

## DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS EM AMOSTRAS COMERCIAIS DE CAFÉ TORRADO

Mariana Costa Monteiro<sup>##</sup> e Luiz Carlos Trugo<sup>†</sup>

Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Cidade Universitária Ilha do Fundão, 21949-900 Rio de Janeiro - RJ

Recebido em 7/6/04; aceito em 15/12/04; publicado na web em 13/4/05

DETERMINATION OF BIOACTIVE COMPOUNDS IN BRAZILIAN ROASTED COFFEES. Coffee is a product consumed all around the world, Brazil being the biggest exporter. However, little is known about the difference in composition of the different brands in terms of bioactive substances. In the present study, ten of the most consumed brands of coffee in Rio de Janeiro were analyzed. Caffeine contents, trigonelline and total chlorogenic acid varied from 0.8 g/100g to 1.4 g/100g; 0.2 g/100g to 0.5 g/100g and from 3.5 g kg<sup>-1</sup> to 15.9 g kg<sup>-1</sup>, respectively. The large heterogeneity observed in the amounts of the bioactive compounds can be attributed to different formulations of the various brands, as well as to different roasting conditions.

Keywords: coffee; bioactive compounds.

## INTRODUÇÃO

O café provém de uma árvore do gênero *Coffea* e dentre as várias espécies conhecidas, as mais comercializadas são *Coffea arabica* e *Coffea canephora*, sendo que *C. arabica* ocupa 74% do parque cafeeiro do Brasil, enquanto que *C. canephora* 26%<sup>1</sup>.

A composição química do café varia de acordo com a espécie e essa diferença contribui para que os grãos crus quando submetidos aos tratamentos térmicos, forneçam bebidas com características sensoriais diferenciadas<sup>2</sup> (Tabela 1).

A cafeína (Figura 1) é um alcalóide farmacologicamente ativo, pertencente ao grupo das xantinas e suas principais fontes alimen-

tares são café, mate e guaraná<sup>3</sup>. Ela é inodora e possui sabor amargo bastante característico, contribuindo com uma nota de amargor importante para o sabor e aroma da bebida do café<sup>4</sup>.

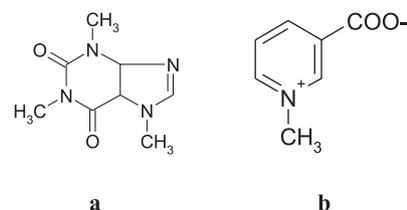


Figura 1. Estrutura química da cafeína (a) e trigonelina (b)

Tabela 1. Composição química do grão de café cru

Componentes	Café Arábica <sup>a</sup>	Café Robusta <sup>a</sup>
Cafeína	1,2	2,2
Trigonelina	1,0	0,7
Cinzas (41% corresponde a K)	4,2	4,4
Ácidos:		
Clorogênico total	6,5	10,0
Alifáticos	1,0	1,0
Quínico	0,4	0,4
Açúcares:		
Sacarose	8,0	4,0
Redutores	0,1	0,4
Polissacarídeos	44,0	48,0
Lignina	3,0	3,0
Pectina	2,0	2,0
Proteína	11,0	11,0
Aminoácidos livres	0,5	0,8
Lipídeos	16,0	10,0

<sup>a</sup>Valores expressos em g 100g<sup>-1</sup> em base seca; dados extraídos da literatura<sup>2</sup>

\*e-mail: macostamonteiro@yahoo.com.br

<sup>##</sup>Parte de trabalho de conclusão do curso de Nutrição de Mariana Costa Monteiro – UNIRIO, 2004.

<sup>†</sup> In Memoriam

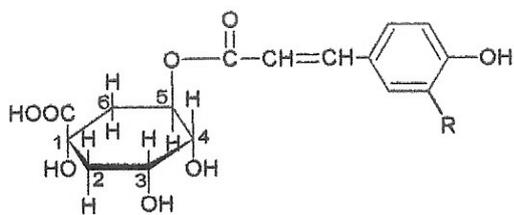
A cafeína é o componente do café mais conhecido, devido às suas propriedades fisiológicas e farmacológicas. Dos diversos efeitos atribuídos à cafeína, alguns já apresentam comprovação científica, como o efeito estimulante do sistema nervoso central, a diminuição do sono e estimulante do músculo cardíaco<sup>5</sup>.

