



# RELATÓRIOS CIENTÍFICOS E TÉCNICOS

## SÉRIE DIGITAL

**ACTIVIDADE ANTIOXIDANTE DE HIDROLISADOS  
PROTEICOS DE BACALHAU, SALMÃO E SOLHA**

**Miguel Garrana Faria; Irineu Batista**

2007

36



Os **RELATÓRIOS CIENTÍFICOS E TÉCNICOS DO IPIMAR** destinam-se a uma divulgação rápida de resultados preliminares de carácter científico e técnico, resultantes de actividades de investigação e de desenvolvimento e inovação tecnológica. Esta publicação é aberta à comunidade científica e aos utentes do sector, podendo os trabalhos serem escritos em português, em francês ou em inglês.

A **SÉRIE COOPERAÇÃO** destina-se, primordialmente, à divulgação de trabalhos realizados com países terceiros no âmbito de programas de cooperação.

A **SÉRIE DIGITAL** destina-se a promover uma consulta mais diversificada e expedita dos trabalhos na área da investigação das pescas e do mar.

#### **Edição**

IPIMAR  
Avenida de Brasília  
1449-006 LISBOA  
Portugal

#### **Corpo Editorial**

Francisco Ruano - Coordenador  
Aida Campos  
Fátima Cardador  
Irineu Batista  
Manuela Falcão  
Maria José Brogueira  
Maria Manuel Martins  
Rogélia Martins

#### **Edição Digital**

Anabela Farinha/Irineu Batista/Luís Catalan

As instruções para os autores estão disponíveis no “site” do IPIMAR [w.w.w.ipimar.pt](http://w.w.w.ipimar.pt) ou podem ser solicitadas aos membros do Corpo Editorial desta publicação.

#### **Capa**

Luís Catalan

#### **ISSN**

1645-863X

Todos os direitos reservados.

# ACTIVIDADE ANTIOXIDANTE DE HIDROLISADOS PROTEICOS DE BACALHAU, SALMÃO E SOLHA

Miguel Garrana Faria; Irineu Batista

Departamento de Inovação Tecnológica e Valorização dos Produtos da Pesca

INIAP-IPIMAR, Av. de Brasília, 1449-006 Lisboa

Recebido em 10.09.2006

Aceite em 19.03.2007

## RESUMO

Os hidrolisados proteicos de pescado são produtos obtidos a partir das proteínas por acção de enzimas proteolíticas. Estes produtos apresentam diferentes propriedades (nutricionais, funcionais, biológicas), sendo de destacar a actividade antioxidante a qual é especialmente importante no caso de produtos alimentares. Assim, é objectivo deste trabalho avaliar o poder antioxidante de hidrolisados proteicos obtidos a partir de músculo de bacalhau (Ba1, Ba2 e Ba3), salmão (Sa1 e Sa2) e solha (So1, So2 e So3). Para a medição do poder antioxidante destes hidrolisados recorreu-se às seguintes técnicas: determinação da actividade antiradicalar utilizando o DPPH, inibição da auto-oxidação do ácido linoleico e determinação da estabilidade antioxidativa recorrendo ao Rancimat. Os resultados obtidos indicaram que os três hidrolisados de bacalhau tinham um baixo poder antioxidante, parecendo que dois deles (Ba1 e Ba2) apresentavam um efeito sinérgico com o  $\alpha$ -tocoferol. Os três hidrolisados de solha tinham igualmente um baixo poder antioxidante, mas os resultados obtidos pelas diferentes técnicas não foram concordantes. Assim, um destes hidrolisados (So1) exibiu a maior actividade antioxidante no ensaio de inibição da auto-oxidação do ácido linoleico, mas tal como o outro hidrolisado de solha (So2) apresentou uma actividade pró-oxidante na técnica de determinação da estabilidade antioxidativa realizada no Rancimat. O maior poder antioxidante foi registado nos dois hidrolisados de salmão, atendendo aos respectivos períodos de indução medidos com o Rancimat.

**Palavras chave:** Hidrolisados proteicos de pescado, actividade antioxidante, DPPH, ácido linoleico, Rancimat

## ABSTRACT

**Antioxidant activity of cod, salmon, and plaice protein hydrolysates:** Fish protein hydrolysates (FPH) are produced from fish proteins by using proteases. Among the different properties (nutritional, functional and biological) exhibited by FPH it has to be emphasized their antioxidant activity, which particularly important in the case of food products. Thus, it is objective of this work to evaluate the antioxidant activity of FPH prepared from the muscle of cod (Ba1, Ba2, and Ba3), salmon (Sa1 and Sa2) and plaice (So1, So2, and So3). The antioxidant activity was measured by the following methods: radical scavenging activity using DPPH, inhibition of linoleic acid autooxidation and antioxidative stability using the Rancimat. The results obtained indicated that the three cod hydrolysates showed a low antioxidant activity but a synergistic effect between the hydrolyates Ba1 and Ba2 and  $\alpha$ -tocopherol seemed occur. The three plaice hydrolysates also presented low antioxidant activity but the results obtained by the three methods were not in accordance. Thus the hydrolysate So1 presented the highest antioxidant activity according to the results of the inhibition of the linoleic acid autooxidation but hydrolysates So1 and So2 showed a pro-oxidant activity in the determination of the antioxidative stability using the Rancimat. The highest antioxidant activity was measured in both salmon hydrolysates according to their induction periods measured by the Rancimat equipment.

**Keywords:** Fish protein hydrolysates, antioxidant activity, DPPH, linoleic acid, Rancimat

---

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

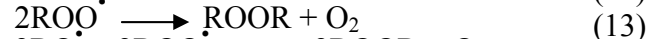
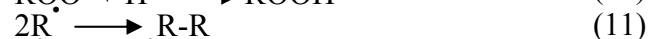
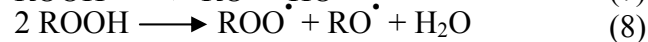
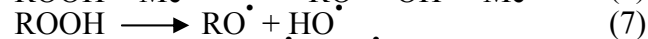
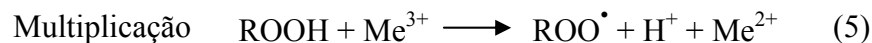
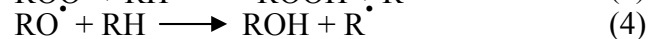
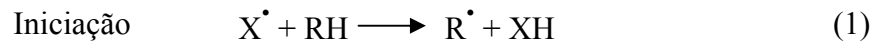
FARIA, M. G.; BATISTA, I., 2007. Actividade antioxidante de hidrolisados proteicos de bacalhau, salmão e solha. *Relat. Cient. Téc. IPIMAR, Série digital* (<http://ipimar-iniap.ipimar.pt>), nº 36, 31 p. + Anexos

## INTRODUÇÃO

A oxidação lipídica é uma das reacções mais frequentes nos produtos alimentares, responsável pela ocorrência de alterações no cheiro, sabor, cor e textura, levando mesmo à redução do valor nutricional (Eriksson, 1987). Trata-se de uma reacção complexa que pode realizar-se através de vários mecanismos e originar um vasto conjunto de produtos. Assim, de acordo com Grosch (1987), a oxidação pode resultar da:

- Reacção de uma molécula de um ácido gordo com qualquer espécie suficientemente reactiva para abstrair um átomo de hidrogénio de um grupo metilénico (-CH<sub>2</sub>-), levando à formação de um radical alquílico. Este tipo de reacção designa-se por auto-oxidação e é dos mais frequentes nos produtos alimentares;
- Adição directa de oxigénio singlete a uma ligação dupla carbono-carbono. O oxigénio singlete forma-se a partir do oxigénio no estado fundamental por foto-oxidação;
- Ligação do oxigénio ao substrato por acção catalítica de lipoxigenases.

A auto-oxidação é um processo autocatílico, em cadeia, que envolve as fases de iniciação, propagação, multiplicação e terminação, estando envolvidas as seguintes reacções:



Os hidroperóxidos formados na auto-oxidação dos ácidos gordos polinsaturados são os produtos primários da oxidação e constituem uma mistura complexa de compostos que

diferem tanto na posição do grupo peróxido na cadeia carbonada como na estrutura isomérica das ligações duplas. Estes produtos da oxidação são muito instáveis, em particular, a temperaturas altas e na presença de íons de metais de transição, decompondo-se para formar um vasto conjunto de compostos que incluem aldeídos, cetonas, álcoois, ácidos carboxílicos, hidrocarbonetos, etc. Estes compostos são os produtos secundários da oxidação responsáveis pelo cheiro e sabor típicos dos produtos oxidados, uma vez que os hidroperóxidos são insípidos e inodoros. Os produtos secundários da auto-oxidação provêm de intermediários como os radicais peróxido ( $\text{ROO}^\bullet$ ) ou alcóxido ( $\text{RO}^\bullet$ ) (Grosch, 1987; Frankel, 1998). Na formação destes radicais, a temperaturas inferiores a  $40^\circ\text{C}$  (Equações 5 e 6), intervêm íons de metais de transição como o cobre, o ferro, o manganês e o cobalto, tal como referido por Chan (1987).

Na figura 1 apresentam-se, esquematicamente, várias fases do processo de auto-oxidação e a formação de produtos secundários da oxidação.

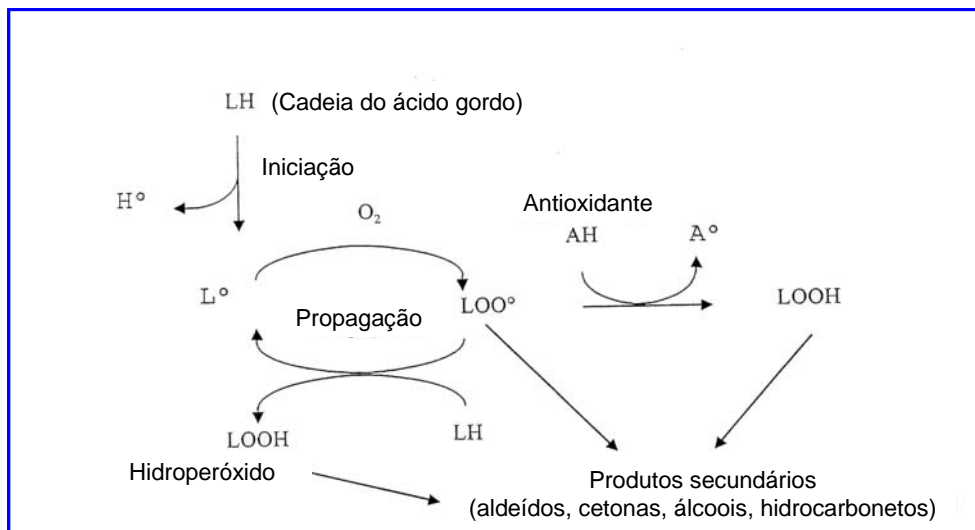


Figura 1 - Esquema da auto-oxidação dos lípidos e formação de compostos secundários.

Têm sido propostos numerosos mecanismos para explicar a formação de compostos carbonílo a partir de hidroperóxidos, apresentando-se na figura 2 uma dessas hipóteses.

Os produtos primários e secundários resultantes da oxidação dos lípidos podem, por sua vez, reagir com as proteínas provocando a sua oxidação (Karel *et al.*, 1975; Matsushita, 1975; Gardner, 1979; Reyftmann *et al.*, 1990; Kikugawa *et al.*, 1991). Estes produtos terciários da oxidação dos lípidos podem dar origem a compostos fluorescentes e promover a formação de ligações cruzadas entre as proteínas. A sua oxidação pode ocorrer através de radicais livres

(Equações 15 e 16), mas foi igualmente referido (Böhlen *et al.*, 1973; Karel *et al.*, 1975; Gardner, 1979; Kikugawa *et al.*, 1991; Aubourg, 1999) que pode ser devida à formação de complexos não-covalentes devido tanto a interações electrostáticas como hidrófobas entre os hidroperóxidos lipídicos ou os produtos secundários da oxidação e os átomos de azoto ou enxofre dos resíduos reactivos dos aminoácidos das proteínas (Equação 17).



De acordo com Pokorny *et al.* (1974), a reacção dos produtos de oxidação dos lípidos com aqueles grupos de proteínas levaria à formação de compostos corados mas de tonalidade clara. Numa segunda fase ocorreria a transformação destes compostos em pigmentos poliméricos de cor castanha.

Os compostos carbonilo resultantes da decomposição dos hidroperóxidos podem reagir também com os fosfolípidos, levando à formação de compostos do tipo Maillard com forte coloração castanha (Pokorny *et al.*, 1976; Bandarra *et al.*, 1999).

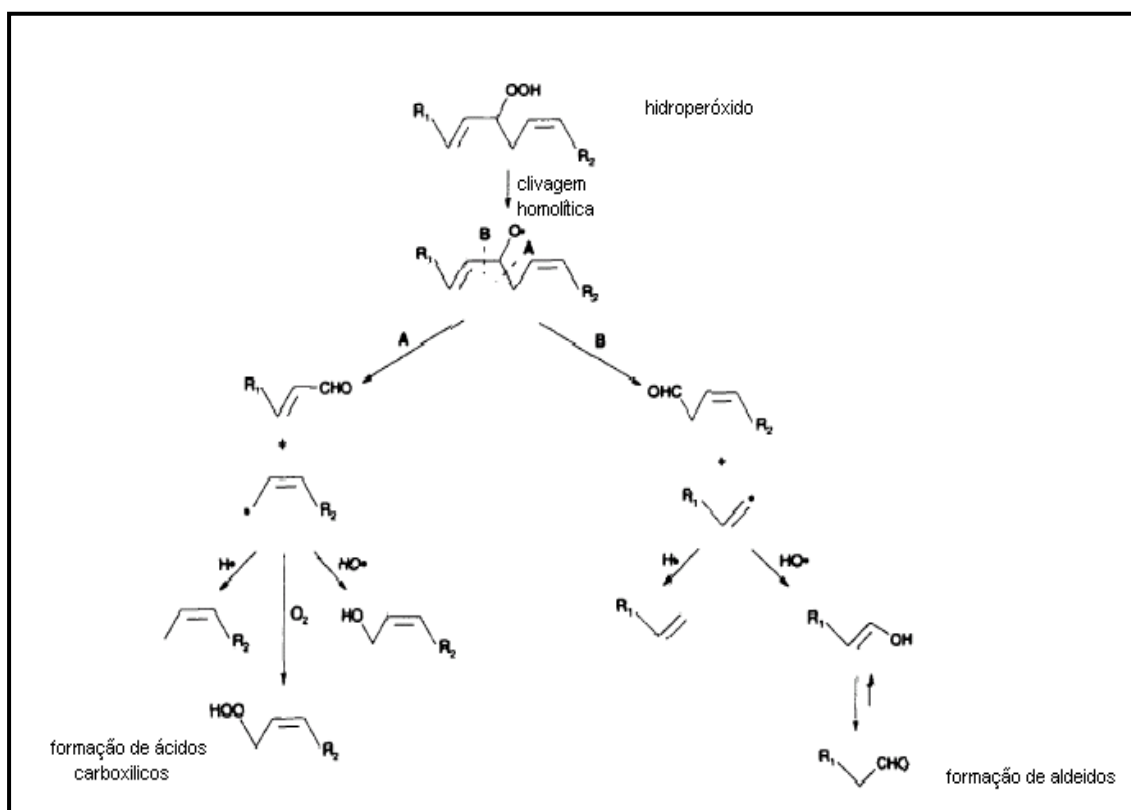


Figura 2 – Esquema de formação de produtos secundários voláteis a partir de um monohidroperóxidos (Frankel, 1998).

