



UNICAMP

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

**ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE PRODUTOS PROTEICOS DE LINHAÇA (*Linum
usitatissimum* L.)**

Autora: Fernanda Guimarães Drummond e Silva

Orientadora: Flavia Maria Netto

CAMPINAS, 2012



UNICAMP

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

FERNANDA GUIMARÃES DRUMMOND E SILVA

Nutricionista

**ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE PRODUTOS PROTEICOS DE LINHAÇA (*Linum
usitatissimum L.*)**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO APRESENTADA À
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS UNICAMP
PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM ALIMENTOS
E NUTRIÇÃO, NA ÁREA DE NUTRIÇÃO EXPERIMENTAL E
APLICADA À TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Este exemplar corresponde à versão final da dissertação defendida por Fernanda Guimarães Drummond e Silva, aprovada pela comissão julgadora em 12/04/2012 e orientada pelo Profa. Dra. Flavia Maria Netto.

Assinatura do Orientador

Flavia Maria Netto

ORIENTADORA

CAMPINAS, 2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
CLAUDIA AP. ROMANO DE SOUZA – CRB8/5816 – BIBLIOTECA DA FACULDADE DE
ENGENHARIA DE ALIMENTOS – UNICAMP

Si38a Silva, Fernanda Guimarães Drummond, 1983-
Atividade antioxidante de produtos proteicos de linhaça
(*Linum usitatissimum* L.) / Fernanda Guimarães
Drummond e Silva. -- Campinas, SP: [s.n.], 2012.

Orientador: Flavia Maria Netto.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Hidrolisados proteicos. 2. Digestão *in vitro*. 3.
Compostos fenólicos. 4. Capacidade de absorção do
radical oxigênio (ORAC). 5. Poder de redução do íon
ferro (FRAP). I. Netto, Flavia Maria. II. Universidade
Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de
Alimentos. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Antioxidant activity of flaxseed protein products (*Linum usitatissimum* L.)

Palavras-chave em inglês (Keywords):

Protein hydrolysates

In-vitro digestion

Phenolic compounds

Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC)

Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP)

Área de concentração: Nutrição Experimental e Aplicada à Tecnologia de Alimentos

Titulação: Mestre em Alimentos e Nutrição

Banca examinadora:

Flavia Maria Netto [Orientador]

Deborah Helena Markowicz Bastos

Vanessa Martins da Silva

Data da defesa: 12/04/2012

Programa de Pós Graduação: Alimentos e Nutrição

Banca Examinadora

Prof. Dra. Flavia Maria Netto
(Orientadora)

Profa. Dra. Deborah Helena Markowicz Bastos
(Membro)

Dra. Maria Teresa Bertoldo Pacheco
(Suplente)

Prof. Dr. Mário Roberto Maróstica Junior
(Suplente)

Dra. Vanessa Martins da Silva
(Membro)

Campinas, 12 de abril de 2012

Dedicatória

*Dedico esta tese aos meus avós,
Wandir e Edith, alicerces da minha
família.*

*“Entender é sempre limitado.
Mas não entender pode não ter fronteiras.”*

Clarice Lispector

Agradecimentos

A Deus pela proteção,

Aos meus pais, Luiz e Lúcia, por nunca medirem esforços para a minha felicidade, pelo amor, suporte, dedicação, carinho e cuidado imensuráveis para que minha vida em Campinas fosse uma extensão da minha rotina em Belo Horizonte. A minha irmãzinha, Luciana, pela torcida, atenção, apoio e brincadeiras que tornam minha vida uma comédia. Ao Max, meu pai drasto, por sempre me tratar como filha. A minha família, vovô, vovó, tios, tias, primos e primas, pelos conselhos, torcida e incentivo. Amo muito todos vocês!

À minha orientadora, Profa. Dra. Flavia Maria Netto, pela disponibilidade, atenção, aprendizado, preocupação, paciência e dedicação extra para que meu crescimento pessoal e profissional fosse o melhor possível. Obrigada pela oportunidade e confiança!

À banca examinadora, Profa. Dra. Deborah Helena Markowicz Bastos, Dra. Maria Teresa Bertoldo Pacheco, Prof. Dr. Mário Roberto Maróstica Junior, Dra. Vanessa Martins da Silva pela atenção e sugestões para que meu trabalho fosse aperfeiçoado.

Às companheiras do LBN, Mariana, Mitiê, Milena, Celia, Maria Elisa, Janaína, Cássia, Eliana e Beth. A presença de vocês torna o dia a dia bem mais divertido e animado! Obrigada pela amizade, parceria e aprendizado. Agradecimento em especial à Beth pelas palavras de otimismo, bolos e comidinhas e à Eliana pelo acolhimento, conselhos, apoio extra-científico, dicas e auxílios durante as mais diversas análises no laboratório.

Ao Chico, pela alegria diária e por sempre me ajudar e ensinar com paciência e bom humor!

Aos amigos e colegas da pós-graduação pelos diversos momentos de alegria e diversão, companheirismo, solidariedade e pelas indispensáveis companhias para almoços e cafezinhos na cozinha. Obrigada em especial a Juliana, Flávia, Erick e Geina por estarem ao meu lado em todos os momentos e às meninas do LANUM pela parceria e compreensão durante as análises realizadas no laboratório Central.

Aos amigos de Campinas, em especial, Débora, Elaine e Irene pelo apoio, incentivo e amizade.

Aos amigos de Belo Horizonte, em especial Débora Watanabe, Ivana Guedes, Rafael Barra, Gláucia Amaral, Elisa Alves pelas divertidas conversas no skype e pela compreensão de que a distância é necessária para meu crescimento profissional.

À minha turma de Nutrição, NUT 2005, pelo exemplo de união e amizade que se sobrepõe a distância.

À professora Dra. Maria Isabel Rodrigues, pelo apoio e disponibilidade para esclarecer minhas dúvidas de estatística.

Aos funcionários do DEPAN, em especial Cidinha e Marta pelos milhares de cafezinhos e pela boa vontade de sempre; a Soely, Yara, Alessandra, Fátima e Carla por facilitarem a realização do meu trabalho fora do LBN.

Aos secretários da Coordenadoria de Pós-Graduação-FEA-UNICAMP, Cosme Perota e Marcos Sampaio por sempre estarem dispostos a ajudar e não se cansarem de responder às mesmas perguntas a todo o momento!

À Universidade Estadual de Campinas, à Faculdade de Engenharia de Alimentos e ao Departamento de Alimentos e Nutrição por fornecer todo suporte necessário ao meu aprendizado.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa de estudos concedida.

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo apoio financeiro ao projeto concedido na forma de Auxílio à Pesquisa, processo nº 2010/52680-7

Muito Obrigada! ☺

RESUMO

Existem evidências numerosas sobre o papel dos radicais livres em uma série de condições patológicas, incluindo envelhecimento, câncer, esclerose múltipla, doenças cardiovasculares. Hidrolisados protéicos de diferentes fontes têm sido estudados por seu potencial antioxidante. A atuação antioxidante da proteína, na maioria das vezes, encontra-se limitada devido à conformação espacial, que concentra resíduos capazes de neutralizar radicais livres no interior da molécula, dificultando o acesso das espécies reativas aos centros nucleofílicos. A hidrólise da proteína contribui para aumentar a exposição desses resíduos de aminoácidos, aumentando sua atuação como antioxidante. Compostos fenólicos podem estar presentes em hidrolisados proteicos de origem vegetal, devido a sua associação com as proteínas. Métodos *in vitro* que simulam as condições do trato gastrointestinal permitem estudar como a digestão pode interferir na atividade antioxidante de peptídeos e compostos fenólicos. O presente trabalho tem como objetivos obter hidrolisados proteicos com capacidade antioxidante a partir da farinha de linhaça e avaliar o efeito da digestão *in vitro* pode interferir nessa atividade. A farinha de linhaça marrom foi desengordurada, obtendo-se a farinha de linhaça marrom desengordurada (FLMD). O concentrado proteico de linhaça (CPL) foi obtido a partir da FLMD por extração alcalina e precipitação no ponto isoelétrico seguida de neutralização. Para obtenção dos hidrolisados proteicos (HPL), a partir do CPL, com Alcalase, foi realizado um delineamento composto central rotacional (DCCR) 2². As variáveis independentes foram pH que variou entre 7,5 a 9,5 e relação enzima: substrato (E:S) que variou de 1:150 a 1:30. As variáveis dependentes foram grau de hidrólise (GH), teor de substâncias redutoras do reagente de Folin-Ciocalteu e atividade antioxidante, determinada por FRAP e ORAC. Teor de substâncias redutoras e atividade antioxidante foram avaliados a partir dos extratos aquosos e metanólico (metanol 70%). Os hidrolisados de maior atividade antioxidante, a FLMD e o CPL foram submetidos à digestão *in vitro*, simulando as condições da digestão gastrointestinal. As amostras antes e após a digestão *in vitro* foram caracterizadas por eletroforese em sistema SDS-PAGE Tricina e por cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (HPLC- RP). O teor de substâncias redutoras e da atividade antioxidante das amostras FLMD, CPL e HPL foram avaliados antes e após a digestão *in vitro*. As condições ótimas para obtenção de HPL de maior GH (21,0%) são pH entre 7,5 e 8,0 e E:S entre 1:60 e 1:30, indicando que a faixa de pH ótimo da enzima e a alta E:S favorecem maior hidrólise do CPL. Para obtenção de HPL com maior teor de substâncias redutoras para os extratos aquoso (24 mg EAG/ g HPL) e metanólico (20 mg EAG/ g HPL) as condições ótimas são pH ~ 8,5 /E:S 1:30. Este resultado parece estar relacionado à liberação de compostos fenólicos ligados a proteína e também de peptídeos durante a hidrólise. Açúcares e aminoácidos aromáticos presentes no hidrolisado podem interferir na reação e superestimar o teor de fenóis dos HPL. A maior atividade antioxidante determinada pelo método de FRAP para o extrato aquoso (42 mg SF/ g HPL) se dá nas condições de pH ~ 9,5/E:S ~1:150 e para o extrato metanólico (40 mg SF/ g HPL) pH entre 8,5 e 9,0/E:S entre 1:90 a 1:150. Para o método de ORAC, as condições ótimas para maior atividade antioxidante no extrato aquoso (300 µmol TE/ g HPL) são pH entre 7,5 a 9,5/E:S ~ 1:30 ou ~1:150 e para o extrato metanólico (330 µmol

TE/ g HPL) são pH ~ 8,5/E:S entre 1:150 e 1:30. Os hidrolisados de maior atividade antioxidante foram os obtidos em pH 8,5/E:S 1:90, e em pH 9,2/E:S 1:133 denominados HPL 0 e HPL 3, respectivamente. Para a FLMD, CPL e os hidrolisados, após a digestão *in vitro*, observou-se que o teor de substâncias redutoras totais aumentou (9 a 20 vezes) para todas as amostras. O teor de substâncias redutoras do CPL (~24 mg EAG/ g amostra), em ambos os extratos, após a digestão *in vitro* se igualou ao teor dos hidrolisados (~23 mg EAG/ g amostra). Este resultado sugere que tanto a hidrólise com Alcalase quanto o processo digestório liberam compostos redutores, dentre eles fenólicos da proteína de linhaça. A atividade antioxidante dos extratos de FLMD e CPL, determinada por FRAP, também aumentou (de 3 a 10 vezes) após a digestão, mas não se igualou à atividade antioxidante dos hidrolisados (48 mg SF/g amostra). No entanto, o CPL apresentou atividade antioxidante determinada por ORAC semelhante à dos hidrolisados no extrato aquoso (~420,24 $\mu\text{mol TE/ g amostra}$) e 10 % maior que o encontrado para os hidrolisados (~365 $\mu\text{mol TE/ g amostra}$) no extrato metanólico. Após a digestão *in vitro*, os hidrolisados apresentaram a maior atividade antioxidante medida por FRAP (50 mg SF/ g amostra), e o CPL, a maior atividade determinada pelo método de ORAC (~430 $\mu\text{mol TE/ g amostra}$). Estes resultados sugerem o processo digestório é tão ou mais eficiente que a Alcalase em liberar os compostos com atividade redutora no CPL. Uma vez que a metodologia de determinação da atividade antioxidante por ORAC tem maior proximidade com o mecanismo de oxirredução que ocorre *in vivo*, esses resultados sugerem o uso do CPL como melhor produto protéico da linhaça com maior potencial antioxidante para a formulação de nutracêuticos e alimentos funcionais.

Palavras chave: hidrolisado proteico, digestão *in vitro*, compostos fenólicos, ORAC, FRAP

ABSTRACT

There are several evidences which indicate the role of free radicals on a series of pathological conditions, including aging, cancer, multiple sclerosis and cardiovascular disease. Hydrolysates from different sources have been studied because of their antioxidant potential. The antioxidant activity of the protein, in most cases, is limited due to their conformation, which concentrates residues capable of neutralize free radicals in the molecule's core, hampering the access of the reactive species to nucleophilic sites. The protein hydrolysis contributes to increasing the exposure of these amino acid residues, increasing their role as antioxidants. Phenolic compounds may also be present in vegetable protein hydrolysates because of their association with proteins. *In vitro* methods that simulate the conditions of the gastrointestinal digestion are an important way to evaluate how the digestion affects the antioxidant activity of phenolic compounds and peptides. This study aims at obtaining hydrolysates with antioxidant capacity from defatted flaxseed flour and evaluate the effect of the *in vitro* digestion on this activity. The brown flaxseed flour was defatted, resulting in the brown defatted flaxseed meal (BDFM). The flaxseed protein concentrate (FPC) was obtained from the BDFM by alkaline extraction and precipitation at the isoelectric point followed by neutralization. To obtain the flaxseed protein hydrolysates (FPL), using FPC and Alcalase, a central composite rotational design (DCCR) was performed. The independent variables were pH ranging from 7.5 to 9.5 and enzyme: substrate ratio (E: S) that ranged from 1:150 to 1:30. The dependent variables were the degree of hydrolysis (DH), total phenolic content and antioxidant activity, determined by FRAP and ORAC. Phenolic and antioxidant activity were evaluated from the aqueous and methanol (70% methanol). The hydrolysates with the highest antioxidant activity, the CPL FLMD were submitted to the *in vitro* digestion. The samples obtained before and after the *in vitro* digestion were characterized by electrophoresis SDS-PAGE-tricine and HPLC. The total phenolic content and antioxidant activity of FLMD, CPL and HPL were evaluated before and after *in vitro* digestion. The optimum conditions to obtain HPL with the highest GDH (21.0%) are pH (7.5-8) and E:S ratio (1:60-1:30), which indicates that the Alcalase optimum pH and highest E:S ratio collaborates to highest hydrolysis of CPL. To obtain HPL with higher content of Folin-Ciocalteu reducing compounds content in aqueous (EAG 24 mg / g HPL) and methanol (20 mg EAG / g HPL) extracts, the optimum conditions were pH ~ 8.5 / E: S 1:30. This result seems to be related to the release of phenolic compounds bound to protein and also of peptides during hydrolysis. The highest antioxidant activity determined by the FRAP method in the aqueous extract (42 mg SF / g HPL) occurs under pH ~ 9.5 / E: S ~ 1:150 and the methanol extract (40 mg SF / g HPL) pH 8.5-9.0 / E: S 1:90-1:150. For the ORAC method, optimum conditions for increased antioxidant activity in aqueous extract (300 μ mol TE / g HPL) are pH 7.5-9.5 / E: S ~ 1:30 or 1:150 and the methanol extract (330 μ mol TE / g HPL) are pH ~ 8.5 / E: S 1:30-1:150. The hydrolysates with the highest antioxidant activities were obtained at pH 8.5 / E: S 1:90, and at pH 9.2 / E: S 1:133 denominated HPL) and HPL 3, respectively. For FLMD, CPL and hydrolysates, after *in vitro* digestion, the content increased (9-20 times) for all samples. The Folin-Ciocalteu reducing capacity of the CPL (EAG ~ 24 mg / g sample) in both extracts after *in vitro* digestion equaled the content of hydrolysates (EAG ~ 23 mg / g sample). This result suggests that both hydrolysis with Alcalase and the digestion process are able to release phenolic compounds from the flaxseed products. The antioxidant activity of extracts of FLMD, CPL determined by FRAP, also increased (from 3 to 10 times) after digestion, but did not reached the antioxidant activity of hydrolysates (48 mg SF / g sample). However, when the activity was determined by ORAC, the FPC showed value similar to the hydrolysates, measured on the aqueous extract (~ 420.24 μ mol TE / g sample) and 10% higher than on

the methanol extract (~ 365 $\mu\text{mol TE / g sample}$). After *in vitro* digestion, hydrolysates showed the highest antioxidant activity measured by FRAP (SF 50 mg / g sample), and the FPC, the highest activity determined by ORAC method (~ 430 micromol TE / g sample). These results suggest that digestive process are equally or more effective than Alcalase in releasing peptides and phenolic compounds present in the FPC. Since the methodology for determining the antioxidant activity by ORAC utilizes a biologically relevant radical source, these results suggest the use of FPC as the best protein product of flaxseed with potential antioxidant in the formulation of nutraceuticals and functional foods.