A trigonelina (Figura 1) é uma N-metil betaína, importante para o sabor e aroma do café. Ela contribui para o aroma por meio da formação de produtos de degradação durante a torra e, entre esses produtos, estão as piridinas e o N-metilpirrol<sup>6</sup>.

O café é um dos únicos produtos que, mediante um processo tão drástico como a torrefação, produz uma vitamina importante para o metabolismo humano, a niacina. Durante a torrefação, a trigonelina sofre desmetilação para formar a niacina, em quantidades que podem chegar próximo a 20 mg 100g<sup>-1</sup> de café torrado<sup>4</sup>.

Os compostos fenólicos são conhecidos por suas características antioxidantes *in vitro*; entre eles figuram os ácidos clorogênicos (ACG), que são considerados os mais importantes e os que se apresentam em maior quantidade no café (Figura 2).

Atualmente, de acordo com a sistematização de Clifford<sup>7</sup>, podemos dizer que os ácidos clorogênicos são um conjunto de 5 grupos principais de compostos fenólicos e seus isômeros formados, principalmente, pela esterificação do ácido quínico com um dos seguintes ácidos derivados do ácido cinâmico: o ácido cafeico, o ferúlico, ou o *p*-cumárico. Estes grupos são ácidos cafeoilquínicos, com três isômeros principais (3, 4, 5); os ácidos dicafeoilquínicos, cujos isômeros principais são 3,4; 3,5; 4,5; ácidos feruloilquínicos



R = H, ácido 5-*p*-cumaroilquínico (5-ACQ)  
 R = OH, ácido 5-cafeoilquínico (5-ACQ)  
 R = OCH<sub>3</sub>, ácido 5-feruloilquínico (5-AFQ)

Figura 2. Estrutura molecular dos ácidos clorogênicos

(3, 4, 5), ácidos *p*-cumaroilquínicos, e os ácidos cafeoilferuloilquínicos.

Durante as últimas décadas, estudos *in vitro* e *in vivo* levaram os pesquisadores a atribuir diferentes funções farmacológicas aos ACG, tais como a ligação a centros opióides do cérebro<sup>8,9</sup>; atividade inibitória sobre as integrases que participam na replicação do vírus HIV<sup>10-14</sup>; indução da diminuição dos níveis sanguíneos de glicose, por meio da inibição da enzima glicose-6-fosfatase<sup>15-17</sup>; efeito indutor na replicação e na mobilidade de macrófagos de camundongos, o que acarretaria um aumento da imunidade<sup>18</sup> e característica anti-mutagênica<sup>19-21</sup>.

Durante o processo de torrefação, esses compostos fenólicos são intensamente degradados, originando pigmentos e componentes voláteis do aroma, como fenol e vinilguaiacol<sup>22,23</sup>.

No Brasil existem diversas marcas de café no mercado, produzidas por torrefadoras amplamente distribuídas nos diferentes estados. Entretanto, pouco se sabe sobre a composição desses produtos, principalmente tendo-se em vista que a composição da bebida, além de ser dependente da formulação dos “blends” de grãos crus, também apresenta variabilidade em função das condições de torrefação. Diferentes marcas de cafés solúveis disponíveis no mercado foram analisadas por Nogueira e Trugo<sup>24</sup> mostrando que a distribuição de ácidos clorogênicos é bastante variável, indicando a forte influência de formulação da matéria prima e do processamento utilizado. Torna-se relevante, portanto, conhecer as características químicas, inclusive os teores dos compostos bioativos presentes nas marcas mais comercializadas. O presente trabalho teve como objetivo caracterizar o perfil de compostos bioativos em amostras comerciais de café torrado e moído no município do Rio de Janeiro.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Obtenção das amostras

As amostras de café torrado e moído mais comercializadas no município do Rio de Janeiro foram adquiridas no mercado, de acordo com informações fornecidas pela ABIC. Tendo em vista as informações contidas nos rótulos, as amostras B, C, D, G, H, I e J foram classificadas como tradicional e as amostras A, E e F como extra forte.

