

Desempenho antimicrobiano em bolores isolados de muffins e capacidade antioxidante de óleos de café (*Coffea arabica* L.) cru e torrado

Antimicrobial performance on molds isolated from muffin and antioxidant capacity of raw and roasted coffee oils (*Coffea arabica* L.)

Desempeño antimicrobiano en mohos aislados de muffins y capacidad antioxidante de aceites de café (*Coffea arabica* L.) tostado y crudo

Recebido: 14/10/2020 | Revisado: 20/10/2020 | Aceito: 25/10/2020 | Publicado: 27/10/2020

Sandra Júnia Monteiro Silva

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5222-8734>

Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Brasil

E-mail: sajumonteiro@yahoo.com.br

Paula Villela Dessimoni Spencer

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8111-172X>

Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Brasil

E-mail: paulavillela88@hotmail.com

Nísia Andrade Villela Dessimoni Pinto

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7485-3757>

Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Brasil

E-mail: nisiavillela@yahoo.com.br

Marcio Schmiele

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8830-1710>

Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Brasil

E-mail: marcio.sc@ict.ufvjm.edu.br

Resumo

Os bolores são os principais agentes causadores de deterioração no bolo, tornando-os impróprios para consumo humano e reduzindo o seu valor comercial e nutritivo. Técnicas de biopreservação podem melhorar a qualidade e a segurança dos produtos de panificação, inibindo o crescimento de fungos deterioradores. Os óleos de café cru e torrado possuem propriedades bioativas, antioxidantes e antimicrobianas, sendo uma alternativa para substituir parcial ou totalmente os conservantes artificiais. Este estudo teve como objetivo isolar os micro-organismos do bolo tipo muffin e avaliar as propriedades antifúngicas desses óleos

frente aos fungos isolados, determinar o teor de compostos fenólicos totais e avaliar a capacidade antioxidante dos óleos pelo método DPPH e FRAP. Após o isolamento da cultura dos fungos do bolo foram realizadas avaliações macroscópica e microscopia. Os fungos encontrados foram caracterizados como filamentosos e pertencentes ao gênero *Trichothecium sp.*, *Aspergillus sp.* e *Penicillium sp.* No entanto, os óleos não apresentaram atividade antifúngica em relação aos fungos isolados do bolo. O óleo de café torrado apresentou maior teor de compostos fenólicos totais em relação ao óleo de café cru (946,84 e 155,76 mg de ácido gálico/100g de extrato, respectivamente). Para a capacidade antioxidante pelo método DPPH não houve diferença entre os óleos e foram inferiores ao método FRAP, o qual foi mais eficiente. Os óleos testados não apresentam potencial efeito antifúngico, mas o óleo de café torrado apresentou maior capacidade antioxidante que o óleo de café cru pelo método FRAP, corroborando com a concentração de fenóis totais identificado.

Palavras-chave: Panificação; Fungos; Compostos bioativos; Antifúngico; Biopreservação.

Abstract

Molds are the main agents that cause the deterioration of the cake, making it inappropriate for human consumption and reducing its commercial and nutritional value. Biopreservation techniques can improve the quality and safety of bakery products by inhibiting the fungi growth. Raw and roasted coffee oils have bioactive, antioxidant and antimicrobial properties, being an alternative to a partial or a total replacement of artificial preservatives. This study aimed to isolate the microorganisms of the muffin cake and evaluate the antifungal properties of these oils against isolated molds and determine the total phenolic compounds and evaluate the antioxidant capacity of the oils by the DPPH and FRAP methods. After isolating the cake's fungi culture, macroscopic and microscopic evaluations were performed. The molds were characterized as filamentous and belonging to the genus *Trichothecium sp.*, *Aspergillus sp.* and *Penicillium sp.* However, the oils did not show antifungal activity relative to the fungi isolated from the cake. Roasted coffee oil had a higher content of total phenolic compounds in relation to crude coffee oil (946.84 and 155.76 mg of gallic acid/100g of extract, respectively). For the antioxidant capacity by the DPPH method there was no difference between the oils and they were lower than in the FRAP method, which was more efficient. The oils tested do not have a potential antifungal effect, but roasted coffee oil has a higher antioxidant capacity than crude coffee oil by the FRAP method, corroborating the total phenolic concentration identified.

Keywords: Bakery; Fungi; Bioactive compounds; Antifungal; Biopreservation.

Resumen

Los mohos son los principales agentes que provocan el deterioro de la torta, haciéndola no apta para el consumo humano y reduciendo su valor comercial y nutricional. Las técnicas de bioconservación pueden mejorar la calidad y seguridad de los productos de panadería, inhibiendo el crecimiento de hongos deteriorantes. Los aceites de café crudo y tostado tienen propiedades bioactivas, antioxidantes y antimicrobianas, siendo una alternativa para reemplazar parcial o totalmente los conservantes artificiales. Este estudio tuvo como objetivo aislar los microorganismos de la torta tipo muffin y evaluar las propiedades antifúngicas de estos aceites contra hongos aislados, determinar el contenido de compuestos fenólicos totales y evaluar la capacidad antioxidante de los aceites por el método DPPH y FRAP. Después de aislar el cultivo de los hongos de la torta, se realizaron evaluaciones macroscópicas y microscópicas. Los hongos encontrados se caracterizaron como filamentosos y pertenecientes al género *Trichothecium sp.*, *Aspergillus sp.* y *Penicillium sp.* Sin embargo, los aceites no mostraron actividad antifúngica en relación con los hongos aislados de la torta. El aceite de café tostado tuvo un mayor contenido de compuestos fenólicos totales en relación al aceite de café crudo (946,84 y 155,76 mg de ácido gálico/100g de extracto, respectivamente). Para la capacidad antioxidante por el método DPPH no hubo diferencia entre los aceites y fueron inferiores que en el método FRAP, que fue más eficiente. Los aceites probados no tienen un potencial efecto antifúngico, pero el aceite de café tostado tiene una mayor capacidad antioxidante que el aceite de café crudo por el método FRAP, corroborando la concentración de fenolicos totales identificada.

Palabras clave: Panadería; Hongos; Compuestos bioactivos; Antifúngico; Biopreservación.

1. Introdução

Os fungos são os principais causadores da deterioração nos produtos de panificação, sendo a principal causa das perdas econômicas destes produtos. Além disso, podem causar danos à saúde dos consumidores devido aos metabólitos secundários tóxicos excretados pelos mesmos, tais como a citrinina, aflatoxina e requefortina (Ju et al., 2018). A contaminação fúngica dos alimentos torna-os impróprios para consumo humano, reduz o valor nutritivo e representa um perigo iminente para a saúde humana (Bound et al., 2016).