Keywords: Hydrolysate, *in vitro* digestion, phenolic compounds, FRAP, ORAC

LISTA DE ABREVIações

CPL	Concentrado protéico de linhaça
DCCR	Delineamento composto central rotacional
E:S	Relação enzima- substrato
EAG	Equivalente de ácido gálico
FLMD	Farinha de linhaça marrom desengordurada
FLMPD	Farinha de linhaça marrom parcialmente desengordurada
GH	Grau de hidrólise
HPL	Hidrolisado proteico de linhaça
HPLC-RP	Cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa
OPA	Reagente o-ftalaldeído, do inglês <i>o-phthalaldehyde</i>
SDG	Secoisolariciresinol diglicosídeo
SECO	2,3-di- (metóxi-4hidróxi-benzil) butano 1,4 diol
SF	Sulfato Ferroso
TE	Equivalente de Trolox

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Análise do potencial Zeta do extrato proteico de farinha de linhaça marrom desengordurada (FLMD).....	26
Figura 2. Fluxograma de obtenção do concentrado proteico de linhaça (CPL).....	27
Figura 3. Fluxograma de obtenção da farinha de linhaça marrom desengordurada (FLMD), concentrado proteico de linhaça (CPL) e hidrolisado proteico de linhaça (HPL) de maior capacidade antioxidante, a partir da farinha de linhaça marrom parcialmente desengordurada (FLMPD).	29
Figura 4. Curva padrão de tirosina para determinação da atividade enzimática da Alcalase.....	30
Figura 5. Eletroforeses SDS-PAGE da farinha de linhaça marrom desengordurada (FLMD), extratos proteicos, farinha residual e concentrado proteico de linhaça (CPL). A) SDS-PAGE em condições redutoras dos extratos proteicos, da farinha residual da extração e da FLMD. 1- Padrões; 2- Extrato proteico obtido na primeira extração; 3- extrato proteico obtido na segunda extração; 4- Resíduo da FLMD após as duas extrações; 5- FLMD. B) SDS-PAGE em condições redutoras. 1- Padrão; 2- CPL. C) SDS-PAGE Tricina em condições redutoras. 1- Padrão; 2- FLMD; 3- CPL.	40
Figura 6. Curvas de hidrólise enzimática do concentrado proteico de linhaça (CPL) com Alcalase. As condições de cada ensaio estão descritas na Tabela 4.	42
Figura 7. Diagrama de Pareto para Grau de Hidrólise (%) em função do pH e da E:S. L: linear. Q: quadrático. pH x E:S: Interação entre pH e E:S.	43
Figura 8. Superfície de Resposta para Grau de Hidrólise (%GH) em função do pH e da relação enzima: substrato (E:S).....	45
Figura 9. Eletroforese em sistema SDS-PAGE Tricina do concentrado proteico de linhaça (CPL) e dos hidrolisados dos 11 ensaios com Alcalase produzidos nas condições determinadas para o DCCR. P- Padrão; C- CPL; 1 a 11- hidrolisados correspondentes aos ensaios 1 a 11 do DCCR.	45
Figura 10. Diagrama de Pareto para teor de substâncias redutoras em função do pH e da relação enzima: substrato para os hidrolisados produzidos nos 11 ensaios do DCCR. A: Extrato aquoso. B: Extrato metanólico.	47
Figura 11. Superfície de Resposta para teor de substâncias redutoras dos hidrolisados proteicos de linhaça (HPL) em função do pH e da relação enzima: substrato no extrato metanólico.	49
Figura 12. Diagrama de Pareto para Atividade Antioxidante em função do pH e da relação enzima: substrato para os hidrolisados produzidos nos 11 ensaios do DCCR. A: FRAP, extrato aquoso. B: FRAP, extrato metanólico. C: ORAC, extrato aquoso. D: ORAC, extrato metanólico.....	51
Figura 13. Superfície de Resposta para Atividade Antioxidante pelo método de FRAP em função do pH e da relação enzima: substrato (E:S). A: Extrato aquoso B: Extrato metanólico. SF: Sulfato ferroso.....	54
Figura 14. Superfície de Resposta para Atividade Antioxidante pelo método de ORAC em função do pH e da relação enzima: substrato (E:S) no extrato aquoso. TE: Equivalente de Trolox.....	56

Figura 15. Eletroforese SDS-PAGE Tricina das amostras Farinha de linhaça marrom desengordurada (FLMD), Concentrado proteico de linhaça (CPL) e Hidrolisado proteico de linhaça (HPL) de maior atividade antioxidante antes e após a digestão. Amostras: A- Padrão; 1- FLMD, 2- CPL, 3-HPL 0, 4- HPL 3 antes da digestão *in vitro*; 5- controle digestão; 6- FLMD, 7- CPL, 8- HPL 0, 9- HPL 3 após a digestão *in vitro*.59

Figura 16. Perfil cromatográfico dos hidrolisados proteicos de linhaça (HPL) de maior atividade antioxidante, antes e após a digestão. A- HPL 0. B- HPL 3.60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Matriz do planejamento fatorial 2 ² com as variáveis independentes pH e relação enzima: substrato, respectivamente, no modelo codificado e real.....	28
Tabela 2. Condições das variáveis independentes pH e relação enzima: substrato, respectivamente, no modelo codificado e real nos ensaios de validação	28
Tabela 3. Composição centesimal da FLMD e do CPL.....	38
Tabela 4. Matriz do DCCR e resposta para GH.....	42
Tabela 5. ANOVA para a resposta Grau de Hidrólise (GH)	43
Tabela 6. Resultados dos ensaios de validação para a resposta Grau de Hidrólise (GH)44	
Tabela 7. Teor de substâncias redutoras dos extratos aquoso e metanólico dos hidrolisados de linhaça obtidos nos ensaios 1 a 11 do DCCR	47
Tabela 8. ANOVA para a resposta teor de substâncias redutoras nos extratos aquoso e metanólico	48
Tabela 9. Atividade Antioxidante determinada pelos métodos FRAP e ORAC dos extratos aquoso e metanólico dos hidrolisados produzidos nas condições do DCCR.....	50
Tabela 10. ANOVA para a resposta Atividade Antioxidante, determinada pelo método de FRAP nos extratos aquoso e metanólico	52
Tabela 11. ANOVA para a resposta Atividade Antioxidante, determinada pelo método de ORAC nos extratos aquoso e metanólico	52
Tabela 12. Composição aminoacídica da FLMD e do CPL (g aminoácido/100g de proteína)	58
Tabela 13. Teor de substâncias redutoras das amostras FLMD, CPL, HPL 0 e HPL 3 antes e após a digestão <i>in vitro</i>	62
Tabela 14. Atividade antioxidante determinada pelo método de FRAP das amostras FLMD, CPL, HPL 0 e HPL 3 antes e após a digestão <i>in vitro</i>	63
Tabela 15. Atividade antioxidantes determinada pelo método de ORAC das amostras FLMD, CPL, HPL 0 e HPL 3 antes e após a digestão <i>in vitro</i>	64
Tabela 16. Teor de proteína por Bradford e teor de substâncias redutoras da FLMD em diferentes extratos	77

Sumário

1- Introdução	1
2- Objetivos	5
2.1- Objetivo Geral.....	5
2.2- Objetivos Específicos	5
3- Revisão Bibliográfica	6
3.1- Radicais Livres e Antioxidantes	6
3.2- Antioxidantes nos Alimentos.....	8
3.3- Proteínas e peptídeos com ação antioxidante.....	9
3.4- Outros compostos antioxidantes em hidrolisados proteicos de origem vegetal.....	13
3.5- Métodos <i>in vitro</i> para avaliar a capacidade redutora de compostos antioxidantes	14
3.6- Influência da digestão <i>in vitro</i> na atividade antioxidante de proteínas e compostos fenólicos.....	16
3.7- Linhaça.....	20
4- Material e Métodos	25
4.1- Material	25
4.2- Obtenção do concentrado proteico	25
4.3 – Obtenção dos hidrolisados.....	27
4.4- Determinação da Atividade Enzimática da Alcalase.....	30
4.5- Obtenção dos extratos.....	31
4.6- Digestão <i>in vitro</i>	31
4.7- Determinação da atividade antioxidante	32
4.7.1- Ensaio de FRAP – Método de Redução do Ferro	32
4.7.2- Ensaio de ORAC	33
4.8- Caracterização da FLMD, do CPL e do HPL	34
4.8.1- Composição Centesimal	34
4.8.2 – Perfil Aminoacídico.....	34
4.8.3 – Teor de substâncias redutoras do reagente Folin-Ciocalteu.....	34
4.8.4- Perfil eletroforético (SDS-PAGE Tricina) e Cromatográfico.....	35
4.9 – Análise Estatística.....	36
5- Resultados e Discussão.....	38

5.1- Obtenção e caracterização da farinha de linhaça marrom desengordurada (FLMD) e do concentrado proteico de linhaça (CPL)	38
5.2- Obtenção do Hidrolisado Proteico de Linhaça (HPL)	41
5.2.1- Grau de Hidrólise	41
5.2.2- Teor de substâncias redutoras do reagente Folin- Ciocalteau	46
5.2.3- Atividade Antioxidante	50
5.3- Caracterização e efeito da digestão <i>in vitro</i> no teor de substâncias redutoras e na atividade antioxidante da FLMD, CPL e HPL 0 e HPL 3	57
5.3.1 – Perfil aminoácídico, eletroforético e cromatográfico	57
5.3.2- Teor de substâncias redutoras do reagente Folin-Ciocalteau	61
5.3.3- Atividade antioxidante	63
6- Conclusões	66
ANEXO - DETERMINAÇÃO DO EXTRATO HIDROFÓBICO	76

1- Introdução

Existem evidências numerosas sobre o papel dos radicais livres em uma série de condições patológicas, incluindo envelhecimento, câncer, esclerose múltipla, doenças cardiovasculares (MARTÍNEZ-CAYUELA, 1995; CERIELLO & MOTZ, 2004; ROBERTS & SINDHU, 2009). A fim de fortalecer o sistema de defesa antioxidante e reduzir os efeitos deletérios que ambientes pró-oxidantes podem causar ao organismo, pesquisadores têm concentrado esforços para encontrar nos alimentos componentes que atuem como redutores em meio biológico e auxiliem na prevenção e no retardo do desenvolvimento de doenças crônicas (KRIS-ETHERTON, HECKER, BONANOME *et al.*, 2002).

Diversas substâncias encontradas nos alimentos possuem comprovada ação antioxidante (LIMÓN-PACHECO & GONSEBATT, 2009). Para serem consideradas como tal, essas substâncias têm que estar presentes em pequenas concentrações em relação ao substrato oxidável e ser capazes de impedir ou retardar a oxidação desse substrato (HALLIWELL, AESCHBACH, LÖLIGER *et al.*, 1995). O β -caroteno (pró-vitamina A) e a vitamina E (tocoferóis e tocotrienóis, principalmente o α -tocoferol), a vitamina C (ácido ascórbico), os compostos fenólicos e mais recentemente as proteínas são exemplos de compostos com atividades antioxidantes presentes nos alimentos. Além desses, os micronutrientes selênio, zinco, cobre e manganês, presentes em frutas e vegetais participam indiretamente do sistema de defesa antioxidante (LIMÓN-PACHECO & GONSEBATT, 2009).

Dentre os compostos fenólicos, ácidos fenólicos e flavonóides se destacam por apresentarem relevante capacidade antioxidante. Na célula vegetal, esses compostos estão em vacúolos celulares ou, na maioria das vezes, encontram-se ligados por meio de uma ligação covalente a polímeros insolúveis como as proteínas e, por isso, necessitam ser liberados por meio de tratamento térmico ou enzimático, fermentação, radiação infravermelho para melhor aproveitamento de sua atividade antioxidante (ROBBINS, 2003; JEONG, KIM, KIM *et al.*, 2004).

As proteínas dos alimentos, além do conhecido valor nutricional, também podem atuar como antioxidantes (JENKINS, KENDALL, VIDGEN *et al.*, 1999). A atividade antioxidante de hidrolisados proteicos está relacionada com a composição e sequência dos aminoácidos e com o tamanho e a estrutura tridimensional do peptídeo (PEÑA-

RAMOS, XIONG & ARTEAGA, 2004). O mecanismo de atuação antioxidante vai depender da composição aminoacídica da proteína. Na maioria das vezes a capacidade antioxidante dos aminoácidos no polipeptídeo encontra-se diminuída devido à conformação espacial que a proteína assume, que concentra resíduos capazes de neutralizar radicais livres no interior da molécula, dificultando o acesso das espécies reativas aos centros nucleofílicos. A hidrólise da proteína provoca alterações na estrutura tridimensional e contribui para aumentar a exposição desses resíduos de aminoácidos, aumentando sua atuação como quelantes, sequestradores de radical, redutores de hidroperóxidos e aldeídos (ELIAS, KELLERBY & DECKER, 2008).

Métodos *in vitro* que simulam as condições do trato gastrointestinal, permitem estudar como a digestão pode interferir na atividade antioxidante de peptídeos e compostos fenólicos (BERMÚDEZ-SOTO, TOMÁS-BARBERÁN & GARCÍA-CONESA, 2007; SANNAVEERAPPA, WESTLUND, SANDBERG *et al.*, 2007; YOU, ZHAO, REGENSTEIN *et al.*, 2010).

Para os compostos fenólicos, o processo de digestão *in vitro*, envolvendo a ação das enzimas digestivas e dos sais biliares, pode promover a liberação tanto dos compostos que estão armazenados na célula vegetal como aqueles que estão ligados a outras substâncias (SAURA-CALIXTO, SERRANO & GOÑI, 2007). Todavia, a maior liberação de compostos antioxidantes por meio da digestão *in vitro* não indica, necessariamente, que a ação antioxidante será maior do que aquela encontrada nos compostos que foram extraídos por solvente orgânico (JEONG, KIM, KIM *et al.*, 2004; SAURA-CALIXTO, SERRANO & GOÑI, 2007). A ação das enzimas gástricas e pancreáticas pode aumentar (SANNAVEERAPPA, WESTLUND, SANDBERG *et al.*, 2007; SAMARANAYAKA, KITTS & LI-CHAN, 2010) tanto como não alterar (SAMARANAYAKA, KITTS & LI-CHAN, 2010) ou reduzir a atividade antioxidante de proteínas e peptídeos (MÖLLER, SCHOLZ-AHRENS, ROOS *et al.*, 2008). Durante o processo digestório, os peptídeos são degradados pelas enzimas de forma a favorecer a formação de peptídeos de menor massa molecular e maior atividade antioxidante ou promover a hidrólise de peptídeos em aminoácidos resultando na redução da atividade antioxidante (SANNAVEERAPPA, WESTLUND, SANDBERG *et al.*, 2007; MÖLLER, SCHOLZ-AHRENS, ROOS *et al.*, 2008). Além disso, durante esse processo, proteínas e peptídeos são expostos a diversos agentes oxidantes provenientes do próprio alimento ou do

processo digestório, que podem afetar a estabilidade e comprometer a capacidade dos hidrolisados de atuarem como redutores (YOU, ZHAO, REGENSTEIN *et al.*, 2010).