### Determinação de cafeína e trigonelina

Para determinação de cafeína e trigonelina foram utilizados os mesmos procedimentos de extração. Em um béquer de 100 mL foram adicionados 0,2 g da amostra, aos quais foram acrescentados 50 mL de água quente, a aproximadamente 90 °C. Após agitação, deixou-se a suspensão em repouso durante 10 min. O conteúdo

foi transferido para um balão volumétrico de 100 mL, com lavagens sucessivas com água destilada, até aproximadamente 80 mL. Para clarificar as amostras foram adicionados 2 mL de solução de acetato de chumbo, agitando-se após a adição. O balão foi avolumado com água e deixado em repouso por 10 min. O conteúdo do balão foi filtrado em papel de filtro. O filtrado foi então utilizado para as análises cromatográficas. As extrações foram realizadas em triplicatas.

As análises de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foram realizadas de acordo com método de Trugo<sup>4</sup>, utilizando coluna em fase reversa C-18 em cromatógrafo Knauer (Alemanha). Para determinação da cafeína foi utilizada fase móvel constituída de água:metanol (60:40, v/v) e comprimento de onda de detecção em 272 nm. Para determinação dos teores de trigonelina foi utilizada fase móvel constituída de água:metanol (95:5, v/v) e comprimento de onda de detecção em 265 nm. Todas as análises foram realizadas em sistema isocrático com fluxo de 1,0 mLmin<sup>-1</sup>. A quantificação foi obtida por comparação da área do pico do componente na amostra com a área do pico referente ao padrão externo de cafeína e trigonelina (Sigma, USA).

### Determinação de ácidos clorogênicos

Para análise de ácido clorogênico 0,5 g da amostra foi dissolvida em 60 mL de solução água:metanol (60:40, v/v), agitando-se durante 15 min. O conteúdo foi transferido para um balão volumétrico de 100 mL, lavando-se o béquer com água destilada até aproximadamente 80 mL. Para clarificar as amostras, foram adicionados 1 mL de solução de Carrez I (acetato de zinco 21,6 g%) e 1 mL de solução de Carrez II (hexacianoferrato de potássio 10,6 g%). O balão foi avolumado com água, agitado e deixado em repouso por 10 min. O conteúdo do balão foi filtrado em papel de filtro. O filtrado foi então utilizado para as análises cromatográficas. As extrações foram realizadas em triplicatas.

As análises de CLAE foram realizadas de acordo com método de Trugo *et al.*<sup>25</sup>, utilizando-se coluna em fase reversa em cromatógrafo Shimadzu (Japão) com fase móvel constituída de tampão citrato trissódico 10 mM e metanol em sistema gradiente, com fluxo de 1,0 mL min<sup>-1</sup> e comprimento de onda de detecção em 325 nm. A quantificação dos diferentes isômeros foi obtida por comparação da área dos picos dos componentes nas amostras com a área do pico referente ao padrão externo de ácido 5-cafeoilquínico, corrigidos pelos respectivos coeficientes de extinção molar, seguindo-se metodologia descrita na literatura<sup>25</sup>.

### Determinação da cor

Para visualização da cor foi utilizado um sistema de classificação da cor por meio de discos padronizados (Roast Color Classification System Agtron – SCAA, 1995). Compara-se a coloração do café com a dos discos, atribuindo-se a numeração do disco correspondente.

As amostras submetidas a um processo de torrefação mais drástico, denominadas de extra-forte, foram classificadas com a numeração 45, enquanto as que sofreram um processamento menos drástico, denominadas de tradicional, foram classificadas com as numerações 55 ou 65.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Cafeína

Os teores de cafeína variaram na faixa de 0,8 g 100 g<sup>-1</sup> a 1,4 g

100 g<sup>-1</sup> conforme mostrado na Figura 3. Dados reportados na literatura demonstram que os teores de cafeína variam de acordo com a espécie do grão. Cafés provenientes de grãos robusta apresentam teores maiores de cafeína quando comparados aos grãos de café arábica<sup>4,26-29</sup>.

