

ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE CAFÉS TORRADO E SOLÚVEL: PADRONIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS

Josiane Alessandra Vignoli¹, Denisley Gentil Bassoli², Marta de Toledo Benassi³

(Recebido: 31 de maio de 2010; aceito 8 de novembro de 2011)

RESUMO: A atividade antioxidante (AA) de café, relacionada à presença de diferentes componentes, tem recebido grande atenção nos últimos anos e pode ser medida por diversos métodos. Entretanto, pouco se sabe sobre a eficiência dos métodos utilizados na avaliação da AA dos cafés. Objetivou-se, neste trabalho padronizar e validar, para café torrado e para café solúvel, técnicas de medida da AA, como ABTS (TEAC), FRAP, Folin-Ciocalteu, DPPH e Deoxirribose. Os resultados indicaram que, todos os métodos de medida de AA testados são precisos e podem ser utilizados para avaliação, tendo apresentado coeficientes de variação entre 3,5 e 10%, considerando-se as duas matrizes (torrado e solúvel) e as diferentes concentrações estudadas. A faixa de concentração empregada deve ser escolhida criteriosamente para cada matriz e método de interesse, uma vez que pode interferir, dependendo da metodologia utilizada, tanto em precisão quanto nos valores de AA observados.

Palavras-chave: FRAP, ABTS, Folin-Ciocalteu, DPPH, deoxirribose.

ANTIOXIDANT ACTIVITY OF ROASTED AND INSTANT COFFEES: STANDARDIZATION AND VALIDATION OF METHODOLOGIES

ABSTRACT: Antioxidant activity (AA) of coffee products has been widely discussed in recent years. The antioxidant potential, which has been related to the presence of different compounds, can be measured through several methodologies. However, the knowledge on the efficiency of these methods is still limited. This study standardized and validated several techniques of AA measurement (ABTS, FRAP, Folin-Ciocalteu, DPPH and Deoxyribose) for roasted and instant coffee. The results showed that all methods were accurate for evaluation of the AA: coefficients of variation between 3.5 and 10% were observed considering the two matrices (roasted and instant coffees) and the different concentrations applied. The concentration range must be carefully chosen for each product and method since it can interfere, depending on the methodology, in the accuracy and the AA values obtained.

Key- words: FRAP, ABTS, Folin-Ciocalteu, DPPH, Deoxyribose.

1 INTRODUÇÃO

Muitos estudos estão sendo focados no potencial antioxidante do café. A atividade antioxidante (AA) depende de constituintes naturais e de compostos formados durante o processo de torrefação. Dentre os constituintes naturais presentes, destacam-se os compostos fenólicos, tais como os ácidos clorogênicos e seus produtos de degradação. A cafeína e os metabólitos de sua degradação, e as melanoidinas formadas durante o processamento, também têm sido associadas à AA também têm sido associadas à AA (DAGLIA et al., 2004; VIGNOLI; BASSOLI; BENASSI, 2011).

Por definição, a atividade antioxidante (AA) é a capacidade de um composto de inibir degradação oxidativa. A AA, em alimentos, envolve pelo menos duas questões: o potencial antioxidativo determinado pela composição e propriedades antioxidantes dos constituintes e os efeitos biológicos que dependem, entre outras coisas, da biodisponibilidade do antioxidante (ROGINSKY; LISSI, 2005).

Mecanismos de ação antioxidante podem incluir supressão da formação de EROs (espécies reativas de oxigênio) tanto pela inibição de enzimas ou pela quelação de elementos envolvidos na produção de radicais livres, sequestro de EROs e aumento ou proteção pelas defesas antioxidantes do organismo

¹Companhia Iguçu de Café Solúvel - Pesquisa e Desenvolvimento - BR 369 - Km 88 - 86.300-000 - Cornélio Procópio - PR - jvignoli@yahoo.com.br

²Companhia Iguçu de Café Solúvel - Pesquisa e Desenvolvimento - BR 369 - Km 88 - 86.300-000 - Cornélio Procópio - PR - denisley@iguacu.com.br

³Universidade Estadual de Londrina/ UEL - Centro de Ciências Agrárias - Rodovia Celso Garcia Cid Km 6 - Londrina - PR - martatb@uel.br

(HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990). Experimentos simples podem ser feitos para analisar a AA *in vitro* e para testar possível efeito pró-oxidante, em diferentes alvos moleculares. Essa análise é preliminar a uma investigação mais complexa *in vivo*: um composto pouco efetivo *in vitro* possivelmente não terá melhor ação *in vivo* (ARUOMA, 1999).

