (Ácidos hidroxicinâmicos), são atribuídas propriedades antioxidantes, as quais poderiam produzir efeitos benéficos ao organismo (OLTHOF; HOLLMAN; KATAN, 2001).

Dentre inúmeros trabalhos sobre o café, muitos têm sido realizados com o intuito de se avaliar os efeitos positivos e negativos do consumo de café na saúde humana (PERIM, 2004).

Alguns desses estudos têm associado à ingestão de café com o desenvolvimento de doenças crônicas, tais como as cardiovasculares, obtendo resultados que comprovam benefícios devido ao consumo moderado desta bebida para evitar o desenvolvimento de síndromes coronárias (PANAGIOTAKOS et al., 2003), provavelmente em função de o café promover a redução na cadeia oxidativa, provocada por radicais livres (ROGINSKY; LISSI, 2004).

Apesar de estudos associarem a ingestão de cafeína com a elevação da pressão sanguínea, em virtude do aumento da resistência vascular (HARTLEY; LOVALLO; WHITSETT, 2004), o seu potencial antioxidante vem sendo amplamente pesquisado, sendo verificado que essa substância inibe a peroxidação lipídica induzida por radicais livres (PERIM, 2004), assim como os ácidos clorogênicos, principais polifenóis em café, os quais também exibiriam propriedades antioxidantes (MURSU et al., 2005).

Recentes estudos têm sugerido que a ingestão de café pode reduzir o risco de diabetes tipo 2, devido o aumento na produção de peptídio-1 ligante do glucagon (GLP-1), um hormônio que estimula a produção de AMP em células beta (por ativação do receptor de membrana). Assim, o GLP-1 tem um efeito trópico na função celular no diabetes tipo 2, permitindo que a glicose seja melhor utilizada pela célula, uma situação que pode melhorar a condição de estresse metabólico desses indivíduos (McCARTY, 2005), gerado pela formação de radicais livres.

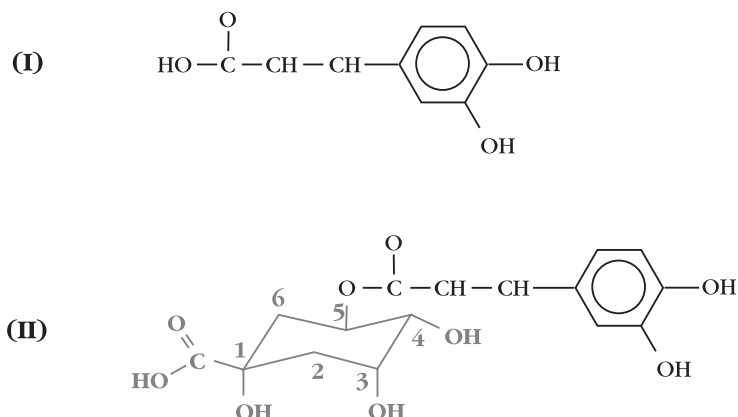
Os radicais livres são átomos ou moléculas instáveis que buscam se estabilizar (BERGER, 2005). Quando em quantidades aumentadas essas espécies favorecem uma condição de estresse oxidativo, um fator envolvido em diversas patologias humanas, como a aterosclerose (MAFRA; ABDALLA; COZZOLINO, 1999).

A oxidação lipídica, uma das principais causas de deterioração em alimentos, provoca profundas alterações em sua qualidade com implicações fisiopatológicas para os seres humanos (MELO; GUERRA, 2002), promovendo danos que podem contribuir para o envelhecimento bem como a instalação de patologias como a aterosclerose, insuficiência renal crônica, entre outras (BERGER, 2005; MAFRA; ABDALLA; COZZOLINO, 1999).

Assim, a nutrição e padrões dietéticos têm sido apresentados como alternativa para impactar diretamente na saúde da população, por meio da redução do dano oxidativo por radicais livres através de antioxidantes, substâncias naturalmente presentes em alimentos, como frutas, vegetais, chá e café (BERGER, 2005; ROGINSKY; LISSI, 2004).

Um estudo avaliou a atividade antioxidante de chás, encontrando resultados significativos de inibição da oxidação, a partir de estudos cinéticos, na concentração de 200ppm para boldo (56,51%), erva-cidreira (22,86%), erva-doce (38,92%), mix de ervas (35,55%) e camomila (23,64%) (RIBEIRO; SILVA; MOREIRA, 2005), graças à presença de compostos presentes, também denominados de fitoquímicos.

Os fitoquímicos que apresentam em sua estrutura um anel aromático com uma ou mais hidroxilas recebem a denominação de compostos fenólicos e, geralmente apresentam propriedade antioxidante (MELO; GUERRA, 2002) (Figura 1).



Fonte: Olthof, Hollman e Katan, 2001.

Figura 1 - Estrutura do ácido cafêico (I) e ácido clorogênico (II)

Segundo Nogueira e Trugo (2003), os derivados do ACG, compostos fenólicos do café, apresentam atividade antioxidante, sendo esta, conforme Olthof, Hollman e Katan (2001), um fator que contribui para a prevenção de doenças crônicas. Sobretudo, para que de fato esses fitoquímicos possam estar biodisponíveis ao organismo, surtindo efeitos benéficos à saúde humana, é necessária a otimização dos processos de extração e isolamentos de compostos bioativos a partir de fontes naturais a fim de se obter isolados que exibam maior atividade que o extrato bruto, além de avaliar sua atividade antioxidante, que por serem sistemas complexos poderão afetar a funcionalidade dos compostos bioativos (MELO; GUERRA, 2002).

Dessa forma, esse trabalho se propôs avaliar a atividade antioxidante *in vitro* do café, uma bebida largamente consumida pelos brasileiros, verificar a presença de compostos fenólicos nas amostras analisadas, além de avaliar o comportamento cinético das amostras de café.

MATERIAL E MÉTODOS

AMOSTRAS

Foram analisadas amostras de café de dois tipos: solúvel e em pó, preparadas com filtro de papel, filtro de pano e expresso, as quais foram obtidas no comércio local.