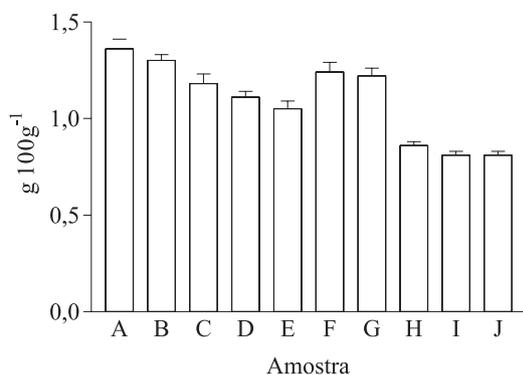


Figura 3. Teores de cafeína em amostras comerciais de café

A grande variabilidade verificada nos teores de cafeína deve-se, principalmente, às diferenças entre as combinações de grãos (“blends”) utilizadas pelas indústrias. Tendo em vista a estabilidade térmica da cafeína, as perdas que ocorrem durante a torrefação são pequenas.

### Trigonelina

Os teores de trigonelina variaram conforme mostrado na Figura 4, apresentando teores na faixa de 0,2 a 0,5 g 100g<sup>-1</sup>. Diversos autores descrevem, assim como para a cafeína, que os teores de trigonelina variam de acordo com a espécie de café. Grãos de café arábica apresentam maiores teores de trigonelina quando comparados aos grãos de café robusta<sup>30,31</sup>.

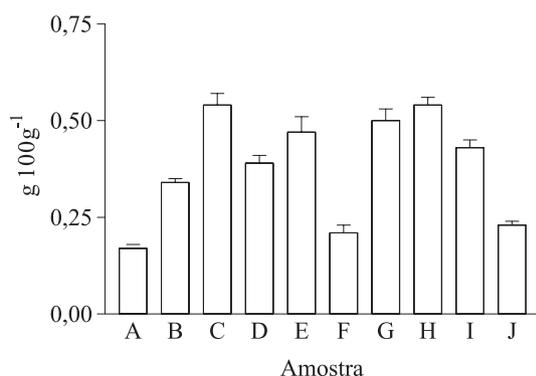


Figura 4. Teores de trigonelina em amostras comerciais de café

Entretanto, durante o processo de torrefação a trigonelina é rapidamente degradada, formando diversos produtos, que incluem produtos voláteis como as piridinas e o N-metipirrol e uma vitamina, a niacina<sup>4</sup>.

O conteúdo de trigonelina presente em amostras de café torrado vai depender do binômio tempo e temperatura de torrefação utilizados no processamento dos grãos. Quanto mais drástico o processo de torrefação, serão encontrados na amostra menores teores de trigonelina.

As amostras que apresentaram menores teores de trigonelina foram aquelas submetidas a um processo de torrefação mais drástico, isto é, torra extra forte. Isto foi confirmado por meio da medi-

da da cor dessas amostras, que obteve a numeração 45 (amostras A, F e J).

### Ácidos clorogênicos

Oito compostos fenólicos dos grupos principais de ACG (ACQ, ácidos cafeoilquínicos; ADICQ, ácidos dicafeoilquínicos; e AFQ, ácidos feruloilquínicos) foram identificados neste estudo. Os teores totais dos ACG estão apresentados na Figura 5 e a distribuição dos principais isômeros, na Tabela 2. Esses teores variaram entre 3,5 e 15,9 g kg<sup>-1</sup>. Na Figura 6 está representada a distribuição percentual dos principais grupos de isômeros dos ACG.

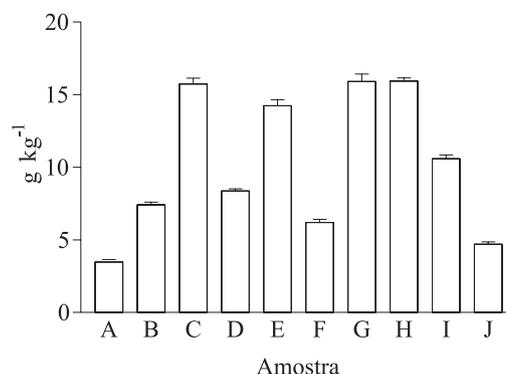


Figura 5. Teores de ácidos clorogênicos totais em amostras comerciais de café

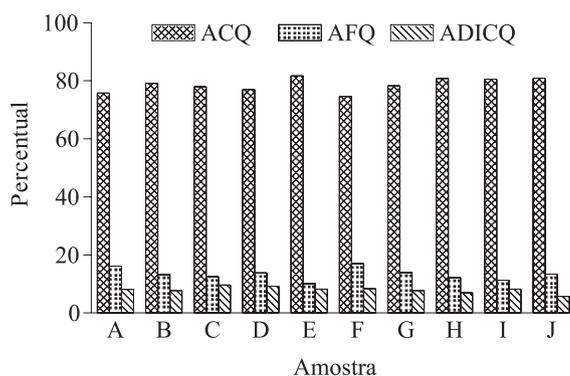


Figura 6. Distribuição percentual dos principais grupos de isômeros de ACG

Em todas as amostras houve um predomínio dos ácidos cafeoilquínicos, que representaram 77,0 a 81,7% do total de ACG. Esses resultados estão concordantes com outros relatos da literatura para amostras de café de diferentes variedades<sup>25</sup>.