Recentemente, tem sido encontrado na literatura estudos da incorporação de compostos naturais em produtos de panificação, visando aumentar a vida de prateleira, fornecer nutrientes e compostos funcionais e melhorar as características sensoriais dos

produtos. Além disso, há uma crescente demanda por produtos seguros e naturais que viabilizem a utilização de técnicas de preservação, melhorando a qualidade e a segurança dos produtos para inibição do crescimento de fungos (Ju et al., 2018; Złotek, 2018).

Os óleos e os óleos essenciais de especiarias, ervas e os constituintes individuais têm crescentes aplicações na indústria de alimentos devido às atividades antifúngica, antitoxigênica e antioxidante (Domingues et al., 2020). Há interesse considerável na preservação de alimentos pelo uso de óleos essenciais e dos componentes presentes neste produto para retardar o crescimento de fungos, inibindo assim a produção de metabólitos secundários de proteção dos fungos, as micotoxinas. Tais isolados de plantas podem aumentar o prazo de validade, a qualidade e o valor nutricional dos produtos alimentares armazenados (Bound et al., 2016).

As substâncias presentes nos óleos de café, como ácidos clorogênicos (óleo de café cru) e os diterpenos (óleo de café torrado), apresentam efeito antimicrobiano e propriedades bioativas (Dogazaki et al., 2002; Spper & Kölling-Speer, 2006; Freiburger, 2013; Lima et al., 2020), reduzindo significativamente o crescimento micelial e a esporulação dos fungos *Penicillium roqueforti* e *Rhizopus stolonifer* (Elizei et al., 2016). Além disso, os óleos de café cru e torrado possuem capacidade antioxidante (pelos métodos: DPPH - *2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*; ORAC - *oxygen radical absorbance capacity*; FRAP - *ferric reducing antioxidant power*; ABTS - *2,2-azinobis(3-ethylbenzthiazoline)-6-sulfonic acid*; TEAC - *trolox equivalent antioxidant capacity*; TRAP - *total radical trapping antioxidant parameter*; AAPH - *2,2'-Azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride*; e TBARS - *thiobarbituric acid reactive substance*) e atividade antibacteriana frente as bactérias *Escherichia coli* e *Escherichia faecalis* (Yashin et al., 2013; Raba et al., 2015).

Diante das propriedades bioativas dos óleos de café cru e torrado e do interesse em usar isolados de plantas como biopreservantes naturais nos alimentos, este estudo propôs isolar e identificar o gênero dos fungos em bolo tipo muffin e verificar a ação antifúngica dos óleos de café cru e torrado frente aos fungos isolados do bolo e avaliar os compostos fenólicos e a capacidade antioxidante dos óleos de café.

2. Metodologia

2.1 Matéria-prima

As matérias-primas utilizadas para este estudo foram: farinha de trigo refinada

(tipo 1), gordura vegetal hidrogenada (100 % gordura), ovo in natura, água potável, sacarose, impulsionador de massa e emulsificante comercial (mistura de monoglicerídeos destilados, estearato de potássio, monoestearato de sorbitana e monoestearato de polioxietileno sorbitano). Todas as matérias-primas foram adquiridas no comércio local de Diamantina (MG). Os óleos de café cru e torrado (da marca Lazlo) foram adquiridos comercialmente através de empresa virtual por compra on-line. Os óleos de café cru e torrado foram isolados através de prensagem a frio e a composição química está apresentada na Tabela 1, de acordo com informações e laudos fornecidos pela empresa que comercializa os produtos.

Tabela 1. Composição química dos óleos de café cru e torrado.

Componente	Óleo de café cru (%)	Óleo de café torrado (%)
C12:0 – Ácido láurico	ni	0,5
C14:0 – Ácido mirístico	0,1	0,4
C16:0 – Ácido palmítico	32,8	32,1
C18:0 – Ácido esteárico	7,5	8,4
C18:1 – Ácido oleico	8,8	13,3
C18:2 – Ácido linoleico	43,3	39,7
C18:3 – Ácido linolênico	1,7	1,8
C20:0 – Ácido araquídico	3,0	ni
C22:0 – Ácido behênico	0,8	ni
Outros	2,1	3,8
Saturados	44,1	ni
Monoinsaturados	10,9	ni
Poli-insaturados	45,0	ni

Fonte: Laudos técnicos fornecidos pela empresa que comercializa os óleos essenciais. ni – não informado.

2.2 Elaboração dos bolos tipo muffin

Para a preparação dos bolos foi seguida a metodologia proposta por Bennion e colaboradores (2013), com modificações. O procedimento foi dividido em duas etapas, a fase creme e a fase massa. Na primeira fase (creme) foram homogeneizadas a gordura vegetal hidrogenada, a sacarose, o emulsificante e o ovo em uma batedeira planetária (Orbit Kitchen 600, Cadence[®]) na velocidade 6 por 3 minutos. Posteriormente, na segunda fase (massa),

foram adicionados os demais ingredientes, exceto o impulsionador de massa, e realizada a bateção na velocidade 3 por mais 2 minutos. Após, o impulsionador de massa foi adicionado e a incorporação ocorreu na velocidade 1 por mais 20 segundos. Porções de 50 g de massa do bolo tipo muffin foram distribuídas em formas de papel e inseridas dentro de recipientes de alumínio e levadas ao forno a 185 °C por 35 minutos. Na Tabela 2 estão apresentadas as quantidades dos ingredientes utilizados.

Tabela 2. Ingredientes e formulação do bolo tipo muffin.

Ingredientes	Quantidade dos ingredientes	
	% (em base farinha)	Gramas para batelada
Farinha de trigo	100,0	337,0
Gordura vegetal hidrogenada	40,0	134,8
Ovo in natura	50,0	168,5
Água potável	44,9	151,6
Sacarose	58,8	198,0
Impulsionador de massa	2,5	8,4
Emulsificante*	0,5	1,7

Fonte: Autores. *Emulsificante comercial composto por monoglicerídeos destilados, estearato de potássio, monoestearato de sorbitana e monoestearato de polioxietileno sorbitano.

2.3 Isolamento dos micro-organismos do bolo

O bolo foi acondicionado em embalagens de polietileno de baixa densidade e armazenado em local seco e arejado até o surgimento das colônias de fungos, as quais começaram a ser visíveis a olho nú no oitavo dia de armazenamento. Porém, esperou-se até o 13º dia para que houvesse maior crescimento e desenvolvimento dos bolores, e em seguida iniciou-se o isolamento dos fungos.