OBTENÇÃO DOS EXTRATOS DE CAFÉ

Para o preparo do extrato solúvel, foram utilizados aproximadamente 2,0g de café solúvel (1 colher de café rasa) dissolvidos em 150ml de água a 80°C. Para a obtenção dos

cafés filtrados em papel, em pano e expresso, foram utilizados cerca de 7,0g (1 colher de sopa nivelada) em 150ml de água a 80°C.

Os extratos foram preparados no laboratório de Técnica Dietética da UFRN, sendo obtidos segundo a dietética convencional.

Verificação de compostos fenólicos por Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

A separação dos compostos fenólicos presentes nas amostras de café foi realizada por meio da técnica de Izmalov e Shraiber (1938), com condições padronizadas e descritas por Moreira (1999), a qual consiste na separação dos componentes da amostra através de migração diferencial sobre uma camada delgada de adsorvente retido numa superfície plana.

Como superfície plana foram utilizadas placas de vidro 20 x 20cm, as quais foram confeccionadas empregando-se sílica Gel 60G (Merk), como adsorvente, numa espessura de 0,25mm. Para tanto, 25g de sílica foram diluídas em 50ml de H₂O. Para a fase móvel foram utilizados η -butanol, ácido acético e água na proporção de 4:5:1, respectivamente.

Durante os experimentos, utilizou-se o volume de 10 μ L das amostras de café.

Após a migração das amostras, as placas foram reveladas com os seguintes agentes cromogênicos, descritos por Duve e White (1991):

- β -caroteno: 9mg de β -caroteno dissolvidos em 30ml de clorofórmio + 2 gotas de ácido linoléico em 30ml de etanol;
- Cloreto férrico e ferricianeto de potássio: 50ml de solução aquosa de FeCl₃ 1% + 50ml de solução aquosa K₃Fe (CN)₆ 1%.

O revelador β -caroteno é específico para identificar a presença de substâncias com provável atividade antioxidante nas amostras estudadas, o que é observado pela coloração laranja, enquanto que o cloreto férrico e ferricianeto de potássio demonstra a presença de prováveis compostos fenólicos, visualizado pela coloração azul (DUVE; WHITE, 1991).

Atividade antioxidante em sistema β -caroteno/ácido linoléico

A análise da atividade antioxidante das amostras foi determinada pelo método *in vitro* desenvolvido por Marco (1968) e modificado por Miller (1971), utilizando-se o ácido linoléico, tween e β -caroteno.

Inicialmente foi produzido um sistema a partir de 40 μ L de ácido linoléico, 14 gotas de Tween 20 (emulsificante), 50 μ L de β -caroteno (20mg/ml de clorofórmio), e 1ml de clorofórmio, o qual foi evaporado. Posteriormente foi adicionada água destilada tratada com borbulhamento de oxigênio durante 30 minutos, até uma diluição, cuja densidade ótica estivesse entre 0,6 e 0,7, num comprimento de onda de 470nm, em espectrofotômetro.

Em seguida, volumes de 10, 20, 40, 50, 100 e 200µL dos extratos foram adicionados ao sistema, o qual foi mantido a 50°C e monitorado com leituras espectrofotométricas a cada 15 minutos durante uma hora. Todas as determinações foram realizadas em duplicata e acompanhadas por um controle sem antioxidante.

A oxidação do ácido linoléico ou outros ácidos graxos polinsaturados resulta na formação de radicais peroxil (ROO•). Sem a presença do antioxidante, o ROO• pode retirar um átomo de hidrogênio de substratos próximos como os lipídios, gerando um novo radical livre que leva à completa oxidação do ácido linoléico, cujos produtos de degradação podem oxidar o β-caroteno. A presença de substâncias antioxidantes, no entanto, pode impedir a oxidação do ácido linoléico, retardando a reação em cadeia de radicais livres em uma ou mais etapas.

As percentagens de inibição da oxidação foram calculadas a partir do decaimento da densidade ótica (DO) do controle (DO inicial – D.O final) considerando como 100% de oxidação. Assim, a queda na leitura da DO das amostras de café, correlacionando-se com o controle estabeleceu a percentagem de inibição da oxidação, subtraindo-se a percentagem de oxidação de cada extrato de 100%. Além da verificação da ação antioxidante dos extratos de café, foi realizada a atividade antioxidante da solução de BHT, um antioxidante sintético utilizado como padrão para efeito comparativo, na concentração de 100ppm.

A gravimetria dos extratos foi realizada em duplicata, sendo os volumes convertidos em ppm (partes por milhão) a fim de proporcionar uma melhor compreensão da discussão frente à comparação com o antioxidante sintético BHT, o qual é utilizado na indústria alimentícia em unidades de ppm.

Tanto a atividade antioxidante quanto a CCD foram realizadas no laboratório de Toxicologia da Faculdade de Farmácia da UFRN.

Estudo cinético da atividade antioxidante no sistema β-caroteno/ácido linoléico

A eficiência da atividade antioxidante dos extratos foi estimada pelo método das tangentes descrito por Yanishlieva e Marinova (1995) e modificado por Moreira (1999) e Moreira e Mancini-Filho (2003) em duas partes das curvas cinéticas obtidas na realização da atividade antioxidante em sistema β-caroteno/ácido linoléico das amostras de café.