Durante a torrefação, os ácidos clorogênicos são progressivamente degradados, contribuindo amplamente para a formação do aroma e sabor final da bebida e outros produtos do café torrado podendo ocorrer perdas de até 90% do conteúdo inicial de ácidos clorogênicos após torrefação severa dos grãos<sup>25,32,33</sup>.

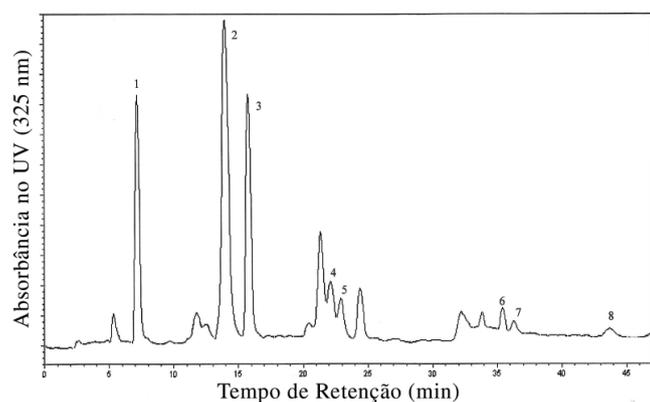
Aproximadamente metade do conteúdo total de ácidos clorogênicos degradados na torrefação pode ser encontrada na fração de pigmentos, na forma de ácido quínico livre e como compostos fenólicos de baixa massa molecular<sup>33</sup>.

Trugo *et al.*<sup>25</sup> atestaram que sementes do tipo arábica têm um conteúdo de ácidos clorogênicos menor que sementes do tipo robusta. Deste modo, conclui-se que o conteúdo total de ácidos clorogênicos seja alterado conforme a espécie e variedade do café. Um exemplo de cromatograma dos isômeros de ACG está mostrado na Figura 7.

**Tabela 2.** Teores dos principais isômeros dos CGAs em amostras comerciais de café

Amostra	Grau de torrefação <sup>a</sup>	Cor <sup>b</sup>	3-ACQ	4-ACQ	5-ACQ	4-AFQ	5-AFQ	3,4-ADICQ	3,5-ADICQ	4,5-ADICQ
A	Extra forte	45	0,75±0,03	0,74±0,04	1,14±0,06	0,32±0,01	0,24±0,01	0,15±0,01	0,13±0,01	ND <sup>c</sup>
B	Tradicional	55	1,42±0,01	1,94±0,06	2,50±0,05	0,56±0,02	0,42±0,02	0,23±0,01	0,22±0,01	0,12±0,01
C	Tradicional	55	2,95±0,06	3,90±0,15	5,40±0,11	1,19±0,01	0,78±0,02	0,52±0,02	0,47±0,03	0,52±0,01
D	Tradicional	55	1,56±0,05	2,04±0,04	2,84±0,02	0,61±0,01	0,54±0,01	0,29±0,01	0,26±0,01	0,22±0,01
E	Extra forte	55	2,85±0,10	3,77±0,14	5,01±0,11	0,73±0,02	0,71±0,006	0,49±0,02	0,33±0,02	0,34±0,01
F	Extra forte	45	1,24±0,06	1,32±0,05	2,06±0,04	0,52±0,01	0,53±0,01	0,18±0,02	0,22±0,02	0,12±0,01
G	Tradicional	65	3,00±0,07	3,81±0,10	5,65±0,22	1,18±0,06	1,05±0,03	0,48±0,02	0,39±0,01	0,35±0,006
H	Tradicional	65	3,03±0,01	3,89±0,07	5,96±0,05	1,08±0,01	0,86±0,03	0,46±0,02	0,38±0,006	0,28±0,01
I	Tradicional	55	2,18±0,05	2,51±0,07	3,83±0,09	0,62±0,01	0,58±0,01	0,29±0,01	0,26±0,01	0,32±0,01
J	Tradicional	45	1,08±0,02	1,13±0,05	1,59±0,06	0,29±0,01	0,34±0,006	0,14±0,006	0,13±0,006	ND <sup>c</sup>

