

INFLUÊNCIA DA REMOÇÃO DA GORDURA NA QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO CHOCOLATE

Valterney Lima Deus^{1,3}; Eliete da Silva Bispo²; Adriana Silva França³; Maria Beatriz Abreu Gloria¹

¹Laboratório de Bioquímica de Alimentos-LBqA, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil

²Departamento de Análises Bromatológicas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brasil

³Laboratório de Excelência em Aproveitamento Sustentável de Resíduos Sólidos, Escola de Engenharia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil

*Autor para correspondências: neideus@hotmail.com

RESUMO

As análises para identificação e quantificação dos compostos bioativos do chocolate, de maneira geral, são realizadas após o pré-tratamento das amostras em que se retira a gordura antes da utilização do solvente polar. Nesse trabalho, objetivou-se avaliar a perda dos compostos fenólicos e das amins bioativas no processo de remoção da gorduramento do chocolate e a sua consequência na atividade antioxidante. As amins bioativas livres foram avaliadas por cromatografia líquida de alta pressão, os compostos fenólicos por Folin-Ciocalteu e a atividade antioxidante pelos métodos do DPPH e íon fosfomolibdênio. Foram identificadas no chocolate as amins espermidina, putrescina, triptamina, tiramina, feniletilamina. Verificou-se que durante a remoção da gordura houve perda significativa da triptamina resultando em $1,21 \pm 0,20$ e $0,58 \pm 0,03$ mg/kg nos chocolates com e sem gordura, respectivamente, sendo encontrado na gordura do chocolate $0,74 \pm 0,05$ mg/kg de triptamina. A atividade antioxidante encontrada no chocolate e na gordura retirada do chocolate não foi diretamente proporcional ao teor de compostos fenólicos, sugerindo que a triptamina pode ser também responsável pela atividade antioxidante do chocolate.

Palavras-chave: fenólicos; *Theobroma cacao*; gordura; desengorduramento; DPPH; triptamina

1. INTRODUÇÃO

Chocolate é o produto obtido a partir da mistura de derivados de cacau (*Theobroma cacao* L.), massa (ou pasta ou liquor) de cacau, cacau em pó e ou manteiga de cacau, com outros ingredientes, contendo, no mínimo, 25% (g/100 g) de sólidos totais de cacau (Brasil, 2005). O processo tradicional de fabricação envolve as seguintes etapas: mistura dos ingredientes, refino, conchagem, temperagem, moldagem, resfriamento, desmoldagem e embalagem (Beckett, 2009). Ao chocolate têm sido atribuídas diversas propriedades nutricionais e funcionais relevantes, dentre elas, o fornecimento de lípidos, açúcares, energia, minerais (potássio, magnésio, cobre e ferro) e antioxidantes, principalmente os polifenóis (Borchers et al., 2000; Kim et al., 2014). No entanto, é importante reconhecer que o chocolate é rico em muitos outros compostos bioativos com atividade antixidante, incluindo as amins bioativas.

Os polifenóis são nutrientes presentes nas plantas e na nossa dieta, sendo o chocolate uma boa fonte. Estas substâncias são metabólitos secundários das plantas e estão envolvidas na prevenção de várias doenças associadas com o estresse oxidativo, como câncer, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas (Genovese & Lannes, 2009).

As amins bioativas são compostos orgânicos nitrogenados de baixo peso molecular, envolvidos em diversas atividades funcionais benéficas à saúde humana. Dentre estas, as poliaminas atuam no crescimento e metabolismo celular, apresentam atividade antioxidante, e são importantes na maturação e recuperação da

mucosa intestinal, mediam a ação de hormônios e fatores de crescimento, estando envolvidas na síntese de DNA, RNA e proteínas (Santiago-Silva et al., 2011; Bandeira et al., 2012). Outras amins presentes no chocolate também possuem atividade antioxidante como a triptamina e seus derivados (Neganova et al., 2010; Estevão et al., 2011), tendo sido descrito um mecanismo de ação das triptaminas na presença de espécies reativas de oxigênio em que há formação de um composto halogenado mais estável (Carvalho et al., 2010). Outras amins têm atividades vasoativas e neuroativas, dentre elas, a feniletilamina e a triptamina são moduladoras do humor. Entretanto, as amins bioativas podem causar efeitos adversos à saúde humana quando ingeridas em concentrações elevadas ou quando o indivíduo apresenta alguma enfermidade ou deficiência genética (Santiago-Silva et al., 2011; Oliveira et al., 2012). Segundo EFSA (2011), efeitos adversos à saúde têm sido atribuídos à histamina e tiramina, sendo os estudos sobre outras amins limitados,