Duas abordagens são aplicadas para determinação da AA, a direta e a indireta. No método indireto estuda-se mais frequentemente a habilidade do antioxidante em sequestrar alguns radicais livres, que não estão associados com a real degradação oxidativa. Nesse caso, determina-se a atividade antioxidante pela atividade doadora de hidrogênio, em que os radicais livres estáveis e coloridos são muito empregados, devido à sua intensa absorvância. Métodos diretos são baseados no estudo do efeito do antioxidante na degradação oxidativa de um sistema teste. Como substrato de oxidação podem ser utilizados lipídios, proteínas, DNA, ou espécies relevantes biologicamente. A peroxidação lipídica mostra-se como o mais conveniente para esse propósito (ROGINSKY; LISSI, 2005).

Diferentes metodologias são utilizadas para caracterizar a capacidade antioxidante de alimentos, entretanto, não há qualquer método universal pelo qual a AA possa ser quantificada com precisão (PRIOR; XIANLI; SCHAICH, 2005). A capacidade antioxidante da bebida do café já foi estudada pelos ensaios de FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) (SÁNCHEZ-GONZÁLEZ et al., 2005), ABTS (2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolona-6-ácido sulfônico) (BORRELI et al., 2002; SÁNCHEZ-GONZÁLEZ et al., 2005), deoxirribose (DAGLIA et al., 2004), DPPH (2,2 Difenil-1- picrilhidrazil) (BORRELI et al., 2002) e determinação de fenólicos totais (BORRELI et al., 2002).

O método de FRAP foi inicialmente desenvolvido para medir poder redutor no plasma, mas o ensaio tem sido adaptado e utilizado para ensaios de antioxidantes em plantas. A reação mede a redução férrica de 2,4,6-tripiridil -s- triazina (TPTZ) para um produto colorido (BENZIE, 1996). A reação detecta compostos com potencial redox $< 0,7V$ (o potencial redox do Fe^{+3} -TPTZ). O ensaio de FRAP mede somente os mecanismos de transferência de elétrons que em combinação com outros métodos, pode ser útil na distinção de mecanismos dominantes com diferentes

antioxidantes (PRIOR; XIANLI; SCHAICH, 2005). Os ensaios utilizando-se o radical ABTS, entre eles o TEAC, são baseados na habilidade dos antioxidantes em sequestrar o ânion radical de longa vida $ABTS^{\cdot-}$. Nesse ensaio, o ABTS é oxidado pelo radical peróxido ou outros oxidantes para seu radical cátion, $ABTS^{\cdot+}$, que é intensamente colorido, e a capacidade antioxidante é medida pela habilidade que o composto em teste possui em decrescer a cor, reagindo diretamente com o radical $ABTS^{\cdot+}$ (AWIKA et al., 2003). O método DPPH vem sendo utilizado para avaliar a atividade sequestradora de compostos específicos ou extratos pela rapidez e facilidade. A redução do radical estável DPPH• (2,2-difenil -1- picrilhidrazil) é monitorada pela diminuição da absorvância desse radical a 515 nm. O mecanismo DPPH é considerado, principalmente pela reação de transferência de elétron, sendo a abstração do átomo de hidrogênio uma reação de via marginal (OU; PRIOR; HUANG, 2005). O ensaio de deoxirribose permite a determinação da razão constante de reações com o radical hidroxil. É um teste em tubo, relativamente simples, no qual o radical é gerado pela mistura de ascorbato, peróxido de hidrogênio e Fe^{3+} - EDTA (HALLIWELL et al., 1995). Após aquecimento em condições ácidas, também ocorre a formação de MDA (malondialdeído), um produto secundário de peroxidação lipídica, que é então detectado pela complexação com o TBA (ácido tiobarbitúrico). O ensaio Folin Ciocalteu, é utilizado há muitos anos como medida de fenólicos totais em produtos naturais, mas o mecanismo básico é uma reação de oxidação/redução e como tal pode ser considerado um outro método de atividade antioxidante (PRIOR; XIANLI; SCHAICH, 2005).