Para evitar ou limitar a oxidação dos lípidos, recorre-se, frequentemente, a antioxidantes os quais apresentam a capacidade de retardar ou prevenir a oxidação, mesmo em concentrações muito baixas em comparação com a dos substratos. Os antioxidantes são, usualmente, classificados em primários e secundários, tendo em conta o modo como interagem com o substrato oxidável. Assim, os antioxidantes primários ou de tipo 1 atrasam ou inibem o passo de iniciação ou interrompem o de propagação da auto-oxidação. Em geral, reagem com os radicais, convertendo-os em produtos termodinamicamente mais estáveis (Shahidi e Wanasundara, 1992). Estes antioxidantes apresentam uma maior afinidade para os radicais peróxido do que para os localizados nos átomos de carbono dos lípidos (Porter, 1980), levando a que a reacção de terminação 9 seja preferencial à reacção 10. Todavia, estes antioxidantes podem tornar-se pró-oxidantes se estiverem presentes em grandes concentrações. De entre os antioxidantes primários destacam-se os tocoferóis, o ácido ascórbico, o BHA e o BHT, em que os dois últimos são sintéticos.

Os antioxidantes secundários, preventivos ou de tipo 2 actuam através de vários mecanismos que incluem: (i) decomposição dos hidroperóxidos em compostos inactivos, como é o caso de vários tióis e sulfitos; (ii) diminuição da sensibilidade dos sistemas com duplas ligações para formar radicais livres, como a estabilização do ácido linoleico pelo hidróxido de potássio; (iii) prevenção da iniciação por acção da luz ou de outra radiação, tais como os carotenos que neutralizam o efeito de fotosensibilização da clorofila; (iv) desactivação de metais pesados, tal como agentes quelantes de que são exemplos os ácidos cítricos, fosfórico e fumárico (Undeland, 1995). Estes antioxidantes apresentam, em geral, sinergia com os antioxidantes primários, sendo utilizados em conjunto. Entre os antioxidantes secundários, contam-se os aminoácidos e os péptidos, sendo a actividade antioxidante destes últimos produtos particularmente evidenciada em péptidos contendo histidina, como, por exemplo, na carnosina, o dipéptido  $\beta$ -alanina-L-histidina (Chen *et al.*, 1998), que apresenta a capacidade para quelar o cobre. Chan e Decker (1997) mostraram que tanto este dipéptido como a anserina ( $\beta$ -alanina-L-1-metilhistidina) têm a capacidade de eliminar radicais hidroxilo e de destruir o oxigénio singleto. Verificou-se ainda que a carnosina destrói aldeídos insaturados resultantes da oxidação, contribuindo assim para reduzir a toxicidade dos produtos de oxidação dos lípidos (Zhou e Decker, 1999). A actividade antioxidante de misturas de péptidos foi igualmente detectada em hidrolisados proteicos de soja (Chen *et al.*, 1995), de caseína (Zioudrou *et al.*, 1979; Ymauchi, 1992; Mahmoud *et al.*, 1992; Businco *et al.*, 1993; Nakamura *et al.*, 1993; Van Beresteijn *et al.*, 1994) e de pescado (Seher e Löschner, 1985;

Shahidi e Amarowicz, 1996; Sathivel *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2003). O valor nutricional e diversas actividades biológicas exibidas pelos hidrolisados proteicos têm levado à sua crescente utilização em diferentes tipos de produtos. Por outro lado, as características da matéria utilizada na preparação dos hidrolisados, o seu modo de preparação e consequente complexidade da sua composição não permitem estabelecer *a priori* as respectivas propriedades antioxidantes.

Assim, é objectivo deste trabalho medir, por diferentes metodologias, a actividade antioxidante de hidrolisados proteicos preparados a partir de bacalhau, salmão e solha.

## MATERIAL E MÉTODOS

### *Material*

Os hidrolisados proteicos utilizados neste trabalho (Tabela 1) foram produzidos pela empresa MARINOVA e fornecidos no âmbito do projecto PROPEPHEALTH (“High-added value functional seafood products for human health from seafood by-products by innovative mild processing”).

Tabela 1 - Hidrolisados proteicos utilizados.

Bacalhau	Salmão	Solha
Ba1	Sa1	So1
Ba2	Sa2	So2
Ba3	-	So3

A banha de porco usada nos ensaios com o Rancimat foi adquirida num supermercado local. Todos os reagentes utilizados nos diversos ensaios eram de grau analítico.

### *Métodos analíticos*

#### *Teor em azoto dos hidrolisados proteicos*

O teor em azoto dos hidrolisados proteicos foi determinado pelo método de Kjeldahl, seguindo o método descrito no AOAC (1990).



*Determinação da actividade antiradicalar dos hidrolisados com o DPPH ( $\alpha, \alpha$ -difeníl- $\beta$ -picrinilhidrazil)*

A determinação da capacidade antiradicalar dos hidrolisados proteicos foi realizada de acordo com o método descrito por Morales e Jiménez-Perez (2001) com algumas modificações. Assim, alíquotas de 200  $\mu$ l das soluções aquosas (em água miliQ) com diferentes concentrações das amostras foram adicionadas a 1,0 ml de uma solução etanólica de DPPH (74 mg/l), preparada extemporaneamente, tal como referido por Wu *et al.* (2003). As misturas foram agitadas durante uma hora num agitador horizontal (modelo Moto-Shake Genei, Scientific Industries), após o que as absorvências foram lidas à temperatura ambiente a 520 nm nos espectrofotómetros UNICAM (Spectrometer UV2-100) ou HITACHI (U-2001 Spectrophometer).

Para cada um dos hidrolisados proteicos foi determinada uma actividade antiradicalar, definida como a quantidade de hidrolisado necessária para reduzir de 50 % a concentração inicial de DPPH em solução ( $EC_{50}$ ). Esta concentração foi obtida a partir da evolução da concentração de DPPH em função da concentração de hidrolisado. A percentagem de redução foi calculada segundo Brand-Williams *et al.* (1995), de acordo com a seguinte equação:

$$\% \text{ redução} = [(A_{\text{controlo}} - A_{\text{amostra}})/A_{\text{controlo}}] \times 100,$$

em que:

$A_{\text{controlo}}$  - absorvência, a 520 nm, da solução de DPPH.

$A_{\text{amostra}}$  - absorvência, a 520 nm, da solução de DPPH e de hidrolisado proteico.

*Determinação da capacidade antioxidante dos hidrolisados através da inibição da auto-oxidação do ácido linoleico*

A determinação da inibição da auto-oxidação do ácido linoleico foi feita de acordo com o método descrito por Wu *et al.* (2003), com algumas modificações. A 0,5 ml das soluções dos hidrolisados, com várias concentrações, foi adicionado 1,0 ml de tampão fosfato 0,05 M (pH 7) e 1,0 ml de uma solução de ácido linoleico 50 mM em metanol (95 %). Os tubos foram bem fechados, agitados vigorosamente num agitador e incubados a 60 °C durante 36 h. Após a incubação, adicionou-se 2,35 ml de metanol a 75 %, 50  $\mu$ l de tiocinato de amónio a 30 % e 50  $\mu$ l de um solução de cloreto ferroso 20 mM em HCl a 3,5 %. Exactamente 3 min depois, a absorvência das soluções foi medida a 500 nm.

O período de incubação foi estabelecido, tal como referido por Sánchez-Moreno *et al.* (1999), a partir do tempo necessário para uma emulsão de ácido linoleico (sem hidrolisado e incubada nas mesmas condições do ensaio) atingir o máximo de absorvência a 500 nm.

A capacidade antioxidante é definida como a concentração de hidrolisado capaz de reduzir de 50 % a oxidação do ácido linoleico, nas condições do ensaio, e foi obtida a partir da actividade antioxidante (AA), a qual é calculada a partir da expressão:

$$AA (\%) = 100 - [(IO_{\text{amostra}}/IO_{\text{controlo}}) \times 100],$$

em que:

$$IO (\text{indução da oxidação}) = A_{(t=36 \text{ h})}/A_{(t=0 \text{ h})}.$$

$A_{(t=36 \text{ h})}$  absorvência após o tempo de incubação (36 horas) e  $A_{(t=0 \text{ h})}$  valor inicial da absorvência.

A capacidade antioxidante foi determinada a partir da regressão linear da actividade antioxidante em função da concentração de hidrolisado.

#### *Determinação da estabilidade antioxidante*

A estabilidade antioxidante foi determinada no aparelho de Rancimat (Methrom 743), representado esquematicamente na figura 3, seguindo o método descrito por Flaczyk *et al.* (2003). A 3 g de banha de porco adicionou-se uma massa de hidrolisado correspondente a uma concentração de 0,5 g  $N_{\text{tot}}$  /100 g de banha ou um antioxidante ( $\alpha$ -tocoferol ou ácido ascórbico) de modo a obter-se uma concentração de 0,02 g de antioxidante /100 g de banha. As condições experimentais em que decorreu o ensaio ( $T = 120 \text{ }^\circ\text{C}$ , caudal de ar 20 l/h) foram seleccionadas de acordo com as instruções de funcionamento do equipamento. A estabilidade antioxidante foi avaliada através do período de indução, expresso em horas.

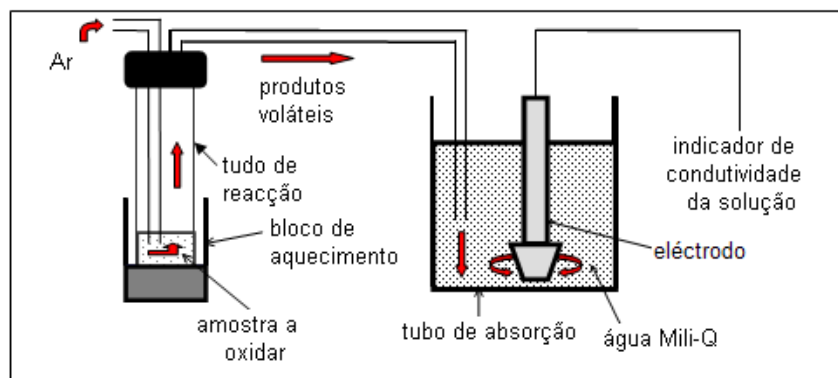


Figura 3 – Ilustração do funcionamento do aparelho Rancimat (adaptado de: [www.johnbarth.com](http://www.johnbarth.com)).

### *Efeito sinérgico entre o $\alpha$ -tocoferol e os hidrolisados proteicos*

O estudo da eventual sinergia entre o  $\alpha$ -tocoferol e os hidrolisados foi realizado no Rancimat (Methrom 743), tal como descrito por Flaczyk *et al.* (2003), com algumas modificações. A banha de porco previamente aquecida durante 10 min, adicionou-se  $\alpha$ -tocoferol e cada um dos hidrolisados de modo a obterem-se concentrações de 0,02 % e 0,5 %  $N_{tot}$ , respectivamente. As condições experimentais usadas no ensaio foram: T = 120 °C e caudal de ar de 20 L/h. Determinou-se, igualmente, o período de indução da banha e da banha com  $\alpha$ -tocoferol.

O efeito sinérgico (ES) foi avaliado através da diferença entre o período de indução (PI) obtido quando o hidrolisado e o  $\alpha$ -tocoferol estavam presentes em simultâneo e a soma dos períodos de indução de cada hidrolisado e do  $\alpha$ -tocoferol utilizados isoladamente, isto é:

$$ES = PI_{\text{hidr} + \alpha\text{-tocoferol}} - (PI_{\text{hidr}} + PI_{\alpha\text{-tocoferol}})$$

### *Métodos estatísticos*

Para a análise estatística dos resultados, recorreu-se ao 'Duncan Multiple Range Test' e t de Student e usou-se os programas de computador Excel 2000 (Microsoft Corporation, Washington, USA) e Statgraphics 5.0 (Statistical Graphics Corporation, Inc., Maryland, USA).

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### *Actividade antiradicalar dos hidrolisados*

Nos ensaios realizados, o DPPH foi solubilizado em etanol, tal como referido por Wu *et al.* (2003), em vez de clorofórmio, levando a que a reacção ocorresse numa única fase o que permitiu uma melhor interacção entre os diferentes hidrolisados e o DPPH. Verificou-se igualmente que era indispensável a agitação dos tubos durante a realização dos ensaios, pois que, caso contrário, a reacção decorria muito lentamente.

Em ensaios preliminares de determinação da capacidade antiradicalar dos hidrolisados, verificou-se que, nas condições de ensaio, apenas concentrações de hidrolisados superiores a 50 mg/ml levavam a diminuições significativas da absorvência da solução de DPPH. Assim, a fim de comparar, a capacidade antiradicalar dos vários hidrolisados, utilizou-se nos vários ensaios uma concentração de 50 mg de hidrolisado/ml. Para comparação, utilizou-se BHT com uma concentração de apenas 0,35 mg/ml, em virtude da sua elevada capacidade

antiradicalar. Na figura 4 apresentam-se os valores da redução da absorvência da solução de DPPH provocada pelos vários hidrolisados e pelo BHT, usando a expressão:

$$\text{Redução} = A_0 - A_H$$

em que  $A_0$  é a absorvência da solução de DPPH e  $A_H$  a absorvência da solução de DPPH com uma amostra de hidrolisado ou BHT, ambas medidas após uma hora de agitação à temperatura ambiente.

Ao comparar os resultados obtidos, verifica-se que o hidrolisado de salmão Sa1 apresentava a maior capacidade antiradicalar, enquanto que a menor foi medida no hidrolisado de bacalhau Ba3. Além disso, é de sublinhar que as capacidades dos hidrolisados Ba1, Sa2, So1 e So3 não eram significativamente diferentes ( $P > 0,05$ ) e também a grande diferença em relação à capacidade do BHT, cuja concentração neste ensaio foi cerca de 140 vezes inferior à dos hidrolisados.