Como na maioria dos estudos realizados com chocolate, a determinação da atividade antioxidante é realizada em extratos que passaram por processo de remoção de gordura, o objetivo do presente estudo foi investigar a influência da remoção da gordura do chocolate na quantificação das amins bioativas, compostos fenólicos e atividade antioxidante do chocolate produzido com cacau do sul da Bahia, região com destaque na produção de cacau do Brasil.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostras

Foi utilizado, para a fabricação do chocolate, o cacau (*Theobroma cacao* L.) da variedade PH16 (híbrido de Forastero Amazônico e Trinitário). Foram escolhidos frutos saudáveis e maduros de uma fazenda no sul da Bahia, Brasil (14°41'96 "S e 39°12'109" W) de clima tropical. Foram produzidos três lotes de chocolates em indústria localizada na região e foram submetidos ao mesmo processamento. As amostras de chocolate com alto teor de cacau foram produzidas segundo a formulação: massa de cacau (66,0%), manteiga de cacau (4,0%), açúcar (29,60%) e lecitina (0,4%). Os chocolates foram mantidos sob refrigeração e todas as amostras foram analisadas em triplicata.

2.2 Delineamento experimental

Foi feita a remoção de gordura das amostras com uso de solventes e as amostras de chocolate com e sem gordura e a gordura extraída foram analisadas quanto aos teores de amins bioativas livres e de fenólicos totais e com relação à atividade antioxidante. Para extração da gordura, dez gramas de chocolate triturado foram desengordurados com éter de petróleo, sob agitador rotativo durante 30 minutos, centrifugadas e o sobrenadante removido. Este processo foi repetido por mais duas vezes (Leite et al., 2013). O solvente foi removido da gordura com nitrogênio.

2.3 Métodos de análise

2.3.1 Preparo dos extratos

Os extratos foram obtidos a partir da massa de cacau e da gordura (5 g) com 7 mL de ácido tricloroacético (TCA) 5%, misturados em agitador durante 5 min, seguido de centrifugação a 11180xg, a 4 °C durante 10 min (Brito et al., 2017). A extração foi repetida duas vezes e os sobrenadantes foram combinados em balão volumétrico e filtrados em papel de filtro e em membrana de 0,45 µm.

2.3.2 Determinação das amins bioativas livres

Nove amins bioativas livres (espermidina, putrescina, agmatina, cadaverina, serotonina, histamina, tiramina, triptamina, e feniletilamina) foram determinadas por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) por par iônico (Brito et al., 2017). Um sistema Shimadzu (Quioto, Japão) consistindo de bombas LC-10AD e injetor automático SIL-10AD VP foi utilizado, e as amins foram separadas utilizando coluna Novapak C18 (3,9 a 300 mm, 4 µm, 60 Å, Waters, MA, EUA) e um gradiente de eluição de 0,2 mol/L de acetato de sódio e 15 mmol/L octanesulfonato de sódio com pH ajustado para 4,9 (fase móvel A) e acetonitrila (fase móvel B).

A quantificação foi realizada por fluorimetria (340 e 445 nm de excitação e de emissão, respectivamente), após derivação pós-coluna com *o*-phtalaldeído, usando curvas analíticas para cada amina ($r^2 > 0,99$). Os resultados foram expressos em mg/kg de chocolate ou de gordura.

2.2.3 Quantificação dos compostos fenólicos

A quantificação dos compostos fenólicos foi realizada de acordo com Brito et al. (2017) usando o método de Folin-Ciocalteu. Os fenólicos foram extraídos das amostras com ácido tricloroacético (5%) e os resultados foram expressos em equivalente ácido gálico.