No geral, os estudos já realizados com o café referem-se ao café verde ou torrado e pouco é conhecido sobre a AA do café solúvel; e as informações sobre padronização e validação dessas metodologias e a aplicação aos diferentes produtos são escassas. Deve-se considerar ainda que, para cada produto, é possível identificar um método ou grupo de métodos que permitam uma avaliação mais adequada da atividade antioxidante. Além disso, o conhecimento sobre a incerteza do método é extremamente valioso quando a comparação de diferentes amostras faz-se necessária.

Neste trabalho, padronizaram-se e foram realizadas as técnicas de medida de AA, ABTS (TEAC), FRAP, Folin-Ciocalteu, DPPH e Deoxirribose, para diferentes matrizes de café (torrado e solúvel).

2 MATERIAL E MÉTODOS

Como material para padronização e comparação das metodologias utilizou-se café robusta, sendo os produtos elaborados pela Companhia Iguazu de Café Solúvel (Cornélio Procópio, Paraná, Brasil), empregando-se para o café torrado grau de torra claro ($L^*=24$, $H^*=58$) e, na sequência, para produção do solúvel, extração convencional com temperaturas de 100 a 180°C. A matéria prima e condições de processo foram selecionadas porque os produtos exibiam expressiva AA, em estudos anteriores (VIGNOLI; BASSOLLI; BENASSI, 2011).

Os reagentes ácido tiobarbitúrico; ABTS (2,2-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico); DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), deoxirribose, cloreto de ferro III e EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) foram obtidos da Sigma Chemical CO. (EUA). Trolox (6-hidroxi - 2,5,7,8-tetrametilchroman-2- ácido carboxílico) e TPTZ (2,4,6-tri (2-piridil-s-triazina) foram obtidos da Fluka/ Sigma-Aldrich (Dinamarca). Folin-Ciocalteu e peróxido de hidrogênio foram obtidos da Merck (Alemanha). Para as análises, empregou-se um espectrofotômetro UV-Vis, modelo UV, mini-1240 (Shimadzu, Japão).

Com relação ao preparo de amostra, para o café torrado, foi adotado o mesmo procedimento para todos os testes, alterando-se apenas a concentração de acordo com o requerido em cada método. Os grãos foram moídos e passados através de uma peneira de 0,35 mm. A amostra foi então pesada, dissolvida em água fervente ficando sob agitação durante 5 minutos, e após filtração, coletou-se o material filtrado (CHAMBEL et al., 1997). As amostras de café solúvel foram preparadas diretamente pela dissolução em água na concentração desejada (Tabela 1).

Para a determinação da atividade antioxidante das amostras, foram testados os métodos ABTS, FRAP, Folin-Ciocalteu, DPPH e Deoxirribose, descritos abaixo.

No método deoxirribose a atividade de sequestro de radicais hidroxílicos pelas soluções de café, baseadas na inibição de degradação dessa pentose foi avaliada de acordo com Aruoma (1994), com algumas modificações. Em 1 mL de solução, a mistura de reação continha $FeCl_3$ (20 μM) premisturado com EDTA (100 μM) em tampão KH_2PO_4/KOH ; 2deoxi-D-ribose (2,8mM), H_2O_2

(2,8mM), ácido ascórbico (25 μM) e 12 μL da solução de café previamente preparada. As amostras foram incubadas em banho de água a 37°C, por 30 minutos. Para determinar as substâncias reativas ao TBA formadas, adicionou-se 1 mL de ácido tiobarbitúrico 1% e 1mL de ácido tricloroacético 2,8%. A mistura foi aquecida em banho a 80°C, por 20 minutos. Posteriormente, foi mantida em gelo por 5 minutos. A absorvância do sobrenadante foi lida a 532 nm. Concomitantemente, foram preparados o branco (ausência de deoxirribose), o controle positivo (ausência de amostra) e o controle negativo (ausência de ferro). As medidas foram realizadas em triplicata. Para corrigir a interferência de substâncias que podem naturalmente ocorrer nas soluções de café e reagir com ácido tiobarbitúrico e devido à cor da própria amostra, foram analisadas soluções relativas, das amostras e do controle, preparadas conforme descrito, porém sem a adição de ácido ascórbico. A atividade sequestradora foi expressa como a porcentagem de inibição da atividade (IA%) da degradação de deoxirribose, na presença da solução de café relativa às amostras controle, de acordo com a equação 1:

$$IA(\%) = 100 - \frac{\Delta Abs_{amostra}}{\Delta Abs_{controle}} * 100 \quad \text{Equação 1:}$$

onde:

Δ Abs amostra: (Absorvância com ácido ascórbico - Absorvância sem ácido ascórbico)

Δ Abs controle: (Absorvância com ácido ascórbico - Absorvância sem ácido ascórbico)

A capacidade antioxidante das soluções de café frente ao radical livre $ABTS^{*+}$ foi realizada de acordo com Sánchez-González et al. (2005). A solução ABTS foi preparada em meio aquoso para evitar precipitação dos componentes do café. O cátion $ABTS^{*+}$ foi produzido reagindo 7mM da solução estoque ABTS com 2,45 mM de persulfato de potássio. A mistura foi armazenada em frasco escuro e em temperatura ambiente por 12-16 horas, antes do uso. A solução $ABTS^{*+}$ foi diluída com tampão fosfato (pH 7.4) para uma absorvância de 0,7 a 730 nm. Após a adição de 10 μL de amostra ou padrão Trolox para 4mL da solução $ABTS^{*+}$ diluída, as leituras de absorvância a 730 nm foram realizadas após 6 minutos de reação. Soluções de etanol com concentrações conhecidas de Trolox (2,5; 5,0; 7,5;

12,5 e 20,0 $\mu\text{Mol/L}$) foram usadas para calibração. Os resultados foram expressos como capacidade antioxidante equivalente ao Trolox (TEAC - $\mu\text{Mol/L Trolox}/\mu\text{g/mL}$ de amostra).

O poder de redução da bebida, pelo método de FRAP, foi avaliado de acordo com metodologia descrita por Sánchez-González et al. (2005), com algumas modificações. O reagente de FRAP foi preparado como segue: 2,5 mL de uma solução 10mM TPTZ em HCl 40mM foram adicionados a 2,5 mL de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e 25 mL de tampão acetato 0.3 mM pH 3.6. A solução foi incubada a 37°C por 30 minutos. Para a avaliação da AA, 900 μL do reagente FRAP preparado previamente, foi misturado com 90 μL de água destilada e 10 μL da amostra ou padrão. As amostras foram incubadas à 37°C, por 30 minutos e a leitura realizada a 595 nm. Soluções padrão com diferentes concentrações de Trolox (4,5; 7,5; 10,5; 12,0 e 18,0 $\mu\text{mol/L}$) foram utilizadas para calibração. Os resultados foram expressos como $\mu\text{mol/L}$ de Trolox / $\mu\text{g/mL}$ de amostra.

Na determinação da atividade antioxidante pelo método DPPH, a redução do radical livre DPPH \cdot foi determinada pela mudança colorimétrica medida a 517 nm. O tubo de reação continha os seguintes reagentes: 1mL de tampão acetato, 1 mL de etanol, 500 μl de DPPH 250 μM e 10 μl de amostra. Após 10 minutos, sob temperatura ambiente, realizou-se a leitura em 517 nm. Juntamente foram preparados o branco (sem amostra e sem DPPH) e controle positivo (sem amostra) (CASAGRANDE et al., 2007). O poder antioxidante da bebida foi calculado pela porcentagem de inibição da atividade do radical livre (IA %), de acordo com a equação 2:

Equação 2:

$$IA (\%) = 100 - (Absorvância da amostra / Absorvância do controle) * 100$$

Para determinação do teor de fenóis totais pelo método de Folin-Ciocalteu, 100 μL das amostras foram adicionados a 7,5 mL de água destilada e 300 μL do reagente de Folin-Ciocalteu 0,9N. Após agitação e mistura, foi acrescentado 1mL de solução Na_2CO_3 20% e 1,1mL de água destilada misturando-se então com auxílio de agitador. A reação foi mantida, sob temperatura ambiente por 1 hora. A leitura foi realizada a 765 nm. Fez-se uma curva de calibração,

utilizando-se ácido gálico como padrão nas concentrações de 0,5; 1,0; 2,0; 5,0 e 7,0 Mmol/L de ácido gálico. Os resultados foram expressos como mMol/L de ácido gálico/ mg/mL de amostra (SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELA-RAVENTOS, 1999).