Desta forma, para o aproveitamento do potencial antioxidante que compostos fenólicos e peptídeos podem desempenhar no organismo é necessário que eles estejam bioacessíveis e biodisponíveis (TEDESCHI, CLEMENT, ROUVET *et al.*, 2009). Além da bioacessibilidade e biodisponibilidade, deve-se considerar o fato de que compostos antioxidantes de origem não proteica podem influenciar a atividade antioxidante de peptídeos (HUANG, MAJUMDER & WU, 2010). Huang *et al.* (2010) verificaram que a presença de cafeína, quercitina, vitamina C e catequina afetaram positivamente a capacidade sequestradora de radicais livres do hidrolisado proteico da clara do ovo. Em testes *in vitro* a interação entre a vitamina C e o hidrolisado da β -lactoglobulina foi tanto positiva como negativa, conforme tamanho do peptídeo resultante da hidrólise (HERNÁNDEZ-LEDESMA, AMIGO, RECIO *et al.*, 2007). Não foram encontrados relatos na literatura sobre os efeitos dos compostos fenólicos sobre a atividade antioxidante de hidrolisado de proteína vegetal, no entanto, a presença de proteína pode afetar a atividade antioxidante dos compostos fenólicos. O estudo de Gahler *et al.*, (2003) com sopa de tomate mostrou que há aumento no teor de compostos fenólicos livres com o aumento da temperatura do tratamento térmico. Esse aumento foi atribuído pelos autores à liberação de proteína na matriz do alimento, que estaria ligada aos compostos fenólicos, impedindo-os de atuarem como antioxidantes.

A linhaça, semente oleaginosa proveniente da planta linho (*Linum usitatissimum* L.), tem motivado diversas pesquisas que avaliam a sua ação e ou de seus constituintes sobre a redução do risco ou o controle de doenças. Foram demonstrados efeitos na redução da glicose pós-prandial (CUNNANE, GANGULI, MENARD *et al.*, 1993) e do colesterol plasmático em adultos jovens eutróficos (CUNNANE, HAMADEH, LIEDE *et al.*, 1995) e de LDL colesterol, na prevenção de doença cardiovascular e alguns tipos de câncer, principalmente os de mama e de próstata em adultos com dislipidemia (JENKINS, KENDALL, VIDGEN *et al.*, 1999; DEMARK-WAHNEFRIED, POLASCIK, GEORGE *et al.*, 2008). A maioria das pesquisas sobre os benefícios da linhaça à saúde tem focado principalmente na ação do ácido α -linolênico (ALA), das lignanas, dos compostos fenólicos e das fibras solúveis, enquanto que as proteínas, presentes em quantidades expressivas, são pouco estudadas (MARAMBE, SHAND & WANASUNDARA, 2008; UDENIGWE, LU, HAN *et al.*, 2009). Por meio de testes *in vitro*, Marambe *et al.* (2008)

verificaram que a proteína de linhaça hidrolisada por *Flavourzyme*, um complexo de endo e exopeptidases, apresentou atividade antihipertensiva e antioxidante, capaz de seqüestrar o radical hidroxila. No estudo de Udenigwe *et al.* (2009), no qual a proteína de linhaça foi hidrolisada por sete proteases (Alcalase, pancreatina, pepsina, termolisina, papaína, tripsina e ficina), foi observado que o hidrolisado possuía atividades antiinflamatória e antioxidante, capaz de sequestrar radical hidroxila e superóxido. Não foram encontrados na literatura estudos que avaliam, *in vitro* ou *in vivo*, a influência das enzimas do trato gastrintestinal na atividade antioxidante do hidrolisado proteico de linhaça. Dessa forma, a simulação da digestão gastrintestinal torna-se interessante por fornecer informações iniciais de como o processo digestório pode interferir na bioatividade dos produtos proteicos obtidos a partir da farinha de linhaça.

2- Objetivos

2.1- Objetivo Geral

Investigar a capacidade antioxidante dos compostos bioacessíveis da farinha, concentrado e hidrolisados proteicos de linhaça.

2.2- Objetivos Específicos

- Estabelecer condições ótimas de hidrólise do concentrado proteico com Alcalase para obtenção de hidrolisados com maior potencial antioxidante.

- Obter e caracterizar quimicamente a farinha de linhaça desengordurada (FLD), concentrado proteico e os hidrolisados proteicos que apresentarem maior potencial antioxidante antes e após a digestão *in vitro*.

3- Revisão Bibliográfica

3.1- Radicais Livres e Antioxidantes

Existem evidências numerosas sobre o papel dos radicais livres em uma série de condições patológicas, incluindo envelhecimento, câncer, esclerose múltipla, doenças cardiovasculares. (MARTÍNEZ-CAYUELA, 1995; CERIELLO & MOTZ, 2004; ROBERTS & SINDHU, 2009; TARKO, DUDA-CHODAK & TUSZYŃSKI, 2009). A fim de fortalecer o sistema de defesa antioxidante e reduzir os efeitos deletérios que um ambiente pró-oxidante pode causar ao organismo, pesquisadores têm concentrado esforços para encontrar nos alimentos componentes que atuem como redutores em meio biológico e auxiliem na prevenção e no retardo do desenvolvimento de doenças crônicas (KRIS-ETHERTON, HECKER, BONANOME *et al.*, 2002; ISSA, VOLATE & WARGOVICH, 2006; OZSOY, YILMAZ, KURT *et al.*, 2009; OKARTER, LIU, SORRELLS *et al.*, 2010).

Esses esforços se justificam com base em estudos epidemiológicos que têm mostrado que o consumo regular de diferentes hortaliças, frutas, grãos e cereais integrais fornecem nutrientes e compostos bioativos que irão aumentar a capacidade do sistema de defesa antioxidante do organismo. Um dos principais mecanismos para que os compostos bioativos presentes nos alimentos exerçam efeito protetor é por meio da propriedade antioxidante capaz de neutralizar os radicais livres responsáveis pelo aparecimento e desenvolvimento de doenças crônicas (LIU, 2007; FRANZINI, ARDIGÒ, VALTUEÑA *et al.*, 2010).

Em sistemas biológicos, o oxigênio é uma molécula essencial ao metabolismo celular, mas paradoxalmente, é também um potente agente tóxico por gerar como subprodutos os radicais livres, que provocam oxidação de biomoléculas e danos às células (LIMÓN-PACHECO & GONSEBATT, 2009).

Os radicais livres são espécies químicas de vida curta e muito reativas (MARTÍNEZ-CAYUELA, 1995), que contém um ou mais elétrons desemparelhados (WICKENS, 2001). Dentre eles, destacam-se as espécies reativas do oxigênio (EROs), que são formados a partir do metabolismo energético e do consumo de oxigênio intracelular, por meio das reações da cadeia respiratória que ocorrem na mitocôndria. Radical hidroxila, ânion superóxido e peróxido de hidrogênio são exemplos de espécies reativas bastante comuns em meio biológico (WICKENS, 2001). Quando ocorre um

desbalanço entre a produção de radicais livres e a capacidade do organismo em neutralizá-los, devido a um excesso de radicais produzidos ou por enfraquecimento do sistema de defesa antioxidante, o organismo fica mais susceptível à oxidação, o que caracteriza um estado de estresse oxidativo (MARTÍNEZ-CAYUELA, 1995; LIMÓN-PACHECO & GONSEBATT, 2009).

O sistema antioxidante tem a função de proteger as macromoléculas, alvos preferenciais dos radicais livres (HUANG, OU & PRIOR, 2005). Eles podem reagir com ácidos graxos insaturados da membrana provocando uma cascata de peroxidação lipídica que resulta na formação de malonodialdeído e outros hidroperóxidos, que são espécies reativas capazes de desencadear novas cascatas de oxidação. A oxidação dos lipídios faz com que se altere a fluidez, a elasticidade da membrana e a permeabilidade seletiva da membrana, prejudicando o metabolismo celular (RAMARATHNAM, OSAWA, OCHI *et al.*, 1995; WICKENS, 2001). Nas proteínas, os radicais podem reagir nos resíduos de cisteína, tirosina e metionina, levando a formação de novas ligações inter e intra proteína e de mais radicais livres (VALKO, RHODES, MONCOL *et al.*, 2006). No DNA eles podem reagir nos centros nucleofílicos dos nucleosídeos resultando em mutações, anomalias cromossômicas que, se se acumularem no organismo, desencadearão um processo carcinogênico (ISSA, VOLATE & WARGOVICH, 2006).

Para neutralizar os radicais livres e reduzir o quadro de estresse oxidativo, o organismo dispõe de diversas substâncias antioxidantes. Para serem consideradas como tal, essas substâncias têm que estar presentes em pequenas concentrações em relação ao substrato oxidável e serem capazes de impedir ou retardar a oxidação desse substrato (HALLIWELL, AESCHBACH, LÖLIGER *et al.*, 1995).

O sistema de defesa antioxidante pode atuar por meio de quatro mecanismos. O primeiro é através de reações catalíticas com a participação de enzimas, antioxidantes endógenos, como a catalase, superóxido dismutase e peroxidase. Nessas reações, selênio, zinco, cobre e manganês atuam como co-fatores enzimáticos. Um exemplo desse mecanismo é a conversão de peróxido de hidrogênio em oxigênio e água, com participação da catalase. O segundo mecanismo é através da ligação de proteínas como a transferrina e a ceruloplasmina aos íons ferrico e cúprico, respectivamente, que são íons pró-oxidantes. Essas reações enzimáticas contribuem para redução da concentração de radicais livres e resultam na redução das reações de iniciação e fazem parte do

sistema de defesa antioxidante primário. O terceiro se refere à proteção realizada por *heat shock* proteínas às macromoléculas em situações de estresse e o último mecanismo é a capacidade que as substâncias antioxidantes, adquiridos pela alimentação, como as vitaminas C e E (α tocoferol) têm de doar elétrons aos radicais, neutralizando-os (LIMÓN-PACHECO & GONSEBATT, 2009). Esses antioxidantes interrompem a etapa de propagação da cascata de oxidação e por isso fazem parte do sistema de defesa secundário (WICKENS, 2001; OU, HUANG, HAMPSCH-WOODILL *et al.*, 2002).

Para expandir a capacidade de defesa do sistema antioxidante é necessário o consumo de alimentos que contenham substâncias com capacidade antioxidante, de forma que uma dieta mista com vegetais, frutas, grãos e cereais integrais possa fornecer nutrientes e compostos bioativos que irão atuar em conjunto com os antioxidantes enzimáticos a fim de minimizar os efeitos deletérios provocados pelo estresse oxidativo (VALTUEÑA, PELLEGRINI, FRANZINI *et al.*, 2008).

3.2- Antioxidantes nos Alimentos

Diversas substâncias encontradas nos alimentos possuem comprovada ação antioxidante (LIMÓN-PACHECO & GONSEBATT, 2009). O β -caroteno (pró-vitamina A) e a vitamina E (tocoferóis e tocotrienóis, principalmente o α -tocoferol), os compostos fenólicos e mais recentemente as proteínas são exemplos de compostos com atividades antioxidantes presentes nos alimentos. Além desses, os micronutrientes selênio, zinco, cobre e manganês, presentes em frutas e vegetais participam indiretamente do sistema de defesa antioxidante (LIMÓN-PACHECO & GONSEBATT, 2009).

A vitamina C atua sequestrando radicais livres em meio aquoso e participa da regeneração do α -tocoferol a partir do radical α -tocoferoxil. A vitamina E se destaca por impedir a peroxidação lipídica e por sequestrar os radicais peroxil e a vitamina A por sequestrar oxigênio singlet e o radical peroxil (DIPLOCK, CHARULEUX, CROZIER-WILLI *et al.*, 1998). Os sais minerais participam como cofatores de enzimas como a glutational peroxidase, enzima chave no sistema de defesa antioxidante enzimático do organismo (LIMÓN-PACHECO & GONSEBATT, 2009).

Os compostos fenólicos, produtos do metabolismo secundário de vegetais, abrangem um amplo grupo de substâncias (ácidos fenólicos, flavonóides e taninos) que

apresentam em sua estrutura pelo menos um anel aromático com um ou mais hidrogênios substituídos por grupos hidroxila. A função dessas substâncias em plantas não é totalmente conhecida, mas sabe-se que elas estão envolvidas na síntese proteica, na atividade enzimática, na fotossíntese, proteção contra insetos e raios UV e, quando presentes em partes comestíveis, são responsáveis pelas cores, características organolépticas e pelas propriedades antioxidantes (ROBBINS, 2003; BALASUNDRAM, SUNDRAM & SAMMAN, 2006).

Dentre os compostos fenólicos, ácidos fenólicos e flavonóides se destacam por apresentarem capacidade antioxidante relevante. Na célula vegetal, esses compostos estão em vacúolos celulares ou, na maioria das vezes, encontram-se ligados por meio de uma ligação covalente a polímeros insolúveis como as proteínas e, por isso, necessitam ser liberados por meio de tratamento térmico ou enzimático, fermentação, radiação infravermelho para melhor aproveitamento de sua atividade antioxidante (ROBBINS, 2003; JEONG, KIM, KIM *et al.*, 2004).

Há evidências na literatura de que aminoácidos, peptídeos e proteínas provenientes dos alimentos de origem vegetal e animal podem trazer benefícios à saúde, uma vez que atuam como imunomoduladores, anti-hipertensivos, antitrombóticos, antioxidantes, e interferem negativamente no desenvolvimento de osteoporose e dislipidemias (KORHONEN & PIHLANTO, 2006; MÖLLER, SCHOLZ-AHRENS, ROOS *et al.*, 2008). Esse enfoque nas propriedades funcionais da proteína tem gerado pesquisas destacando a capacidade antioxidante que peptídeos gerados a partir da hidrólise da proteína de diferentes alimentos podem apresentar. Estudos com as proteínas do leite, da soja, do trigo, do amaranto, e de ovos, têm mostrado potencial antioxidante que peptídeos e aminoácidos podem apresentar, principalmente por meio de testes *in vitro*, que avaliam diferentes mecanismos de capacidade antioxidante (CHEN, MURAMOTO, YAMAUCHI *et al.*, 1996; PEÑA-RAMOS, XIONG & ARTEAGA, 2004; OZSOY, YILMAZ, KURT *et al.*, 2009; HUANG, MAJUMDER & WU, 2010).

3.3- Proteínas e peptídeos com ação antioxidante

A busca por antioxidantes naturais se deve principalmente ao risco potencial à saúde que os antioxidantes sintéticos podem oferecer (ZHU, CHEN, TANG *et al.*, 2008;

YOU, ZHAO, CUI *et al.*, 2009). Diversas substâncias naturais como extratos fenólicos de plantas, tocoferol e catequinas, com comprovada ação antioxidante, são amplamente utilizadas como forma de proteger o alimento da oxidação e conseqüentemente da alteração de suas características originais, e também como forma de agregar ao alimento propriedades funcionais. Nesse contexto, a busca por novos componentes naturais com possível ação antioxidante tem sido investigada, entre eles os peptídeos e aminoácidos, tanto de origem animal quanto vegetal (ZHU, CHEN, TANG *et al.*, 2008).