2.2.4 Determinação da atividade antioxidante

2.2.4.1. DPPH

O método do DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) seguiu o procedimento descrito por Roesler et al. (2007). A redução do radical do DPPH foi medida por monitoramento do declínio da absorbância a 517 nm por 30 minutos, ao abrigo da luz, até valores estáveis de absorção. A capacidade antioxidante de cada amostra (IC50) foi expressa como a concentração em $\mu\text{g/mL}$ do extrato requerida para consumir DPPH em 50%.

2.2.4.2. Fosfomolibdênio

A atividade antioxidante foi determinada pelo método de redução do íon fosfomolibdenio (Pietro et al., 1999). Foi preparada solução reagente (0,6 M ácido sulfúrico, 28 mM de fosfato de sódio, e 24 mM de molibdato de amônio). A absorção foi lida a 695 nm em espectrofotômetro UV-Visível 1650 PC Shimadzu (Kioto, Japão). A quantificação foi feita por interpolação em uma curva de calibração do padrão ácido L-ascórbico e o resultado dado em mg equivalente de Ácido Ascórbico por mL do extrato (mgEAA/mL).

2.2.5 Análise estatística

Os resultados foram submetidos a análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância, utilizando Minitab versão 18.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Influência da remoção da gordura na quantificação de aminas bioativas

Os resultados obtidos ao verificar a influência da remoção da gordura na quantificação das aminas bioativas estão descritos na tabela 1. Dentre as nove aminas pesquisadas, cinco foram detectadas tanto nas amostras com e sem gordura, dentre elas, a poliamina espermidina e as aminas biogênicas putrescina, triptamina, tiramina e feniletilamina. Em ambas as amostras, a amina encontrada em maior teor foi a espermidina, seguida da tiramina, feniletilamina, putrescina e triptamina. A predominância de espermidina no chocolate é importante visto que esta poliamina apresenta funções relevantes à saúde, podendo-se destacar a modulação e promoção do crescimento, atuação na divisão celular, organogênese, resposta ao estresse, regulação da inflamação sistêmica, inibição da síntese de citocinas inflamatórias em macrófagos, regulação da ativação do fator de necrose tumoral (NF- κ B), maturação da mucosa intestinal pós-natal e imunoglobulina A (IgA) e recuperação da mucosa intestinal (Santiago-Silva et al., 2011; Matsumoto et al., 2011; Bandeira et al., 2012; Mochou et al., 2012). Ainda, as poliaminas são potentes sequestradoras do radical hidroxila, oxigênio singlete e peróxido de hidrogênio, podendo assim inibir a peroxidação lipídica, retardar a senescência e participar na redução de danos ao DNA (Kalac, 2014).

Observa-se pela tabela 1 que a remoção da gordura do chocolate previamente à análise das aminas não afetou a extração de quatro das cinco aminas presentes no chocolate, incluindo a espermidina, putrescina, tiramina e feniletilamina. Entretanto, o chocolate sem gordura apresentou um teor significativamente menor de triptamina comparado ao não desengordurado. De fato, a gordura

extraída do chocolate continha quantidade significativa de triptamina, o que confirma o arraste desta amina durante o processo de desngorduramento.

Tabela 1. Teores médios \pm desvios padrão das aminas bioativas em chocolate, chocolate sem gordura e na gordura extraída do chocolate

Amostras	Aminas bioativas (mg/kg)		
	Chocolate	Chocolate sem gordura	Gordura do chocolate
Espermidina	13,77 \pm 0,73 ^a	12,95 \pm 0,16 ^a	ND
Putrescina	2,37 \pm 0,30 ^a	2,31 \pm 0,36 ^a	ND
Triptamina	1,21 \pm 0,20 ^a	0,58 \pm 0,03 ^b	0,74 \pm 0,05 ^b
Tiramina	5,02 \pm 0,03 ^a	4,92 \pm 0,09 ^a	ND
Feniletilamina	4,45 \pm 0,55 ^a	4,33 \pm 0,46 ^a	ND

Médias \pm dp (base úmida) com letras diferentes na mesma linha são significativamente diferentes (Teste de Tukey, $p < 0,05$).