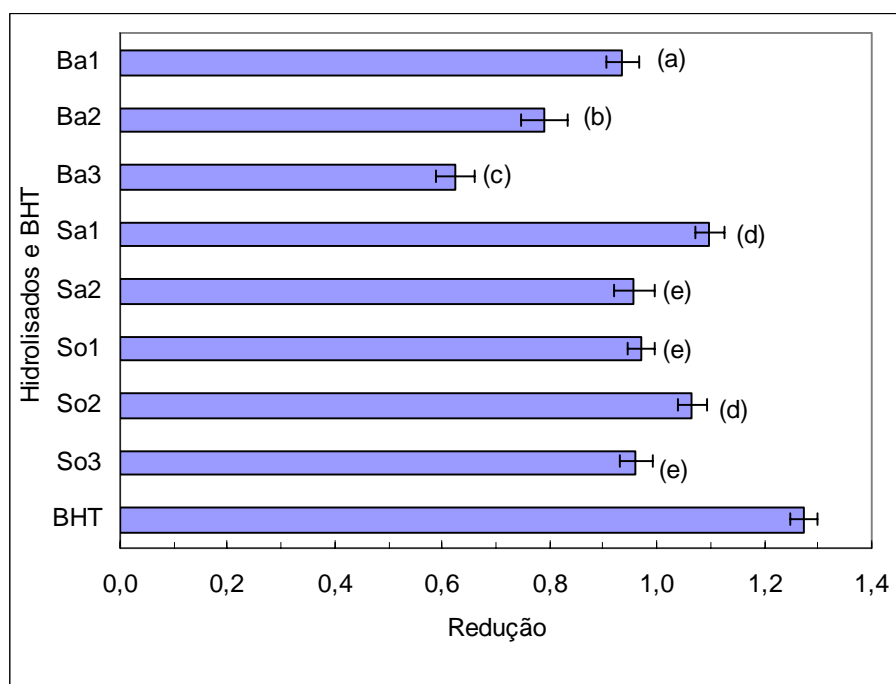


Figura 4 – Redução da concentração de DPPH pelos hidrolisados e pelo BHT. Cada resultado é a média de dez ensaios repetidos em triplicado. Os resultados assinalados com letras diferentes são significativamente diferentes ( $P < 0,05$ ).

A actividade antiradicalar ( $EC_{50}$ ) dos vários hidrolisados foi determinada a partir do efeito da concentração de cada hidrolisado na percentagem de redução do DPPH. Assim, para cada hidrolisado foram realizados três ensaios independentes, apresentando-se na figura 5 os

resultados obtidos com o hidrolisado Sa1 no ensaio 1, onde se exemplifica também o modo de obtenção do valor de EC<sub>50</sub> correspondente. A totalidade dos valores obtidos encontra-se no Anexo I.

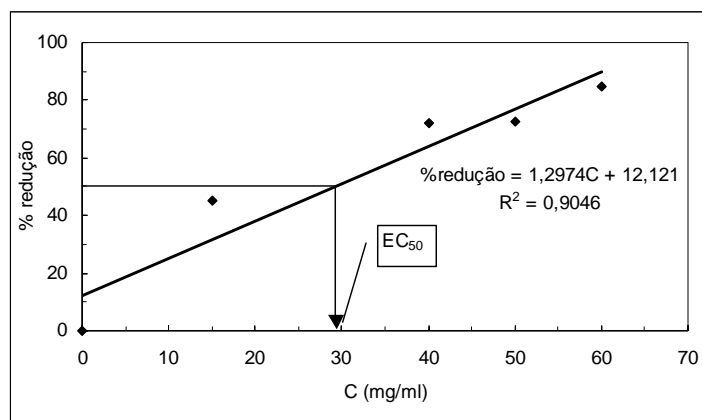


Figura 5 – Percentagem de redução da concentração de DPPH em função da concentração do hidrolisado de salmão Sa1 (ensaio 1).

Com base nos valores da percentagem de redução do DPPH vs concentração de hidrolisado estabeleceram-se correlações lineares que apresentavam um elevado nível de significância ( $P < 0,001$ ). A partir destas correlações calcularam-se os respectivos EC<sub>50</sub>, sendo os valores apresentados na Tabela 2 a média dos três valores.

Tabela 2 - Relações % redução de DPPH vs concentração de hidrolisado (C) e valores de EC<sub>50</sub> médios dos diferentes hidrolisados estudados.

Hidrolisado	Equação da recta			EC <sub>50</sub> (mg/ml)
	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	
Ba1	$\%red=0,915C+10,121$ $R^2 = 0,9677$	$\%red=0,946C+8,482$ $R^2 = 0,9633$	$\%red=0,9565C+8,916$ $R^2 = 0,9620$	43,47±0,479
Ba2	$\%red=0,8743C+10,87$ $R^2 = 0,9513$	$\%red=0,9253C+8,595$ $R^2 = 0,9507$	$\%red=0,911C+9,741$ $R^2 = 0,9581$	44,57±0,303
Ba3	$\%red=0,709C+1,272$ $R^2 = 0,9927$	$\%red=0,755C-0,061$ $R^2 = 0,9784$	$\%red=0,7511C+1,251$ $R^2 = 0,9741$	66,63±1,897
Sa1	$\%red=1,2974C+11,162$ $R^2 = 0,9046$	$\%red=1,287C+11,309$ $R^2 = 0,9162$	$\%red=1,3276C+11,162$ $R^2 = 0,8842$	29,50±0,486
Sa2	$\%red=1,044C+6,741$ $R^2 = 0,9425$	$\%red=1,067C+5,673$ $R^2 = 0,9504$	$\%red=1,012C+9,940$ $R^2 = 0,9399$	40,85±1,099
So1	$\%red=0,918C+9,625$ $R^2 = 0,9709$	$\%red=0,9593C+6,310$ $R^2 = 0,9752$	$\%red=0,930C+9,663$ $R^2 = 0,9615$	44,29±1,121
So2	$\%red=1,051C+11,007$ $R^2 = 0,9534$	$\%red=1,028C+13,730$ $R^2 = 0,9305$	$\%red=0,9386C+17,928$ $R^2 = 0,9490$	35,52±1,485
So3	$\%red=0,978C+13,999$ $R^2 = 0,9301$	$\%red=1,043C+10,138$ $R^2 = 0,9392$	$\%red=1,032C+12,242$ $R^2 = 0,9262$	37,19±0,880

Na figura 6 estão representados os valores de  $EC_{50}$  os quais foram também calculados em mgN/ml, dado que os diferentes hidrolisados não apresentavam o mesmo teor de azoto. Porém, os valores de  $EC_{50}$  expressos desse modo apresentavam o mesmo tipo de distribuição.

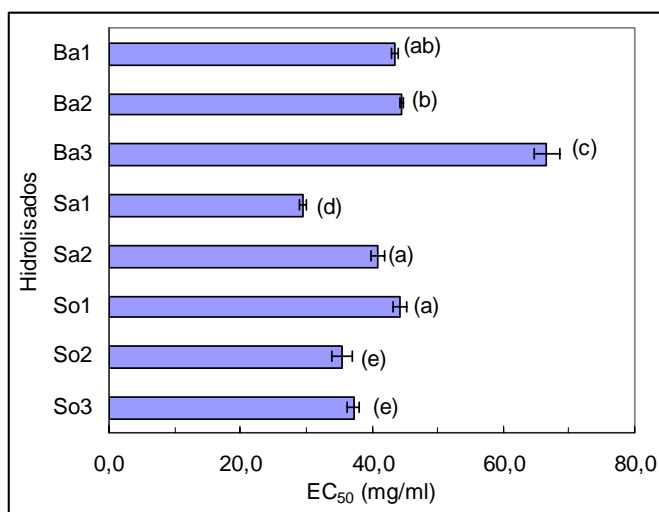


Figura 6 – Valores de  $EC_{50}$  (mg/ml) dos vários hidrolisados. Os resultados assinalados com letras diferentes são significativamente diferentes ( $P < 0,05$ ).

Em paralelo, foram também determinados os valores de  $EC_{50}$  do BHA, BHT e ácido ascórbico, seguindo a mesma metodologia, os quais estão representados graficamente na figura 7. No Anexo II encontram-se os resultados obtidos com estes antioxidantes.

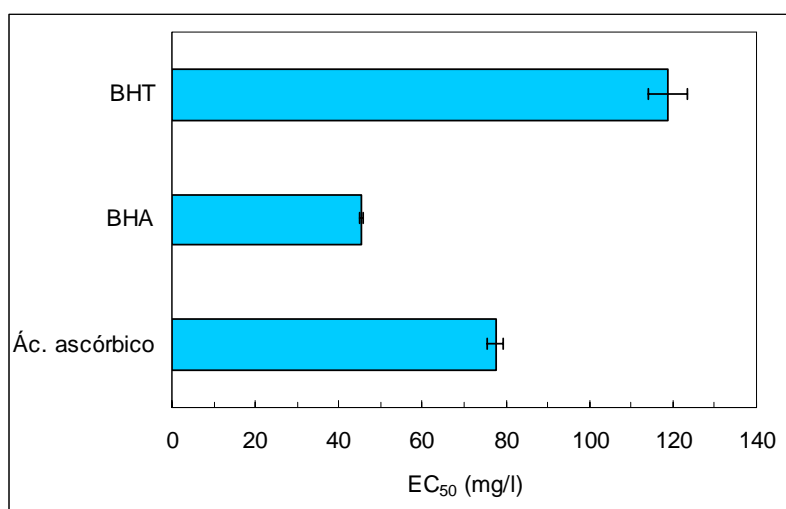


Figura 7 – Valores de  $EC_{50}$  (mg/l) do BHT, BHA e ácido ascórbico. Cada resultado é a média de três determinações.

De um modo geral, verificou-se uma boa concordância entre os valores da capacidade antiradicalar apresentados na figura 4 e os valores de EC<sub>50</sub> (Fig. 6), registando o hidrolisado Sa1 a maior actividade antiradicalar e o Ba3 a menor.

A comparação dos valores de EC<sub>50</sub> dos três oxidantes testados com os obtidos por Brand-Williams *et al.* (1995) mostra algumas diferenças. Assim, no caso do BHA o valor obtido (45,5 mg/ml) era muito concordante com o referido por estes autores (45 mg/l). Porém, os valores de EC<sub>50</sub> do BHT e do ácido ascórbico eram cerca do dobro dos mencionados por estes autores, 55,5 mg/l para o BHT e 39 mg/l para o ácido ascórbico. As diferenças verificadas podem atribuir-se ao facto destes autores terem utilizado metanol como solvente do DPPH. Efectivamente, Zhou *et al.* (2005) verificaram, em ensaios com DPPH, que os extractos metalónicos de antioxidantes de trigo apresentavam maior actividade antioxidante do que os respectivos extractos etanólicos.

Ao comparar os valores de EC<sub>50</sub> dos hidrolisados com os dos antioxidantes, verifica-se que os valores destes últimos eram cerca de mil vezes inferiores aos dos hidrolisados o que põe em evidência a baixa actividade antiradicalar destes produtos. No entanto, é de admitir que estes hidrolisados possuam fracções de péptidos que apresentem maior actividade antiradicalar, tal como verificado por Jao e Ko (2002) que isolaram fracções peptídicas de hidrolisados obtidos da água de cozedura de atum as quais apresentavam actividade muito semelhante às do BHA e do ácido ascórbico.

A actividade antiradicalar dos hidrolisados depende também do método de preparação usado. Nesse sentido, Wu *et al.* (2003) verificaram, em estudos realizados com cavala-pintada (*Scomber austriasicus*), que existia uma boa correlação entre a concentração de péptidos presentes em autolisados (produtos obtidos com as enzimas endógenas) ou em hidrolisados obtidos com a protease N (EC 3.4.21.66) e a respectiva actividade antioxidante.

#### *Capacidade antioxidante dos hidrolisados proteicos medida através da inibição da auto-oxidação do ácido linoleico*

Os resultados da evolução da oxidação do ácido linoleico mantido a 60 °C (Fig. 8) apresentam um máximo após 36 horas. Este tempo é consideravelmente inferior ao obtido por Sánchez-Moreno *et al.* (1999) que obtiveram o máximo após 96 horas de incubação. Porém, estes autores realizaram os ensaios a uma temperatura de 40 °C o que poderá explicar a grande diferença entre os períodos ao fim dos quais foi atingido o nível máximo dos hidroperóxidos.

Nestes ensaios utilizou-se metanol como solvente, tal como Yen *et al.* (2003) e Kim *et al.* (2005), mas, de acordo com Mihaljevic *et al.* (1996), o metanol pode reduzir o  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$ , o que levaria à determinação de uma menor concentração de  $\text{Fe}^{3+}$  e, por conseguinte, a uma sobrestimação da actividade antioxidante do produto em estudo. De acordo com aqueles últimos autores, as reacções envolvidas no processo seriam as seguintes:



Na figura 9 encontram-se os resultados da inibição da auto-oxidação do ácido linoleico pelos vários hidrolisados, usando concentrações de 50 mg/ml. Nesta figura está também indicada a inibição conseguida com BHT, em que se usou uma concentração de 2,7 mg/ml. A inibição, tal como a redução de DPPH, foi calculada pela diferença entre as absorvências resultantes dos peróxidos formados numa emulsão de ácido linoleico ( $A_{\text{inib0}}$ ) e noutra contendo este ácido e um hidrolisado ou BHT ( $A_{\text{inibH}}$ ), ou seja, Inibição =  $A_{\text{inib0}} - A_{\text{inibH}}$ .

Os resultados da inibição da auto-oxidação do ácido linoleico indicam que o hidrolisado Ba3 se destacava significativamente dos restantes, apresentando o menor poder antioxidante.

Ressaltam, igualmente, as diferenças entre os três hidrolisados de bacalhau, as quais podem estar relacionadas com o processo seguido nas respectivas produções. Aliás, estas diferenças foram também registadas no ensaio com o DPPH, embora se trate de um ensaio de tipo muito diferente. Em ambos os ensaios registou-se a mesma

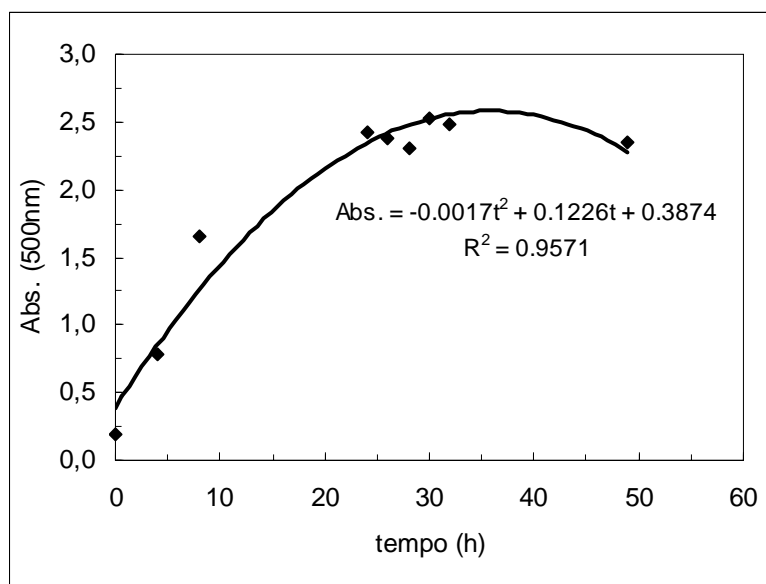


Figura 8 – Evolução do nível de hidroperóxidos durante a auto-oxidação do ácido linoleico.

ordem decrescente do poder antioxidante, isto é, Ba1>Ba2>Ba3. Nos hidrolisados das outras espécies registaram-se também diferenças significativas entre eles, embora menos notórias.