Peptídeos e aminoácidos antioxidantes são considerados substâncias bioativas; ou seja, são componentes presentes nos alimentos, capazes de interferir no metabolismo ou em processos fisiológicos do organismo causando um impacto positivo na saúde do indivíduo (MÖLLER, SCHOLZ-AHRENS, ROOS *et al.*, 2008). Os peptídeos bioativos podem atuar como antihipertensivos, antioxidantes, antitrombóticos, anticarcinogênicos, opióides e imunomoduladores (KITTS & WEILER, 2003; MÖLLER, SCHOLZ-AHRENS, ROOS *et al.*, 2008).

A modificação enzimática pode ser utilizada para acentuar o potencial bioativo das proteínas (ARCAN & YEMENICIOGLU, 2010). A hidrólise da proteína resulta na formação de aminoácidos e peptídeos, com tamanhos variados, de 3 a 20 aminoácidos, chamados de hidrolisado proteico. Essa hidrólise pode ocorrer, *in vivo* por ação de enzimas do trato digestivo e ou por enzimas da microbiota intestinal e *in vitro* por ação de enzimas isoladas de microrganismos (MÖLLER, SCHOLZ-AHRENS, ROOS *et al.*, 2008).

Os principais efeitos provocados pela hidrólise enzimática são a diminuição do peso molecular, o aumento do número de grupos ionizáveis e da exposição de resíduos predominantemente hidrofóbicos ao meio externo. Diferentes peptídeos podem ser gerados de acordo com a especificidade da enzima, com as condições do meio e o tempo de reação, o que resulta em um produto que contém aminoácidos livres, peptídeos de baixa a alta massa molecular e proteínas não hidrolisadas. Além da liberação de peptídeos bioativos, a modificação enzimática altera outras propriedades funcionais das proteínas como a capacidade de formar géis, emulsões e espumas (PANYAM & KILARA, 1996).

A modificação enzimática pode ser quantificada por meio do cálculo do grau de hidrólise (GH), que mede a porcentagem de ligações peptídicas quebradas pela protease durante a reação. Ele pode ser mensurado, dentre outras formas, por meio da medida do

consumo de base necessária para manter o pH constante durante a hidrólise (PANYAM & KILARA, 1996).

Diversas enzimas podem ser utilizadas para obtenção de hidrolisados proteicos, como Neutrase, bromelina, papaína, *Flavourzyme* e Alcalase (MARAMBE, SHAND & WANASUNDARA, 2008; UDENIGWE, LU, HAN *et al.*, 2009; ORSINI DELGADO, TIRONI & AÑÓN, 2011). Essa última é uma endopeptidase, do tipo serina protease, produzida pelo *Bacillus licheniformis* e bastante utilizada devido à sua ampla especificidade e grande capacidade hidrolítica para produção de hidrolisados de proteínas de origem vegetal. Ela atua quebrando, preferencialmente, a porção carbóxi terminal dos aminoácidos glutamina, metionina, lisina, tirosina e glutamato (YANG, YANG, LI *et al.*, 2011).

Leite, iogurte, queijos, ovos, peixes (sardinha, salmão, atum), trigo, soja, e sorgo são alguns alimentos que se destacam como boas fontes de proteínas e peptídeos bioativos (CHEN, MURAMOTO, YAMAUCHI *et al.*, 1996; PEÑA-RAMOS, XIONG & ARTEAGA, 2004; MÖLLER, SCHOLZ-AHRENS, ROOS *et al.*, 2008). A maioria desses polipeptídeos bioativos não são absorvidos pelo intestino e atuam diretamente no trato gastrointestinal ou indiretamente através de receptores e vias de sinalização celular dos enterócitos (MÖLLER, SCHOLZ-AHRENS, ROOS *et al.*, 2008).

Dentre as diversas funções que peptídeos e aminoácidos bioativos podem exercer, a capacidade antioxidante é uma das que tem sido amplamente estudada (LI, JIANG, ZHANG *et al.*, 2008; TANG, PENG, ZHEN *et al.*, 2009; ARCAN & YEMENICIOGLU, 2010; ORSINI DELGADO, TIRONI & AÑÓN, 2011). A atividade antioxidante de hidrolisados proteicos está relacionada com a composição e sequência dos aminoácidos e com o tamanho e a estrutura tridimensional do peptídeo (PEÑA-RAMOS, XIONG & ARTEAGA, 2004). O mecanismo de atuação antioxidante vai depender da composição aminoacídica da proteína. Na maioria das vezes, a capacidade antioxidante dos aminoácidos no polipeptídeo encontra-se limitada devido à conformação espacial que a proteína assume que concentra resíduos capazes de neutralizar radicais livres no cerne da molécula, dificultando o acesso das espécies reativas aos centros nucleofílicos. A hidrólise da proteína provoca alterações na estrutura tridimensional e contribui para aumentar a exposição dos resíduos de aminoácidos, aumentando a sua atuação como quelante,

sequestrador de radical, redutor de hidroperóxidos e de aldeídos (ELIAS, KELLERBY & DECKER, 2008).

A maior capacidade antioxidante dos peptídeos em relação à proteína de origem e aos aminoácidos deve-se à relação entre as propriedades químicas, físicas e na composição química do peptídeo (ELIAS, KELLERBY & DECKER, 2008). As proteínas que contêm aminoácidos sulfurados, aromáticos e de caráter básico apresentam elevado potencial em doar prótons, assim como aquelas que têm aminoácidos básicos e ácidos possuem a habilidade de quelar metais responsáveis por desencadear o processo de oxidação lipídica (ARCAN & YEMENICIOGLU, 2010). Geralmente o maior potencial antioxidante é observado nas proteínas e peptídeos compostos predominantemente por aminoácidos de caráter hidrofóbico (LI, JIANG, ZHANG *et al.*, 2008).

Peptídeos com resíduos de His, Tyr, Met e Pro possuem poder de neutralizar radicais livres (PEÑA-RAMOS, XIONG & ARTEAGA, 2004), a sequência Leu-Leu-Pro-His-His apresenta grande capacidade antioxidante (CHEN, MURAMOTO, YAMAUCHI *et al.*, 1996) e a sequência Tyr-Phe-Tyr-Pro-Glu-Leu atua como seqüestrador de radicais livres e supressor do ânion superóxido (KITTS & WEILER, 2003). Peptídeos que contêm resíduos de His atuam como quelantes e sequestradores do radical hidroxil (KITTS & WEILER, 2003). Aminoácidos livres como Tyr, Met, His, Lys, Trp e Pro também podem exercer atividade antioxidante (CHEN, MURAMOTO, YAMAUCHI *et al.*, 1996). , porém o aumento no grau de hidrólise da proteína resulta na diminuição da atividade antioxidante, devido à redução da massa molecular dos peptídeos e aumento no número de aminoácidos livres (ELIAS, KELLERBY & DECKER, 2008).

A atividade antioxidante de hidrolisados proteicos é afetada pelas condições operacionais de obtenção do concentrado proteico; pelo tipo de protease utilizada e pelo grau de hidrólise escolhido (DONG, ZENG, WANG *et al.*, 2008). Para diferentes proteínas, o mesmo grau de hidrólise fornece uma composição distinta de aminoácidos e peptídeos nos hidrolisados e, conseqüentemente, diferentes atividades antioxidantes (YOU, ZHAO, CUI *et al.*, 2009). Isso permite que a atividade antioxidante do hidrolisado seja manipulada conforme o desejado, a partir da determinação prévia das condições de hidrólise (DONG, ZENG, WANG *et al.*, 2008).

Compostos antioxidantes de origem não proteica podem influenciar a atividade antioxidante de peptídeos, embora os resultados não sejam conclusivos (HUANG,

MAJUMDER & WU, 2010). Huang *et al.* (2010) verificaram que a presença de cafeína, quercitina, vitamina C e catequina exercem efeito sinérgico na capacidade sequestradora de radicais livres do hidrolisado proteico da clara do ovo. Em testes *in vitro* a interação entre a vitamina C e o hidrolisado da β -lactoglobulina foi tanto positiva como negativa, conforme tamanho do peptídeo resultante da hidrólise (HERNÁNDEZ-LEDESMA, AMIGO, RECIO *et al.*, 2007). No estudo de Gahler *et al.* (2003) foi observado um aumento no teor de compostos fenólicos livres à medida que aumentava a temperatura do tratamento térmico de sopa de tomate. A elevação da temperatura tanto favoreceu o rompimento das ligações que mantinham os compostos fenólicos associados às proteínas da matriz alimentar, e provocou alterações na conformação espacial da proteína que também contribuíram para a maior liberação dos compostos fenólicos.

3.4- Outros compostos antioxidantes em hidrolisados proteicos de origem vegetal

Compostos fenólicos são compostos amplamente distribuídos no reino vegetal, podendo ser encontrados em frutas, hortaliças, grãos, castanhas e sementes. Nos alimentos, esses compostos podem atuar como antioxidantes e, no organismo, podem apresentar efeito protetor contra o desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis. Os polifenóis incluem os flavonóides (flavonas, flavonóides, flavanas, flavononas, isoflavonas, catequinas, chalconas, antocianinas e antocianidinas), ácido clorogênico, ácidos fenólicos, cumarinas, lignanas e ligninas, taninos, tocoferóis e tocotrienóis (NACZK & SHAHIDI, 2006; MEDINA, 2011).

Durante o processo de extração da fração proteica, os compostos fenólicos que se encontram ligados às proteínas são arrastados e, conseqüentemente, estarão presentes no concentrado proteico. Na obtenção de hidrolisados, esses compostos podem ser liberados devido à ação enzimática (ROBBINS, 2003; JEONG, KIM, KIM *et al.*, 2004; TANG, PENG, ZHEN *et al.*, 2009) e, junto com os aminoácidos e peptídeos formados, contribuir para a atividade antioxidante do hidrolisado (TANG, PENG, ZHEN *et al.*, 2009).

Tang *et al.* (2009) estudaram a diferença no teor de fenólicos totais na farinha e no hidrolisado proteico de trigo sarraceno obtido com diferentes graus de hidrólise. Nesse estudo, a ligação entre fenólicos e proteínas influenciou a solubilidade e a susceptibilidade

das proteínas à hidrólise. A ligação dos compostos fenólicos com as proteínas, preferencialmente as albuminas, forma agregados de alta massa molecular reduzindo a solubilidade em água ao mesmo tempo em que expõe sítios catalíticos que, na proteína nativa, estariam voltados para o interior da molécula, favorecendo a ação de enzimas hidrolíticas. A presença de polifenóis associados às proteínas também interfere na capacidade antioxidante do hidrolisado, uma vez que existe uma forte correlação que pode ser encontrada entre a atividade antioxidante e teor de fenólicos totais do hidrolisado (TANG, PENG, ZHEN *et al.*, 2009).

3.5- Métodos *in vitro* para avaliar a capacidade redutora de compostos antioxidantes

Diversos tipos de ensaios podem ser utilizados para estimar a atividade antioxidante de produtos de origem vegetal ou animal (OU, HUANG, HAMPSCH-WOODILL *et al.*, 2002; THAIPONG, BOONPRAKOB, CROSBY *et al.*, 2006; MAGALHÃES, SEGUNDO, REIS *et al.*, 2008). Esses ensaios podem se basear em reação de transferência de elétrons (SET), como a capacidade antioxidante equivalente ao Trolox (TEAC) e o poder de redução do íon ferro (FRAP), ou em reação de transferência de um átomo de hidrogênio (HAT) como o potencial de absorção total de radical (TRAP) e a capacidade de absorção do radical oxigênio (ORAC) (OU, HUANG, HAMPSCH-WOODILL *et al.*, 2002).

Nos métodos baseados na reação SET, os antioxidantes interagem com as espécies reativas sem a presença de uma terceira molécula que competiria com o antioxidante pela espécie oxidante (Equação 1). No caso do FRAP, a reação de transferência do elétron ocorre entre o complexo íon férrico- 2,4,6-tripiridilhidrazina [$\text{Fe}^{+3}(\text{TPTZ})_2$] e o antioxidante (ArOH) (Equação 2). Nesse ensaio, a habilidade dos antioxidantes em reduzir o complexo [$\text{Fe}^{+3}(\text{TPTZ})_2$] em meio ácido é calculada pela medida da absorbância a 595 nm, após trinta minutos de repouso, a temperatura de 37 °C (MAGALHÃES, SEGUNDO, REIS *et al.*, 2008).



Esse ensaio é simples, barato e oferece um índice de atividade antioxidante confiável, porém alguns aspectos devem ser respeitados. O primeiro é em relação ao potencial redox da substância antioxidante, que deve ser superior ao par $\text{Fe}^{+3}/\text{Fe}^{+2}$, caso contrário uma substância que não exerce atividade antioxidante pode atuar como redutora gerando um resultado falso positivo. O outro é o fato de que nem todos os antioxidantes reduzem os íons ferro em menos de trinta minutos, como é o caso dos ácidos fenólicos caféico, ferrúlico, quercitina e ácido ascórbico, assim como antioxidantes com atividade seqüestradora de radical, como tióis e carotenóides, não podem ser determinados. O terceiro se refere ao baixo valor de pH, 3,7, que pode induzir a precipitação de proteínas, como a caseína do leite e tornar mais lenta a transferência de elétrons. Por último, a interferência da bilirrubina, que quando oxidada se transforma em biliverdina, composto com alta absorvância a 595 nm e de extratos coloridos de vegetais. Esse ensaio também não favorece a análise de amostras biológicas, uma vez que seus mecanismos não se relacionam com os mecanismos fisiológicos (OU, HUANG, HAMPSCH-WOODILL *et al.*, 2002; MAGALHÃES, SEGUNDO, REIS *et al.*, 2008).

Nos métodos baseados na reação HAT, há um radical iniciador responsável por gerar os radicais peroxil (ROO^{\bullet}); uma sonda, que representa uma biomolécula, alvo em potencial para sofrer ataque do radical livre e a espécie antioxidante (Equações 3 e 4). Nesses métodos, a capacidade antioxidante depende da taxa de reação entre o radical e a espécie antioxidante bem como do radical com a sonda e da concentração entre o composto antioxidante e a sonda (MAGALHÃES, SEGUNDO, REIS *et al.*, 2008).



No ORAC, a fluoresceína (FI) é utilizada como sonda, e o 2,2'azobis (2-amidino-propano) dihidroclorido (AAPH) como gerador de radicais ROO^{\bullet} . A redução na fluorescência da fluoresceína é um indicativo do ataque do radical à sonda. Na presença de um antioxidante, ocorre a doação de um átomo de hidrogênio para o radical peroxil, transformando-se em hidroperóxido (ROOH) e num radical estável (ArO^{\bullet}). Isso diminui a taxa de redução da fluorescência uma vez que o radical é, em parte, neutralizado pelo antioxidante. O efeito protetor do antioxidante sobre a sonda pode ser mensurado através do cálculo da área abaixo da curva (AUC) de decaimento da fluorescência da fluoresceína da amostra comparada com a curva sem a presença de um antioxidante por um período

superior a trinta minutos e os resultados são expressos em μM de equivalente de Trolox. Nesse ensaio, o decaimento da fluorescência se deve principalmente à concentração de AAPH e não da fluoresceína. O AAPH não reage diretamente com a amostra, de forma que o resultado obtido é a medida direta da capacidade da amostra em atuar como *chain-breaking* (OU, HUANG, HAMPSCH-WOODILL *et al.*, 2002).