O procedimento de validação foi realizado seguindo guias de validação da Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA (2003), Associação Brasileira de Normas Técnicas - ABNT (2000) e International Organization for Standardization - ISO (1994).

Para estudo da linearidade, inicialmente, definiu-se a faixa de trabalho para cada metodologia. Para avaliação dos métodos de atividade antioxidante, as amostras foram preparadas em diferentes concentrações de maneira que os valores de absorvância das reações finais ficassem na faixa de leitura entre 0,2 e 0,7UA. As concentrações selecionadas e validadas em cada metodologia, para o café solúvel e torrado estão apresentadas na Tabela 1. Como a atividade antioxidante foi determinada em amostras complexas e não a partir de um composto isolado, avaliaram-se apenas os parâmetros de precisão e linearidade.

A linearidade foi estudada para os métodos de Folin-Ciocalteu, FRAP e ABTS, avaliando-se as faixas de 0,5 a 7 mMol de ácido gálico; 4,5 a 18,0 $\mu\text{Mol/L}$ de Trolox e 2,5 a 20 $\mu\text{Mol/L}$ de Trolox, respectivamente, seguindo recomendações da ANVISA (2003) que determina um coeficiente de correlação igual a 0,99.

Determinou-se a precisão intermediária (inter-dias), com análises realizadas em dias diferentes com diferentes analistas. A avaliação foi feita de acordo com a ISO 5725 (ISO, 1994) e NBR 14597 (ABNT, 2000), onde é estabelecido que $t.(n-1) \geq 15$; sendo t o grupo de medições e n o número de repetições de cada grupo. Nas metodologias ABTS, FRAP, DPPH e Folin foram realizadas 5 repetições (preparações independentes), em três concentrações para o café solúvel e três concentrações para o café torrado, $n = 15$ (5 repetições em triplicata). Para a metodologia de deoxirribose, o experimento foi realizado com duas concentrações e 3 repetições, obtendo-se $n = 9$ (3 repetições em triplicata). As determinações foram realizadas por 5 dias consecutivos ($t=5$).

TABELA 1 – Concentrações de cafés torrado e solúvel, utilizadas na validação das diferentes metodologias.

Métodos	Concentração (mg/mL)	
	Solúvel	Torrado
ABTS	1,00	5,00
	3,00	10,00
	5,00	15,00
DPPH	1,00	1,00
	3,00	4,00
	5,00	8,00
FRAP	0,45	0,90
	0,90	1,50
	1,50	3,00
FOLIN	0,50	2,00
	1,00	3,00
	2,00	5,00
DEOXIRRIBOSE	5,00	5,00
	10,00	15,00

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As curvas de calibração para as metodologias ABTS, FRAP e Folin apresentaram linearidade (valores de $R \geq 0,99$, para $p \leq 0,01$), na faixa estudada.

A Tabela 2 apresenta, para os cafés torrado e solúvel, os valores médios de AA obtidos em cada metodologia, nas concentrações estudadas. Os resultados correspondem à média obtida das repetições (3 ou 5 repetições em triplicata) realizadas durante 5 dias consecutivos (precisão interensaio). Os coeficientes de variação entre dias (CV%) informam o grau de dispersão dos resultados.

Pode-se observar que, para as duas matrizes, todos os métodos apresentaram coeficientes de variação (CV) abaixo de 10% em, pelo menos, uma das concentrações estudadas. Os maiores coeficientes de variação, em geral, foram encontrados no nível mais baixo de concentração estudado. No preparo da bebida do produto torrado, o teor de sólidos solúveis final, que participará da reação de sequestro dos radicais, é menor que no caso do solúvel. A diferença de concentração poderia influenciar a reação, resultando em maiores variações, em baixos níveis de concentração.

Para os métodos em que foi medido o sequestro de radicais: DPPH, deoxirribose e ABTS, CV superiores a 5% foram encontrados, tanto no café solúvel, quanto no torrado. Para os ensaios de ABTS e FRAP, observou-se boa repetibilidade nas duas matrizes independentemente da concentração. Anese e Nicoli (2003), comparando bebidas de cafés com diferentes torras descrevem variação na medida de ABTS de 3 a 14%, superior a observada neste trabalho. Mesmo considerando-se concentrações diferenciadas, apenas o ensaio com DPPH para café solúvel, na concentração 1mg/mL (CV de 23%), apresentou CV superior ao valor de 15% recomendado pela ANVISA (2003), indicando que, para essa matriz, seria adequado trabalhar com concentrações mais altas (Tabela 2). Além disso, pode-se considerar que, para o método DPPH, a avaliação da concentração é essencial para se avaliar uma determinada matriz.