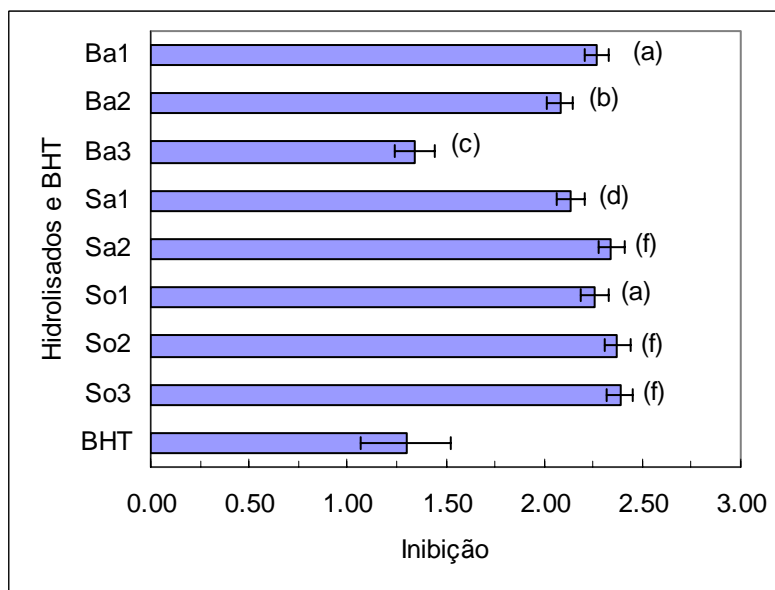


Figura 9 – Inibição da auto-oxidação do ácido linoleico pelos hidrolisados e pelo BHT. Cada resultado é a média de dez ensaios repetidos em triplicado. Os valores assinalados com letras diferentes são significativamente diferentes estatisticamente ( $P < 0,05$ ).

A fim de permitir a comparação do poder antioxidante dos vários hidrolisados, medido através da inibição da oxidação do ácido linoleico, determinou-se o valor das respectivas capacidades antioxidantes. Para cada hidrolisado foram realizados três ensaios independentes, apresentando-se na figura 10, como exemplo, os resultados obtidos no ensaio 1 com o hidrolisado de salmão Sa1. A totalidade dos resultados obtidos nestes ensaios encontram-se no Anexo II.

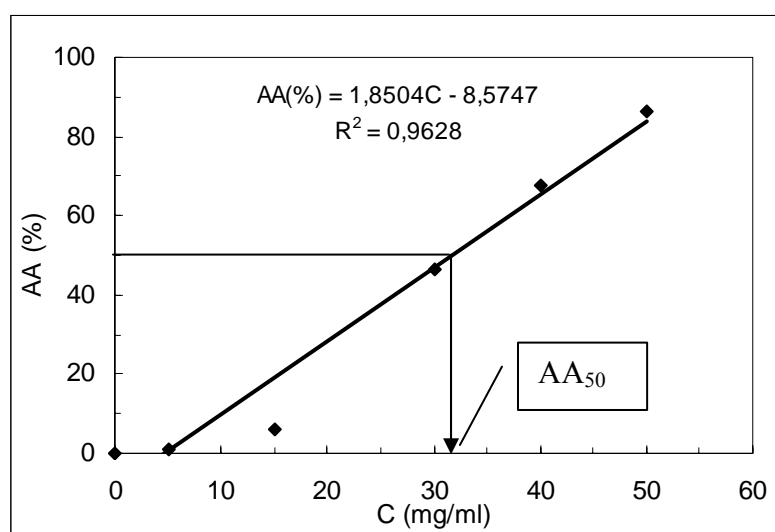


Figura 10 – Inibição da oxidação do ácido linoleico em função da concentração de hidrolisado de salmão Sa1 (ensaio 1).

Na tabela 3 apresentam-se as equações das rectas que melhor se ajustam aos resultados experimentais obtidos em cada ensaio com os hidrolisados, bem como o valor médio da respectiva capacidade antioxidante. Na figura 11 apresentam-se, graficamente, os valores de AA<sub>50</sub> os quais, quando expressos em mgN/ml, apresentavam o mesmo tipo de distribuição, tal como no caso dos valores de EC<sub>50</sub>.

Tabela 3 – Valores de AA<sub>50</sub> dos diferentes hidrolisados estudados.

Hidrolisado	Equação da recta			AA <sub>50</sub> (mg/ml)
	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	
Ba1	AA(%)=1,869C-5,834 $R^2 = 0,9275$	AA(%)=1,897C-8,035 $R^2 = 0,9501$	AA(%)=2,022C-10,622 $R^2 = 0,9650$	<b>30,16±0,383</b>
Ba2	AA(%)=1,835C-16,152 $R^2 = 0,9253$	AA(%)=1,834C-15,186 $R^2 = 0,9555$	AA(%)=1,859C-15,743 $R^2 = 0,9557$	<b>35,65±0,351</b>
Ba3	AA(%)=1,076C+0,822 $R^2 = 0,9596$	AA(%)=1,108C+2,958 $R^2 = 0,9254$	AA(%)=1,145C-0,551 $R^2 = 0,9503$	<b>44,09±1,616</b>
Sa1	AA(%)=1,850C+8,5 $R^2 = 0,9628$	AA(%)=1,885C-11,676 $R^2 = 0,9265$	AA(%)=2,005C-13,424 $R^2 = 0,9591$	<b>31,80±0,611</b>
Sa2	AA(%)=1,982C-3,773 $R^2 = 0,9877$	AA(%)=2,110C-4,929 $R^2 = 0,9557$	AA(%)=2,044C-5,398 $R^2 = 0,9631$	<b>26,75±0,623</b>
So1	AA(%)=1,966C-1,146 $R^2 = 0,9390$	AA(%)=1,856C-1,413 $R^2 = 0,9304$	AA(%)=1,954C+0,058 $R^2 = 0,8938$	<b>26,42±1,124</b>
So2	AA(%)=1,521C+26,974 $R^2 = 0,8781$	AA(%)=1,541C+25,391 $R^2 = 0,8975$	AA(%)=1,475C+29,912 $R^2 = 0,9339$	<b>13,76±2,129</b>
So3	AA(%)=1,803C-0,848 $R^2 = 0,9676$	AA(%)=1,865C-3,831 $R^2 = 0,99481$	AA(%)=1,882C-1,7246 $R^2 = 0,9704$	<b>28,18±0,383</b>

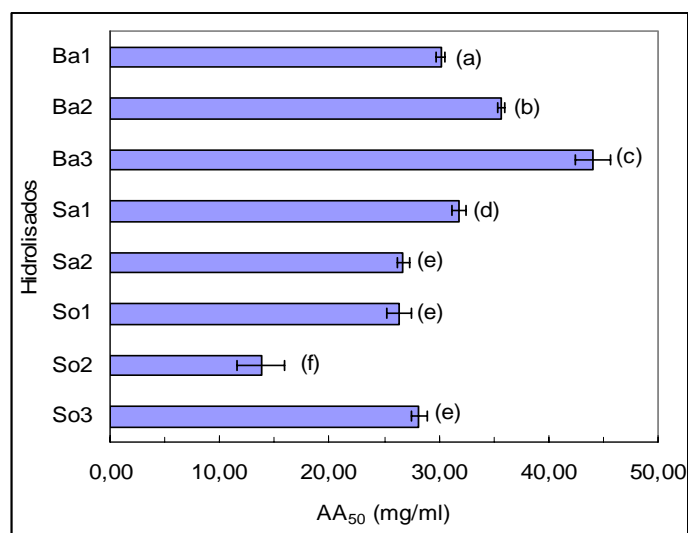


Figura 11 - Valores de AA<sub>50</sub> (mg/ml). Os resultados assinalados com letras diferentes são significativamente diferentes ( $P < 0,05$ ).

Os resultados obtidos neste ensaio com o BHA e BHT apresentam-se na Tabela 4 e na figura 12. Os valores de AA<sub>50</sub> estão em concordância com os obtidos nos ensaios em que se utilizou a mesma concentração de hidrolisado (Fig. 9). Além disso, estes valores permitem concluir que o hidrolisado So2 se destacava dos restantes, apresentando a maior actividade antioxidante.

Tabela 4 – Valores de AA<sub>50</sub> (mg/l) dos antioxidantes BHA e BHT.

Antioxidante	Equação da recta			AA <sub>50</sub> (mg/l)
	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	
BHA	AA(%)=18,079C+5,4189 $R^2 = 0,8384$	AA(%)=17,129C+4,9163 $R^2 = 0,8591$	AA(%)=16,897C+5,5907 $R^2 = 0,8051$	<b>2,573±0,095</b>
BHT	AA(%)=16,198C+5,6607 $R^2 = 0,8669$	AA(%)=15,265C+10,689 $R^2 = 0,9012$	AA(%)=14,53C+12,592 $R^2 = 0,8501$	<b>2,629±0,094</b>

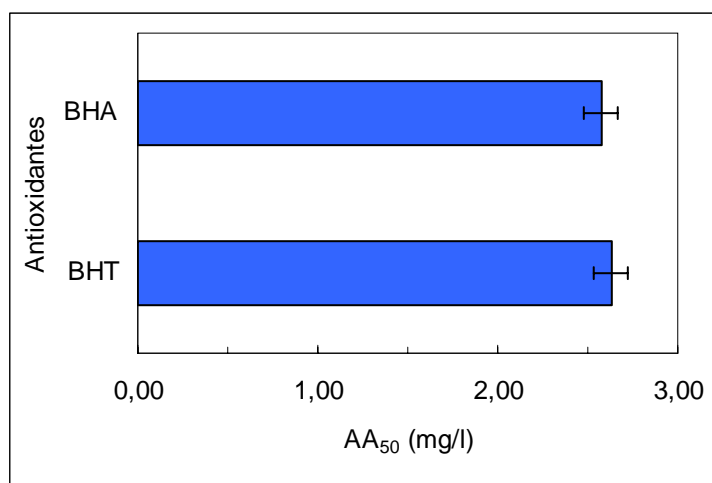


Figura 12 – Valores de AA<sub>50</sub> do BHA e do BHT. Cada resultado é a média dos resultados obtidos em três ensaios.

A relação entre os valores de AA<sub>50</sub> do BHA e do BHT e o dos diferentes hidrolisados é de 1:10000, o que mostra a actividade antioxidante muito baixa destes produtos, tal como, aliás, já havia sido medida no ensaio com o DPPH.

Sathivel *et al.* (2003) verificaram que a actividade antioxidante de hidrolisados de arenque dependia da fracção (inteiro, descabeçado e eviscerado, cabeças, gónadas) utilizada na preparação. Porém, a percentagem de inibição da autoxidação do ácido linoleico obtida com estes hidrolisados era cerca de um sexto a um meio da conseguida com BHA, BHT e  $\alpha$ -tocoferol. Também Jeon *et al.* (1999) obtiveram hidrolisados de bacalhau que apresentavam

uma actividade antioxidante de cerca de metade da verificada com  $\alpha$ -tocoferol. A separação do hidrolisado, por ultrafiltração, em várias fracções mostrou que a correspondente a 5 kDa apresentava uma actividade antioxidante semelhante à do  $\alpha$ -tocoferol.

Wu *et al.* (2003), conforme já referido, obtiveram hidrolisados de cavala pintada que apresentavam uma actividade antioxidante muito superior à dos autolisados preparados a partir da mesma espécie. Além disso, verificaram que os péptidos presentes na fracção do hidrolisado com aproximadamente 1400 Da apresentavam o máximo de actividade antioxidante para uma sistema de auto-oxidação de ácido linoleico.

#### *Estabilidade antioxidante dos hidrolisados proteicos*

A banha de porco comercial utilizada nestes ensaios tinha dois antioxidantes (BHA e BHT), conforme referido no rótulo da embalagem. A presença destes antioxidantes levou a que, de um modo geral, num conjunto de ensaios preliminares se registasse apenas um pequeno aumento no período de indução o qual não foi significativamente diferente do obtido apenas com a banha. Estes resultados sugeriam que a acção destes antioxidantes se sobrepunha à actividade antioxidante dos hidrolisados. Além disso, o pequeno aumento do período de indução obtido nestes ensaios com os diferentes hidrolisados levou também a admitir que não teriam ocorrido interacções entre estes produtos e o BHA ou o BHT.

A fim de eliminar a acção dos antioxidantes BHA e BHT procedeu-se ao aquecimento prévio da banha e controlou-se o período de indução em função do tempo de aquecimento (Fig. 13). Considerou-se que um aquecimento durante 10 minutos a 275 °C era suficiente, pois que o período de indução se aproximava do valor de 0,82 h referido por Lee *et al.* (2005) como o característico da banha sem antioxidantes. Além disso, verificou-se que a banha aquecida durante tempos mais dilatados apresentava períodos de indução erráticos devido à presença de muitos produtos resultantes da oxidação do substrato.

Com base nestes resultados, realizaram-se os ensaios de estabilidade antioxidante dos hidrolisados usando banha de porco previamente aquecida a 275 °C durante 10 minutos. Os períodos de indução assim obtidos com os diferentes hidrolisados apresentam-se na figura 14.

Nos ensaios com o Rancimat, utilizou-se banha de porco como substrato a oxidar porque ensaios prévios realizados com óleos de peixe mostraram que se oxidavam muito rapidamente, em virtude do seu elevado grau de insaturação, levando a que não fosse possível determinar períodos de indução nas condições do ensaio. Aliás, a utilização da banha de porco

é comum no estudo das características antioxidantes de hidrolisados proteicos obtidos a de subprodutos alimentares (Flaczyk *et al.*, 2003), extractos de diferentes produtos (Velasco *et al.*, 2004; Murcia *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2005) e farinhas de tremçoço (Lampart-Szczapa *et al.*, 2003).