O ORAC é um dos métodos mais comuns para determinação da atividade de sequestro do radical peróxil (MAGALHÃES, SEGUNDO, REIS *et al.*, 2008), muito utilizado para avaliar a capacidade antioxidante do plasma, proteínas e antioxidantes extraídos de plantas e alimentos (DÁVALOS, GÓMEZ-CORDOVÉS & BARTOLOMÉ, 2004). No entanto, esse ensaio não mede a atividade antioxidante total de um composto uma vez que seu mecanismo permite somente a avaliação da neutralização dos radicais peróxil. O oxigênio singlet e outros radicais provenientes do oxigênio, como o radical hidroxil, que possuem mecanismos de reação distintos ao do peróxil, não podem ser mensurados por esse ensaio (OU, HUANG, HAMPSCH-WOODILL *et al.*, 2002).

3.6- Influência da digestão *in vitro* na atividade antioxidante de proteínas e compostos fenólicos

A avaliação da capacidade antioxidante dos hidrolisados podem contribuir para o uso desses compostos para desenvolvimento de alimentos funcionais e nutracêuticos (TANG, PENG, ZHEN *et al.*, 2009). No entanto, faltam estudos que comprovem a eficácia dos hidrolisados proteicos *in vivo* (KORHONEN & PIHLANTO, 2006; MÖLLER, SCHOLZ-AHRENS, ROOS *et al.*, 2008; YOU, ZHAO, REGENSTEIN *et al.*, 2010).

Para que estes compostos apresentem capacidade antioxidante *in vivo* é necessário que eles alcancem o seu sítio de ação e, para isto, precisam ser digeridos, liberados da matriz alimentícia, solubilizados e absorvidos (SOLER-RIVAS, RAMÍREZ-ANGUIANO, REGLERO *et al.*, 2009). Dentro do trato gastrointestinal, os compostos antioxidantes dos alimentos são expostos a diversos agentes oxidantes provenientes do próprio alimento ou do processo digestório, que podem afetar a estabilidade e comprometer a capacidade dos componentes de atuarem como redutores (YOU, ZHAO, REGENSTEIN *et al.*, 2010). Além disso, durante esse processo, eles podem ser degradados, podem não ser absorvidos ou podem estar em concentrações inferiores à

necessária para provocar um efeito significativo (MÖLLER, SCHOLZ-AHRENS, ROOS *et al.*, 2008).

A digestão é um processo fisiológico que quebra os macronutrientes presentes nos alimentos em moléculas passíveis de serem assimiladas pelos enterócitos. A degradação começa pela boca com a quebra parcial dos polissacarídeos pela ptilialina presente na saliva. No estômago, o bolo alimentar é misturado ao suco gástrico onde ocorre principalmente a quebra das proteínas em peptídeos pela ação da pepsina. O processo digestório segue com a presença do digerido gástrico no intestino delgado, na presença de suco pancreático e sais biliares. Nessa etapa, ocorre a hidrólise de proteínas, peptídeos, oligossacarídeos, ácidos nucleicos e lipídios em subunidades capazes de serem absorvidas pelo epitélio intestinal (SOLER-RIVAS, RAMÍREZ-ANGUIANO, REGLERO *et al.*, 2009).

As condições do trato gastrintestinal podem ser mimetizadas por métodos de digestão *in vitro*. Esses métodos são úteis para se estudar como a dinâmica do processo digestório pode interferir na bioatividade dos peptídeos. É possível verificar se os componentes dos alimentos podem reagir com o peptídeo e também se as condições de cada parte do trato gastrintestinal, com diferentes valores de pH, e diferentes tipos e concentrações de enzimas e sais biliares influenciam na atividade antioxidante do mesmo (MARTOS, CONTRERAS, MOLINA *et al.*, 2010). Os métodos de digestão *in vitro* se caracterizam por serem rápidos, seguros e sem restrições éticas como acontece com os métodos *in vivo* (SANNAVEERAPPA, WESTLUND, SANDBERG *et al.*, 2007).

Por meio da simulação das condições do trato gastrintestinal, é possível avaliar como a digestão pode interferir na atividade de compostos antioxidantes (BERMÚDEZ-SOTO, TOMÁS-BARBERÁN & GARCÍA-CONESA, 2007; SANNAVEERAPPA, WESTLUND, SANDBERG *et al.*, 2007; YOU, ZHAO, REGENSTEIN *et al.*, 2010). A digestão *in vitro* foi utilizada para avaliar a atuação antioxidante de compostos fenólicos e flavononas da aronia, uma planta nativa da América do Norte (BERMÚDEZ-SOTO, TOMÁS-BARBERÁN & GARCÍA-CONESA, 2007), de hidrolisados de proteínas do ovo (MIGUEL, ALONSO, SALAICES *et al.*, 2007; MARTOS, CONTRERAS, MOLINA *et al.*, 2010), e de diferentes espécies de pescado (SAMARANAYAKA, KITTS & LI-CHAN, 2010; YOU, ZHAO, REGENSTEIN *et al.*, 2010).

Segundo Tagliazucchi *et al.* (2010), o trato gastrintestinal atua como um extrator de compostos fenólicos, seja por trituração liberando o conteúdo de fenólicos presentes dentro das células e dos que estão fracamente ligados à parede celular, seja pela ação de enzimas em diferentes condições de pH, promovendo a liberação daqueles compostos que estão mais fortemente aderidos à parede das células. Nesse processo, a maior parte dos polifenóis presentes nos alimentos, principalmente os flavonóides, são liberados na fase gástrica da digestão (MANDALARI, TOMAINO, RICH *et al.*, 2010; TAGLIAZUCCHI, VERZELLONI, BERTOLINI *et al.*, 2010; BOUAYED, HOFFMANN & BOHN, 2011). Na fase intestinal, ocorre uma elevação discreta no teor de fenóis totais em relação ao liberado na digestão gástrica, devido ao aumento no tempo de digestão e pela ação das enzimas intestinais nos demais componentes da matriz alimentar facilitando a liberação dos polifenóis (BOUAYED, HOFFMANN & BOHN, 2011).

A bioatividade dos compostos fenólicos também sofre interferências ao longo da digestão devido à presença de radicais livres e às alterações de pH. O trato gastrintestinal é constantemente exposto à espécies reativas presentes no alimento, produzidos por células do sistema imune ativadas por bactérias e toxinas provenientes do bolo alimentar e aqueles resultantes da respiração celular. A presença de compostos fenólicos na luz intestinal pode contribuir para manutenção do epitélio ao reduzir os radicais livres por meio da transferência de elétrons ou de átomos de hidrogênio. Essa atividade antioxidante é mais intensa no intestino do que no estômago, devido à desprotonação do grupo hidroxil dos anéis aromáticos provocada pela mudança de pH de ácido para levemente básico (BOUAYED, HOFFMANN & BOHN, 2011).

Em relação às proteínas e peptídeos, a ação das enzimas gástricas e pancreáticas pode aumentar (SANNAVEERAPPA, WESTLUND, SANDBERG *et al.*, 2007; SAMARANAYAKA, KITTS & LI-CHAN, 2010) tanto como não alterar (SAMARANAYAKA, KITTS & LI-CHAN, 2010) ou reduzir sua capacidade antioxidante (MÖLLER, SCHOLZ-AHRENS, ROOS *et al.*, 2008). Durante o processo digestório, os peptídeos são degradados pelas enzimas de forma a favorecer a formação de peptídeos de menor massa molecular e maior atividade antioxidante ou promover a hidrólise de peptídeos em aminoácidos resultando na redução da atividade antioxidante (SANNAVEERAPPA, WESTLUND, SANDBERG *et al.*, 2007; MÖLLER, SCHOLZ-AHRENS, ROOS *et al.*, 2008). Além disso, durante esse processo, proteínas e peptídeos são expostos a diversos agentes oxidantes provenientes do próprio alimento ou do processo digestório, que

podem afetar a estabilidade e comprometer a capacidade dos hidrolisados de atuarem como redutores (YOU, ZHAO, CUI *et al.*, 2009).

Estudo realizado por Orsini Delgado *et al.* (2011) envolvendo a bioatividade do concentrado e hidrolisado proteico de amaranto após a digestão *in vitro* mostrou que ambos, concentrado e hidrolisado, apresentam atividade antioxidante antes e após a digestão. Para o hidrolisado, a ação das enzimas digestivas foi menor em relação ao concentrado, no entanto essa diferença não provocou a redução da atividade antioxidante. Em estudo com concentrado proteico de grão de bico, Arcan & Yemenicioglu (2010) relataram que a hidrólise do concentrado com pepsina resultou num aumento da solubilidade e na capacidade de sequestrar radical das proteínas, entretanto reduziu a habilidade de quelar metais e a estabilidade de emulsões e espumas formadas por essas proteínas hidrolisadas.

A utilização de hidrolisados proteicos ou peptídeos como forma de melhorar a capacidade antioxidante dos alimentos funcionais traz um benefício a mais em relação a outros alimentos que são enriquecidos com substâncias antioxidantes, uma vez que a adição de proteína ao alimento também significa melhorar seu valor nutricional (HUANG, MAJUMDER & WU, 2010). Porém, é necessário desenvolver tecnologias que permitam adicionar aos alimentos peptídeos bioativos assegurando sua bioatividade por um período pré-determinado e com segurança. Os peptídeos são moléculas de baixo massa molecular, mais reativos que a proteína, e que, uma vez no alimento, têm maior chance de reagir com carboidratos, lipídios e outras substâncias presentes na matriz que resultarão na perda parcial ou total da bioatividade. Além disso, eles também estão susceptíveis a sofrerem alterações decorrentes das etapas de processamento que poderão levar a formação de produtos tóxicos, cancerígenos ou alergênicos (KORHONEN & PIHLANTO, 2006).

O estudo da influência da digestão *in vitro* nos hidrolisados proteicos permite prever como será sua liberação *in vivo* e fazer inferências sobre qual seria a matriz alimentar mais adequada para inseri-lo, bem como suas interações com demais nutrientes presente no alimento e com as enzimas digestivas (TEDESCHI, CLEMENT, ROUVET *et al.*, 2009). Todavia, não se pode afirmar que a liberação dos peptídeos bioativos da matriz alimentícia no trato gastrointestinal seja garantia de que eles serão absorvidos em sua totalidade e que, por consequência, haveria o máximo de aproveitamento de seu poder

antioxidante; da mesma forma, a liberação de compostos fenólicos por meio da digestão *in vitro* não indica, necessariamente, que a ação antioxidante será maior do que aquela encontrada nos compostos que foram extraídos por solvente orgânico (JEONG, KIM, KIM *et al.*, 2004; SAURA-CALIXTO, SERRANO & GOÑI, 2007).

Desta forma, para o aproveitamento do potencial antioxidante que compostos fenólicos e peptídeos podem desempenhar no organismo é necessário que eles estejam bioacessíveis e biodisponíveis (TEDESCHI, CLEMENT, ROUVET *et al.*, 2009).

3.7- Linhaça

A linhaça é uma semente oleaginosa, proveniente da planta linho que tem sido consumida há cerca de cinco mil anos como um ingrediente alimentar ou nutracêutico em razão de suas propriedades medicinais (OOMAH, 2001). Seu nome científico, *Linum usitatissimum* significa “muito útil”. Atualmente, ela tem despertado interesse por ser um ingrediente multifuncional na formulação de alimentos e por seus benefícios à saúde (RABETAFIKA, VAN REMOORTEL, DANTHINE *et al.*, 2011; SINGH, MRIDULA, REHAL *et al.*, 2011).

É cultivada principalmente em regiões frias, como no nordeste do Canadá, principal produtor mundial, que em 2009/2010 produziu pouco mais de 930 mil toneladas (CANADA, 2010) seguido por China, Índia, Estados Unidos e Etiópia (SINGH, MRIDULA, REHAL *et al.*, 2011). Os canadenses detêm 80% do mercado da linhaça e seus principais consumidores mundiais são União Européia, Estados Unidos, Japão e Coreia do Sul (MARAMBE, SHAND & WANASUNDARA, 2008; SINGH, MRIDULA, REHAL *et al.*, 2011). No Brasil, o cultivo de linhaça é feito no noroeste do Rio Grande do Sul (SOARES, PACHECO, BRITO *et al.*, 2009). A produção é pequena, 21 toneladas por ano, enquanto que na Argentina, maior produtor da América Latina, são produzidas cerca de 80 toneladas por ano (ALMEIDA, BOAVENTURA & GUZMAN-SILVA, 2009; SOARES, PACHECO, BRITO *et al.*, 2009).

As sementes de linhaça podem variar de coloração, de acordo com a quantidade de pigmentos na casca e a forma de cultivo, apresentando-se nas cores marrom escura e amarelo claro (MORRIS, 2007). A semente de cor marrom escura é rica em ácido alfa linolênico (ALA) e é a variedade mais produzida no Canadá (MORRIS, 2007). A semente

de linhaça de cor amarela pode ser de dois tipos, a variedade Ômega, desenvolvida nos Estados Unidos, que apresenta teores de ácido graxo ômega 3 semelhante ao das sementes de cor marrom e a variedade Solin, que apresenta baixos teores de ALA (MORRIS, 2007).

A composição da semente de linhaça é de aproximadamente 41% de lipídeos, 20% de proteínas, 28% de fibra total, 7,7% de umidade e 3,4% de cinzas. Essa composição sofre variações de acordo com genética, meio ambiente, forma de processamento da semente e método de análise utilizado (MORRIS, 2007).

Quanto à composição de lipídios, 75% deles se encontram no embrião e 30% na casca e no endosperma da semente. A linhaça contém 5 a 6% de ácido palmítico, 3 a 6% de ácido esteárico, 19 a 29% de ácido oléico, 14 a 18% de ácido linoléico e 52% de ácido alfa linolênico (ALA) (SINGH, MRIDULA, REHAL *et al.*, 2011). De acordo com Morris (2007), a quantidade de ácido alfa linolênico (ômega 3), e ácido graxo linoléico (ômega 6), corresponde a 57% e 16%, respectivamente, do teor de lipídios totais da linhaça (MORRIS, 2007).

Na semente de linhaça a proteína encontra-se 56 a 70% nos cotilédones e os outros 30% na casca e no endosperma (RABETAFIKA, VAN REMOORTEL, DANTHINE *et al.*, 2011). Os principais tipos de proteína que constituem a linhaça são a 11- 12S globulina e a 1,6 - 2S albumina. A fração de alto peso molecular é representada pelas globulinas composta por 5 subunidades de pesos moleculares 50,9; 35,3; 30,0; 24,6; e 14,4 kDa. Duas delas são ácidas (35,3; 30,0 kDa) e uma delas é básica (24,6 kDa). As albuminas são os principais componentes da fração de baixo peso molecular, composta por uma cadeia de polipeptídeo com peso molecular entre 16 e 18 kDa. Outros tipos de proteínas que podem ser encontradas na linhaça são as oleosinas, com peso molecular entre 16 a 24 kDa, de caráter lipofílico, encontrada entre os fosfolipídios; as proteínas ligadoras ao cádmio e proteínas antifúngicas (WANASUNDARA & SHAHIDI, 2003).

A composição aminoacídica é similar a da proteína de soja, que é considerada uma das proteínas vegetais de melhor qualidade (WANASUNDARA & SHAHIDI, 2003; MORRIS, 2007). A proteína de linhaça é uma excelente fonte de Arg, Gln e His, que têm conhecido poder de fortalecer o sistema imune; também é rica em Cys e Met que melhoram o sistema antioxidante do organismo, por meio da estabilização do DNA durante a divisão celular, e contribuem para redução do risco de certos tipos de câncer de

cólon (OOMAH, 2001). Os aminoácidos limitantes são Lys, Thr e Tyr (WANASUNDARA & SHAHIDI, 2003).

Em relação aos carboidratos, o teor de açúcares simples e amido na semente é inferior a 1% (MORRIS, 2007). A semente linhaça possui 28% de fibra dietética. A proporção entre fibra solúvel (mucilagem) e insolúvel (celulose e lignina) varia entre 20:80 e 40:60.