Posteriormente, a técnica de semeadura de fungo filamentosos em meio de cultura sólido foi utilizada para obter as culturas puras dos fungos. Para tal, os fungos presentes no bolo foram colocados em meio de batata-dextrose-ágar (BDA) sob condições assépticas a 28 °C por 2 a 5 dias até que as culturas fossem obtidas. Em seguida, os procedimentos foram repetidos com os fungos obtidos nas placas para garantir que a cultura pura fosse isolada (Ribeiro & Stelato, 2011; Ju et al., 2018).

2.4 Identificação macroscópica dos fungos isolados do bolo

As características macroscópicas observadas dos fungos isolados foram a coloração, o fundo, a pigmentação, a textura, a superfície, as bordas e a topografia. Após a observação dessas características, as mesmas foram comparadas com a literatura para uma prévia identificação dos fungos (Ribeiro & Stelato, 2011).

2.5 Identificação microscópica dos fungos isolados do bolo

Para a análise microscópica, inicialmente foi realizado o microcultivo dos fungos. Para tal procedimento, os micro-organismos foram inoculados sobre o meio e lateralmente, recobertos com a lamínula previamente esterilizada em autoclavada. Utilizou-se água destilada para embeber o papel filtro e evitar o ressecamento do meio de cultivo e favorecer as condições de crescimento dos fungos. Após inoculadas as placas, estas foram colocadas em estufa bacteriológica (30 °C), durante 3 dias para crescimento dos fungos e posterior observação das características morfológicas em microscópio óptico.

2.6 Análise antifúngica do óleo de café cru e torrado frente aos micro-organismos isolados do bolo

Para as análises antifúngicas dos óleos de café cru e torrado foi utilizado o método de difusão em disco em meio sólido de acordo com as normas do National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 2015). Os fungos que haviam sido isolados do bolo foram reativados em batata-dextrose-ágar a 28 °C e incubados até a existência de fungos filamentosos. Posteriormente, a concentração celular inicial dos fungos foi ajustada com solução salina estéril (10 %) de acordo com escala 0,5 de turbidez de MacFarland utilizando o espectrofotômetro a 580 nm, para obtenção de transmitância de 70 a 75 %, para padronização da população inicial dos fungos.

Em ambiente estéril, foi colocado o meio batata-dextrose-ágar nas placas de Petri e, após a secagem, as soluções fúngicas espalhadas no meio sólido. Os óleos de café cru e torrado foram diluídos em etanol e *tween* 80 nas seguintes concentrações: 200, 150, 100 e 50 µL/mL, respectivamente. Discos de papel de 8 mm de diâmetro foram imersos nas concentrações das amostras dos óleos e dos controles (apenas com os diluentes) e, posteriormente, foram posicionados sobre os meios que continham as soluções fúngicas

(depois da secagem). As placas foram incubadas em estufa por 5 dias a 28 °C. Durante o cultivo, as concentrações de óleo permeavam sobre o meio batata-dextrose-ágar. O diâmetro da zona de inibição foi medido e os ensaios foram realizados em triplicata, sendo que em cada placa foram colocados quatro discos, totalizando doze discos (NCCLS, 2015).

2.7 Determinação dos compostos fenólicos totais

O teor dos compostos fenólicos totais foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu segundo Swain e Hillis (1959), com adaptações. Os óleos de café cru e torrado foram diluídos em metanol (0,1 mg/mL) e reagente de Folin-Ciocalteu diluído em água destilada (1:10) (2,5 mL). Utilizou-se 0,5 mL da diluição e, após 5 minutos, adicionou-se solução aquosa de carbonato de sódio 7,5 % (2,0 mL). Para o desenvolvimento da reação química, os ensaios foram mantidos em repouso por duas horas em ambiente escuro e, posteriormente, foi realizada a leitura da absorbância a 740 nm em espectrofotômetro. O teor de compostos fenólicos foi determinado utilizando uma curva padrão de ácido gálico mg/mL ($R^2 = 0,999$). As análises foram realizadas em triplicata e os resultados expressos em mg de ácido gálico/g de extrato seco.

2.8 Capacidade antioxidante in vitro

2.8.1 Método de Captura do Radical Livre DPPH

A capacidade antioxidante pelo método DPPH foi realizada de acordo com Scherer e Godoy (2014), a qual consistiu na adição de alíquotas (0,1 mL) de extratos em 3,9 mL de solução metanólica de DPPH (0,1 mM). Agitou-se vigorosamente os tubos que, posteriormente, foram mantidos em ambiente escuro por 90 min. A absorbância dos ensaios foi quantificada em espectrofotômetro (517 nm) e o solvente metanol utilizado como branco. Todas as análises foram realizadas em triplicata. O índice de DPPH foi calculado através da equação 1:

$$I \% = [(Abs_0 - Abs_1)/Abs_0] \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

onde: Abs_0 e Abs_1 são as absorbâncias do branco e da amostra, respectivamente.

O IC₅₀ indica a concentração de extrato suficiente para atingir 50 % de inibição do radical livre DPPH e foi calculado utilizando a equação da reta obtida pela curva de calibração ($r = 0,912$), conforme apresentado na Equação 2, onde “b” é o intercepto do eixo y e “a” é a inclinação da reta.

$$IC_{50} = (50-b)/a \quad \text{Equação 2}$$

Os resultados do DPPH também foram expressos em relação ao índice de capacidade antioxidante (ICA) e calculado de acordo com a equação 3:

$$ICA = (\text{concentração final de DPPH } (\mu\text{g.mL}^{-1}) / IC_{50}(\mu\text{g.mL}^{-1})) \quad \text{Equação 3}$$

2.8.2 Método de Redução do Ferro – FRAP

A determinação da capacidade antioxidante pela redução do ferro foi realizada de acordo com Rufino et al. (2006), com adaptações. As amostras de óleos (20 μL) foram diluídas em tween 80 (20 μL) e acetato de etila (0,5 mL) e, em ambiente protegido da luz, foi adicionado 270 μL de água destilada e 2,7 mL do reagente FRAP (preparado com 50 mL de tampão acetato de sódio 0,3 M, 5 mL da solução TPTZ - 2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazina - 10 mM e 5 mL da solução de cloreto férrico 20 mM) às alíquotas (90 μL) das diluições de cada óleo de café. A mistura foi homogeneizada em vortex e mantida em banho maria (37 °C). Após 30 minutos de reação, realizou-se a leitura em espectrofotômetro a 595 nm. O reagente FRAP foi utilizado como controle. A capacidade antioxidante do FRAP foi calculada utilizando-se a equação da reta obtida por curva analítica ($R^2 = 0,931$) e os resultados expresso em μM sulfato ferroso/g de óleo. Todas as análises foram analisadas em triplicata.