3.2 Influência da remoção da gordura na quantificação de fenólicos totais

Ao verificar a influência da retirada da gordura na quantificação dos compostos fenólicos e na atividade antioxidante, determinados pelos testes de Folin-Ciocalteu e DPPH, respectivamente, obteve-se os resultados apresentados na tabela 2.

Com relação aos compostos fenólicos totais, teores significativamente maiores foram obtidos nas amostras sem gordura (10,83 \pm 1,60 mg/g) comparado à mesma massa de chocolate comum. A quantidade de compostos fenólicos encontrada no chocolate e na gordura retirada do chocolate não diferiu estatisticamente, 3,21 \pm 0,52 mg/g e 1,43 \pm 0,29 mg/g, respectivamente. Conclui-se que a o solvente TCA (5%) extrai apenas os poucos fenólicos que estão ligados à gordura do chocolate. É importante observar que alguns compostos fenólicos ficam na porção lipídica quando esta é retirada do chocolate, procedimento frequentemente realizado no pré-tratamento das amostras.

Tabela 2. Teores médios \pm desvios padrão dos fenólicos totais e atividade antioxidante no chocolate, chocolate desngordurado e na gordura extraída do chocolate

Amostra	Compostos fenólicos (mg ácido gálico/g)	Atividade antioxidante	
		DPPH (μ g/mL)	Íon fosfomolibdênio (mgEAA/mL)
Chocolate	3,21 \pm 0,52 ^b	118,44 \pm 7,33 ^a	0,09 \pm 0,00 ^c
Chocolate sem gordura	10,83 \pm 1,60 ^a	18,70 \pm 0,47 ^c	1,13 \pm 0,02 ^a
Gordura do chocolate	1,43 \pm 0,29 ^b	100,30 \pm 9,39 ^b	0,14 \pm 0,02 ^b

Médias \pm dp com letras diferentes na mesma coluna são significativamente diferentes (Teste de Tukey, $p < 0,05$). Foi feita correção para a massa de chocolate retirando-se a gordura.

O teor de compostos fenólicos extraído na amostra desngordurada foi maior que nas demais amostras. Isso pode ter ocorrido devido à presença da gordura, que possui característica apolar, impedindo a extração dos compostos fenólicos pelo solvente. Partindo desse princípio, a maioria dos estudos até então realizados, trabalha com as amostras desngorduradas para retirada dos compostos bioativos, principalmente os fenólicos, que possuem característica polar (Efraim et al., 2010; Leite et al., 2013).

Um fator importante a ser observado é que pela primeira vez um estudo de atividade antioxidante e de fenólicos totais foi realizado com extratos obtidos por TCA (5%). O rendimento em fenólicos totais obtido com este solvente assemelhou-se a extração com água, quando comparado com metanol, como constatado por Pires et al. (2016).

3.2 Influência da remoção da gordura na atividade antioxidante

Na análise da atividade antioxidante (tabela 2) é possível verificar que houve diferença significativa entre as três amostras analisadas, chocolate, chocolate sem gordura e gordura do chocolate pelos métodos DPPH e do íon fosfomolibdênio. Os resultados encontrados para o chocolate após remoção da gordura são semelhantes na análise pelo DPPH aos descritos por Leite et al. (2013), $20,47 \pm 1,86 \mu\text{g/mL}$, apesar da obtenção do extrato para determinação da atividade antioxidante ter sido realizada com metanol comparado a ácido tricloroacético.

Foi verificada maior atividade antioxidante na gordura do chocolate do que no chocolate determinada pelo método do radical DPPH ($100,30 \pm 9,39$ e $118,44 \pm 7,33 \mu\text{g/mL}$) e confirmado pelo método do íon fosfomolibdênio ($0,09 \pm 0,00$ e $0,14 \pm 0,02 \text{ mgEAA/mL}$), apesar dessas amostras não diferirem estatisticamente no teor de compostos fenólicos, porém diferiam no teor da triptamina.