Resultados expressos em g kg<sup>-1</sup>; <sup>a</sup>informação declarada no rótulo; <sup>b</sup>cor obtida de acordo com o Sistema de Discos Roast Color Classification; <sup>c</sup>não detectado



**Figura 7.** Perfil cromatográfico típico de ácidos clorogênicos em café torrado representado pela amostra H. Condições cromatográficas: coluna Rexchrom ODS-C18 (5 mm; 25 cm x 4,6 mm, Regis, USA), coluna de guarda (5 mm; 1 cm x 3 mm, Regis, USA); sistema de gradiente linear utilizando tampão citrato trissódico 10 mM e metanol a 1 mL min<sup>-1</sup>. 1 = 3-ACQ; 2 = 5-ACQ; 3 = 4-ACQ; 4 = 5-AFQ; 5 = 4-AFQ; 6 = 3,4-ADICQ; 7 = 3,5-ADICQ; 8 = 4,5-ADICQ.

O conteúdo final destes compostos em produtos de café pode indicar o ponto de torra utilizado sobre os grãos<sup>25,33</sup>. Os menores teores de ácidos clorogênicos totais foram observados em duas amostras (A e J), em que o isômero 4,5-ADICQ não foi detectado.

As amostras que apresentaram menores teores de ácidos clorogênicos totais são aquelas que foram submetidas a um processo de torrefação mais drástico, isto é, torra extra forte, o que foi confirmado através da medida de cor das amostras feita pelo sistema de discos, as quais receberam numeração 45 (amostras A, F e J).

Durante a torrefação, ao se degradarem em virtude da reação de pirólise, alguns compostos fenólicos podem produzir lactonas ou quinídeos com propriedades farmacológicas, como afinidade pelos sítios receptores de opióides, conforme verificado em experimentos *in vitro*<sup>8</sup>.

## CONCLUSÕES

Os métodos utilizados mostraram-se apropriados para a determinação dos compostos bioativos estudados nas amostras de café. A amostra E não apresentou características químicas e colorimétricas próprias de café extra forte, contrariando informação declarada no rótulo.

Os teores dos compostos investigados mostraram grande variação em função das diferentes marcas, o que pode ser explicado tanto pelo emprego de diferentes variedades de café nas misturas de grãos (“blends”) bem como pelas condições de torrefação.

A variabilidade dos teores de cafeína nas amostras pode ser explicada principalmente pelas características genéticas dos grãos de café utilizados, em virtude deste composto não ser fortemente influenciado pelas condições de torrefação.

Amostras com forte coloração escura, indicando alto grau de torra, mostraram menores teores de trigonelina e ácidos clorogênicos, que são mais susceptíveis ao aquecimento.

A divulgação de teores de compostos bioativos no rótulo do café torna-se altamente recomendável, pois permitiria que o consumidor avaliasse melhor o produto para decidir em sua escolha.

## AGRADECIMENTOS

Ao apoio financeiro do CNPq e da FAPERJ. L. C. Trugo era bolsista de Produtividade em Pesquisa do CNPq.