2.9 Análise estatística

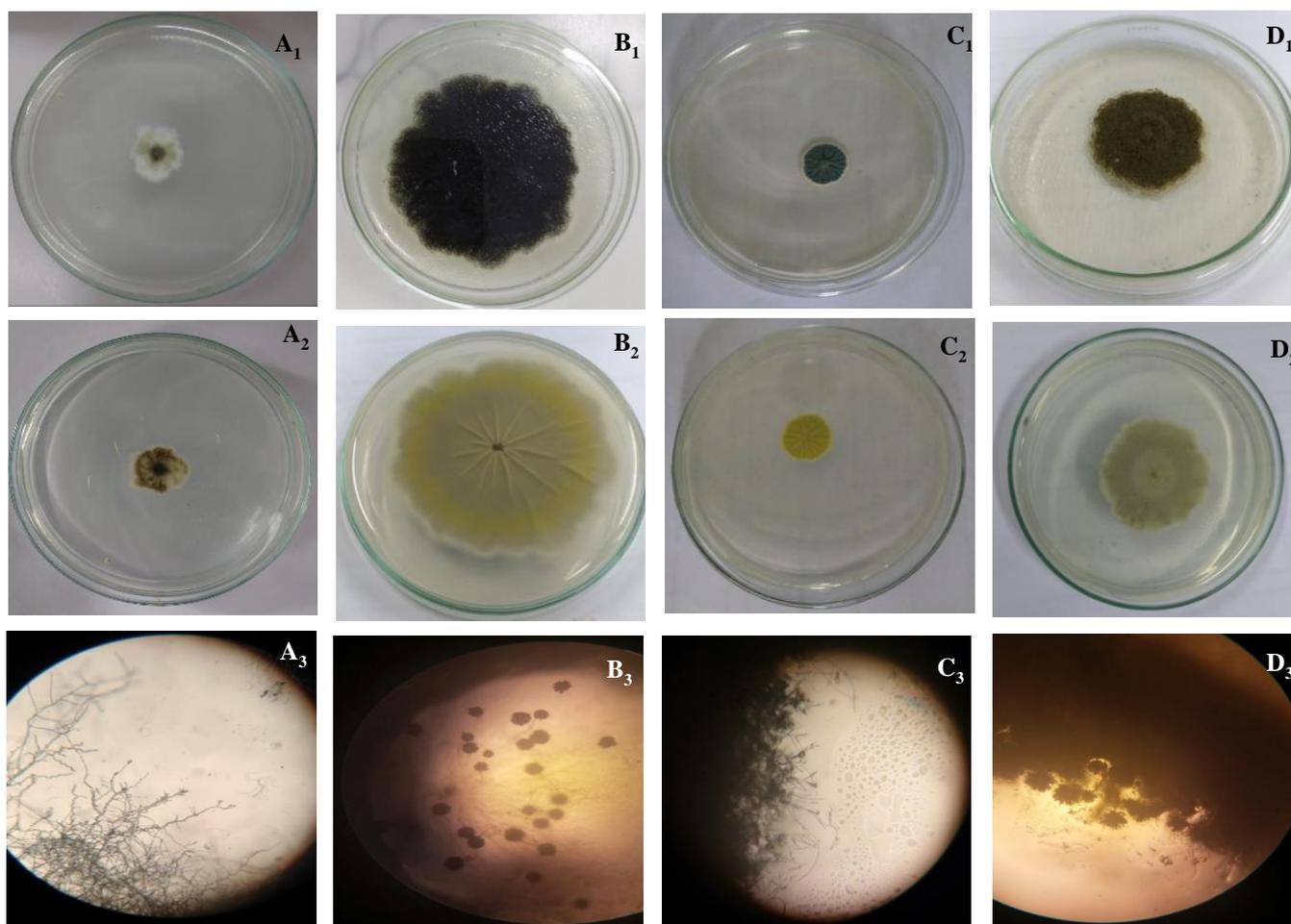
Os dados foram analisados através do teste *t-Student* com nível de confiança de 95 % ($p < 0,05$).

3. Resultados e Discussão

3.1 Isolamento e identificação dos micro-organismos do bolo

No bolo foram identificados quatro tipos de fungos diferentes (Figura 1). Após uma avaliação preliminar macroscópica (Tabela 3) e microscópica (imagens A3, B3, C3 e D3 da Figura 1), as características de cada fungo foram comparadas com a literatura (Silveira, 1968; Jay, 2005; Ribeiro & Stelato, 2011), sendo possível verificar que todos os fungos encontrados eram filamentosos e que as cepas pertencem ao gênero *Trichothecium*, *Aspergillus sp.* e *Penicillium sp.*

Figura 1. Morfologia das 4 colônias de fungos encontrados no bolo.



Fonte: Acervo dos autores. Legenda: A - *Trichothecium sp.*; B e D - *Aspergillus sp.*; C - *Penicillium sp.* Imagens da superfície frontal (A1, B1, C1, D1), traseira (A2, B2, C2, D2) e foto microscópica aumentada 100 vezes (A3, B3, C3, D3).

O *Trichothecium* (Figura 1A) é um gênero comum de fungo com diversas aplicações

econômicas, podendo ser aplicado na agricultura, indústria de alimentos, controle biológico e medicinal. Os compostos secundários produzidos por este grupo de fungos geralmente não são tóxicos aos humanos e, alguns destes, possuem potencial para inibir fungos patogênicos aos humanos (Balasubramanian et al., 2003).

Algumas espécies de *Aspergillus sp.* (Figura 1B e 1D) estão presentes na deterioração de alimentos (Vecchia & Castilhos-Fortes, 2007) podendo aparecer na coloração amarela, verde e negra, de acordo com o tipo de alimento (Jay, 2005). O fungo se desenvolve na presença de elevadas concentrações de açúcar (osmofílico) e sal (halófilo), indicando a possibilidade de extrair água de substância com baixa atividade de água (Tortora et al., 2017). A colônia do *Aspergillus sp.* possui aparência aveludada ou cotonosa ou granulosa. Inicialmente de coloração branca, podendo se tornar amarela, verde, marrom ou negra. O lado reverso da colônia pode ser branco, amarelo ou marrom (Ribeiro & Stelato, 2011).