A eliminação de radicais livres DPPH e a capacidade antioxidante medida pelos métodos convencionais, sempre foi fortemente correlacionada com o teor de flavonoides totais (Abu Bakar et al., 2009). De fato, a atividade antioxidante de extratos de cacau e a concentração dos fenóis totais parece ser significativa, já que os extratos com as maiores concentrações de fenóis monoméricos são aqueles com maior atividade antioxidante (Neganova et al., 2010; Estevão et al., 2011; Oliveira et al., 2011). No entanto, os resultados encontrados em outros trabalhos com chocolate e cacau não mostraram relação entre a atividade antioxidante e fenólicos totais (Leite et al., 2013; Deus, 2015), justificada pela possível interação flavonoides x flavonoides, que pode reduzir ou aumentar a atividade antioxidante total (Hidalgo et al., 2010). Baseado neste estudo, pode-se inferir, que a atividade antioxidante dos chocolates pode também estar relacionada com a presença de outras substâncias como a triptamina e não apenas dos compostos fenólicos.

Outra constatação que corrobora com essa afirmação é a elevada atividade antioxidante registrada na gordura do chocolate que além de compostos fenólicos possuía triptamina. Estudos recentes têm demonstrado importante atividade antioxidante da triptamina (Carvalho et al., 2010).

4. CONCLUSÕES

O chocolate da Bahia é fonte de aminas bioativas com destaque da poliamina espermidina, que é benéfica à saúde humana. O processo de remoção da gordura do chocolate previamente à análise de aminas não interferiu na quantificação de espermidina, putrescina, tiramina e feniletilamina, entretanto, há uma perda significativa de triptamina no extrato etéreo. O chocolate desengordurado permitiu melhor extração dos compostos fenólicos pelo solvente. A quantidade de compostos fenólicos não foi diretamente proporcional à atividade antioxidante das amostras de chocolate com gordura e na gordura retirada do chocolate, sugerindo que a triptamina pode ser também responsável pela atividade antioxidante do chocolate.

Agradecimentos

Agradecimentos: A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e a FAPEMIG pelo suporte financeiro.

5. REFERÊNCIAS

Abu Bakar, M.F. et al. Phytochemicals and antioxidant activity of different parts of bambangan (Mangifera pajang) and tarap (Artocarpus odoratissimus). *Food Chemistry*, Barking, v.113, n. 2, p. 479–83, 2009.