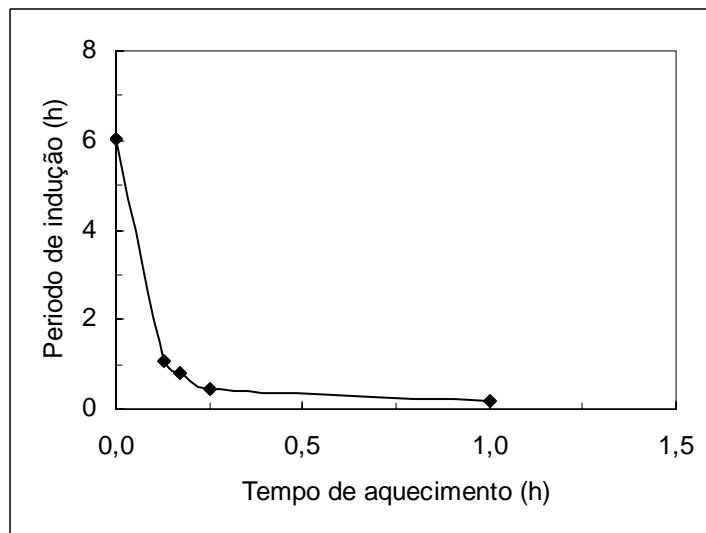


Figura 13 - Evolução do período de indução da banha de porco em função do tempo de aquecimento a 275 °C. Cada resultado é a média de três determinações.

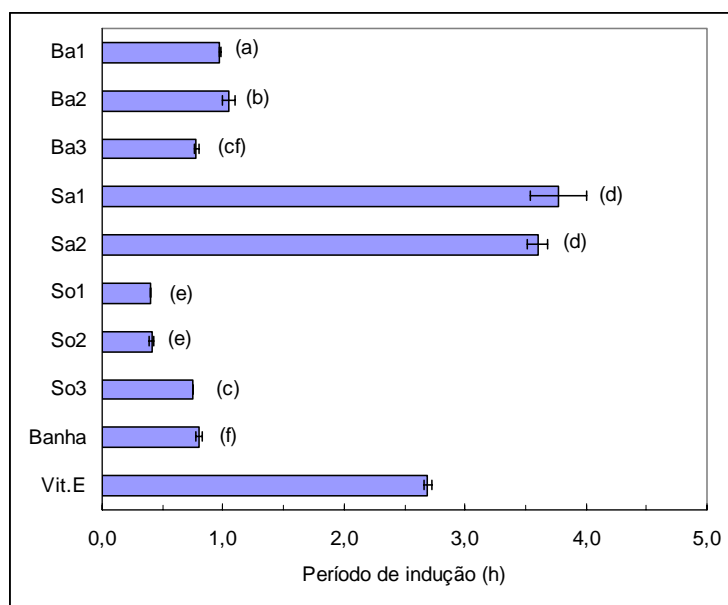


Figura 14 – Período de indução da banha de porco (pré-aquecida) com os vários hidrolisados e o  $\alpha$ -tocoferol (toc). Os valores assinalados com letras diferentes são significativamente diferentes ( $P < 0,05$ ).

Os períodos de indução conseguidos com os diferentes hidrolisados apresentaram valores muito diferentes. De um modo geral, verificou-se que os produtos preparados a partir da mesma espécie apresentavam períodos de indução idênticos. Assim, os maiores períodos de indução foram conseguidos com os hidrolisados Sa1 e Sa2, os quais eram significativamente superiores ( $P < 0,05$ ) ao da banha pré-aquecida, excedendo-o em cerca de 373 e 350 %, respectivamente. Relativamente ao  $\alpha$ -tocoferol, os períodos de indução dos hidrolisado Sa1 e Sa2 aumentaram, respectivamente, cerca de 41 % e de 34 %. Estes resultados podem considerar-se mais expressivos do que os obtidos por Flaczyck *et al.* (2003) com hidrolisados preparados a partir de penas de aves, tendo registado aumentos máximos de 80 % em relação à banha.

No caso dos hidrolisados de solha, So1, So2 e So3, os períodos de indução apresentavam diminuições de 50, 49 e 6 %, respectivamente, em relação à banha. Esta redução do período de indução leva a admitir que estes hidrolisados, nas condições do ensaio, actuam como pró-oxidantes.

Os períodos de indução dos hidrolisados de bacalhau Ba1 e Ba2, por sua vez, eram significativamente superiores ( $P < 0,05$ ) ao da banha, embora os aumentos se cifrassem apenas em cerca de 21 % no caso do Ba1 e 31 % no do Ba2. O período de indução da banha com o hidrolisado Ba3 apresentou uma diminuição de *ca.* 3 % em relação ao da banha, mas os valores não eram significativamente diferentes ( $P > 0,05$ ).

#### *Efeito sinérgico entre os hidrolisados e o $\alpha$ -tocoferol*

O estudo do possível efeito sinérgico entre os diferentes hidrolisados e o  $\alpha$ -tocoferol foi realizado no Rancimat usando banha pré-aquecida, tal como referido anteriormente. Nas figuras 15 e 16 apresentam-se dois exemplos da determinação do período de indução nos sistemas envolvendo, respectivamente, o hidrolisado Ba1 e  $\alpha$ -tocoferol e o hidrolisado So2 e  $\alpha$ -tocoferol. No primeiro caso está bem evidenciado o aumento considerável do período de indução no sistema em que se adicionou o hidrolisado Ba1 e o  $\alpha$ -tocoferol à banha. Trata-se, por conseguinte, de uma situação em que parece registar-se um efeito sinérgico entre o hidrolisado e o  $\alpha$ -tocoferol. No segundo caso, verificou-se, precisamente, uma situação em que a presença da mistura do hidrolisado So2 e do  $\alpha$ -tocoferol conduziu a um período de indução inferior ao obtido quando se utilizou apenas o  $\alpha$ -tocoferol.

Na figura 17 apresentam-se os valores do período de indução da banha com os diferentes hidrolisados e com a mistura de cada hidrolisado com o  $\alpha$ -tocoferol.

Para verificar a ocorrência de efeito sinérgico entre os hidrolisados e o  $\alpha$ -tocoferol, teve-se em consideração o seguinte critério:

$$PI_{\text{mistura}} - (PI_{\text{hid}} + PI_{\alpha\text{toc}}) > 0 \quad \Rightarrow \quad \text{verificou-se sinergia}$$

$$PI_{\text{mistura}} - (PI_{\text{hid}} + PI_{\alpha\text{toc}}) < 0 \quad \Rightarrow \quad \text{não se verificou sinergia}$$

Com base nos valores do período de indução obtidos e tendo em consideração o critério referido, elaborou-se a Tabela 6.

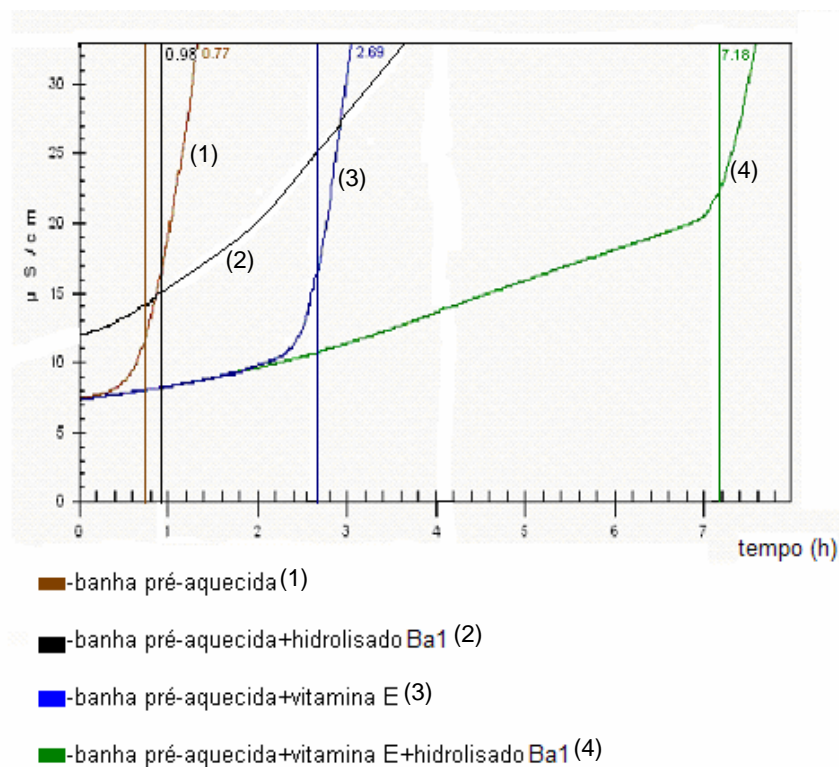


Figura 15 – Evolução da condutividade durante o ensaio com a banha de porco (pré-aquecida) e o hidrolisado Ba1 ou com a mistura deste hidrolisado com o  $\alpha$ -tocoferol. Para comparação apresenta-se também a evolução no ensaio apenas com a banha de porco e desta com o  $\alpha$ -tocoferol.

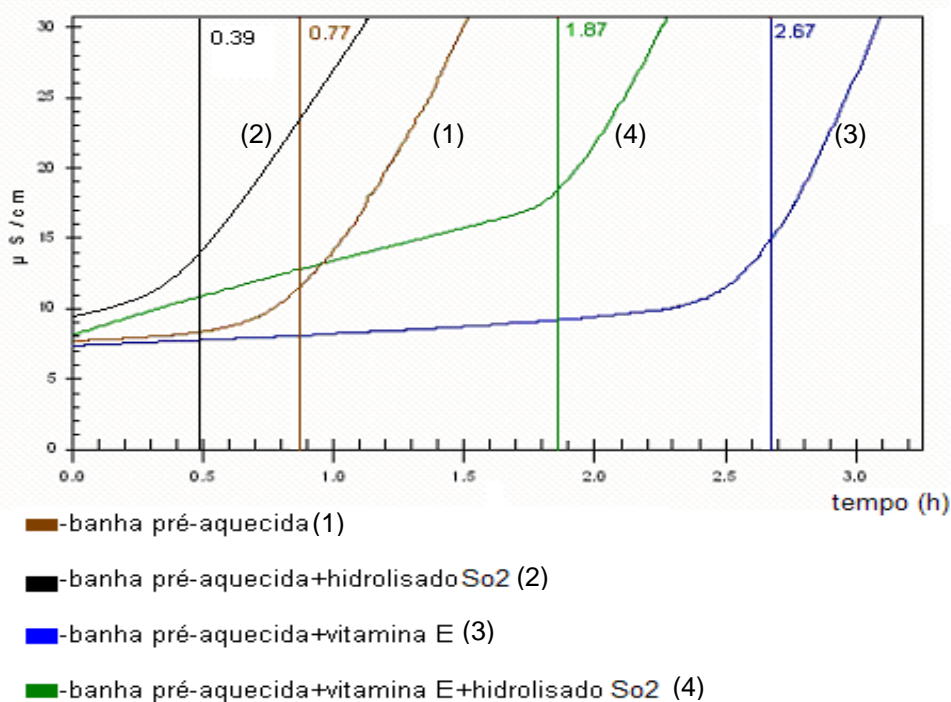


Figura 16 – Evolução da condutividade durante o ensaio com a banha de porco (pré-aquecida) e o hidrolisado So2 ou com a mistura deste hidrolisado com o  $\alpha$ -tocoferol. Para comparação apresenta-se também a evolução no ensaio apenas com a banha de porco e desta com o  $\alpha$ -tocoferol.

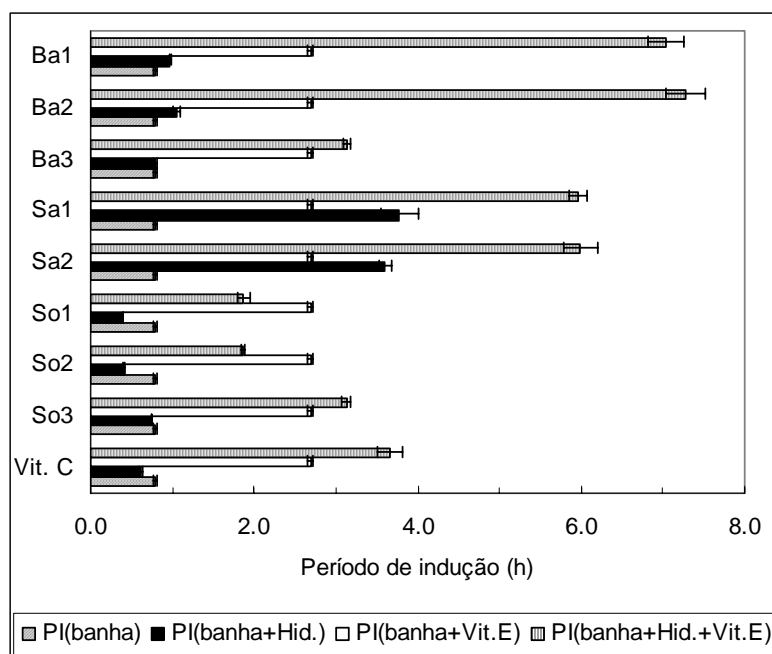


Figura 17 – Período de indução da banha de porco (pré-aquecida) com os vários hidrolisados e com a mistura destes com o  $\alpha$ -tocoferol. Cada resultado é a média de três determinações.



Nos ensaios em que se utilizaram os hidrolisados de salmão em conjunto com o  $\alpha$ -tocoferol registaram-se aumentos de 122 % (Sa1) e 123 % (Sa2) em relação ao ensaio com a banha (Fig. 17). Porém, não parece ter ocorrido nenhuma sinergia uma vez que a soma dos períodos de indução eram inferiores aos registados nos ensaios em que se usaram os dois produtos individualmente (Tabela 6). Os aumentos do período de indução verificados devem-se à acção antioxidante de cada um dos produtos.

Tabela 6 – Efeito sinérgico entre o  $\alpha$ -tocoferol e os hidrolisados em estudo.

Hidrolisado	Teor em azoto (%)	$PI_{mistura} - (PI_{hid} + PI_{atoc})$	Sinergia
Ba1	73,8	3,362	<u>Sim</u>
Ba2	73,3	3,537	<u>Sim</u>
Ba3	72,0	-0,333	Não
Sa1	71,4	-0,510	Não
Sa2	70,7	-0,297	Não
So1	72,9	-1,217	Não
So2	68,0	-1,233	Não
So3	70,7	-0,307	Não

Nos ensaios em que se utilizaram os hidrolisados de solha So1 e So2 e  $\alpha$ -tocoferol observou-se um comportamento concordante com o registado anteriormente no estudo da estabilidade destes dois hidrolisados no Rancimat. Efectivamente, o período de indução registado nos ensaios com a mistura de cada um dos hidrolisados com o  $\alpha$ -tocoferol diminuiu cerca de 30 % em relação ao período de indução obtido nos ensaios em que se utilizou apenas  $\alpha$ -tocoferol (Fig. 17). O hidrolisado So3, por sua vez, apresentou um comportamento diferente dos outros dois hidrolisados de solha, na medida em que se verificou um aumento do período de indução nos ensaios onde foi utilizado em conjunto com o  $\alpha$ -tocoferol. No entanto, não se verificou nenhum efeito sinérgico (Tabela 6). Estes diferentes comportamentos entre os três hidrolisados de solha podem atribuir-se a diversos factores, tais como a qualidade da matéria-prima, grau de hidrólise dos hidrolisados, presença de lípidos e o seu grau de oxidação.