Para as metodologias ABTS, FRAP e Folin, que têm seus resultados expressos por comparação do teor de um composto utilizado na curva de calibração, a resposta não deve sofrer variações com as concentrações, já que corresponde ao teor de Trolox ou ácido gálico por $\mu\text{g/mL}$ de amostra ou mg/mL ,

respectivamente. Para as metodologias deoxirribose e DPPH, que medem a inibição do radical livre pelo antioxidante presente na amostra, a inibição tende a aumentar com elevação da concentração de amostra, que leva a um aumento no teor de compostos antioxidantes. Assim, para as metodologias ABTS, FRAP e Folin, a concentração utilizada teve pouca influência nos resultados observados, enquanto para deoxirribose e DPPH, os valores de atividade antioxidante foram dependentes das concentrações empregadas. (Tabela 2). Isso indica que, para essas metodologias, a comparação de resultados com dados de literatura deveria ser realizada levando-se em conta a faixa de concentração estudada, ou utilizando-se de várias concentrações para obtenção dos valores de IC_{50} .

Nos trabalhos encontrados na literatura, realiza-se a comparação da AA com base em Análise de Variância e teste de médias (ANESE; NICOLI, 2003; PARRAS et al., 2007), mas o nível de significância e os testes de médias empregados variam, dificultando a análise. O conhecimento da precisão dos métodos, obtido em estudo de validação, para cada matriz específica permitiria a comparação da atividade antioxidante de diferentes amostras.

Os resultados demonstram que, nas concentrações propostas, é possível utilizar todos os métodos estudados para medir a atividade antioxidante dos cafés torrado e solúvel, bem como indicam qual a melhor faixa de trabalho para que mínimas variações nas medidas ocorram.

TABELA 2 – Avaliação da precisão interdias em diferentes métodos para o café torrado e solúvel.

Método	Café Torrado			Café Solúvel			CV médio (%)**
	Conc. (mg/mL)	AA	CV (%)	Conc. (mg/mL)	AA	CV (%)	
ABTS* (μ Mol/Ltrolox/ μ g. mL ⁻¹) <i>média</i>	5,00	0,59	9,79	1,00	1,36	7,99	9,65
	10,00	0,48	11,07	3,00	1,16	8,27	
	15,00	0,47	9,07	5,00	1,11	11,97	
		0,52	9,98		1,21	9,41	
DPPH* (%IA) <i>média</i>	3,00	14,57	8,89	1,00	13,26	22,72	7,61
	5,00	25,45	4,32	4,00	48,90	5,28	
	10,00	47,25	3,39	8,00	80,22	1,13	
		---	5,5		---	9,71	
FRAP* (μ Mol/Ltrolox/ μ g. mL ⁻¹) <i>média</i>	0,30	0,62	5,10	0,15	1,28	5,67	4,67
	0,60	0,63	4,42	0,30	1,24	6,29	
	0,90	0,61	2,77	0,45	1,25	3,75	
		0,62	4,1		1,26	5,24	
Folin* (mMol/L ác.gal./ mg.mL ⁻¹) <i>média</i>	2,00	7,36	3,30	0,50	17,10	4,87	3,51
	3,00	7,21	2,26	1,00	16,93	3,72	
	5,00	6,76	3,11	2,00	16,08	4,01	
		7,11	2,89		16,70	4,12	
<i>Deoxi</i> ** (%IA) <i>média</i>	5,00	29,37	11,24	5,00	45,26	4,26	7,12
	15,00	48,14	6,17	10,00	59,70	6,59	
		---	8,81		---	5,43	

* média de 25 valores (quintuplicatas, 5dias) e CV (%) entre os dias

** média de 15 valores (triplicata, 5dias) e CV (%) entre os dias

***média dos valores de CV considerando-se todas as concentrações, nas duas matrizes

4 CONCLUSÕES

As metodologias FRAP, DPPH, ABTS, Folin e deoxirribose são aplicáveis para avaliação qualitativa e quantitativa da atividade antioxidante, em amostras de café torrado solúvel.