A mucilagem é um conjunto de polissacarídeos que, quando misturados à água, aumentam sua viscosidade e no organismo tem papel laxativo. Ela pode representar até 8% do peso da semente e sua hidrólise ácida gera diversos polissacarídeos como L-galactose, D-xilose, L-arabinose, L-raminose e ácido D-galacturônico (SINGH, MRIDULA, REHAL *et al.*, 2011).

Dentre os compostos fenólicos encontrados na linhaça, destacam-se no grupo das lignanas o SECO-2 [2,3-di- (metóxi-4hidróxi-benzil) butano 1,4 diol] que é encontrado conjugado a um diglicosídeo SDG (secoisolariciresinol diglicosídeo), o lariciresinol, isolariciresinol, matairesinol (STRUJIS, VINCKEN, VERHOEF *et al.*, 2007); no grupo dos ácidos fenólicos dos ácidos fenólicos os ácidos ferrúlico (10,9mg/g), o clorogênico (7,5 mg/g), e o gálico (2,8 mg/g) e entre o grupos dos flavonóides a C-flavona e o O-glicosídeo (SINGH, MRIDULA, REHAL *et al.*, 2011). Esses ácidos podem estar presentes nas formas livre ou ligada, principalmente a um glicosídeo (JOHNSSON, PEERLKAMP, KAMAL-ELDIN *et al.*, 2002). As lignanas são compostos polares e, por isso, podem se solubilizar em água, porém, por serem substâncias orgânicas, se solubilizam melhor em misturas de solventes orgânicos polares com água (ZHANG, LI, WANG *et al.*, 2007). De acordo com estudos de otimização de Zhang *et al.* (2007) o melhor rendimento de extração das lignanas da linhaça é em etanol a 70%. Quando ligados a um glicosídeo, o SDG, ácido cumárico e ácido ferúlico, a liberação ocorre mais facilmente quando a linhaça é submetida à hidrólise alcalina (JOHNSSON, PEERLKAMP, KAMAL-ELDIN *et al.*, 2002). Todos esses compostos se destacam pela sua capacidade antioxidante e consequente efeito benéfico em doenças como diabetes, hipertensão aterosclerose e, além disso, estão positivamente relacionados com a prevenção de câncer de mama e próstata (STRUJIS, VINCKEN, VERHOEF *et al.*, 2007; CHETANA, SUDHA, BEGUM *et al.*, 2010).

Em relação às vitaminas, a linhaça contém 0,88; 2,42; 9,2 e 0,24 de α , β , γ e δ tocoferol, respectivamente, totalizando 12,74 mg de tocoferóis/100 g de semente (SINGH,

MRIDULA, REHAL *et al.*, 2011). O γ tocoferol é um potente antioxidante que protege as proteínas celulares e os lipídios da oxidação, diminuindo a pressão arterial e os riscos do desenvolvimento de alguns tipos de câncer, doenças cardiovasculares e doenças degenerativas como mal de Alzheimer (MORRIS, 2007).

O elevado teor de ácido α -linolênico (ALA), de compostos fenólicos, de lignanas (JENKINS, KENDALL, VIDGEN *et al.*, 1999; OOMAH, 2001), e de fibra solúvel (JENKINS, KENDALL, VIDGEN *et al.*, 1999) na semente de linhaça tem motivado diversas pesquisas que avaliam a ação da linhaça e ou de seus constituintes sobre a redução do risco ou o controle de doenças. Esses estudos têm demonstrado o efeito benéfico da linhaça na redução da glicose pós-prandial (CUNNANE, GANGULI, MENARD *et al.*, 1993), do colesterol plasmático (CUNNANE, HAMADEH, LIEDE *et al.*, 1995) e de LDL colesterol; na prevenção de doença cardiovascular e câncer (JENKINS, KENDALL, VIDGEN *et al.*, 1999), principalmente câncer de mama e de próstata (JENKINS, KENDALL, VIDGEN *et al.*, 1999; DEMARK-WAHNEFRIED, POLASCIK, GEORGE *et al.*, 2008).

Mais recentemente, as proteínas, presentes em quantidades bastantes expressivas, também começaram a ser estudadas em relação as suas propriedades tecnológicas e principalmente funcionais (RABETAFIKA, VAN REMOORTEL, DANTHINE *et al.*, 2011). Marambe *et al.*, (2008) verificaram que a proteína de linhaça hidrolisada pela *Flavourzyme* apresentou atividade antihipertensiva e antioxidante, capaz de sequestrar o radical hidroxila. No estudo de Udenigwe *et al.*, (2009), em que a proteína de linhaça foi hidrolisada por sete enzimas (Alcalase, pancreatina, pepsina, termolisina, papaína, tripsina e ficina), foi observado que o hidrolisado possuía atividades antiinflamatória e antioxidante, capaz de sequestrar radical hidroxila e superóxido.

Especificamente para a proteína de linhaça, a ação anti-hipertensiva, antioxidante, anti-inflamatória e anticolesterolêmicas devem ser estudadas considerando também o efeito sinérgico da associação com as lignanas e fibras (RABETAFIKA, VAN REMOORTEL, DANTHINE *et al.*, 2011). No processo de obtenção do isolado proteico por extração alcalina e precipitação no ponto isoelétrico, a mucilagem e os compostos fenólicos são extraídos junto com a proteína, interferindo no rendimento e grau de pureza do isolado (WANASUNDARA & SHAHIDI, 2003).

As proteínas de linhaça influenciam a secreção de insulina e auxiliam na regulação da glicose sanguínea, e esses efeitos são exacerbados quando elas estão associadas às

mucilagens (WANASUNDARA & SHAHIDI, 2003; RABETAFIKA, VAN REMOORTEL, DANTHINE *et al.*, 2011). Sinergismo semelhante ocorre quando as proteínas estão ligadas aos compostos fenólicos por pontes de hidrogênio. Essa interação potencializa o efeito protetor contra o desenvolvimento de câncer e a ação antioxidante (RABETAFIKA, VAN REMOORTEL, DANTHINE *et al.*, 2011). A associação particular da proteína de linhaça com mucilagens e compostos fenólicos, se bem explorada pode abrir novas perspectivas do uso da linhaça e de seus componentes nos alimentos (RABETAFIKA, VAN REMOORTEL, DANTHINE *et al.*, 2011).

4- Material e Métodos

4.1- Material

A farinha de linhaça marrom parcialmente desengordurada (FLMPD) foi obtida da empresa **Cisbra**, (Panambi, RS, Brasil). Essa farinha, conforme informação do fornecedor, é destinada à fabricação de produtos de panificação.

Os reagentes Alcalase 2.4L, pepsina, pancreatina, sais biliares, Folin-Ciocalteu, ácido gálico, trolox, TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazina), AAPH (2,2'-azobis (2-methylpropionamidine) dihydrochloride), dodecil sulfato de sódio (SDS) e tricina utilizados foram adquiridos da *Sigma* (St Louis, EUA). A fluoresceína sódica foi adquirida da *Synth* (São Paulo, Brasil). A acrilamida, bis-acrilamida e tris da *Bio-Rad* (Irvine, EUA). Metanol, ácido trifluoracético (TFA), acetonitrila, comassie brilliant blue G250 e hidróxido de sódio foram adquiridos da *Merck* (Hohenbrunn, Alemanha).

4.2- Obtenção do concentrado proteico

A FLMPD foi desengordurada com hexano na proporção de 1:3 (m/v), revolvida manualmente a cada 30 min, por 6 h a temperatura ambiente. Após esse período, o solvente em excesso foi retirado e novo volume de hexano igual ao inicial foi adicionado. A mistura foi revolvida a cada 30 min por mais 6 horas, a temperatura ambiente, e o sobrenadante foi retirado e igual volume de hexano foi adicionado. Após 12 horas, o excesso de solvente foi retirado e a mistura filtrada. O material foi revolvido regularmente, a temperatura ambiente, para garantir a evaporação completa do solvente, obtendo-se a farinha de linhaça marrom desengordurada (FLMD).

Para obtenção do concentrado proteico de linhaça (CPL), foi utilizada a metodologia clássica de obtenção dos isolados proteicos: extração em meio alcalino, precipitação das proteínas no pl e neutralização (DEV & QUENSEL, 1989). A FLMD foi dispersa em água deionizada na razão farinha:água de 1:10, o pH foi ajustado para 9,0 utilizando 1 mol/L NaOH e a mistura foi agitada em homogeneizador (Fisaton, São Paulo, Brasil) a temperatura ambiente por 60 min e em seguida centrifugada a $16.274 \times g$ / 30 min em centrífuga modelo RC5C (Sorvall Instruments Dupont, Wilmington, EUA). O

sobrenadante contendo a proteína extraída foi removido e igual volume de água deionizada foi adicionado, o pH foi ajustado para 9,0 utilizando 1 mol/L NaOH e a mistura foi agitada à temperatura ambiente por 60 min e centrifugada a $16.274 \times g$ / 30 min. O sobrenadante foi misturado ao sobrenadante da primeira extração.

Para definir o pH de precipitação, o ponto isoelétrico das proteínas extraídas em pH 9,0 foi determinado por meio da análise do potencial Zeta com a utilização do equipamento Zetasizer (Malvern, Worcestershire, RU). Para isso o sobrenadante foi diluído em água deionizada na proporção 1:1. Foi feita uma varredura de pH a partir do pH 7 até o pH 2,5. A análise foi feita em duplicata. O valor de pH no qual a carga líquida da proteína de linhaça é nula é 4,2 conforme a Figura 1.

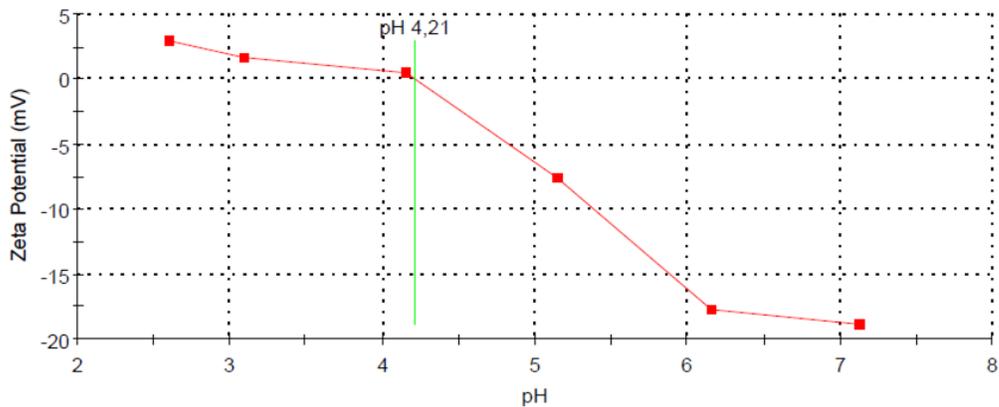


Figura 1. Análise do potencial Zeta do extrato proteico de farinha de linhaça marrom desengordurada (FLMD)

O sobrenadante das duas extrações foi misturado e o pH ajustado a 4,2 pela adição de 1 mol/L HCl. A proteína precipitada foi separada por centrifugação, lavada três vezes com água acidificada (pH 4,2), suspensa em um pequeno volume de água deionizada e o pH ajustado a 6,0 com 1 mol/L NaOH e em seguida foi liofilizada (Liofilizador Edwards – super Modulyo, West Sussex, RU) e armazenada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até ser utilizada (Figura 2). O rendimento da extração proteica foi determinado de acordo com a equação 5.

Rendimento (%) = $\frac{\text{concentração de proteína no concentrado} \times \text{massa do concentrado}}{\text{concentração de proteína na FLMD} \times \text{massa de FLMD}} \times 100$ (eq. 5)

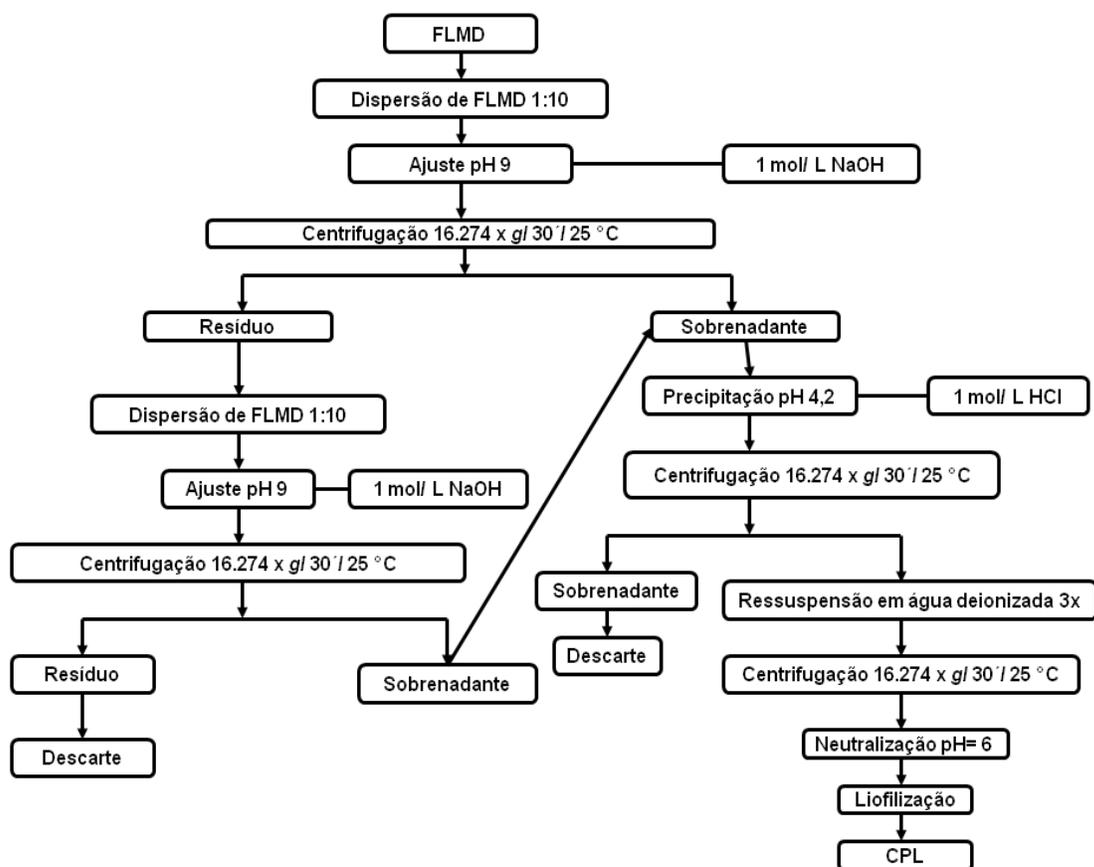


Figura 2. Fluxograma de obtenção do concentrado proteico de linhaça (CPL).
FLMD: Farinha de linhaça marrom desengordurada

4.3 – Obtenção dos hidrolisados

Para determinar as melhores condições de obtenção dos hidrolisados proteicos de linhaça (HPL) com maior capacidade antioxidante, foram realizados experimentos fatoriais do tipo Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) de 2 fatores, com 2 níveis, 3 pontos centrais e 4 pontos axiais, totalizando 11 ensaios. Nesses ensaios, as variáveis independentes (fatores) foram a relação enzima-substrato (E:S) que variou de 1:150 a 1:30, e o pH, que variou de 7,5 a 9,5 (Tabela 1). As variáveis dependentes foram o grau de hidrólise (GH), o teor de substâncias redutoras e a atividade antioxidante, determinada pelos testes *in vitro* FRAP e ORAC descritos no item 4.8. Cada experimento foi realizado em duplicata.