No comportamento antioxidante dos hidrolisados de bacalhau registaram-se também diferenças entre eles, tal como nos de solha. Assim, no sistema com o hidrolisado Ba3 e o  $\alpha$ -tocoferol verificou-se um aumento de período de indução, mas não parece ter havido sinergia entre eles. Por sua vez, no caso dos hidrolisados Ba1 e Ba2 parece ter-se verificado um efeito

sinérgico com o  $\alpha$ -tocoferol. Nos ensaios com estas misturas os aumentos do período de indução, em relação ao controlo com  $\alpha$ -tocoferol, foram de 161,3 % para o Ba1 e 170,3 % no caso do Ba2. O alto teor de azoto destas amostras (73,8 % no Ba1 e 73,3 % no Ba2) leva a considerar que a forma oxidada do  $\alpha$ -tocoferol possa ser reduzida por grupos com azoto. A capacidade de regeneração do  $\alpha$ -tocoferol por vários péptidos (carnosina, anserina e ofidina) foi demonstrada por Boldyrev *et al.* (1988), sugerindo uma acção sinérgica entre estes péptidos e o  $\alpha$ -tocoferol na inibição da oxidação lipídica. Também Taylor *et al.* (1981) mostraram que alguns aminoácidos são capazes de estabelecer ligações covalentes com o Trolox-C, um derivado sintético do  $\alpha$ -tocoferol, para produzir Troloxil-aminoácidos, compostos com uma actividade antioxidante superior à do Trolox-C.

Os hidrolisados Ba1 e Ba2, que pareciam evidenciar um efeito sinérgico com o  $\alpha$ -tocoferol, apresentavam igualmente os teores mais elevados de azoto, levando a admitir que o poder antioxidante dos hidrolisados estaria relacionado com o teor deste elemento. Porém, não se registou uma relação significativa entre os valores de  $\Delta = PI_{mistura} - (PI_{Hid.} + PI_{\alpha toc.})$  obtidos para os vários hidrolisados e o respectivo teor em azoto. Todavia, deve ter-se em consideração o número de hidrolisados analisados foi limitado e que o teor de azoto situava-se numa gama relativamente estreita. Além disso, a tentativa de correlacionar o poder antioxidante com o teor em azoto constitui uma primeira aproximação, pois que nem todos os aminoácidos apresentam o mesmo efeito antioxidante, havendo mesmo alguns, como a cisteína, que apresentam um efeito pró-oxidante (Marcuse, 1960).

A fim de comparar os resultados obtidos nos ensaios de determinação da actividade antiradicalar e de inibição da auto-oxidação do ácido linoleico, apresenta-se na figura 18 os valores de  $EC_{50}$  e  $AA_{50}$ .

Embora os dois métodos se baseiem em princípios muito distintos, verifica-se que, de um modo geral, os resultados apresentam um padrão semelhante. Assim, a mesma ordem crescente das actividades antiradicalar e antioxidante foi registada nos hidrolisados de bacalhau (Ba1, Ba2 e Ba3). Também no caso dos hidrolisados de solha (So1, So2 e So3) se verificou a mesma ordem dos resultados obtidos pelas duas técnicas, sendo de salientar, que ao hidrolisado de solha So2 correspondeu o menor valor de  $AA_{50}$  e um dos valores mais baixos de  $EC_{50}$ . Por outro lado, no hidrolisado de salmão Sa1 não se registou a mesma tendência, pois que apresentava o menor valor de  $EC_{50}$ , mas o terceiro maior de  $AA_{50}$ .

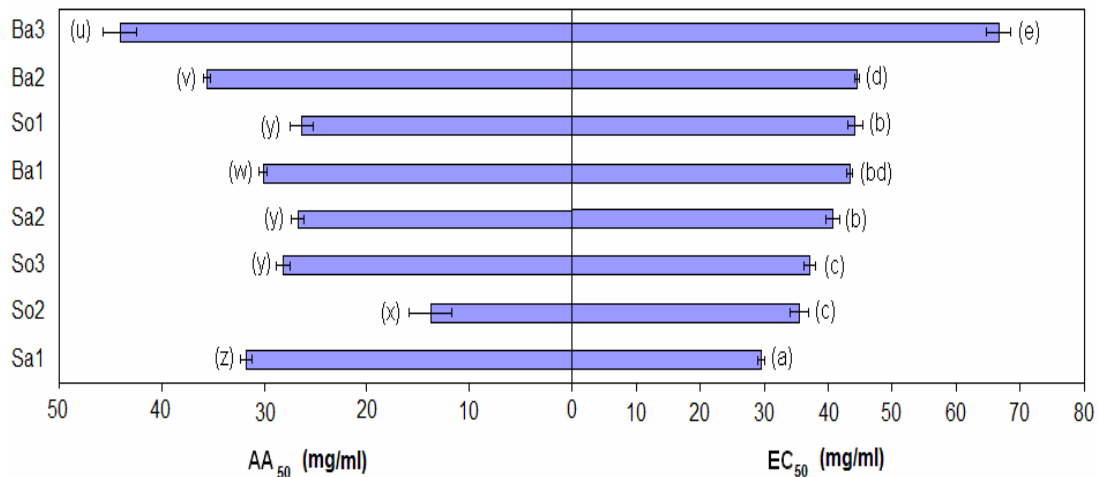


Figura 18 – Comparação entre os valores de AA<sub>50</sub> e EC<sub>50</sub> obtidos com os vários hidrolisados. Os valores assinalados com letras diferentes são significativamente diferentes ( $P < 0,05$ ).

Na figura 19 apresentam-se os valores do período de indução e de EC<sub>50</sub>. Neste caso não se regista um paralelismo tão grande como entre os valores de EC<sub>50</sub> e AA<sub>50</sub>, mas é de assinalar a concordância entre os resultados respeitantes aos hidrolisados de bacalhau que apresentavam uma baixa actividade antiradicalar e também períodos de indução curtos. Por outro lado, o hidrolisado de salmão Sa1, com a maior actividade antiradicalar, exibiu também o período de indução mais dilatado.

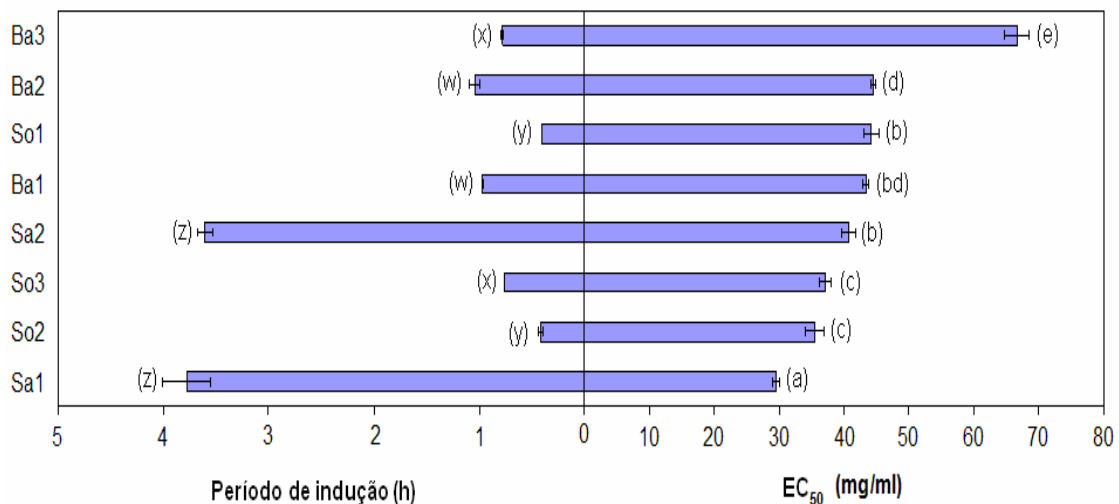


Figura 19 – Comparação entre os valores do período de indução e de EC<sub>50</sub> obtidos com os vários hidrolisados. Os valores assinalados com letras diferentes são significativamente diferentes ( $P < 0,05$ ).

A comparação entre os valores de  $AA_{50}$  e o período de indução apresenta-se na figura 20. Também neste caso, não se registou, de um modo geral, uma boa concordância entre os resultados obtidos pelas duas técnicas. Este é o caso, por exemplo, do hidrolisado So2 que tem o menor  $AA_{50}$  e apresenta um efeito pró-oxidante nos ensaios realizados no Rancimat. Todavia, é de salientar a concordância dos resultados no que se refere aos hidrolisados de bacalhau.

A não concordância que se regista entre os resultados obtidos pelas diferentes técnicas, em particular entre a de estabilidade antioxidante em que se utiliza o Rancimat e as duas outras, leva a admitir que os grupos funcionais envolvidos nas diferentes condições dos ensaios possam não ser os mesmos ou que a presença nos hidrolisados de outros tipos de compostos para além dos péptidos que apresentem propriedades antioxidantes e que, por conseguinte, possam desempenhar um papel importante nos ensaios.

É de salientar que os dois hidrolisados de bacalhau (Ba1 e Ba2) que demonstraram uma possível sinergia com o  $\alpha$ -tocoferol, apresentavam, de um modo geral, nos métodos ensaiados um baixo poder antioxidante.

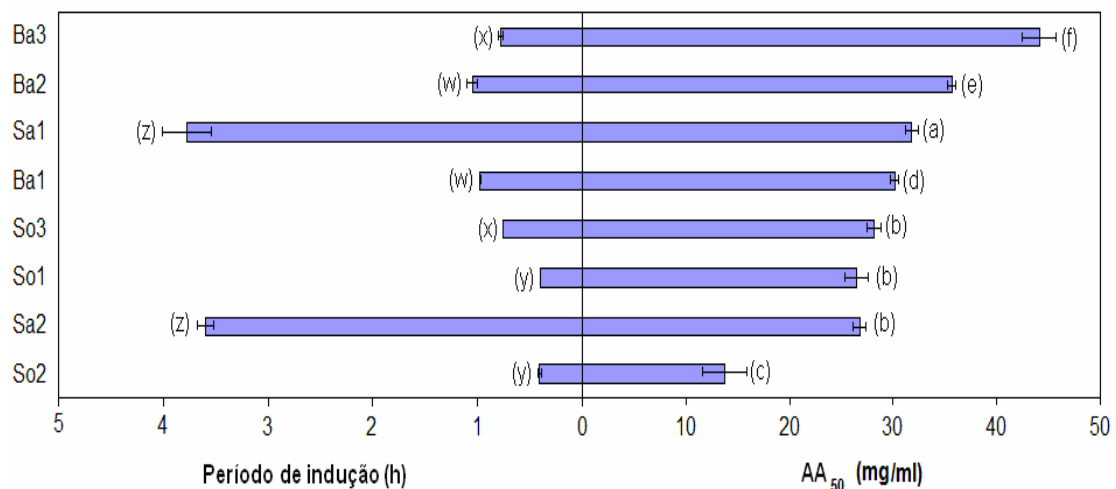


Figura 20 – Comparação dos valores do período de indução e de  $AA_{50}$  obtidos com os vários hidrolisados. Os valores assinalados com letras diferentes são significativamente diferentes ( $P < 0,05$ ).

### Conclusões:

Os resultados obtidos no presente trabalho permitem apresentar as seguintes conclusões:

- Os hidrolisados de salmão evidenciaram o maior poder antioxidante, registando-se igualmente uma boa concordância com os valores de  $EC_{50}$  e de  $AA_{50}$ .

- Os hidrolisados de solha apresentaram um baixo poder antioxidante, mas os resultados obtidos pelas diferentes técnicas não foram concordantes.
- Todos os hidrolisados de bacalhau revelaram um baixo poder antioxidante, mas parece ter-se registado um efeito antioxidante sinérgico entre os hidrolisados Ba1 e Ba2 e o  $\alpha$ -tocoferol.

## AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi elaborado no âmbito do projecto PO *Mare* “Biotecnologia dos Organismos Marinhos – 22-05-01-FDR-0007”.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AOAC, 1990. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 15 th ed. Association of Official Analytical Chemists, Inc. Arlington, USA, 1298 p.
- AUBOURG, S. P., 1999. Recent advances in assessment of marine lipid oxidation by fluorescence. Review. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 76: 409-419.
- BANDARRA, N. M.; CAMPOS, R. M.; BATISTA, I.; NUNES, M. L.; EMPIS, J. M., 1999. Antioxidant synergy of  $\alpha$ -tocopherol and phospholipids. *JAACS*, 76 (8): 905-913.
- BÖHLEN, P.; STEIN, S.; DAIRMAN, W.; UDENFRIEND, S., 1973. Fluorometric assay of protein in the nanogram range. *Arch. Biochem. Biophys.*, 155: 213-220.
- BOLDYREV, A. A.; DUPIN, A. M.; PINDEL, E. V.; EVERIN, S. E., 1988. Antioxidative properties of histidine-containing dipeptides from skeletal muscles of vertebrates. *Comp. Biochem. Physiol.*, 898 (2): 245-250.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C., 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm.-Wiss. U.-Technol.*, 28 (1): 25-30.
- BUSINCO, L.; DREBORG, S.; EINARSON, R.; GIAMPIETRO, P. G.; HOST, A.; KELLER, K. M.; STROBEL, S.; WAHN, U., 1993. Hydrolysed cow's milk formulae allergenicity and use in treatment and prevention. An ESPACI Position Paper in Pediatric Allergy Immunol., 4: 101 – 111.
- CHAN, H. W.-S., 1987. The mechanism of autoxidation. In: H.W.-S. CHAN (Ed.), *Autoxidation of Unsaturated Lipids*, Academic Press Inc., London, England, pp. 1 – 16.
- CHAN, K. M.; DECKER, E. A., 1994. Endogenous skeletal muscle antioxidants. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 34: 403-426.