- Bandeira, C. M.; Evangelista, W. P.; Glória, M. B. A. Bioactive amines in fresh, canned and dried sweet corn, embryo and endosperm and germinated corn. *Food Chemistry*, v. 131, p. 1355-1359, 2012.
- Beckett, S. T. *Industrial Chocolate Manufacture and Use*. 4. ed. London: Wiley-Blackwell, 2009. p. 720.
- Borchers, A. T.; Keen, C. L.; Hannum, S. M.; Gershwin, M. E. Cocoa and Chocolate: Composition, Bioavailability, and Health Implications. *Journal of Medicinal Food*, v. 3, p. 77-105, 2000.
- Brito, B. N. C., Chisté, R. C., Pena, R. S., Gloria, M. B. A., Lopes, A. S. Bioactive amines and phenolic compounds in cocoa beans are affected by fermentation. *Food Chemistry*, Barking, v. 228, p. 484-490, 2017.
- Brasil, Agência Nacional De Vigilância Sanitária. Resolução RDC 264 de 22 de setembro de 2005: fundamentada nos itens 2.1.4 e 2.1.5 do CODEX STAN 87/ 81.
- Carvalho, L. C.; Estevão, M. S.; Ferreira, L. M.; Fernandes, E.; Marques, M. M. A new insight on the hypochlorous acid scavenging mechanism of tryptamine and tryptophan derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 20, p. 6475-6478, 2010.
- Deus, V. L. *Influência dos métodos de secagem nas propriedades antioxidantes de cacau (Theobroma cacao L.)*. Salvador, 2015. p. 31. Dissertação (Mestre em Ciência de Alimentos). Faculdade de Farmácia. Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA.
- Efrain, P.; Pezoa-García, N. H.; Jardim, D. C. P.; Nishikawa, A.; Haddad, R.; Eberlin, M. N. Influência da fermentação e secagem de amêndoas de cacau no teor de compostos fenólicos e na aceitação sensorial. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 30, p. 142-150, 2010.
- EFSA (European Food Safety Authority). Scientific opinion on risk based control of biogenic amines formation in fermented foods. *EFSA Journal*, v. 9, n. 10, p. 2392, 2011.
- Estevão, M. S.; Carvalho, L. C.; Ferreira, L. M.; Fernandes, E.; Marques, M. M. Analysis of the antioxidant activity of an indole library: cyclic voltammetry versus ROS scavenging activity. *Tetrahedron Letters*, v. 52, p. 101-106, 2011.
- Genovese, M. I.; Lannes, S. C. Da S. Comparison of total phenolic content and antiradical capacity of powders and “chocolates” from cocoa and cupuaçu. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 29, n.4, p. 810-814, 2009.
- Hidalgo, M.; Sánchez-Moreno, C.; Pascualteresa, S. Flavonoid-flavonoid interaction and its effect on their antioxidant activity. *Food Chemistry*, v. 121, n. 3, p. 691-696, 2010.
- Kalac, P.; Krizer, M. Formation of biogenic amines in four edible mushroom species stored under different conditions. *Food Chemistry*. v. 58, p. 233-236, 1997.
- Kim J.; Kim, J.; Shim, J.; Lee, C. Y.; Lee, K. W.; Lee, H. J. Cocoa phytochemicals: recent advances in molecular mechanisms on health. *Critical Reviews in the Science of Food*, v. 54, p. 1458-1472, 2014.
- Leite, P. B.; Maciel, L. F.; Opretzka, L. C. F.; Soares, S. E.; Bispo, E. S. Phenolic compounds, methylxanthine and antioxidant activity in cocoa mass and chocolates produced from “witch broom disease” resistant and non resistant cocoa cultivars. *Ciências e agrotecnologia, Lavras*, v. 37, n. 3, p. 244-250, 2013.
- Matsumoto, M.; Kurihara, S. Probiotics-induced increase of large intestinal luminal polyamine concentration may promote longevity. *Medical Hypotheses*, v. 77, p. 469-472, 2011.
- Mochou, P. N.; Wu, J.; Cona, A.; Tavladoraki, P.; Angelini, R.; Roubelakis-Angelakis, K.A. The polyamines and their catabolic products are significant players in the turnover of nitrogenous molecules in plants. *Journal of Experimental Botany*, v. 63, n. 14, p. 5003-5015, 2012.
- Neganova, M. E.; Afanas'eva, S. V.; Klochkov, S. G.; Shevtsova, E. F. Mechanisms of Antioxidant Effect of Natural Sesquiterpene Lactone and Alkaloid Derivatives. *Biophysics And Biochemistry, Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, v. 152, n. 6, 2012.
- Oliveira, R. B. A.; Evangelista, W. P.; Sena M. J.; Glória, M. B. A. Tuna fishing, capture and post-capture practices in the northeast of Brazil and their effects on histamine and on other bioactive amines. *Food Control*, v. 25, p. 64-68, 2012.
- Pires, T. C.; Melo, T. S.; Maciel, L. F.; Bispo, E. S. *Otimização do processo de extração de compostos fenólicos totais em cacau (Theobroma cacao L.)* XXV Congresso Brasileiro de Ciência de e Tecnologia de Alimentos. Gramado, RS. 2016.

- Prieto, P.; Pineda, M.; Aguilar, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidante capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Analytical Biochemistry*, v. 269, p. 337–341, 1999.
- Roesler, R.; Malta, L. G.; Carrasco, L. C.; Holanda, R. B.; Sousa, C. A. S.; Pastore, G. M. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. *Ciência e Tecnologia Alimentos*, v. 27, n. 1, p. 53-60, 2007.
- Santiago-Silva, P.; Labanca, R. A.; Glória, M. B. A. Functional potential of tropical fruits with respect to free bioactive amines. *Food Research International*, v. 44, p. 1264-1268, 2011.