A colônia de *Penicilium sp.* (Figura 1C) possui coloração inicial branca, podendo se tornar verde acinzentada, com extremidades brancas e aspecto pulverizado durante o cultivo (Ribeiro & Stelato, 2011). Algumas espécies causam a deterioração de frutas, vegetais, conservas e grãos (Tortora et al., 2017). Também podem produzir citrina, toxina do arroz amarelo e micotoxinas (Jay, 2005).

Tabela 3. Identificação macroscópica dos fungos isolados do bolo tipo muffin.

Fungos	A	B	C	D
Cor visual	Branca	Preta	Verde acinzentada/ bordas brancas	Verde/bordas brancas
Aspecto	Seco	Seco	Seco	Seco
Topografia	Plana	Plana	Convexa	Convexa
Borda	Irregular	Dentada	Regular	Dentada
Superfície	Rugosa	Fissurada	Fissurada	Lisa
Textura	Cotonosa	Pulverizada	Camurça	Pulverizada
Tamanho	Pontual	Grande	Pontual	Médio
Pigmentação (fundo da placa)	Ausente	Esverdeada	Amarela	Ausente

Legenda: A - *Trichothecium sp.*; B e D - *Aspergillus sp.*; C - *Penicillium sp.* Fonte: Autores.

O estudo de Ju et al. (2018) corrobora com alguns fungos encontrados neste trabalho,

pois os autores isolaram os micro-organismos do bolo e encontraram fungos da linhagem *Penicillium spp.* e *Aspergillus sp.* Além disso, no trabalho de Souza e colaboradores (2004), os autores descrevem *Rhizopus spp.*, *Penicillium spp.*, *Eurotium repens* e *Aspergillus niger*, como fungos que foram isolados de produto de panificação.

3.2 Efeito antifúngico dos óleos de café torrado e cru

De acordo com o NCCLS (2015), a resposta do micro-organismo em relação ao efeito antimicrobiano do composto testado sobre o mesmo poderá ser resistente, de resistência intermediária ou de sensibilidade verificado pelo tamanho do halo de inibição. Os parâmetros para verificar o efeito antimicrobiano de um composto estão dispostos na Tabela 4.

Tabela 4. Classificação do micro-organismo em relação ao composto antimicrobiano testado.

Resistente	Intermediário	Sensível
≤ 12 mm de halo de inibição	13 – 14 mm de halo de inibição	≥ 15 mm de halo de inibição

Fonte: Adaptado de: NCCLS (2015).

Para o teste de difusão em batata-dextrose-ágar, os óleos de café cru e torrado não inibiram o crescimento dos fungos do gênero *Trichothecium sp.*, *Aspergillus sp.* e *Penicillium sp.*, em nenhuma das concentrações utilizadas. As placas que continham óleo de café apresentaram crescimento de fungo igual ou superior ao controle. Esse fato pode ter ocorrido devido aos óleos de café serem compostos por grande quantidade de triacilgliceróis (Speer & Kölling-Speer, 2006; Cornelio-Santiago et al., 2017), de acordo com o apresentado na Tabela 1. O trabalho de Luginbuehl et al. (2017) demonstrou que, além dos açúcares, os lipídeos são uma importante fonte de carbono orgânico biodisponíveis aos fungos. De acordo com Mehta, Bodh e Gupta (2017), os micro-organismos produzem alta quantidade de lipases. Estes autores ainda citam que dentre os fungos filamentosos que possuem capacidade de produzir lipase estão o *Penicillium sp.* e *Aspergillus sp.*, e tais lipases são capazes de hidrolisar os triacilgliceróis, além de catalisar uma variedade de reações químicas que incluem esterificação, transesterificação, acidólise e aminólise.

Dados da literatura demonstraram a atividade antibacteriana dos óleos de café cru e torrado, principalmente ao fato do primeiro composto conter ácido clorogênico e o segundo, diterpenos (Almeida et al., 2006; Araujo, 2014; Stefanello et al., 2019). Mas para fungos, há

poucos estudos de atividade antifúngica dos óleos de café e a maioria dos resultados são de baixa atividade. Como as estruturas da parede celular das bactérias e dos fungos são diferentes, acredita-se que a inibição do crescimento bacteriano pelos óleos de café cru e torrado seja mais eficiente que para inibição fúngica.

A literatura reporta que as bactérias contêm peptidoglicanos em sua parede celular, a qual possui como principal função, conferir rigidez estrutural à parede da célula bacteriana e constituir uma barreira física contra o ambiente externo, além de servir de suporte para outros componentes (Vollmer et al., 2008). Para ter acesso à célula bacteriana, os antibióticos passam pelas porinas (proteínas das membranas), as quais possuem no interior, características hidrofílicas (Guimarães et al., 2010). Entretanto, os fungos possuem quitina presente nas paredes celulares, que é um polímero de carboidrato (N-acetilglicosamina) de alta massa molar e que proporciona rigidez e suporte estrutural à parede celular dos mesmos (Gow & Yadav, 2017). Desta forma, infere-se que os óleos essenciais possuem melhor atividade antifúngica que os óleos de café cru e torrado, pois estes apresentam natureza lipofílica maior quando comparados aos óleos essenciais obtidos de fontes vegetais.

Entre os principais mecanismos de ação de compostos naturais sobre os microorganismos, tem-se: (i) desintegrar a membrana citoplasmática e (ii) desestabilizar a força próton motriz, o fluxo de elétrons, o transporte ativo e a coagulação do conteúdo da célula. Não são todos os mecanismos de ação que agem em alvos específicos, alguns sítios podem ser afetados em consequência de outros mecanismos (Burt, 2004; Araújo, 2014). Em relação a ação antimicrobiana dos óleos essenciais, uma característica relevante são os componentes hidrofóbicos que permitem a ruptura dos lipídeos da membrana celular bacteriana, causando a desintegração das estruturas e tornando-as mais permeável (Bagheri et al., 2020; Bora et al., 2020; Kringel et al., 2020).

3.3 Compostos fenólicos totais

Como pode ser observado na Tabela 5, o resultado dos compostos fenólicos totais para o óleo de café cru foi de 155,76 mg de ácido gálico/100 g de extrato e para o óleo de café torrado foi de 946,84 mg de ácido gálico/100 g de extrato, diferindo estatisticamente ($p < 0,05$). Pelos resultados encontrados foi possível inferir que os óleos de café possuem uma quantidade significativa de compostos fenólicos. Para o óleo de café torrado, o valor encontrado de compostos fenólicos foi bem mais elevado que para o óleo de café cru. Esse fato pode ser atribuído ao processo de torrefação que afeta os compostos fenólicos através da

reação de *Maillard*. Tais compostos são formados pela degradação térmica de carboidratos, ácido clorogênico e ligninas, dessa forma, tanto o tempo como a temperatura de torrefação dos grãos de café interferem na composição e no fenol formado (Wong, 2018; Araújo, 2019).