- CHEN, H.; MURAMOTO, K.; YAMAUCHI, F., 1995. Structural analysis of antioxidative peptides from soybean  $\beta$ -conglycinin. *J. Agric. Food Chem.*, 43 (3): 574-578.
- CHEN, H.; MURAMOTO, K.; YAMAUCHI, F.; FUJIMOTO, K.; NOKIHARA, K., 1998. Antioxidative properties of histidine-containing peptides designed from peptide fragments found in the digests of a soybean protein. *J. Agric. Food Chem.*, 46 (1): 49-53.
- ERIKSSON, C. E., 1987. Oxidation of lipids in food systems. In: H. W. S. CHAN (Ed.), *Autoxidation of unsaturated lipids*, Academic Press Inc., London, England, pp. 207-231.
- FLACZYK, E.; AMAROWICZ, R.; KORCZAK J., 2003. Antioxidant activity of protein hydrolyzates from by-products of the food industry. *Journal of Food Lipids*, 10: 129-140.
- FRANKEL, E. N., 1998. Foods. In: E.N. FRANKEL (Ed.), *Lipid oxidation*, The Oily Press, Dundee, Great Britain, pp. 187-225.
- GARDNER, H. W., 1979. Lipid hydroperoxide reactivity with proteins and amino acids: A review. *J. Agric. Food Chem.*, 27: 220 – 229.
- GROSCH, W., 1987. Reactions of hydroperoxides - products of low molecular weight. In: H. W. S. CHAN (Ed.), *Autoxidation of Unsaturated Lipids*, Academic Press Inc., London, England, pp. 96-140.
- JAO, C. L.; KO, W. C., 2002. 1,1-Diphenil-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging by protein hydrolyzates from tuna cooking juice. *Fisheries Science*, 40: 909-915.
- JEON, Y.; BYON, H.; KIM, S., 1999. Improvement of functional properties of cod frame protein hydrolysates using ultrafiltration membranes. *Process Biochemistry*, 35: 471-478.
- KAREL, M.; SCHAICH, K.; ROY, R. B., 1975. Interaction of peroxidizing methyl linoleate with some proteins and amino acids. *J. Agric. Food Chem.*, 23: 159 – 163.
- KIKUGAWA, K.; KATO, T.; HAYASAKA, A., 1991. Formation of dityrosine and other fluorescent amino acids by reaction of amino acids with lipid hydroperoxides. *Lipids*, 26: 922-929.
- KIM, M.; XU, Z.; BENTO, L. S. M.; DAY, D. F., 2005. Antioxidant activities of methanol extracts from crude sugar cane syrup. 2005 IFT Annual Meeting, New Orleans, Louisiana.
- LAMPART-SZCZAPA, E.; KORCZAK, J.; NOGALA-KALUCKA, M.; ZAWIRSKA-WOJTASIAK, R., 2003. Antioxidant properties of lupin seed products. *Food Chemistry*, 83: 279-285.
- LEE, S.-C.; JEONG, S.-M.; KIM, S.-Y.; NAM, K. C.; AHN, D. U., 2005. Effect of far-infrared irradiation on the antioxidant activity of defatted sesame meal extracts. *J. Agric. Food Chem.*, 53: 1495-1498.

- MAHMOUD, M. J.; MALONE, W. T.; CORDLE, C. T., 1992. Enzymatic hydrolysis of casein: Effect of degree of hydrolysis on antigenicity and physical properties. *J. Food Sci.*, 57, 1223 – 1229.
- MARCUSE, R., 1960. Antioxidative effect of amino-acids. *Nature*, 186 (4728): 886-887.
- MATSUSHITA, S., 1975. Specific interactions of linoleic acid hydroperoxides and their secondary degraded products with enzyme proteins. *J Agric Food Chem.*, 23: 150 - 154.
- MIHALJEVIC, B.; KATUSIN-RAZEM, B.; RAZEM, D., 1996. The reevaluation of the ferric thiocyanate assay for lipid hydroperoxides with special considerations of the mechanistic aspects of the response. *Free Radical Biology & Medicine*, 21 (21): 53-63.
- MORALES, F. J.; JIMENEZ-PEREZ, S., 2001. Free radical scavenging capacity of Maillard reaction products as related to colour and fluorescence. *Food Chemistry*, 72 (1): 119-125.
- MURCIA, M. A.; EGEA, I.; ROMOJARO, F.; PARRAS, P.; JIMÉNEZ, A. M.; MARTINEZ-TOMÉ, M., 2004. Antioxidant evaluation in deserts spices compared with common food additives. Influence of irradiation procedure. *J. Agric. Food Chem.*, 52: 1872-1881.
- NAKAMURA, T.; SYUKUNOBE, Y.; SAKURAI, T.; IDOTA, T., 1993. Enzymatic production of hypoallergenic peptides from casein. *Milchwissenschaft*, 48, 11 – 14.
- POKORNY, J.; EL-ZEANY, B. A.; JANICEK, G., 1974. Browning reactions of oxidized fish lipids with proteins. In Proc. IV Int. Cong. Food Sci. Technol. 1: 2 217-223.
- POKORNY, J.; LUAN, N. T.; SVOBODOVA, H.; JANICEK, G., 1976. Stabilization of fat with natural antioxidants. Part 4. Antioxidative effect of soybean phospholipids. *Nahrung*, 20: k3-k4.
- PORTER, W. L., 1980. Recent trends in food applications of antioxidants. In: M. G. SIMIC and M. KAREL (Eds.), *Autooxidation in Food and Biological Systems*, Plenum Press, New York, pp. 143-165.
- REYFTMANN, J.-P.; SANTUS, R.; MAZIERE, J.-C.; MORLIERE, P.; SALMON, S.; CANDIDE, C.; MAZIERE, C.; HAIGLE, J., 1990. Sensitivity of tryptophan and related compounds to oxidation induced by lipid autooxidation. Application to human serum low- and high-density lipoproteins. *Biochim Biophys Acta*, 1042: 159 - 167.
- SÁNCHEZ-MORENO, C.; LARRAURI, J. A.; SAURA-CALIXTO, F., 1999. Free radical scavenging capacity and inhibition of lipid oxidation of wines, grape juices and related polyphenolic constituents. *Food Research International*, 32: 407-412.
- SATHIVEL, S.; BECHTEL, P. J.; SMILEY, S.; CRAPO, C.; REPPOND, K. D.; PRINYAWIWATKUL, W., 2003. Biochemical and functional properties of herring (*Clupea harengus*) byproducts hydrolysates. *J. Food Sci.*, 68 (7): 2196-2200.

- SHAHIDI, F.; AMAROWICZ, R., 1996. Antioxidant activity of protein hydrolyzates from aquatic species. *JAACS*, 73: 1197 – 1199.
- SHAHIDI, F.; WANASUNDARA, P.K. J. P. D., 1992. Phenolic antioxidants. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 32: 67-103.
- SEHER, V. A.; LÖSCHNER, D., 1985. Natural antioxidants V: Antioxidants and synergists of Antarctic krill. *Fette Seifen Anstrichm.*, 87 (11): 454 – 457.
- TAYLOR, M. J.; RICHARDSON, T.; JASENSKY, R. D., 1981. Antioxidant activity of amino acids bound to Trolox-C. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 58: 622-626.
- UNDELAND, I., 1995. Oxidation in fatty fish during processing and storage – A literature review. Department of Food Science, Chalmers University of Technology and SIK, The Swedish Institute for Food Research. 188 p.
- VAN BERESTEIJN, E. C.; PEETERS, R. A.; KOPER, J.; MEIJER, R.; ROBBEN, A.; SCHMIDT, D., 1994. Molecular mass distribution, immunological properties and nutritive value of whey protein hydrolysates. *J. Food Prot.*, 57, 619 – 625.
- VELASCO, J.; ANDERSEN, M. L.; SKIBSTED, L. H., 2004. Evaluation of oxidative stability of vegetable oils by monitoring the tendency to radical formation. A comparison of electron spin resonance spectroscopy with the Rancimat method and differential scanning calorimetry. *Food Chemistry*, 85: 623-632.
- WU, H.; CHEN, H.; SHIAU, C., 2003. Free aminoacids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*). *Food Research International*, 36: 949-957.
- YEN, G.-C.; CHANG, Y.-C.; SU, S.-W., 2003. Antioxidant activity and active compounds of rice koji fermented with *Aspergillus candidus*. *Food Chemistry*, 83: 49-54.
- YMAUCHI, K., 1992. Biologically functional proteins of milk and peptides derived from milk proteins. *Bull. IDF* 272, 51 – 58.
- ZHOU, K.; MOORE, J.; PARRY, J. W.; YU, L., 2005. Solvent and Radical Systems Altered Antioxidant Activity Estimation. *The Second International Congress on Antioxidant Methods*, E.U.A.
- ZHOU, S.; DECKER, E. A., 1999. Ability of carnosine and other skeletal muscle compounds to quench aldehydic lipid oxidation products. *J. Agric. Food Chem.*, 47: 21 – 55.
- ZIOUDROU, C.; STREATY, R. A.; KLEE, W. A., 1979. Opioid peptides derived from food proteins. The exorphins in pepsin hydrolysates of wheat gluten and alpha-casein. *J. Biol. Chem.*, 254, 2446 – 2449.



**ANEXO I – Valores da % de redução do DPPH pelos hidrolisados e pelo BHA, BHT e ácido ascórbico.**

Tabela 1 - Resultados obtidos na redução do DPPH por diferentes concentrações dos hidrolisados Ba1, Ba2 e Ba3 e utilizados no cálculo dos respectivos EC<sub>50</sub>.

Conc. (mg/ml)	Ba1		Ba2		Ba3	
	Abs. (520 nm)	% redução	Abs. (520 nm)	% redução	Abs. (520 nm)	% redução
0	1,530 <sup>(a)</sup>	0	1,489 <sup>(b)</sup>	0	1,509 <sup>(c)</sup>	0
10	1,216	20,52	1,173	21,22	1,378	7,08
10	1,290	15,69	1,280	14,04	1,459	1,62
10	1,286	15,95	1,246	16,32	1,467	1,08
20	1,068	30,20	1,065	28,48	1,253	15,51
20	1,119	26,86	1,094	26,53	1,262	14,90
20	1,088	28,89	1,023	31,30	1,214	18,14
30	0,915	40,20	0,918	38,35	1,142	22,99
30	0,853	44,25	0,849	42,98	1,116	24,75
30	0,872	43,01	0,895	39,89	1,117	24,68
40	0,744	51,37	0,687	53,86	1,045	29,53
40	0,771	49,61	0,741	50,24	1,053	28,99
40	0,747	51,18	0,683	54,13	0,954	35,67
50	0,588	61,57	0,562	62,26	0,928	37,42
50	0,577	62,29	0,548	63,20	0,897	39,51
50	0,556	63,66	0,601	59,64	0,889	40,05
60	0,498	67,45	0,504	66,15	0,802	45,92
60	0,479	68,69	0,437	70,65	0,711	52,06
60	0,445	70,92	0,490	67,09	0,724	51,18
70	0,387	74,71	0,407	72,67	0,701	52,73
70	0,364	76,21	0,391	73,74	0,672	54,69
70	0,340	77,78	0,350	76,49	0,655	55,83
80	0,279	81,76	0,342	77,03	0,591	60,15
80	0,275	82,03	0,329	77,90	0,556	62,51
80	0,269	82,42	0,321	78,44	0,542	63,45
90	0,227	85,16	0,266	82,14	0,509	65,68
90	0,232	84,84	0,252	83,08	0,506	65,88
90	0,217	85,82	0,241	83,81	0,489	67,03
100	0,221	85,56	0,242	83,75	0,485	67,30
100	0,216	85,88	0,23	84,55	0,453	69,45
100	0,216	85,88	0,244	83,61	0,449	69,72

<sup>(a)</sup> Média de: 1,546; 1,514; 1,533 <sup>(b)</sup> Média de: 1,495; 1,470; 1,502 <sup>(c)</sup> Média de: 1,505; 1,507; 1,515. No cálculo da % de redução utilizou-se, para cada hidrolisado, o respectivo valor médio da absorvência da solução de DPPH preparada diariamente.

Tabela 2 - Resultados obtidos na redução do DPPH por diferentes concentrações dos hidrolisados Sa1 e Sa2 e utilizados no cálculo dos respectivos EC<sub>50</sub>.

Conc. (mg/ml)	Sa1		Sa2	
	Abs. (520 nm)	% redução	Abs. (520 nm)	% redução
0	1,527 <sup>(a)</sup>	0	1,463 <sup>(b)</sup>	0
10	1,003	34,36	1,298	11,28
10	1,070	29,97	1,281	12,44
10	0,979	35,93	1,218	16,75
20	0,837	45,22	1,033	29,39
20	0,870	43,06	1,113	23,92
20	0,826	45,94	0,953	34,86
30	0,563	63,15	0,862	41,08
30	0,561	63,29	0,787	46,21
30	0,578	62,17	0,801	45,25
40	0,429	71,92	0,583	60,15
40	0,412	73,04	0,692	52,70
40	0,370	75,79	0,655	55,23
50	0,420	72,51	0,475	67,53
50	0,412	73,04	0,485	66,85
50	0,425	72,19	0,426	70,88
60	0,229	85,01	0,438	70,06
60	0,218	85,73	0,361	75,32
60	0,213	86,06	0,408	72,11
70	0,210	86,26	0,357	75,60
70	0,210	86,26	0,340	76,76
70	0,217	85,80	0,331	77,38
80	0,209	86,32	0,272	81,41
80	0,207	86,45	0,279	80,93
80	0,212	86,13	0,274	81,27
90	0,217	85,80	0,274	81,27
90	0,218	85,73	0,263	82,02
90	0,211	86,19	0,273	81,34
100	0,218	85,73	0,277	81,07
100	0,212	86,13	0,273	81,34
100	0,211	86,19	0,276	81,13

<sup>(a)</sup> Média de: 1,528; 1,532; 1,521 <sup>(b)</sup> Média de: 1,486; 1,440; 1,464. No cálculo da % de redução utilizou-se, para cada hidrolisado, o respectivo valor médio da absorvência da solução de DPPH preparada diariamente.

Tabela 3 - Resultados obtidos na redução do DPPH por diferentes concentrações dos hidrolisados So1, So2 e So3 e utilizados no cálculo dos respectivos EC<sub>50</sub>.