Na primeira parte da curva (entre 15 e 45 minutos, após o início da reação), é medida a eficiência do antioxidante de bloquear a reação em cadeia através da interação com os radicais peróxidos. Essa eficiência é medida pela relação entre as tangentes das curvas cinéticas das amostras (meio de reação mais o extrato) e o controle sem antioxidante, sendo os valores obtidos denominados fator 1 (F₁):

$$F_1 = \frac{\text{tangente do extrato}_{(15-45)}}{\text{tangente do controle}_{(15-45)}}$$

Na segunda parte da curva (entre 75 e 105min) é medida a possibilidade do antioxidante participar de outras reações (degradação de peróxidos) durante o processo oxidativo. Essa medida é obtida pela relação entre as tangentes das curvas cinéticas das amostras (meio de reação mais o extrato) e o controle sem antioxidantes. Os valores encontrados foram denominados de fator 2 (F_2):

$$F_2 = \frac{\text{tangente do extrato}_{(75-105)}}{\text{tangente do controle}_{(75-105)}}$$

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Inicialmente foi criado um banco de dados utilizando-se o software Microsoft Excel versão 5.0 e o software INSTAT 2.2 para o tratamento estatístico. Os resultados foram apresentados como médias $\pm$ desvio padrão. As variações detectadas foram avaliadas através da análise de variância (ANOVA) e do teste de Tukey-Kramer. Para a comparação entre as médias obtidas das amostras foi utilizado o teste *t* de *Student* para amostras pareadas, nas quais se fixou, em todos os cálculos, um nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)

A cromatografia em camada delgada (CCD) em fase normal é uma técnica adequada para a detecção de compostos presentes em extratos de plantas, além de ser sensível o bastante para diferenciar pequenas alterações estruturais, quando uma fase móvel apropriada é utilizada para promover a separação frente a uma grande variação de polaridades existentes entre esses compostos (GOCAN; CIMPAN; MURESAN, 1996).

Dentre as vantagens apresentadas pela CCD, destacam-se a simplicidade de operação, disponibilidade de reagentes sensíveis e seletivos para detecção sem a interferência da fase móvel, além de que essa técnica permitir a análise de várias substâncias em uma única placa usando pouco solvente. Assim, os perfis cromatográficos das amostras de café reveladas com β -caroteno (lado esquerdo) e com ferricianeto/cloreto férrico (lado direito) estão mostrados na figura 2.

Todas as amostras de café reveladas com β -caroteno apresentaram bandas com atividade antioxidante identificadas pela permanência da cor laranja, indicando que os antioxidantes impediram a fotoxidação do β -caroteno, as quais apresentaram fatores de retenção (R_f) distintos com valores que variaram de 0,72 a 0,81 em ambos sistemas reveladores. O R_f pode variar em função de alguns fatores como a camada de adsorvente, a saturação da cuba bem como a temperatura.

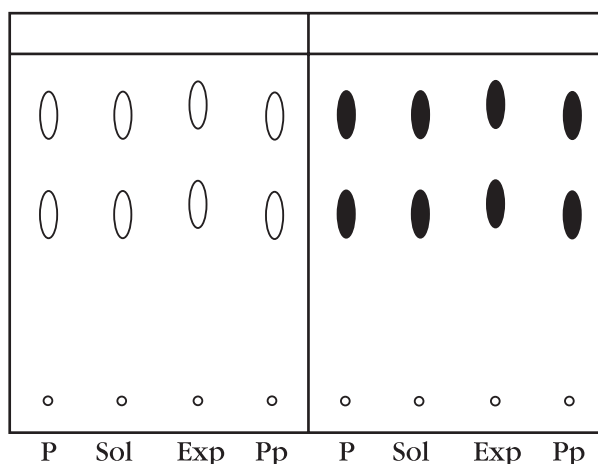


Figura 2 - Comportamento cromatográfico das amostras de café. P = filtro de pano; Sol = solúvel; Exp = expresso; Pp = filtro de papel; ○ = revelação no sistema β -caroteno/ácido linoléico; ● = revelação no sistema ferricianeto/cloreto férrico

A revelação com ferricianeto/cloreto férrico, por outro lado, permitiu detectar a presença de compostos fenólicos, como é indicado pelo aparecimento de manchas azuis, com variação de R_f de 0,75 a 0,85, cujos resultados confirmam àqueles obtidos na revelação com o β -caroteno nos quais as amostras de café mostraram conter compostos com atividade antioxidante.

Situação análoga foi observada por Nascimento et al. (2002) para os extratos de *T. ulmifolia* Linn. com detecção de compostos fenólicos que inibiram a oxidação do β -caroteno e, portanto, com atividade antioxidante.

Tais resultados apresentaram semelhanças a um estudo realizado por Moreira e Mancini-Filho (2004), no qual foram identificados ácidos fenólicos em uma mistura de especiarias (mostarda, canela e erva-doce), tais como o catecol, salicílico e caféico, com atividade antioxidante, cujos valores de R_f variaram de 0,62 e 0,90 em extratos de diferentes polaridades.

ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Inibição da oxidação acoplada no sistema β -caroteno/ácido linoléico

Os processos de oxidação de substâncias orgânicas são uma das principais causas da redução da vida-de-prateleira dos produtos alimentícios industrializados bem como das matérias-primas em geral. Portanto, o conhecimento e compreensão dos mecanismos de reação e as formas de controle para os mesmos são de suma importância econômica para a indústria alimentícia (DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ, 2004).

No organismo, os radicais livres são produzidos como produtos do metabolismo e como resultado da exposição à radiação e a alguns poluentes ambientais. Nos indivíduos saudáveis, existe delicado balanço entre essas espécies reativas e os antioxidantes. Havendo desequilíbrio, a condição é denominada “estresse oxidativo” (DAMASCENO et al., 2002).

O mecanismo e consequência da oxidação por radicais livres em alimentos e em sistemas biológicos com danos a componentes celulares é o que resulta na ocorrência de doenças crônicas, como aterosclerose, catarata, cânceres, diabetes, doenças neurológicas, desordens imuno-inflamatórias, entre outras (FERRARI; TORRES, 2003).

Como definem Roginsky e Lissi (2004), atividade antioxidante é a capacidade de um componente ou um conjunto de compostos em inibir a degradação oxidativa, por exemplo, peroxidação lipídica, constituindo-se os fenólicos nos principais componentes antioxidantes presentes em alimentos, tais como frutas, vegetais, chá, vinho e café.

Assim, os resultados da atividade antioxidante das amostras de café analisadas, expressas em percentual de inibição da oxidação (Figura 3) demonstraram que, para todas as amostras de café, o volume de 200µL foi o que apresentou melhor potencial antioxidante com percentagens de inibição de 91%, 88%, 86,5% e 83,9%, sem diferença estatística ($p>0,05$) para café expresso, preparado com filtro de pano, filtro de papel e solúvel, respectivamente, em relação ao 100% de oxidação no controle sem antioxidantes.