Para a hidrólise do CPL foram fixadas as condições de temperatura (60 °C), concentração do substrato (5% m/v) e tempo de hidrólise (180 min). A escolha da temperatura ótima da enzima foi feita com base na ficha técnica da Alcalase. A concentração de substrato foi definida baseada em estudos com hidrolisados proteicos de linhaça (MARAMBE, SHAND & WANASUNDARA, 2008; UDENIGWE, LU, HAN *et al.*, 2009) e em testes preliminares que mostraram que essa era a maior concentração que permitia agitação satisfatória da mistura de reação. A protease escolhida foi a Alcalase por ser uma endopeptidase de ampla especificidade amplamente utilizada na produção de hidrolisados proteicos de origem vegetal (ZHU, ZHOU & QIAN, 2006).

Tabela 1. Matriz do planejamento fatorial 2^2 com as variáveis independentes pH e relação enzima: substrato, respectivamente, no modelo codificado e real

Ensaio	Valores Codificados		Valores Reais	
	pH	E:S	pH	E:S
1	-1	-1	7,8	1:133
2	-1	1	7,8	1:48
3	1	-1	9,2	1:133
4	1	1	9,2	1:48
5	-1,41	0	7,5	1:90
6	1,41	0	9,5	1:90
7	0	-1,41	8,5	1:150
8	0	1,41	8,5	1:30
9	0	0	8,5	1:90
10	0	0	8,5	1:90
11	0	0	8,5	1:90

Para validação do modelo matemático obtido, foram realizados 4 ensaios, em duplicata, em condições de pH e relação enzima substrato diferentes das determinadas pela matriz do delineamento, escolhidas aleatoriamente (Tabela 2).

Tabela 2. Condições das variáveis independentes pH e relação enzima: substrato, respectivamente, no modelo codificado e real nos ensaios de validação

Ensaio	Valores Codificados		Valores Reais	
	pH	E:S	pH	E:S
1	-0,705	0,705	8	1/060
2	-0,705	-0,705	8	1/120
3	0,705	-1,41	9	1/150
4	1,41	-1,41	9,5	1/150

A reação de hidrólise foi monitorada utilizando-se o método do pH-stat com uso de titulador automático modelo DL 50 *Graphix* (Mettler Toledo, Schwerzenbach, Suíça) acoplado ao banho termostaticado (Marconi, Piracicaba, Brasil) com sistema de agitação. A reação foi interrompida por aquecimento a 90 °C por 10 min para a inativação da enzima. O grau de hidrólise (GH) foi definido pela equação 6:

$$GH (\%) = BN_b(1/\alpha)(1/MP)(1/h_{tot}) \times 100 \text{ (eq. 6)}$$

onde: B = consumo de base em mL; N_b = normalidade da base; $1/\alpha$ = média de grau de dissociação do grupo $\alpha\text{-NH}_2$; MP = massa da proteína em g; h_{tot} = número total de ligações peptídicas no substrato proteico (7,8 mEq / g proteína) (ADLER-NISSEN, 1979).

Os hidrolisados obtidos (Figura 3) foram resfriados, congelados e liofilizados.

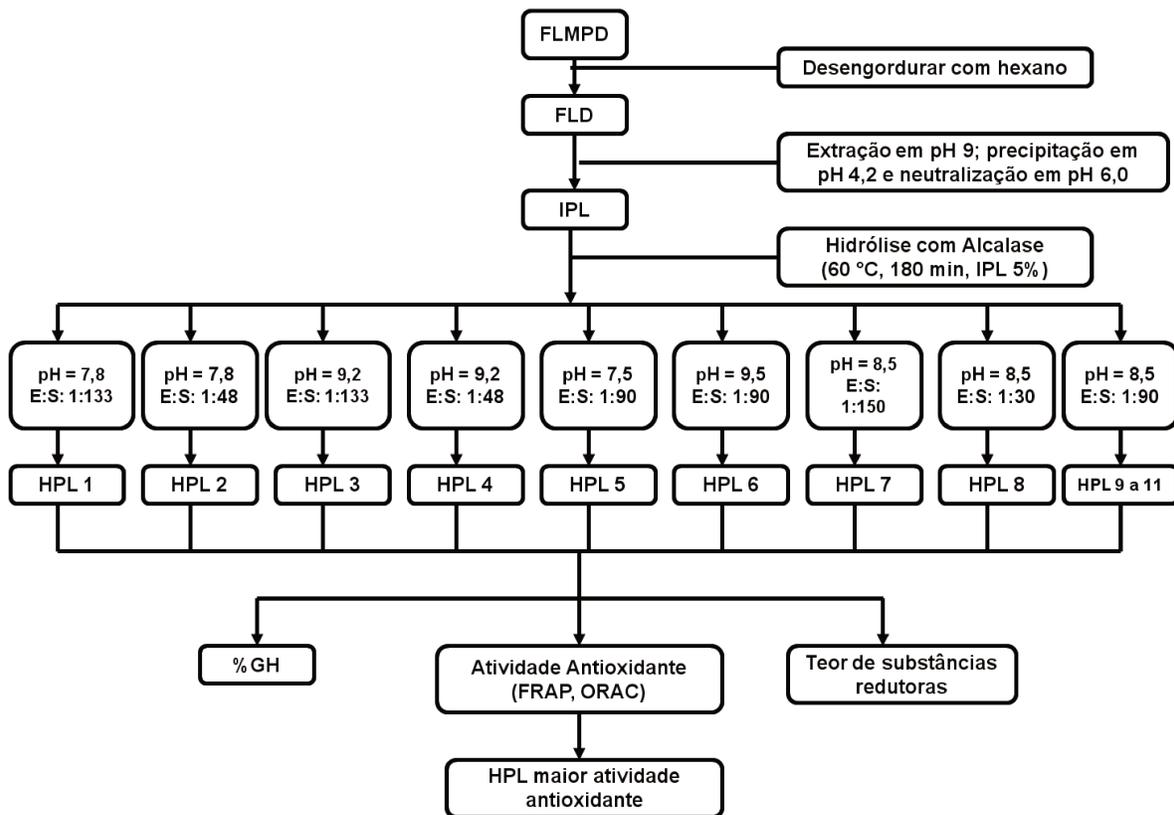


Figura 3. Fluxograma de obtenção da farinha de linhaça marrom desengordurada (FLMD), concentrado proteico de linhaça (CPL) e hidrolisado proteico de linhaça (HPL) de maior capacidade antioxidante, a partir da farinha de linhaça marrom parcialmente desengordurada (FLMPD).

4.4- Determinação da Atividade Enzimática da Alcalase

A atividade proteolítica das enzimas foi determinada utilizando solução 1,2% caseína (m/v; Reagen, Rio de Janeiro, Brasil) em tampão fosfato (0,1 mol/L), pH 7,5 e conduzida a 60°C por 10 min. A reação foi interrompida pela adição de solução 30% de ácido tricloroacético (TCA), com concentração final de 15% (m/v). O material foi filtrado em filtro de papel comum e a absorbância do sobrenadante foi determinada em Espectrofotômetro UV-Vis (DU – 70 Beckman, Fullerton, CA, EUA) a 275 nm. Uma unidade (U) de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar, em 1 min a proteína solúvel em TCA equivalente a 1 µg de tirosina (EMI *et al.*, 1976).

Foi construída uma curva de calibração (Figura 4) com L-Tirosina (Sigma Aldrich, St Louis, EUA) com 10, 20, 30, 40 e 50 µg/mL de tirosina. As determinações foram feitas em triplicata.

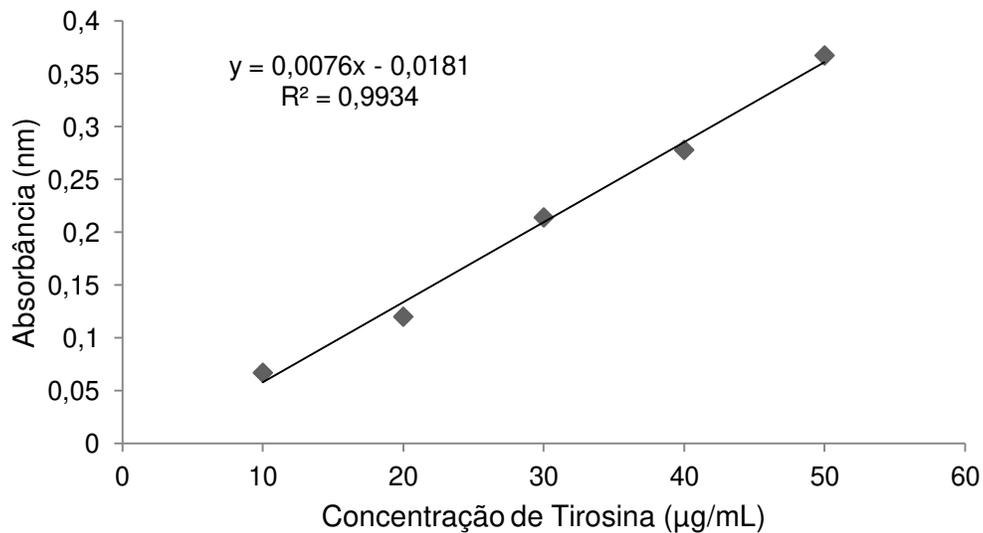


Figura 4. Curva padrão de tirosina para determinação da atividade enzimática da Alcalase.

4.5- Obtenção dos extratos

Para obtenção do extrato aquoso, as amostras foram suspensas em água deionizada a 1% (m/v), agitadas em agitador magnético por 30 min, centrifugadas a 35.735 x *g* por 30 min, a 10° C em centrífuga RC5C (Sorvall Instruments Dupont, Wilmington, EUA) e filtradas em filtro de papel comum. O volume final foi completado para o volume inicial (10 mL) com água deionizada e armazenados a - 20° C até sua utilização.

A escolha do metanol 70% para obtenção dos extratos foi feita após experimentos preliminares com extratos etanólicos e metanólicos com diferentes concentrações (70, 85, 100%) para determinação da melhor condição de extração de compostos fenólicos, determinados conforme descrito no item 4.10.3.

As amostras (100 mg) foram dispersas em 10 mL de solução metanólica 70%, colocadas em erlenmeyer, agitadas em banho termostático Dubinoff (Marconi, Piracicaba, Brasil) a 60° C por 60 min. Os extratos foram centrifugados a 35.735 x *g* por 30 min a 10 °C em centrífuga modelo RC5C (Sorvall Instruments Dupont, Wilmington, EUA) e filtrados em papel de filtro comum. O volume final foi completado para o volume inicial (10 mL) com solução metanólica 70% e foram armazenados a - 20° C até sua utilização.

4.6- Digestão *in vitro*

A FLMD, o CPL e os HPL com maior capacidade antioxidante foram submetidos à digestão *in vitro* para avaliação deste processo na atividade antioxidante.

A digestão *in vitro* foi realizada conforme descrito por Martos *et al.*, (2010) com adaptações. Para simulação da digestão gástrica, dispersões aquosas (5,9 mg/mL de proteína da amostra) de FLMD, CPL ou HPL de maior atividade antioxidante foram adicionadas a uma solução de 35 mmol/L NaCl, e o pH ajustado para 2 com 1mol/L HCl. Essa mistura permaneceu em banho termostático a 37 °C por 15 min, sob agitação. Em seguida, adicionou-se 5 mg/mL de pepsina (E:S 1:20 m/m) e o pH foi novamente ajustado para 2 com 1mol/L HCl. A mistura permaneceu em banho termostático a 37 °C por 60 min, sob agitação.

Procedeu-se a simulação da digestão intestinal ajustando-se o pH para 6,5 com 1 mol/L NaHCO_3 e adicionando 1 mol/L CaCl_2 e 9 mg/mL de sais biliares e essa mistura permaneceu em banho termostatizado a 37 °C, por 15 min, sob agitação. Em seguida foi adicionada pancreatina (10mg/mL, E:S 1:10 m/m) e 4 mL de água deionizada. A mistura foi levada ao banho termostatizado a 37 °C por 60 min, sob agitação. Para interromper a reação, o digerido foi aquecido em banho termostatizado a 90 °C por 10 min, sob agitação, e centrifugado 11.000 x g por 15 min em centrífuga RC5C (Sorvall Instruments Dupont, Wilmington, EUA), e o sobrenadante foi congelado. Ao final da digestão intestinal, as concentrações eram: 4 mg/mL de proteína, 7,6 mmol/L de CaCl_2 , 0,07 mg/mL de sais biliares, 0,1 mg/mL de pancreatina e 0,2 mg/mL de pepsina. O procedimento foi realizado em triplicata para cada amostra.

4.7- Determinação da atividade antioxidante

4.7.1- Ensaio de FRAP – Método de Redução do Ferro

Este ensaio se baseia na medida direta da habilidade dos antioxidantes da amostra em reduzir, em meio ácido, o complexo Fe^{+3} /tripiridiltriazina (TPTZ), para formar Fe^{+2} , de intensa cor azul e absorção máxima a 593 nm.

Em tubo de 2 mL, em ambiente escuro, uma alíquota de 30 μL do extrato da amostra ou do padrão foi adicionado a 90 μL de água e 900 μL do reagente FRAP (450 μL de 0,3 mol/L de tampão acetato, pH 3,6; 225 μL de solução de 10 mmol TPTZ em 40 mmol HCl e 225 μL de solução de 20 mmol cloreto férrico) e a mistura foi agitada em vórtex. Uma alíquota de 200 μL foi transferida para uma microplaca. Após 30 min de incubação a 37 °C a absorbância foi medida a 595 nm em leitor de microplaca *Synergy™ HT Multi-Mode Microplate Reader* (BioTek®, Vermont, EUA). Para o branco, a amostra foi substituída pelo solvente utilizado no extrato.

Para a determinação da atividade antioxidante das amostras foi construída uma curva padrão de sulfato ferroso (SF), nas concentrações 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 e 3,0 mmol/L.

Os resultados foram expressos mg SF/ g amostra. As determinações foram feitas, em três repetições, em triplicatas.

4.7.2- Ensaio de ORAC

O ensaio de ORAC (siga em inglês de capacidade de absorção de radicais oxigênio) foi realizado seguindo a metodologia descrita por Ou *et al.*, (2002) e adaptada por Dávalos *et al.*, (2004).

Para o ensaio, foram adicionados 20 µL de extrato, 120 µL de fluoresceína sódica em tampão fosfato de potássio (pH 7,4) na concentração final de 0,378 µg/mL (preparada a partir de uma solução estoque de 3,87 mg/mL) e 60 µL de AAPH (2,2'-azobis (2-metilpropionamidina) dihidroclorídrico) em água (concentração final de 108 mg/mL). Para o branco, o extrato foi substituído por tampão fosfato de potássio. Como padrão foi utilizado soluções de Trolox em tampão fosfato de potássio a 25, 50, 100, 300 e 500 µmol/L. Após a adição de todos os reagentes na placa, foi feita a leitura da fluorescência, a cada 1 min, por 80 min, a 37 °C, em leitor de microplaca *Synergy™ HT Multi-Mode Microplate Reader*. Foram utilizados os seguintes filtros: excitação 485 nm e emissão 520 nm. As determinações foram feitas em três repetições em triplicatas.

As leituras da fluorescência foram utilizadas no cálculo da AUC (sigla em inglês para área abaixo da curva), para as amostras, diferentes concentrações de Trolox e o branco de acordo com a equação 7. Os valores da AUC do padrão e das amostras foram subtraídos do valor de AUC do branco. Os valores de AUC das amostras foram substituídos na equação da reta obtida pela curva padrão de Trolox e os valores expressos em µmol Trolox equivalente (TE)/ g de amostra.

$$AUC = 1 + f_2/f_1 + f_3/f_1 + f_4/f_1 + f_n/f_1 \text{ (eq. 7)}$$

Onde:

f_1 = leitura da fluorescência no tempo 1

f_2 = leitura da fluorescência no tempo 2

f_n = leitura da fluorescência no tempo 80 min

4.8- Caracterização da FLMD, do CPL e do HPL

4.8.1- Composição Centesimal

A FLMD, o CPL e os hidrolisados foram analisados quanto ao teor de proteína por Kjeldahl (AOAC, 1997), de cinzas e umidade, por gravimetria (AOAC, 1997), de lipídeos pelo do método de Bligh & Dyer (1959) e de carboidratos, por diferença. Na análise de Kjeldahl, para a conversão do nitrogênio total em proteína total, multiplicou-se o teor de nitrogênio pelo fator de conversão 6,25 (UDENIGWE, LU, HAN *et al.*, 2009). As determinações foram realizadas em triplicata.