Tabela 5. Concentração de compostos fenólicos nos óleos de café cru e torrado.

Óleos	Compostos fenólicos totais (mg de ácido gálico/100 g de extrato)
Café cru	155,76 ± 3,94
Café torrado	946,84 ± 24,96

Fonte: Autores. Valores expressos pela média ± desvio padrão (n=3). Dados analisados pelo teste *t-Student* (p<0,05).

Para determinar os compostos fenólicos totais utilizou-se o reagente de Folin – Ciocalteu, que mede a capacidade de um composto ou mistura de compostos em reduzir o ácido fosfomolibídico e fosfotúngstico a um complexo de coloração azul (Ainsworth & Gillespie, 2007). Porém, podem haver compostos que não são considerados fenólicos como os hidratos de carbono, aminas aromáticas, ácido ascórbico, entre outros, os quais se degradam facilmente e podem resultar na formação de complexos azuis, ocasionando valor excessivo no resultado de fenólicos totais (Huang et al., 2005).

Além disso, o solvente de extração utilizado para extrair os fenólicos totais possui forte influência sobre a determinação do mesmo, pelo fato da polaridade do solvente interferir nos tipos de compostos extraídos (Parry et al., 2005). Desta forma, pode ser que os valores estão levemente superestimados. Com certeza uma análise mais refinada e de maior precisão, como a análise cromatográfica poderia elucidar melhor este resultado.

3.4 Capacidade antioxidante

A capacidade antioxidante do café tem relação direta com a presença de compostos fenólicos, principalmente pelos ácidos clorogênicos. Os resultados do DPPH foram expressos em IC₅₀ e o índice de capacidade antioxidante (ICA). O IC₅₀ (mg ácido gálico/g de óleo) é a quantidade de amostra necessária que consegue sequestrar 50 % do radical livre DPPH. Portanto, valores altos desse parâmetro indicam menor capacidade antioxidante. Conforme demonstrado na Tabela 6, os óleos de café cru e torrado não obtiveram diferença significativa para o IC₅₀. A capacidade antioxidante total tem relação direta com o sequestro do radical livre no caso do DPPH e por inibir a oxirredução, no caso do FRAP (Yashin et al., 2013).

Para o método DPPH não houve diferença significativa entre os óleos. Enquanto para o método de redução do ferro (FRAP), o óleo de café torrado apresentou maior poder e redução do ferro, ou seja, maior capacidade antioxidante, com diferença estatística.

Tabela 6. Valores de IC₅₀ pelo método DPPH e de índice de capacidade antioxidante total pelo método DPPH e FRAP dos óleos de café.

Amostras	Método		
	DPPH		FRAP
	IC ₅₀ (mg/g de óleo)	ICA (mg/g de óleo)	(μ M sulfato ferroso/g óleo)
Óleo de café cru	4,54 \pm 0,11 ^{ns}	8,86 \pm 0,25 ^{ns}	63,45 \pm 1,54
Óleo de café torrado	2,82 \pm 0,14 ^{ns}	12,44 \pm 0,46 ^{ns}	198,97 \pm 1,41

Fonte: Autores. Valores correspondentes à média \pm desvio padrão (n=3). Dados analisados pelo teste *t-Student* (p<0,05). ns = não significativo. Legenda; IC₅₀ – Concentração Inibitória; ICA – Índice de Capacidade Antioxidante; DPPH - 2,2-Difenil-1-Picril-Hidrazil; FRAP - Ferric Reducing Antioxidant Power.

O método FRAP apresentou diferença significativa entre os óleos analisados, pois apresenta maior correlação com compostos fenólicos e vitamina C do que com outros antioxidantes, por exemplo. Em estudo da capacidade antioxidante total de extratos obtidos de frutos de goiaba, pelos métodos ABTS, DPPH, FRAP e ORAC, foi verificado que o FRAP foi a técnica mais reprodutível e aquela que apresentou uma elevada correlação com os teores de ácido ascórbico e grupos fenólicos (Thaipong et al., 2006). O que corrobora com os resultados obtidos neste estudo, pois a análise do método pelo FRAP, apresentou coerência com a análise dos compostos fenólicos obtidas no item anterior. Ou seja, maior capacidade antioxidante do óleo de café torrado em relação ao óleo do café cru.

Além disso, outros métodos podem ser mais sensíveis a alguns compostos específicos, por exemplo, a ação do método FRAP, é baseada na redução do ferro, diferente do método de DPPH que é baseado na captura do radical orgânico (Kuskoski et al., 2005). Assim, pode ter ocorrido significância pelo método FRAP e não ter tido significância pelo método DPPH para os óleos de café, devido à natureza lipofílica dos óleos.

Com base nos resultados obtidos é possível inferir que o óleo de café torrado possui maior capacidade antioxidante. Esse fato pode ser atribuído aos compostos gerados no processo de torrefação, como os produtos secundários da reação de *Maillard*, principalmente as melanoidinas (embora possuem algumas propriedades indesejáveis à saúde do consumidor), que apresentam capacidade antioxidante com efeitos fisiológicos positivos, por

possuam grupamentos estruturais como redutonas, enaminas e pirrolequinas que concedem à molécula forte poder sequestrante de espécies reativas de oxigênio (como por exemplo, os radicais hidroxila, peroxila e ânions superóxidos) (Hayase, 1996; Borrelli et al., 2002).

Além disso, outro composto encontrado no café que possui capacidade antioxidante é a cafeína, a qual é termoestável e não é afetada significativamente durante o processo de torrefação. Estudos demonstraram que o café descafeinado possui menor potencial antioxidante que o café normal, metabólitos da cafeína como metilxantina e 1-metilurato, exibiram capacidade antioxidante *in vitro* (Shi et al., 1991; Farah et al., 2005). Além disso, a capacidade antioxidante dos óleos de café possivelmente é inferior à do café. De acordo com esta informação, Affonso et al. (2016) verificaram que o conteúdo de fenólicos fica retido na biomassa residual do café, não sendo extraídos com o método de prensagem a frio para a fração óleo, resultando em baixo valor de fenólicos do óleo e, conseqüentemente, menor capacidade antioxidante.