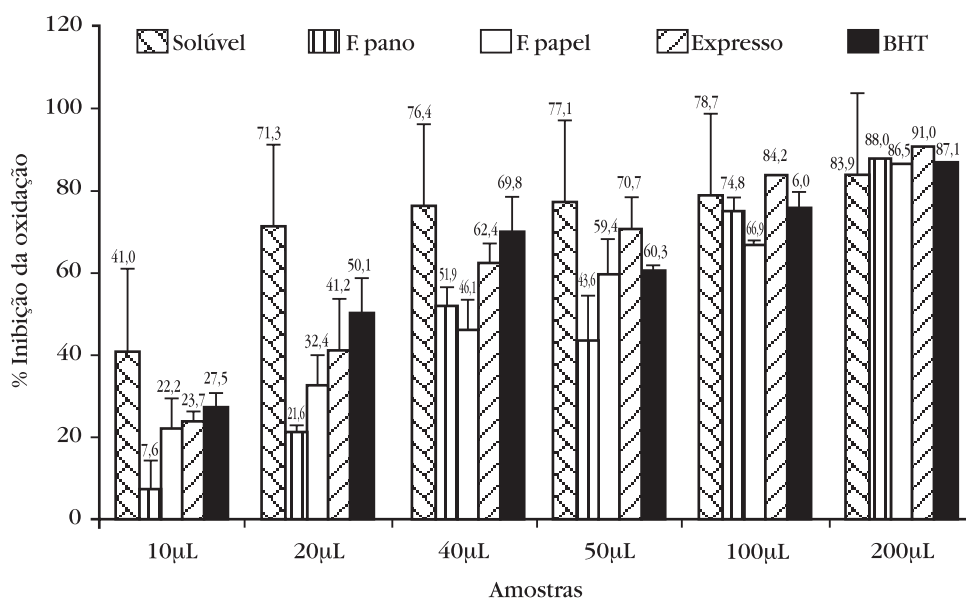


Figura 3 - Percentagem de inibição da oxidação segundo os volumes das amostras de café

É importante ressaltar que o objetivo do presente trabalho foi analisar as bebidas de acordo como são preparadas e ingeridas pela população. Sendo assim, as concentrações

de sólidos solúveis presentes nas amostras diferiram entre si; por exemplo, para um mesmo volume, as amostras de café solúvel, café preparado em filtro de pano, filtro de papel e expresso apresentaram as concentrações de 640ppm, 168ppm, 250ppm e 798ppm, respectivamente. Como se pode observar, apesar da significativa diferença entre o teor de sólidos solúveis dos cafés preparados em filtro de pano e em papel em relação ao solúvel e o expresso, essas amostras apresentaram uma atividade antioxidante tão elevada quanto à das outras amostras. Pode-se dizer que provavelmente essas amostras contenham menor teor de compostos fenólicos, porém com boa atividade antioxidante.

Considerando o conceito de antioxidante, como substâncias que em baixas concentrações são capazes de inibir o processo oxidativo, enfatizado por Abdalla (1993), o café solúvel no volume de 20 μ L, correspondente a 64ppm, foi o que apresentou um relevante papel antioxidante em relação às outras amostras, visto que não apresentou diferença estatística ($p > 0,05$) para os volumes subseqüentes (40 μ L, 50 μ L, 100 μ L e 200 μ L), indicando ser efetivo ao prevenir em 71,3% a oxidação da emulsão β -caroteno/ácido linoléico, expressando, assim, maior estabilidade frente à oxidação.

Dados de um estudo realizado por Nogueira e Trugo (2003) com cafés solúveis brasileiros complementam esses resultados. Nessa pesquisa foi verificada a distribuição dos isômeros de ácido clorogênico (ACG) em nove amostras de café solúvel representativas de marcas brasileiras. Os teores totais de ACG variaram de 0,6 a 5,9g%, sendo o 5-ácido cafeoilquínico o isômero mais encontrado. Isso sugeriu que embora os ACG, compostos com atividade antioxidante, segundo os mesmos autores, sejam bastante sensíveis à torração, quantidades apreciáveis são encontradas no café solúvel, o que se deve em parte à solubilidade desses compostos em água quente, usada durante a extração industrial.

A atividade antioxidante de extratos aquosos de plantas e especiarias tem mostrado resultados significantes. A eficiência dessa atividade tem sido atribuída aos compostos fenólicos que são reconhecidos como potentes antioxidantes em diversos meios de reação. A *T. ulmifolia* Linn (chanana) inibiu em 73,3% a oxidação no sistema β -caroteno/ácido linoléico (NASCIMENTO et al., 2006). Do mesmo modo 200ppm de extrato aquoso de mostarda apresentou proteção contra a oxidação com média de 70%, tanto pela proteção dos ácidos graxos insaturados que compõem a fração lipídica da especiaria como pela inibição da oxidação (MOREIRA; MANCINI-FILHO, 2003).

Um estudo realizado por Ferrari e Torres (2002) avaliou a capacidade antioxidante total (CAT) de 21 diferentes tipos de alimentos comercializados no município de São Paulo/ SP, incluindo vegetais, chocolate, café, dentre outros. Os maiores valores de CAT observados foram: 2194,23 μ mol/100g para a castanha do Brasil; 1053,27 μ mol/100g para o guaraná em pó; 1025,84 μ mol/100L para o café pronto para consumo; 868,86 μ mol/100g para o chocolate ao leite; 400,68 μ mol/100g para maçã; 368,92 μ mol/100g para couve e 345,85 μ mol/100g para a beterraba, destacando a importância de uma dieta variada.

A própria indústria de alimentos, visando minimizar os problemas decorrentes de processos oxidativos, utiliza antioxidantes sintéticos que, em sua maioria apresenta

problemas de solubilidade, alguns promovem alterações no sabor dos alimentos além de que outros são altamente tóxicos, o que restringe o seu emprego em alimentos ou material de embalagem de acordo com legislação em vigor, sendo a sua utilização alvo de questionamentos quanto à sua inocuidade (GUERRA; LAJOLO, 2005).

Para fins comparativos foi verificada a eficácia do Butil hidroxitolueno (BHT), um antioxidante sintético, na proteção de sistemas lipídicos.