## REFERÊNCIAS

- http://www.agricultura.gov.br, acessada em Novembro 2003.
- Clarke, R. J. Em *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*; Caballero, B.; Trugo, L. C.; Finglas, P., eds.; Academic Press: London, England, 2003, vol. 3, p. 1486.
- Arnaud, M. J. Em *Encyclopedia of Human Nutrition*; Caballero, B.; Sadler, M. J.; Starin, J. J., eds.; Academic Press: London, England, 1999, vol. 1, p. 206.
- Trugo, L. C.; *PhD Thesis*, University of Reading, England, 1984.
- Nehlig, A.; *Chemtech* **1999**, 29, 30.
- Moreira, R. F. A.; Trugo, L. C.; De Maria, C. A. B.; *Quim. Nova* **1999**, 22, 209.
- Clifford, M. N.; *Coffee – botany, biochemistry and production of beans and beverage*, Croom Helm: London, England, 1985.
- Boublik, J. H.; Quinn, M. J.; Clements, J. A.; Herington, A. C.; Wynne, K. N.; Funder, J. W.; *Nature* **1983**, 301, 246.
- Wynne, K. N.; Familiar, M.; Boublik, J. H.; Drummer, O. H.; Era, I. D.; Funder, J. W.; *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **1987**, 14, 785.
- King, P. J.; Ma, G. X.; Miao, W. F.; *J. Med. Chem.* **1999**, 42, 497.
- McDougall, B.; King, P. J.; Wu, B. W.; Hostomsky, Z.; Reinecke, M. G.; Robinson, W. E. Jr.; *Antimicrob. Agents Chemother.* **1998**, 42, 140.
- Robinson Jr., W. E.; Cordeiro, M.; Abdel-malek, S.; Jia, Q.; Chow, S. A.; Reinecke, M. G.; Mitchell, W. M.; *Mol. Pharmacol.* **1996**, 50, 846.
- Robinson Jr., W. E.; Reinecke, M. G.; Abdel-malek, S.; Jia, Q.; Chow, S. A.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1996**, 93, 6326.
- Zhu, K.; Cordeiro, M. L.; Atienza, J.; Robinson, W. E. Jr.; Chow, S. A.; *J. Virol.* **1999**, 73, 3309.
- Arion, W. J.; Canfield, W. K.; Ramos, F. C.; Su, M. L.; Burger, H. J.; Hemmerle, H.; Schubert, G.; Below, P.; Herling, A. W.; *Arch. Biochem. Biophys.* **1998**, 351, 279.

16. Herling, A. W.; Burger, H. J.; Schwab, D.; Hemmerle, H.; Below, P.; Schubert, G.; *Am. J. Physiol.* **1998**, 274, 1087.
17. Johnston, K. L.; Clifford, M. N.; Morgan, L. M.; *Am. J. Clin. Nutr.* **2003**, 78, 728.
18. Tatefuji, T.; Izumi, N.; Ohta, T.; Arai, S.; Ikeda, M.; Kurimoto, M.; *Biol. Pharm. Bull.* **1996**, 19, 966.
19. Stich, H. F.; Rosin, M. P.; Bryson, L.; *Mutat. Res.* **1982**, 95, 119.
20. Wattenberg, L. W.; *Cancer Res.* **1983**, 43, 2448s.
21. Wood, A. W.; Huang, M. T.; Chang, R. L.; Newmark, H. L.; Lehr, R. E.; Yagi, H.; Sayer, J. M.; Jerina, D. M.; Conney, A. H.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1982**, 79, 5513.
22. Dart, S. K.; Nursten, H. E. Em *Coffee - Chemistry*; Clarke, R. J.; Macrae, R., eds.; Elsevier Applied Science Publisher: London, 1985, vol. 1, cap 7.
23. Moreira, R. F. A.; Trugo, L. C.; De Maria, C. A. B.; *Quim. Nova* **2000**, 23, 195.
24. Nogueira, M.; Trugo, L. C.; *Ciênc. e Tecnol. Aliment.* **2003**, 23, 296.
25. Trugo, L. C.; Macrae, R.; *Analyst* **1984**, 109, 263.
26. Casal, S.; Oliveira, M. B.; Alves, M. R.; Ferreira, M. A.; *J. Agric. Food Chem.* **2000**, 48, 3420.
27. Casal, S.; Oliveira, M. B. P. P.; Ferreira, M. A.; *Food Chem.* **2000**, 68, 481.
28. De Maria, C. A. B.; Trugo, L. C.; Moreira, R. F. A.; *Food Chem.* **1995**, 52, 447.
29. Ky, C. L.; *Food Chem.* **2001**, 75, 223.
30. Casal, S.; Andrade, P. B.; Oliveira, M. B.; *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **1999**, 22, 513.
31. Mazzafera, P.; *Phytochemistry* **1991**, 30, 2309.
32. Trugo, L. C.; Macrae, R.; *Food Chem.* **1986**, 19, 1.
33. Trugo, L. C.; De Maria, C. A. B.; Werneck, C. C.; *Food Chem.* **1991**, 42, 81.