4. Considerações Finais

A partir do isolamento dos fungos do bolo tipo muffin foram encontrados três gêneros diferentes de fungos: *Trichothecium sp.*, *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.* Os óleos de café cru e torrado não apresentaram efeito antifúngico contra os fungos isolados do bolo tipo muffin na análise *in vitro*. Esse fato pode ter ocorrido devido aos óleos de café possuírem de forma majoritária os triacilglicerídeos em sua composição, que podem ter apresentado a função de substrato para os micro-organismos. Os óleos de café possuem concentrações expressivas de compostos fenólicos, destacando-se o óleo de café torrado que apresentou concentração superior em relação ao óleo de café cru. Através dos métodos antioxidantes testados DPPH e FRAP, foi possível verificar que os óleos de café possuem capacidade antioxidante, dando ênfase ao óleo de café torrado que foi mais eficiente para o método FRAP.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri e ao Instituto de Ciência e Tecnologia pelo suporte institucional e à Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior pelo suporte financeiro (código de financiamento 001) e pela bolsa de estudos de S. J. M. Silva (protocolo 23038.014292/2018-73).

Referências

Affonso, R. C. L., Voytena, A. P. L., Fanan, S., Pitz, H., Coelho, D. S., Horstmann, A. L., Pereira, A., Uarrota, V. G., Hillmann, M. C., Varela, L. A. C., Ribeiro-do-Valle, R. M., & Maraschin, M. (2016). Phytochemical composition, antioxidant activity, and the effect of the aqueous extract of coffee (*Coffea arabica* L.) bean residual press cake on the skin wound healing. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 1923754. <https://doi.org/10.1155/2016/1923754>.

Ainsworth, E. A., & Gillespie, K. M. (2007). Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plants tissues using Folin-Ciocalteu reagent. *Nature Protocols*, 2, 875-877. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.102>.

Almeida, A. A. P., Farah, A., Silva, D. A. M., Nunan, E. A., & Glória, M. B. A. (2006). Antibacterial activity of coffee extracts and selected coffee chemical compounds against enterobacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 8738-8743. <https://doi.org/10.1021/jf0617317>.

Araújo, G. M. (2014). *Avaliação da atividade anti-Helicobacter pylori e citotóxica in vitro de extratos orgânicos obtidos das folhas de Encholirium spectabile e Syzygium cumini*. Dissertação, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, Brasil.

Araújo, J. M. A. (2019). *Química de Alimentos – Teoria e Prática* (7a ed). Viçosa: UFV.

Bagheri, L., Khodaei, N., Salmieri, S., Karboune, S., & Lacroix, M. (2020). Correlation between chemical composition and antimicrobial properties of essential oils against most common food pathogens and spoilers: In-vitro efficacy and predictive modelling. *Microbial Pathogenesis*, 2020, 104212. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104212>.

Balasubramanian, N., Juliet, G. A., Srikalaivani, P., & Lalithakumari, D. (2003). Release and regeneration of protoplasts from the fungus *Trichothecium roseum*. *Canadian Journal of Microbiology*, 49, 263-268. <https://doi.org/10.1139/w03-034>.

Bennion, E. B. B., Bamford, G. S. T. S. T., & Benin. E. B. G. S. (2013). *The technology of cake making* (6a ed). Bristol: Springer.

Bora, H., Kamle, M., Mahato, D. K., Tiwari, P., & Kumar, P. (2020). Citrus essential oils (CEOs) and their applications in food: An overview. *Plants*, 9, 357. <https://doi.org/10.3390/plants9030357>.

Borrelli, R. C., Visconti, A., Mennella, C., Anese, M., & Fogliano, V. (2002). Chemical characterization and antioxidant properties of coffee melanoidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 6527–6533. <https://doi.org/10.1021/jf025686o>.

Bound, D. J., Murthy, P. S., & Srinivas, P. (2016). 2, 3-Dideoxyglucosides of selected terpene phenols and alcohols as potent antifungal compounds. *Food Chemistry*, 210, 371-380. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.04.127>.

Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94, 223-253. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022>.

Cornelio-Santiago, H. P., Gonçalves, C. B., Oliveira, N. A., & Oliveira, A. L. (2017). Supercritical CO₂ extraction of oil from green coffee beans: Solubility, triacylglycerol composition, thermophysical properties and thermodynamic modelling. *The Journal of Supercritical Fluids*, 128, 386-394. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2017.05.030>.

Dogazaki, C., Shindo, T., Furuhashi, K., & Fukuyama, M. (2002). Identification of chemical structure of antibacterial components against *Legionella pneumophila* in a coffee beverage. *The Pharmaceutical Society of Japan*, 122, 487-494. <https://doi.org/10.1248/yakushi.122.487>.

Domingues, S. C. O., Matos, D. L., Carvalho, M. A. C., Rabelo, H. O., Yamashita, O. M., & Karsburg, I. V. (2020). Antifungal activity of plant extracts in *Rhizoctonia* sp. orchid isolated. *Research, Society and Development*, 9, e392985423. <https://doi.org/10.33448/rsd-v9i8.5423>

Elizei, V. G., Chalfoun, S. M., Botelho, D. M. S., & Rebelles, P. P. R. (2016). Antifungal activity, in vitro, of the green coffee oil. *Arquivos do Instituto Biológico*, 83, 1-7. <https://doi.org/10.1590/1808-1657001162013>.

Farah, A., Paulis, T., Trugo, L. C., & Martin, P. R. (2005). Effect of roasting on the formation of chlorogenic acid lactones in coffee. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1505–1513. <https://doi.org/10.1021/jf048701t>.

Freiberger, E. B. (2013). *Nanocápsulas de poli(L-ácido láctico) contendo óleo de café torrado*. Dissertação, Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, Departamento Acadêmico de Alimentos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, Brasil.

Gow, N. A., & Yadav, B. (2017). Microbe Profile: *Candida albicans*: a shape-changing, opportunistic pathogenic fungus of humans. *Microbiology*, 163, 1145-1147. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000499>.

Guimarães, D. O., Momesso, L. S., & Pupo, M. (2010). Antibiotics: therapeutic importance and perspectives for the discovery and development of new agents. *Química Nova*, 33, 667-679. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422010000300035>.

Hayase, F. (1996). Scavenging of active oxygen by melanoidins. In I. Raphael (ed.), *The Maillard Reaction Consequences for the Chemical and Life Sciences* (pp89-104). Oxford: John Wiley & Sons.

Huang, D., Ou, B., & Prior, R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1841-1856. <https://doi.org/10.1021/jf030723c>.

Jay, J. M. (2005). *Microbiologia de alimentos* (6a ed). Porto Alegre: Artmed.