Os resultados indicaram que o volume de 20 μ L (64ppm) do café solúvel também mostrou um percentual de inibição da oxidação superior ao BHT a 20ppm nesse mesmo volume (50,1%), com diferença estatística ($p < 0,05$), demonstrando dessa forma maior eficiência contra a oxidação. Vale ressaltar que, como mostrado na figura 4, todas as concentrações das amostras de café, exceto o café preparado em filtro de pano, estiveram com concentrações superiores às do BHT, demonstrando que extratos brutos podem ser mais eficientes do que padrões puros.

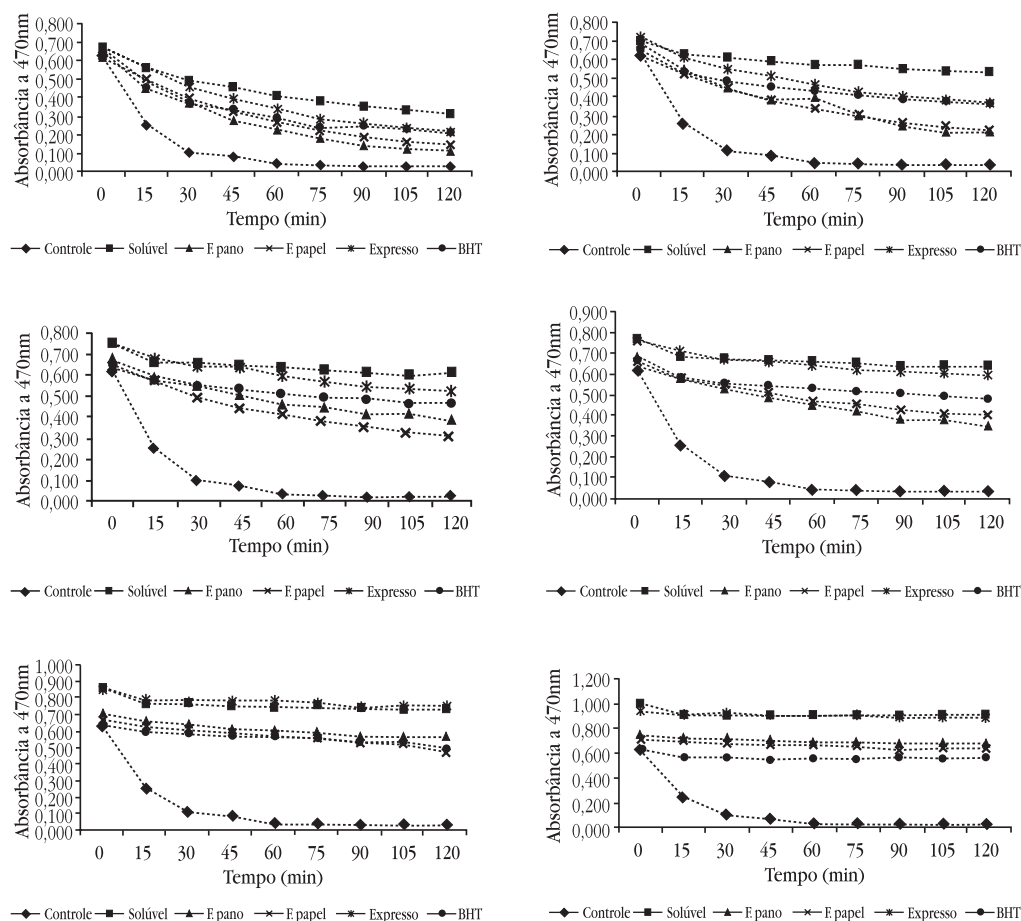


Figura 4 - Curvas cinéticas das amostras de café em volumes de 10 μ L, 20 μ L, 40 μ L, 50 μ L, 100 μ L, e 200 μ L obtidas pela inibição da oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoléico, em comparação ao BHT

Esses dados são relevantes, pois, desde a década de 80, o interesse em encontrar antioxidantes naturais para o emprego em produtos alimentícios ou para uso farmacêutico, tem aumentado consideravelmente, com o intuito de substituir antioxidantes sintéticos, os quais têm sido restringidos devido ao seu potencial de toxicidade (DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ, 2004).

Estudos sobre atividade antioxidante de substâncias naturais e sintéticas na conservação de óleos, gorduras e alimentos gordurosos foram reportados numa revisão realizada por Ramalho e Jorge (2006). Para a gordura animal, o ácido caféico e o extrato metanólico de alecrim mostraram ser os antioxidantes mais adequados apresentando inclusive efeito superior ao BHT e BHA (butil-hidroxi-anisol), respectivamente. Para os óleos vegetais, as pesquisas indicaram o TBHQ (terc-butil-hidroquinona) como o antioxidante sintético mais efetivo inclusive sob altas temperaturas, apresentando os antioxidantes naturais melhor efetividade que BHA e BHT, como os extratos de orégano, alecrim e gergelim para óleo de soja, extrato de gergelim, ácidos clorogênicos, gálico, protocatequínico e caféico para óleo de girassol, ascorbil palmitato e extrato de alecrim para óleo de canola e ácido caféico para óleo de oliva.

Moreira e Mancini-Filho (2004) reportaram em seu estudo *in vivo* que além da ação preventiva de substâncias fenólicas, presentes nas especiarias, sobre a ação lipídica em alimentos, os resultados obtidos sugeriram, também, um provável efeito antiinflamatório destes compostos, devido à ação inibitória sobre enzimas da biossíntese dos eicosanóides. Por outro lado, acrescentaram que maiores investigações e ensaios biológicos mais abrangentes são necessários, a fim de se observar o efeito dos compostos fenólicos de especiarias sobre o metabolismo lipídico e para assegurar-nos do efeito delas como alimento funcional.

Estudo cinético das amostras

A eficiência da capacidade antioxidante das amostras de café, no sistema β -caroteno/ácido linoléico, foi analisada separadamente para cada volume, na tentativa de delinear o mecanismo de ação desses extratos através de curvas cinéticas. Os resultados da atividade antioxidante possibilitou a elaboração de curvas cinéticas representadas na figura 4. O estudo cinético do BHT foi realizado para fins comparativos.