Conc. (mg/ml)	So1		So2		So3	
	Abs. (520 nm)	% redução	Abs. (520 nm)	% redução	Abs. (520 nm)	% redução
0	1,521 <sup>(a)</sup>	0	1,520 <sup>(b)</sup>	0	1,509 <sup>(c)</sup>	0
10	1,205	20,78	1,182	22,24	1,097	27,30
10	1,309	13,94	1,066	29,87	1,234	18,22
10	1,279	15,91	1,202	20,92	1,215	19,48
20	1,063	30,11	0,998	34,34	0,978	35,19
20	1,152	24,26	1,031	32,17	1,031	31,68
20	1,021	32,87	1,007	33,75	0,935	38,04
30	0,924	39,25	0,810	46,71	0,754	50,03
30	0,900	40,83	0,743	51,12	0,762	49,50
30	0,901	40,76	0,779	48,75	0,774	48,71
40	0,783	48,52	0,604	60,26	0,607	59,77
40	0,798	47,53	0,590	61,18	0,633	58,05
40	0,721	52,60	0,565	62,83	0,564	62,62
50	0,593	61,01	0,454	70,13	0,491	67,46
50	0,619	59,30	0,426	71,97	0,446	70,44
50	0,591	61,14	0,448	70,53	0,437	71,04
60	0,494	67,52	0,387	74,54	0,369	75,55
60	0,474	68,84	0,337	77,83	0,356	76,41
60	0,468	69,23	0,363	76,12	0,347	77,00
70	0,360	76,33	0,258	83,02	0,297	80,32
70	0,417	72,58	0,243	84,01	0,303	79,92
70	0,370	75,67	0,265	82,57	0,267	82,31
80	0,294	80,67	0,212	86,05	0,266	82,37
80	0,269	82,31	0,219	85,59	0,262	82,64
80	0,270	82,25	0,215	85,86	0,261	82,70
90	0,224	85,27	0,22	85,53	0,268	82,24
90	0,225	85,20	0,22	85,53	0,268	82,24
90	0,233	84,68	0,215	85,86	0,268	82,24
100	0,218	85,67	0,218	85,66	0,268	82,24
100	0,223	85,34	0,222	85,39	0,268	82,24
100	0,203	86,65	0,221	85,46	0,264	82,50

<sup>(a)</sup> Média de: 1,516; 1,507; 1,540 <sup>(b)</sup> Média de: 1,544; 1,514; 1,502 <sup>(c)</sup> Média de: 1,509; Abs.<sub>2</sub>=1,474; Abs.<sub>3</sub>=1,548. No cálculo da % de redução utilizou-se, para cada hidrolisado, o respectivo valor médio da absorvência da solução de DPPH preparada diariamente.

Tabela 4 - Resultados obtidos para o cálculo do valor de EC<sub>50</sub> do BHT, BHA e ácido ascórbico.

BHT (mg/l)	Abs. (520 nm)	% redução	BHA (mg/l)	Abs. (520 nm)	% redução	Vit. C (mg/l)	Abs. (520 nm)	% redução
0	1,468 <sup>(a)</sup>	0	0	1,561*	0	0	1,554 <sup>(c)</sup>	0
20	1,392	5,18	20	0,960	38,38	20	1,396	10,17
20	1,325	9,74	20	0,977	37,29	20	1,305	16,02
20	1,323	9,88	20	0,991	36,39	20	1,385	10,88
60	1,017	30,72	60	0,778	50,06	60	0,971	37,52
60	0,824	43,87	60	0,763	51,03	60	0,957	38,42
60	1,07	27,11	60	0,752	51,73	60	0,963	38,03
100	0,836	43,05	100	0,146	90,63	100	0,444	71,43
100	0,809	44,89	100	0,143	90,82	100	0,554	64,35
100	0,729	50,34	100	0,141	90,95	100	0,387	75,10
140	0,516	64,85	140	0,118	92,43	140	0,222	85,71
140	0,579	60,56	140	0,091	94,16	140	0,250	83,91
140	0,502	65,80	140	0,112	92,81	140	0,181	88,35
180	0,394	73,16				180	0,120	92,28
180	0,403	72,55				180	0,139	91,06
180	0,392	73,30				180	0,126	91,89
220	0,372	74,66						
220	0,322	78,07						
220	0,309	78,95						

<sup>(a)</sup> Média de: 1,489; 1,456; 1,467 <sup>(b)</sup>Média de: 1,558; 1,552; 1,574 <sup>(c)</sup> 1,567; 1,552; 1,543. No cálculo da % de redução utilizou-se, para cada antioxidante, o respectivo valor médio da absorvência da solução de DPPH preparada diariamente.

## ANEXO II – Valores da actividade antioxidante dos hidrolisados e do BHA e BHT

$$OI_{\text{controlo}} = \text{Abs. controlo}(t=36\text{h}) / \text{Abs. controlo}(t=0\text{h})$$

$$\text{Abs. controlo}(t=36\text{h}) = 2,5978$$

$$\text{Abs. controlo}(t=0\text{h}) = 0,1933$$

$$OI_{\text{controlo}} = 13,4369$$

$$AA(\%) = 100 - [(OI_{\text{amostra}} / OI_{\text{controlo}}) \times 100]$$

Tabela 5 - Valores de AA utilizados para calcular AA<sub>50</sub> do hidrolisado Ba1.

		1º ensaio			2º ensaio			3º ensaio		
Conc. (mg/ml)	0 h	36 h	OI <sub>amostra</sub>	AA (%)	36 h	OI <sub>amostra</sub>	AA (%)	36 h	OI <sub>amostra</sub>	AA (%)
5	0,198*	2,499	12,65	5,88	2,401	12,15	9,57	2,474	12,52	6,82
15		2,354	11,91	11,34	2,457	12,43	7,46	2,427	12,28	8,59
30		0,929	4,70	65,01	1,247	6,31	53,03	1,23	6,22	53,67
40		0,884	4,47	66,71	0,841	4,26	68,33	0,839	4,25	68,40
50		0,437	2,21	83,54	0,345	1,75	87,01	0,206	1,04	92,24
AA <sub>50</sub> mg/ml)				29,87			30,59			30,01

\*Média de: 0,219; 0,145; 0,213; 0,231; 0,180.

Tabela 6 - Valores de AA utilizados para calcular AA<sub>50</sub> do hidrolisado Ba2.

		1º ensaio			2º ensaio			3º ensaio		
Conc. (mg/ml)	0 h	36 h	Ol <sub>amostra</sub>	AA (%)	36 h	Ol <sub>amostra</sub>	AA (%)	36 h	Ol <sub>amostra</sub>	AA (%)
5	0,1906*	2,455	12,88	4,14	2,526	13,25289	1,36947	2,499	13,11123	2,423716
15		2,481	13,02	3,13	2,47	12,95908	3,556054	2,479	13,0063	3,204639
30		1,815	9,52	29,13	1,666	8,740818	34,94914	1,689	8,86149	34,05108
40		1,134	5,95	55,72	0,886	4,648478	65,40513	0,974	5,110178	61,96907
50		0,407	2,14	84,11	0,626	3,284365	75,55712	0,514	2,696747	79,93029
AA <sub>50</sub> (mg/ml)		36,04			35,54			35,36		

\*Média de: 0,175; 0,197; 0,201; 0,202; 0,178

Tabela 7 - Valores de AA utilizados para calcular AA<sub>50</sub> do hidrolisado Ba3.

		1º ensaio			2º ensaio			3º ensaio		
Conc. (mg/ml)	0 h	36 h	Ol <sub>amostra</sub>	AA (%)	36 h	Ol <sub>amostra</sub>	AA (%)	36 h	Ol <sub>amostra</sub>	AA (%)
5	0,208*	2,556	12,29	8,55	2,552	12,27	8,69002	2,483	11,94	11,16
15		2,447	11,76	12,45	2,253	10,83	19,38817	2,505	12,04	10,37
30		1,871	8,99	33,06	1,917	9,22	31,41018	1,904	9,15	31,88
40		1,418	6,82	49,26	1,212	5,83	56,63492	1,561	7,50	44,15
50		1,356	6,52	51,48	1,292	6,21	53,77253	1,116	5,37	60,07
AA <sub>50</sub> (mg/ml)		45,69			42,46			44,13		

\*Média de: 0,136; 0,208; 0,234; 0,234; 0,228

Tabela 8 - Valores de AA utilizados para calcular AA<sub>50</sub> do hidrolisado Sa1.

		1º ensaio			2º ensaio			3º ensaio		
Conc. (mg/ml)	0 h	36 h	Ol <sub>amostra</sub>	AA (%)	36 h	Ol <sub>amostra</sub>	AA (%)	36 h	Ol <sub>amostra</sub>	AA (%)
5	0,1924*	2,556	13,28	1,131784	2,525	13,1237	2,33089	2,523	13,11331	2,41
15		2,434	12,65	5,850846	2,293	11,91788	11,30484	2,422	12,58836	6,32
30		1,381	7,178	46,58177	1,653	8,591476	36,06058	1,318	6,850312	49,01866
40		0,83	4,31	67,89491	0,536	2,785863	79,26707	0,714	3,711019	72,38188
50		0,358	1,86	86,15226	0,606	3,149688	76,55941	0,425	2,20894	83,56064
AA <sub>50</sub> (mg/ml)		31,65			32,34			31,12		

\*Média de: 0,197; 0,205; 0,194; 0,188; 0,178

Tabela 9 - Valores de AA utilizados para calcular AA<sub>50</sub> do hidrolisado Sa2.

		1º ensaio			2º ensaio			3º ensaio		
Conc. (mg/ml)	0 h	36 h	Ol <sub>amostra</sub>	AA (%)	36 h	Ol <sub>amostra</sub>	AA (%)	36 h	Ol <sub>amostra</sub>	AA (%)
5	0,2016*	2,453	12,17	9,45	2,504	12,42	7,56	2,522	12,51	6,90
15		2,243	11,13	17,20	2,226	11,04	17,83	2,243	11,13	17,20
30		1,064	5,28	60,72	0,942	4,67	65,23	1,042	5,17	61,53
40		0,507	2,51	81,28	0,321	1,59	88,15	0,432	2,14	84,05
50		0,27	1,34	90,03	0,217	1,08	91,99	0,284	1,41	89,52
AA <sub>50</sub> (mg/l)		27,12			26,03			27,10		

\*Média de: 0,176; 0,197; 0,210; 0,235; 0,190.

Tabela 10 - Valores de AA utilizados para calcular AA<sub>50</sub> do hidrolisado So1.

		1º ensaio			2º ensaio			3º ensaio		
Conc. (mg/ml)	0 h	36 h	Ol <sub>amostra</sub>	AA (%)	36 h	Ol <sub>amostra</sub>	AA (%)	36 h	Ol <sub>amostra</sub>	AA (%)
5	0,2162*	2,478	11,46	14,70	2,575	11,91	11,36	2,549	11,79	12,26
15		2,478	11,46	14,70	2,487	11,50	14,39	2,46	11,38	15,32
30		0,992	4,59	65,85	0,998	4,62	65,65	0,711	3,29	75,53
40		0,518	2,40	82,17	0,681	3,15	76,56	0,501	2,32	82,75
50		0,229	1,06	92,12	0,439	2,03	84,89	0,349	1,61	87,99
AA <sub>50</sub> (mg/ml)		26,01			27,69			25,56		

\*Média de: 0,219; 0,232; 0,225; 0,234; 0,171

Tabela 11 - Valores de AA utilizados para calcular AA<sub>50</sub> do hidrolisado So2.

		1º ensaio			2º ensaio			3º ensaio		
Conc. (mg/ml)	0 h	36 h	Ol <sub>amostra</sub>	AA (%)	36 h	Ol <sub>amostra</sub>	AA (%)	36 h	Ol <sub>amostra</sub>	AA (%)
5	0,2716*	2,306	8,49	36,81	2,483	9,14	31,96	2,528	9,31	30,73
15		2,309	8,50	36,73	2,158	7,95	40,87	1,636	6,02	55,17
30		0,412	1,52	88,71	0,548	2,02	84,98	0,712	2,62	80,49
40		0,314	1,156	91,40	0,282	1,04	92,27	0,19	0,70	94,79
50		0,209	0,77	94,27	0,267	0,98	92,68	0,187	0,69	94,88
AA <sub>50</sub> (mg/ml)		11,71			15,96			13,62		

\*Média de: 0,216; 0,264; 0,287; 0,266; 0,325.



Tabela 12 - Valores de AA utilizados para calcular AA<sub>50</sub> do hidrolisado So3.

		1º ensaio			2º ensaio			3º ensaio		
Conc. (mg/ml)	0 h	36 h	Ol <sub>amostra</sub>	AA (%)	36 h	Ol <sub>amostra</sub>	AA (%)	36 h	Ol <sub>amostra</sub>	AA (%)
5	0,218*	2,478	11,37	15,40	2,486	11,40	15,13	2,516	11,54	14,11
15		2,432	11,16	16,98	2,458	11,28	16,09	2,308	10,59	21,21
30		1,406	6,45	52,00	1,634	7,50	44,22	1,406	6,45	52,00
40		0,777	3,56	73,47	0,839	3,85	71,36	0,919	4,22	68,63
50		0,283	1,30	90,34	0,143	0,66	95,12		0,15	98,88
AA <sub>50</sub> (mg/ml)		28,20			28,87			27,49		

\*Média de: 0,224; 0,221; 0,210; 0,243; 0,192.

Tabela 13 - Valores de AA utilizados para calcular AA<sub>50</sub> do BHA.

		1º ensaio			2º ensaio			3º ensaio		
Conc. (mg/l)	0 h	36 h	Ol <sub>amostra</sub>	AA (%)	36 h	Ol <sub>amostra</sub>	AA (%)	36 h	Ol <sub>amostra</sub>	AA (%)
1	0,2018*	2,477	12,27	8,65	2,453	12,16	9,54	2,513	12,45	7,32
2		1,182	5,86	56,41	1,231	6,10	54,60	1,153	5,71	57,48
3		0,892	4,42	67,10	1,134	5,62	58,18	1,099	5,45	59,47
5		0,315	1,56	88,38	0,386	1,91	85,76	0,435	2,16	83,96
20		0,297	1,47	89,05	0,300	1,49	88,94	0,322	1,59	88,12
AA <sub>50</sub> (mg/ml)		2,47			2,63			2,63		

\*Média de: 0,277; 0,169; 0,164; 0,181; 0,218.

Tabela 14 - Valores de AA utilizados para calcular AA<sub>50</sub> do BHT.

		1º ensaio			2º ensaio			3º ensaio		
Conc. (mg/l)	0 h	36 h	Ol <sub>amostra</sub>	AA (%)	36 h	Ol <sub>amostra</sub>	AA (%)	36 h	Ol <sub>amostra</sub>	AA (%)
0,5	0,202*	2,435	12,05	10,29	2,473	12,24	8,89	2,462	12,19	9,29
1		2,421	11,99	10,80	2,047	10,13	24,58	2,06	10,20	24,10
2		1,183	5,86	56,42	1,232	6,10	54,61	1,192	5,90	56,08
3		1,177	5,83	56,64	1,076	5,33	60,36	0,968	4,79	64,34
5		0,531	2,63	80,44	0,528	2,61	80,55	0,645	3,19	76,24
AA <sub>50</sub> (mg/ml)				2,74			2,58			2,57

\*Média de: 0,232; 0,187; 0,189; 0,227; 0,175.