Ju, J., Xu, X., Xie, Y., Guo, Y., Cheng, Y., Qian, H., & Yao, W. (2018). Inhibitory effects of cinnamon and clove essential oils on mold growth on baked foods. *Food Chemistry*, 240, 850-855. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.07.120>.

Kringel, D. H., Silva, W. M. F., Biduski, B., Waller, S. B., Lim, L-T., Dias, A. R. G., & Zavareze, A. R. (2020). Free and encapsulated orange essential oil into a β -cyclodextrin inclusion complex and zein to delay fungal spoilage in cakes. *Journal of Food Processing and Preservation*, 44, e14411. <https://doi.org/10.1111/jfpp.14411>.

Kuskoski, E. M., Asuero, A. G., Troncoso, A. M., Mancini-Filho, J., & Fett, R. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Food Science and Technology*, 25, 726-732. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612005000400016>.

Lima, C. M., Pagnossa, J. P., Lago, R. C., Neves, I. C. O., Oliveira, A. C. S., Verruck, S., Seraglio, S. K. T., Piccoli, R. H., Carvalho, E. E. N., Minim, L. A., Rocha, R. A., Botrel, D. A., & Pereira, R. G. F. A. (2020). Functional and technological potential of arabica coffee oils. *Research, Society and Development*, 9, e700997702. <https://doi.org/10.33448/rsd-v9i9.7702>.

Luginbuehl, L. H., Menard, G. N., Kurup, S., Erp, H. V., Radhakrishnan, G. V., Breakspear, A., Oldroyd, G. E. D., & Eastmond, P. J. (2017). Fatty acids in arbuscular mycorrhizal fungi are synthesized by the host plant. *Science*, 356, 1175-1178. <https://doi.org/10.1126/science.aan0081>.

Mehta, A., Bodh, U., & Gupta, R. (2017). Fungal lipases: a review. *Journal of Biotech Research*, 8, 58-77. Disponível em: <http://www.btsjournals.com/assets/2017v8p58-77.pdf>. Acesso em Out 24, 2020.

NCCLS. (2015). National Committee for clinical laboratory standards. *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, approved standard* (10th ed). Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute.

Parry, J., Su, L., Luther, M., Zhou, K., Yurawecz, M. P., Whittaker, P., & Yu, L. (2005). Fatty acid composition and antioxidant properties of cold-pressed marionberry, boysenberry, red raspberry, and blueberry seed oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 566-573. <https://doi.org/10.1021/jf048615t>.

Raba, D. N., Poiana, M-A., Borozan, A. B., Stef, M., Radu, F., & Popa, M-V. (2015). Investigation on crude and high-temperature heated coffee oil by ATR-FTIR spectroscopy along with antioxidant and antimicrobial properties. *PloS One*, *10*, e0138080. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138080>.

Ribeiro, M. C., & Stelato, M. M. (2011). *Microbiologia prática: aplicações de aprendizagem de microbiologia básica: bactérias, fungos e vírus* (2a ed). São Paulo: Atheneu.

Rufino, M. S. M., Alves, R. E., Brito, E. S., Morais, S. M., Sampaio, C. G., Pérez-Jiménez, J., & Saura-Calixto, F. D. (2006). *Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pelo método de redução do ferro (FRAP)*. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical-Comunicado Técnico. Recuperado de <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPAT-2010/11964/1/cot-125.pdf>.

Scherer, R., & Godoy, H. T. (2014). Effects of extraction methods of phenolic compounds from *Xanthium strumarium* L. and their antioxidant activity. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, *16*, 41–46. <https://doi.org/10.1590/S1516-05722014000100006>.

Shi, X., Dalal, N. S., & Jain, A. C. (1991). Antioxidant behaviour of caffeine: efficient scavenging of hydroxyl radicals. *Food and Chemical Toxicology*, *29*, 1-6. [https://doi.org/10.1016/0278-6915\(91\)90056-D](https://doi.org/10.1016/0278-6915(91)90056-D).

Silveira, V. D. (1968). *Lições de micologia* (3a ed). Rio de Janeiro: José Olympio.

Souza, S. M. C., Pereira, M. C., Angélico, C. L., & Pimenta, C. J. (2004). Avaliação de óleos essenciais de condimentos sobre o desenvolvimento micelial de fungos associados a produtos de panificação. *Ciência e Agrotecnologia*, *28*, 685-690. <https://doi.org/10.1590/S1413-70542004000300027>.

Speer, K., & Kölling-Speer, I. (2006). The lipid fraction of the coffee bean. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, *18*, 201-216. <https://doi.org/10.1590/S1677-04202006000100014>.

Stefanello, N., Spanevello, R. M., Passamonti, S., Porciúncula, L., Bonan, C. D., Olabiyi, A. A., Rocha, J. B. T., Assmann, C. E., Morsch, V. M., & Schetinger, M. R. C. (2019). Coffee, caffeine, chlorogenic acid, and the purinergic system. *Food and Chemical Toxicology*, *123*, 298-313. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.10.005>.

Swain, T., & Hillis, W. E. (1959). The phenolics constituents of prumus domestica: the quantitative analysis of phenolic constituents. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *10*, 63-68. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740100110>.

Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L., & Byrnc, D. H. (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, *19*, 669-675. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2006.01.003>.

Tortora, G. J., Funke, B. R., & Case, C. L. (2017). *Microbiologia* (12a ed). Porto Alegre: Artmed.

Vecchia, A. D., & Castilhos-Fortes, R. (2007). Contaminação fúngica em granola comercial. *Food Science and Technology*, *27*, 324-327. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612007000200020>.

Vollmer, W., Blanot, D., & Pedro, M. A. (2008). Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiology Reviews*, *32*, 149-167. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00094.x>.

Wong, S. W. D. (2018). *Mechanism and theory in food chemistry* (2a ed.). California: Springer Internacional Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-50766-8>.

Yashin, A., Yashin, Y., Wang, J. Y., & Nemzer, B. (2013). Antioxidant and antiradical activity of coffee. *Antioxidants*, *2*, 230-245. <https://doi.org/10.3390/antiox2040230>.

Złotek, U. (2018). Antioxidative, potentially anti-inflammatory, and antidiabetic properties, as well as oxidative stability and acceptability, of cakes supplemented with elicited basil. *Food Chemistry*, *243*, 168-174. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.09.129>.

Porcentagem de contribuição de cada autor no manuscrito

Sandra Júnia Monteiro Silva – 25 %

Paula Villela Dessimoni Spencer – 25 %

Nísia Andrade Villela Dessimoni Pinto – 25 %

Marcio Schmiele – 25 %