As curvas cinéticas de atividade antioxidante dos extratos das amostras de café representam o decaimento da absorbância (diferença entre as leituras t_0 e t_{120}) à medida que o β -caroteno é oxidado pelos produtos e/ou subprodutos da oxidação do ácido linoléico. A eficiência do antioxidante é inversamente proporcional à oxidação do β -caroteno, sendo demonstrada através das curvas cinéticas que se apresentam como uma extensão do tempo de indução.

Como pode ser visualizado na tabela 1, a qual contém os valores de fator 1 (F1) e fator 2 (F2) para cada amostra analisada, os volumes de 10 μ L, 20 μ L, 40 μ L, 50 μ L, 100 μ L e 200 μ L para as amostras de café solúvel, café preparado em filtro de papel e filtro de pano

(exceto para o volume de 10µL) e expresso apresentaram valores de F1 inferiores a 1, o que, conforme Yanishlieva e Marinova (1995), representa a efetividade do antioxidante ao bloquear as reações em cadeia, devido aos radicais peróxidos, sugerindo que os extratos de café expressam atividade seqüestradora de radicais, resultados que se equipararam aos valores de F1 encontrados para o BHT.

Tabela 1 - Parâmetros cinéticos caracterizando a inibição da oxidação do sistema β-caroteno/ácido linoléico pelas amostras de café

AMOSTRA	VOLUMES											
	10µL		20µL		40µL		50µL		100µL		200µL	
	F1	F2	F1	F2	F1	F2	F1	F2	F1	F2	F1	F2
Café solúvel	0,6	10,2	0,2	6,8	0,1	5,4	0,1	2,8	0,1	2,4	0,0	0,0
Café filtro pano	1,2	10,6	0,9	18,0	0,5	6,8	0,6	8,4	0,2	3,4	0,1	0,0
Café filtro papel	1,0	12,2	0,8	11,4	0,7	10,6	0,4	8,6	0,2	6,8	0,1	2,8
Expresso	0,9	10,0	0,6	8,2	0,2	6,0	0,3	4,2	0,0	2,4	0,0	3,2
BHT	0,7	2,2	0,4	7,4	0,3	5,4	0,3	4,2	0,1	3,2	0,1	0,0

Dentre os antioxidantes presentes nos alimentos, os compostos fenólicos, antioxidantes primários, têm sido associados à inibição da oxidação, tanto em alimentos como em sistemas biológicos, pela sua capacidade em seqüestrar radicais livres e bloquear reações em cadeia. Estão largamente distribuídos na natureza e são derivados dos ácidos benzóico e cinâmico, bem como de flavonóides (MOREIRA; MANCINI-FILHO, 2004). No entanto, essas substâncias nem sempre protegem as células e os tecidos de todos os danos oxidativos, visto que podem apresentar atividade pró-oxidante em determinadas condições (DECKER, 1997).

Foi o que pôde ser observado nos valores de F2 para os volumes de 10µL, 20µL, 40µL, 50µL, 100µL para todas as amostras e de 200µL para café preparado em papel e expresso, o que representa a possibilidade de o antioxidante participar de outras reações, isto é, decomposição dos hidroperóxidos com oxigênio formando espécies radiculares, que aceleram o processo oxidativo do sistema, exibindo, portanto uma atividade pró-oxidante na etapa de propagação da cadeia oxidativa (YANISHILIEVA; MARINOVA, 1995). Alguns antioxidantes apresentam tal característica quando são utilizados em altas concentrações, o que pode ter acontecido no presente trabalho, como reportam, por exemplo, alguns estudos utilizando o α-tocoferol (SCHULER, 1990).

Valores de F2 relevantes (inferiores a 1) foram encontrados para as amostras de café solúvel e café coado em pano a 200µL, os quais apontam para uma possível capacidade de inibição da propagação da cadeia oxidativa, resultados esses semelhantes aos encontrados para o BHT.

Comportamento semelhante foi apresentado pelos ácidos caféico e clorogênico, eficientes antioxidantes fenólicos, e pela quercetina, um potente sequestrador de radicais livres, os quais foram relatados por Pratt e Birac (1979), em uma investigação em grãos de soja, farinha de soja desengordurada, e concentrado e isolado protéico de soja.

Segundo Andueza, Cid e Nicoli (2004), a atividade antioxidante e pró-oxidante do café sofre influência de diversos fatores, dentre eles, a variedade do café, armazenamento assim como o efeito do processamento e da torração sobre a atividade antioxidante.

Duarte et al. (2005) analisaram bebidas preparadas com café nos graus de torração claro, médio e escuro. Foram determinados o pH, os conteúdos de sólidos totais, de polifenóis, de substâncias redutoras e o de ácidos clorogênicos, além da atividade antioxidante dos extratos aquosos. Foi observada redução progressiva da atividade antioxidante e de compostos fenólicos com o grau de torração, ou seja, quanto mais torrado menor o conteúdo de fenólicos com detrimento, conseqüentemente, do potencial inibidor da oxidação.

Garcia e Daoud (2002) enfatizam que se tem atribuído aos radicais livres efeitos benéficos e nocivos, sendo a função dos antioxidantes normalizar as concentrações dessas espécies. Entretanto, nem a concentração normal de ERO é determinada, nem as doses de antioxidantes necessárias para se manter um nível de oxidantes endógenos adequados nos processos fisiológicos normais, como no envelhecimento, inflamação e em infecções, sendo consenso, portanto, que os antioxidantes devam ser administrados com precaução, evitando assim possíveis efeitos pró-oxidantes.

Desse modo, apesar do conhecimento existente sobre o potencial antioxidante apresentado pelos compostos fenólicos e existam inúmeros métodos *in vitro* para determinação da atividade antioxidante de alimentos, é de extrema importância o estudo da ação dessas substâncias *in vivo*, visto que a real ação desses compostos em sistemas biológicos dependerá de fatores como sua biodisponibilidade e metabolismo no organismo, bem como de possíveis interações com antioxidantes endógenos, os quais devem ser levados em consideração (ROGINSKY; LISSI, 2004).