Foram obtidos coeficientes médios de variação entre 3,5% e 10% para as metodologias estudadas, considerando-se as duas matrizes e diferentes concentrações.

Ocorre interferência da concentração utilizada na precisão e nos valores de AA, variável com a metodologia utilizada, devendo ser escolhida, criteriosamente, para cada matriz e método de interesse.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução RE nº 899**, de 23 de maio 2003. Determina a publicação do “Guia para validação de métodos analíticos”. Brasília, 2003. Disponível em: <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public>>. Acesso em: 5 maio 2010.

ANESE, M.; NICOLI, M. C. Antioxidant properties of ready-to-drink coffee brews. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Columbus, v. 51, n. 4, p. 942-946, Feb. 2003.

ARUOMA, O. I. Deoxyribose assay for detecting hydroxyl radicals. **Methods in Enzymology**, New York, v. 233, p. 57-66, 1994.

_____. Free radicals, antioxidants and international nutrition. **Asia Pacific Journal Clinical Nutrition**, Ashford, v. 8, n. 1, p. 53-63, 1999.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 14597**: precisão de métodos analíticos: determinação da repetibilidade e reprodutibilidade de métodos para ensaios de produtos químicos: estudo intralaboratorial. Rio de Janeiro, 2000.

AWIKA, J. M. et al. Screening methods to measure antioxidant activity of sorghum (*Sorghum bicolor*) and sorghum products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Columbus, v. 51, n. 23, p. 6657-6662, Dec. 2003.

BENZIE, I. F. F. An automated, specific, spectrophotometric method for measuring ascorbic acid in plasma (EFTSA). **Clinical Biochemistry**, Winnipeg, v. 24, p. 111-116, 1996.

BORRELI, R. C. et al. Chemical characterization and antioxidant properties of coffee melanoidins. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, Columbus, v. 50, n. 22, p. 6527-6533, Nov. 2002.

CASAGRANDE, R. et al. *In vitro* evaluation of quercetin cutaneous absorption from topical formulations and its functional stability by antioxidant activity. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 328, p. 183-190, 2007.

CHAMBEL, M. B. et al. Development of a HPLC/Diode Array detector method for simultaneous determination of 5-HMF, furfural, 5-O-Caffeoylquinic acid and caffeine in coffee. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, New York, v. 20, n. 18, p. 2949-2957, 1997.

DAGLIA, M. et al. *In vitro* and *ex vivo* antihydroxyl radical activity of green and roasted coffee. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Columbus, v. 52, n. 6, p. 1700-1704, Mar. 2004.

HALLIWELL, B. et al. The characterization of antioxidants. **Food and Chemical Toxicology**, London, v. 33, p. 601-617, 1995.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. **Methods in Enzymology**, New York, v. 186, p. 1-85, 1990.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 5725**: accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results, part 1: general principles and definitions. Geneva, 1994.

OU, B.; PRIOR, R. L.; HUANG, D. The chemistry behind dietary antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, Columbus, v. 53, n. 6, p. 1841-1856, Mar. 2005.

PARRAS, P. et al. Antioxidant capacity of coffees of several origins brewed following three different procedures. **Food Chemistry**, Oxford, v. 102, n. 3, p. 582-592, Mar. 2007.

PRIOR, R. L.; XIANLI, W.; SCHAICH, K. Standardized methods for determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Columbus, v. 53, n. 10, p. 4290-4302, May 2005.

Coffee Science, Lavras, v. 7, n. 1, p. 68-75, jan./abr. 2012

ROGINSKY, V.; LISSI, E. A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. **Food Chemistry**, Oxford, v. 92, n. 2, p. 235-254, Feb. 2005.

SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, I. et al. In vitro antioxidant activity of brewed using different procedures: Italian, espresso and filter. **Food Chemistry**, Oxford, v. 90, n. 1/2, p. 133-139, Jan./Feb. 2005.

SINGLETON, V.L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin- Ciocateau reagent. **Methods in Enzymology**, New York, v. 299, p. 152-178, 1999.

VIGNOLI, J. A. ; BASSOLI, D. G; BENASSI, M. T. Antioxidant activity, polyphenols, caffeine and melanoidins in soluble coffee: The influence of processing conditions and raw material. **Food Chemistry**, Oxford, v. 124, n. 2, p. 863-868, Feb. 2011.