Nesse contexto, frente aos resultados obtidos nesse estudo, bem como os obtidos na literatura a respeito do potencial antioxidante do café, seria o café um alimento funcional? Embora esse seja um questionamento no meio científico, os dados relatados nessa pesquisa apontam para novos estudos que direcionem uma estratégia de alimentação preventiva incluindo alimentos com capacidade de inibir a oxidação, na tentativa de interromper danos celulares e prevenir doenças, relacionados à produção excessiva de radicais livres no organismo.

E mesmo que a quantidade de café, que deva ser ingerida diariamente a fim promover benefícios à saúde em função de seu efeito antioxidante não estar bem estabelecida, as menores quantidades, são as que expressam os melhores resultados, suportando assim, o conceito de antioxidantes, como substâncias que em pequenas concentrações revelam potencial inibitório da oxidação (ABDALLA, 1993). Daí a importância de se orientar a

população quanto à escolha do tipo, forma de preparo do café, bem como sobre a necessidade de consumi-lo com moderação, conservando, na dieta, essa bebida de ampla aceitação pela população, em especial a brasileira.

Assim, mais estudos laboratoriais são necessários a fim de se estabelecer a concentração máxima utilizada para atividade antioxidante segura e correlacionar com a quantidade (medida caseira) àquela utilizada pela população em seu cotidiano e com isso contribuir com um dado seguro para ser trabalhado na clínica médico-nutricional.

CONCLUSÕES

Em todas as amostras de café analisadas foi identificada a presença de compostos fenólicos com atividade antioxidante, sendo o café solúvel a amostra que apresentou melhor estabilidade frente à oxidação. O estudo cinético, no geral possibilitou verificar maior efetividade em bloquear a fase de iniciação das reações de oxidação para todos os extratos, exceto o solúvel e o preparado em filtro de pano, que apresentaram também capacidade de inibição da propagação da cadeia oxidativa.

Os resultados *in vitro* obtidos sugerem o café como fonte de compostos fenólicos, atuando na proteção de processos oxidativos. Contudo, maiores investigações são necessárias, sobretudo *in vivo*, a fim de se obter conclusões mais precisas sobre o efeito desses fitoquímicos no organismo.

REFERÊNCIAS/REFERENCES

- ABDALLA, D. S. P. Antioxidantes. 1. Conceitos básicos e perspectivas terapêuticas. *ARS CURANDI*, São Paulo, p. 143-164, 1993.
- ANDUEZA, S.; CID, C.; NICOLI, M. C. Comparison of antioxidant and pro-oxidant activity in coffee beverages prepared with conventional and "Torrefacto" coffee. *Lebensm.-Wiss. U.-Technol*, v. 37, n. 8, p. 893-897, 2004.
- BERGER, M. M. Can oxidative damage be treated nutritionally? *Clinical Nutrition*, v. 24, n. 2, p. 172-183, Apr. 2005.
- DAMASCENO, D. C.; VOLPATO, G. T.; CALDERON, I. M. P.; RUDGE, M. V. C. Radicais livres, estresse oxidativo e diabetes. *Diabetes Clínica*, v. 5, p. 355-361, 2002.
- DE MARIA, C. A. B.; MOREIRA, R. F. A.; TRUGO, L. C. Componentes voláteis do café torrado. Parte I. Compostos heterocíclicos. *Química Nova*, v. 22, n. 2, p. 209-217, abr. 1999.
- DECKER, E. A. Phenolics: prooxidants or antioxidants? *Nutr. Rev.*, Secaucus, v. 55, n. 11, p. 396-407, 1997.
- DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. *Visão Acadêmica*, Curitiba, v. 5, n. 1, p. 33-40, jan./jun. 2004.
- DUARTE, S. M. S.; ABREU, C. M. P.; MENEZES, H. C.; SANTOS, M. H.; GOUVÊA, C. M. C. P. Effect of processing and roasting on the antioxidant activity of coffee brews. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v. 25, n. 2, p. 387-393, abr.-jun. 2005.

- DUVE, K. J.; WHITE, P. J. Extration and identification of antioxidant in oats. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, Champaign, v. 61, n. 6, p. 365-370, 1991.
- ESTEBAN-DIÉZ, I.; GONZÁLEZ-SÁIZ, J. M.; PIZARRO, C. An evaluation of orthogonal signal correction methods for the characterisation of arabica e robusta coffee varieties by NIRS. *Analytica Chimica Acta*, v. 514, n. 1, p. 57-67, 2004.
- FERRARI, C. K. B.; TORRES, E. A. F. S. *Avaliação da capacidade antioxidante total (CAT) e calorimetria de vinte e um diferentes tipos de alimentos comercializados no município de São Paulo (SP), Brasil*. 2002. 124 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.
- FERRARI, C. K. B.; TORRES, E. A. F. S. Biochemical pharmacology of functional foods and prevention of chronic diseases of aging. *Biomedicine & Pharmacoterapy*, v. 57, n. 5-6, p. 251-260, 2003.
- GARCIA, J. A. V.; DAOUD, R. Antioxidantes fenólicos: efeitos dos antioxidantes fenólicos na prática desportiva. *Fitness & Performance*, v. 1, n. 4, p. 21-27, jul./ago. 2002.
- GOCAN, S.; CIMPAN, G.; MURESAN, L. Automated multiple development thin layer chromatography of some plant extracts. *J. Pharm. Biomed. Analys.*, v. 14, n. 8-10, p. 1221-1227, 1996.
- GUERRA, N. B.; LAJOLO, F. M. Ação antioxidante de especiarias face diferentes atividades de água. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v. 25, n. 1, p. 45-50, jan.-mar. 2005.
- HARTLEY, T. R.; LOVALLO, W. R.; WHITSETT, T. L. Cardiovascular effects os caffeine in men and women. *Am. J. Cardiol.*, v. 93, n. 8, p. 1022-1026, Apr., 2004.
- IZMALOV, N. A.; SHRAIBER, M. S. A drop-chromatographic method of anlysis and its utilization in pharmacy. *Farmatsia*, Moscou, n. 3, p. 1-7, 1938.
- MAFRA, D.; ABDALLA, D. S. P.; COZZOLINO, S. M. F. Peroxidação lipídica em pacientes com insuficiência renal crônica. *Revista de Nutrição*, Campinas/SP, v. 12, n. 3, p. 205-212, set./dez. 1999.
- MARCO, G. J. A. Rapid method for evaluation of antioxidants. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, v. 45, p. 594-598, 1968.
- McCARTY, M. F. A chlorogenic acid-induced increase in GLP-1 production may mediate the impact of heavy coffee consumption on diabetes risk. *Medical Hypotheses*, v. 64, n. 4, p. 848-853, 2005.
- MELO, E. A.; GUERRA, N. B. Ação antioxidante de compostos fenólicos naturalmente presentes em alimentos. *Bol. SBCTA*, v. 36, n. 1, p. 1-11, jan./jun. 2002.
- MILLER, H. E. A simplified method for the evaluation of antioxidant. *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, Champaign, v. 48, p. p1, 1971.
- MOREIRA, A. V. B. *Avaliação da atividade antioxidante de sementes de mostarda (Brassica alba, L.)*. I Identificação dos principais compostos responsáveis pela inibição da oxidação. 1999. 120 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.
- MOREIRA, A. V. B.; MANCINI-FILHO, J. Atividade antioxidante das especiarias mostarda, canela e erva-doce em sistemas aquosos e lipídicos. *Nutrire: rev. Soc. Bras. Alim. Nutr.*, v. 25, p. 31-46, jun. 2003.
- MOREIRA, A. V. B.; MANCINI-FILHO, J. Influência dos compostos fenólicos de especiarias sobre a lipoperoxidação e o perfil lipídico de tecidos de ratos. *Revista de Nutrição*, Campinas, v. 17, n. 4, p. 411-424, out./dez. 2004.
- MOREIRA, R. F. A.; TRUGO, L. C.; DE MARIA, C. A. B. Componentes voláteis do café torrado. Parte II. Compostos alifáticos, alicíclicos e aromáticos. *Química Nova*, v. 23, n. 2, p. 195-203, 2000.
- MURSU, J.; VOUTILAINEN, S.; NURMI, T.; ALFTHAN, G.; VIRTANEN, J. K.; RISSANEN, T. H.; HAPPONEN, P.; NYSSÖNEN, K.; KAIKKONEN, J.; SALONEN, R.; SALONEN, J. The effect of

- coffee consumption on lipid peroxidation and plasma total homocysteine concentrations: a clinical trial. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 38, n. 4, p. 527-534, 2005.
- NASCIMENTO, M. A.; SILVA, A. K.; FRANÇA, L. C. B.; LÓPEZ, J. A.; ALMEIDA, M. G. *Avaliação da atividade antioxidante de extrato etéreo, etanólico, hidroetanólico e aquoso de Turnera ulmifolia L. (Turneraceae)*. 2002. 93 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2002.
- NASCIMENTO, M. A.; SILVA, A. K.; FRANÇA, L. C. B.; QUIGNARD, J. A.; LÓPEZ, J. A.; ALMEIDA, M. G. *Turnera ulmifolia L. (Turneraceae): preliminary study of its antioxidant activity*. *Bioresource Technology*, v. 97, p. 1387-1391, 2006.
- NOGUEIRA, M.; TRUGO, L. C. Distribuição de isômeros de ácidos clorogênicos e teores de cafeína e trigonelina em cafés solúveis brasileiros. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v. 23, n. 2, p. 296-299, maio-ago. 2003.
- OLIVEIRA, S. D.; FRANCA, A. S.; GLÓRIA, M. B. A.; BORGES, M. L. A. The effect of roasting on the presence of bioactives amines in coffees of diferent qualities. *Food Chemistry*, v. 90, n. 1/2, p. 287-291, 2005.
- OLTHOF, M. R.; HOLLMAN, P. C. H.; KATAN, M. B. Chlorogenic acid and caffeine acid are absorbed in humans. *J. Nutr.*, v. 131, n. 1, p. 66-71, 2001.
- PANAGIOTAKOS, D. B.; PITSAVOS, C.; CHRYSOHOOU, C.; KOKKINOS, P.; TOUTOUZAS, P.; STEFANADIS, C. The J-shaped effect of coffee consumption on the risk of developing acute coronary syndromes: the CARDIO 2000 case-control study. *J. Nutr.*, v. 133, n. 10, p. 3228-3232, 2003.
- PERIM, R. Café e seus efeitos na saúde. *Nutrição, Saúde & Performance*, ano 4, n. 22, p. 21-24, 2004.
- PHILIPPI, S. T. *Nutrição e técnica dietética*. São Paulo: Manole, 2003. 390 p.
- PRATT, D. E.; BIRAC, P. M. Source of antioxidant activity of soybeans and soy products. *J. Food Science*, v. 44, p. 1720-1722, 1979.
- RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gorduras. *Química Nova*, v. 29, n. 4, p. 755-760, 2006.
- RIBEIRO, D. A. V.; SILVA, D. C. F.; MOREIRA, A. V. B. *Atividade antioxidante dos principais chás consumidos na cidade do Natal/RN*. In: REUNIÃO ANUAL DA SBPC, 57., 2005. Fortaleza, CE. Anais.
- ROGINSKY, V.; LISSI, E. A. Review of methods to determine chain-braking antioxidant activity in food. *Food Chemistry*, v. 45, n. 6, p. 157-177, 2004.
- SCHULER, P. Natural antioxidants exploited commercilly. In: HUDSON, B. J. F. (Ed.). *Food antioxidants*. Amsterdan: Elsevier, 1990. cap. 4, p. 99-169.
- YANISHLIEVA, N. V.; MARINOVA, E. M. Effects of antioxidants on the stability of triacylglycerols and methyl esters of fatty acids of sunflower oil. *Food Chemistry*, v. 54, n. 4, 1995, p. 377-382(6).

Recebido para publicação em 17/01/07.

Aprovado em 04/04/07.