4.8.2 – Perfil Aminoacídico

A determinação de aminoácidos totais foi feita para a FLMD, CPL e nos HPL de maior atividade antioxidante.

A composição aminoacídica foi determinada segundo metodologia descrita por White, Hart e Kry (1986). A FLMD, o CPL e seus hidrolisados de maior atividade antioxidante com Alcalase foram hidrolisados por 24 horas com 6 N HCl e posteriormente separados por CLAE com reação pré-coluna com fenilisotiocianato e detectados a 254 nm, temperatura de 53 °C, sistema HPLC (Thermo Fisher Scientific Inc.). Foi utilizada uma coluna para aminoácidos livres (Pico Tag Column – For Free Amino acid analysis – Part N° WAT010950), cromatógrafo Thermo Separation Products e detector Spectra System UV 2000.

4.8.3 – Teor de substâncias redutoras do reagente Folin-Ciocalteu

O teor de substâncias redutoras do reagente de Folin-Ciocalteu foi determinado conforme descrito por Medina (2011). Para a reação, 450 µL de água foram misturados a 50 µL de amostra ou padrão, seguidos da adição de 50 µL do reagente de Folin-Ciocalteu. A mistura foi agitada em vórtex e deixada em repouso por 5 min. Em seguida foi adicionado 500 µL de 7,5% Na₂CO₃ e 200 µL de água. A mistura foi novamente agitada em vórtex e deixada em repouso por 90 min. A absorbância foi lida em 765 nm, em leitor

de microplaca *Synergy™ HT Multi-Mode Microplate Reader*. As determinações foram feitas em três repetições em triplicatas.

Para a determinação da concentração de substâncias redutoras nas amostras foi construída uma curva padrão de ácido gálico, nas concentrações de 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600 µg/mL. O teor de substâncias redutoras foi expresso em mg de equivalentes de ácido gálico EAG/g de amostra.

4.8.4- Perfil eletroforético (SDS-PAGE Tricina) e Cromatográfico

A caracterização quanto ao perfil eletroforético foi feita para FLMD, CPL E HPL de maior atividade antioxidante e quanto ao cromatográfico foi feita nos hidrolisados de maior atividade antioxidante, antes e após a digestão *in vitro*.

- SDS PAGE

Os perfis de distribuição de massa molecular da FLMD, extratos proteicos e CPL foram determinados por eletroforese em gel de poliacrilamida em sistema SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970). Foram utilizados o gel de separação (12% T e 4% C) e gel de empilhamento (4% T e 2,67% C). As amostras foram diluídas em tampão redutor (62,5 mmol Tris-HCl, pH 6,8, 2% SDS, 20% glicerol, 5% β-mercaptoetanol e 0,1% azul de bromofenol), aquecidos a 90 °C por 10 min. Foram aplicadas alíquotas de 10 µL da solução das amostras contendo 0,4% de proteína. Após a corrida, o gel foi corado em 0,1% Comassie Blue G250 e descorado com várias lavagens e solução ácido acético/metanol/água (1:4:5).

- SDS PAGE-Tricina

Os perfis de distribuição de massa molecular da FLMD, CPL e HPL também foram determinados em sistema SDS-PAGE-Tricina, realizado de acordo com o descrito por Schager e Jagow (1987). Foram utilizados géis de poliacrilamida de diferentes concentrações: gel de separação (14,6% T e 4% C), gel espaçador (10% T e 3% C) e gel de empilhamento (4% T e 3% C). As amostras foram diluídas em tampão redutor (Tris-HCl 0,5M, pH 6,8, 10% SDS, 10% glicerol, 5% β-mercaptoetanol e 0,1%, azul de bromofenol aquecidos a 40°C por 30 min. Após as corridas, os géis foram fixados por 1 hora em solução metanol/ácido acético/ água (5:1:4) e corados por Comassie Brilliant Blue G250

(0,04% em 10% de ácido acético). Posteriormente foram descorados em 10% de ácido acético.

- Cromatografia Líquida de Fase Reversa (CLAE-FR)

Foi utilizado um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência, com injetor automático e detector de absorvância de arranjo de diodos. A separação foi realizada em coluna Agilent C18 *Microsorb MV*TM (250 mm x 4,6 mm DI), a 40 °C com fluxo de 1 mL/min. A fase móvel foi composta de dois solventes. O solvente A, 0,04% ácido trifluoracético (TFA) em água e o solvente B, 0,03% de TFA em acetonitrila. Os solventes foram filtrados através de membrana 0,45 µm e sonicados por 10 min em ultrason. As amostras foram centrifugadas a 35.735 x *g* por 30 min, a 20° C em centrífuga modelo RC5C (Sorvall Instruments Dupont, Wilmington, EUA), filtradas em papel de filtro comum e em seguida em membrana 0,45 µm. Foi aplicado um sistema de gradiente iniciando com 100% de solvente A, reduzindo para 30% em 40 min, e para 0% em 50 min. O detector foi fixado em 214 nm. Para obtenção e processamento das informações, foi utilizado o software Star Chromatography Workstation (todos da Agilent, 1200 Series EUA).

4.9 – Análise Estatística

Para análise do DCCR foi utilizado o *software STATISTICA* versão 7.0 (*Stat Soft, Tulsa*, EUA). Devido à grande variabilidade inerente aos processos que envolvem enzimas, foram considerados significativos os parâmetros com p-valor menor que 10% ($p < 0,10$) para análise de efeitos e para cálculo da análise de variância (ANOVA).

Os resultados foram analisados no programa *SPSS*, na versão 16.0. Foram realizados testes paramétricos, pois os dados apresentaram distribuição normal para o teste de normalidade de *Shapiro-Wilk*. Para verificar a diferença entre o teor de substâncias redutoras e a atividade antioxidante dos extratos aquoso e metanólico de FLMD, CPL e cada HPL foi feito Teste T de *Student*. Para verificar a diferença entre o teor de substâncias redutoras e a atividade antioxidante antes e após a digestão *in vitro* foi feito o teste T pareado. Para verificar a diferença no teor de substâncias redutoras e na atividade antioxidante de um mesmo extrato para FLMD, CPL e HPL foi feito ANOVA,

post hoc Tukey. O valor de p foi fixado em 5% ($p < 0,05$), com o intuito de obter uma confiabilidade de 95% entre as comparações.

5- Resultados e Discussão

5.1- Obtenção e caracterização da farinha de linhaça marrom desengordurada (FLMD) e do concentrado proteico de linhaça (CPL)

Para obtenção do concentrado proteico de linhaça (CPL), a farinha de linhaça marrom parcialmente desengordurada (FLMPD) foi previamente desengordurada com hexano, obtendo a farinha de linhaça marrom desengordurada (FLMD) que apresentou 5,4% de lipídios totais, indicando que o desengorduramento foi parcial. A partir da FLMD foi obtido o CPL. A composição centesimal da FLMD e do CPL está apresentada na Tabela 3.

Tabela 3. Composição centesimal da FLMD e do CPL

Composição (%)	FLMD	CPL
Proteínas*	38,99 ± 0,25	71,77 ± 0,94
Lipídios	5,37 ± 1,74	4,08 ± 0,13
Cinzas	4,00 ± 0,45	1,48 ± 0,05
Umidade	9,30 ± 0,00	9,09 ± 0,00
Carboidratos**	42,34	13,58

* N% x 6,25

** Calculado por diferença

Média ± desvio padrão de 3 replicatas

Segundo Wanasundara & Shahidi (2003), o teor proteico da semente de linhaça pode variar entre 20,9 a 48,1% (N% x 5,41). Essa variação é devida ao clima da região onde a semente foi produzida. Quanto menor a temperatura do local, maior será o teor de lipídios e menor será o de proteína. As farinhas de linhaça desengorduradas devem apresentar um teor mínimo de 30% de proteína, valor consonante ao encontrado neste estudo (WANASUNDARA & SHAHIDI, 2003). Ho *et al.* (2007) utilizando o método de Bradford, encontraram 33,3% de proteína na farinha de linhaça parcialmente desengordurada, 43,0% de carboidrato, 12,4% de lipídio, 5,5% de cinza e 5,8% de umidade. A FLMD apresentou valores semelhantes para proteína (39,0%) e carboidratos (42,3%), mas diferentes para lipídeos (5,6%), cinzas (4,0%) e umidade (9,3%).

O teor de carboidratos da FLMD, 42,3%, coincide com o teor de fibras encontrado por Rabetafika *et al.* (2011) para semente de linhaça desengordurada, sugerindo que, possivelmente, os polissacarídeos correspondem às fibras, principalmente mucilagens e lignanas. Esses compostos podem apresentar propriedades antioxidantes, atuando na

prevenção de doenças como diabetes, obesidade e câncer (WANASUNDARA & SHAHIDI, 2003).

No presente estudo, para obtenção do CPL foi utilizado pH 9 para extração alcalina e pH 4,2 para precipitação obtendo-se um teor de proteína de 71,8% (N% x 6,25), inferior ao reportado na literatura. De acordo com Wanasundara *et al.*, (2003) o teor de proteína no concentrado proteico de linhaça pode variar entre 78 a 93% (N% x 6,25) em função do pH utilizado nas etapas de extração (pH 8,5 a 10) e precipitação (pH 3,5 a 4,2). Krause *et al.*, (2002) obtiveram concentrado proteico com 89% (N% x 6,25) a partir da farinha descascada e desengordurada, utilizando pH 8,5 e 4,0 para extração e precipitação das proteínas, respectivamente. Essa diferença pode ser devida ao tratamento prévio realizado na farinha de linhaça antes da extração da proteína, para eliminar lipídios e principalmente fibra solúvel ou pelo método de extração escolhido.

O rendimento da extração das proteínas foi de 45,3%. De acordo com artigo de revisão de Wanasundara & Shahidi (2003), aproximadamente 85% do total de proteínas da linhaça pode ser extraído. Oomah *et al.* (1994) conseguiram um rendimento na extração de 85% e Wanasundara & Shahidi (1996) de 78%. A diferença entre esses valores e o do presente estudo possivelmente deve-se ao tipo de extração. Oomah *et al.*, (1994) e Wanasundara & Shahidi (1996) utilizaram 1M NaCl em pH entre 7 e 8, o que aumenta a extração das globulinas, principal proteína existente na linhaça, pelo efeito *salting in*. Segundo Wanasundara & Shahidi (2003), para aumentar o rendimento do processo de obtenção da proteína seria necessário realizar a demucilagem da semente, antes de iniciar a extração. Isso pode ser feito mergulhando a semente da linhaça em uma solução a 1% de ácido clorídrico, seguida de lavagem para remoção dos polissacarídeos.

Os perfis eletroforéticos da FLMD, do extrato proteico obtido em pH 9,0 e do CPL, em sistemas SDS-PAGE e SDS-PAGE Tricina, ambos em condições redutoras (Figura 5), foram obtidos para caracterização e acompanhar as possíveis perdas durante o processo de obtenção do concentrado.

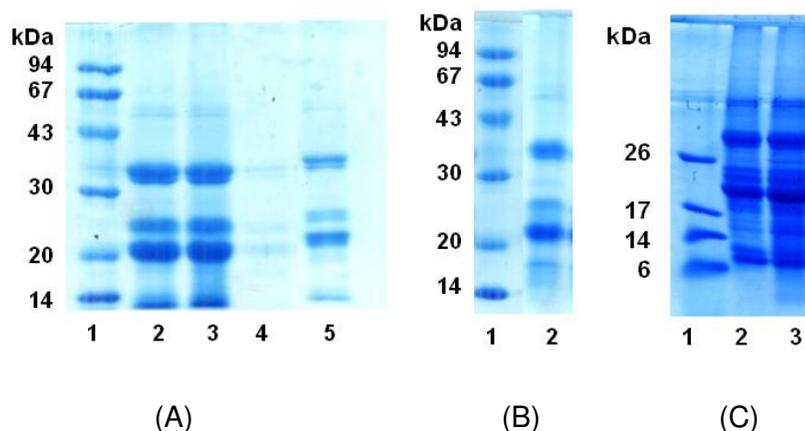


Figura 5. Eletroforeses SDS-PAGE da farinha de linhaça marrom desengordurada (FLMD), extratos proteicos, farinha residual e concentrado proteico de linhaça (CPL). A) SDS-PAGE em condições redutoras dos extratos proteicos, da farinha residual da extração e da FLMD. 1- Padrões; 2- Extrato proteico obtido na primeira extração; 3- extrato proteico obtido na segunda extração; 4- Resíduo da FLMD após as duas extrações; 5- FLMD. B) SDS-PAGE em condições redutoras. 1- Padrão; 2- CPL. C) SDS-PAGE Tricina em condições redutoras. 1- Padrão; 2- FLMD; 3- CPL.

Os perfis eletroforéticos em sistema SDS-PAGE dos extratos, resíduos e FLMD são semelhantes, o que indica que o processo de extração não resultou em perdas qualitativas da proteína da FLMD para o extrato e nem para o concentrado. A análise dos perfis (Figura 5 A) mostra 6 bandas principais de massas moleculares 51, 34, 31, 23, 21 e 13 kDa. Essas bandas, possivelmente, se referem à globulina, fração de alta massa molecular, composta por 5 subunidades de massas moleculares 51, 35, 30, 24,6 e 14,4 kDa (WANASUNDARA & SHAHIDI, 2003).

Oomah & Mazza (1998) encontraram 4 principais bandas de massas moleculares 34, 25, 24 e 14 kDa e também frações com menor massa molecular. Chung *et al.* (2005) encontraram três bandas predominantes de massas moleculares 20, 23, 31 kDa e outras 9 com massas moleculares entre 9 e 17 kDa. Para melhor visualização das bandas de menor massa molecular a análise do perfil eletroforético também foi realizada em sistema SDS-PAGE Tricina (Figura 5 C). Observou-se que a banda de 23 kDa visualizada em gel SDS-PAGE (Figura 5 A) possivelmente é formada por duas bandas, que podem ser visualizadas na Figura 5 C com massas moleculares de 23 e 22 kDa. Também nesse gel observou-se outras 4 bandas de massas moleculares entre 17 e 6 kDa. Essa fração de proteínas de baixa massa molecular possivelmente corresponde às albuminas, fração

responsável por 42% das proteínas contidas na semente, composta principalmente por cadeias de polipeptídios de massa molecular entre 16 e 18 kDa (WANASUNDARA & SHAHIDI, 2003).

5.2- Obtenção do Hidrolisado Proteico de Linhaça (HPL)

Foi realizado um estudo fatorial DCCR a fim de otimizar as condições de obtenção do HPL de maior atividade antioxidante. As variáveis independentes foram pH, variando de 7,5 a 9,5, e E:S variando de 1:150 a 1:30. As variáveis dependentes foram o grau de hidrólise, o teor de substâncias redutoras e a atividade antioxidante determinada por FRAP e ORAC.

A hidrólise enzimática da proteína gera hidrolisados com propriedades funcionais diferentes da matéria prima original. O conhecimento sobre as variáveis que interferem no GH permite que ele seja manipulado para obter peptídeos com propriedades distintas. Os compostos fenólicos também foram estudados uma vez que eles se encontram associados à proteína de linhaça e também apresentam atividade antioxidante.

5.2.1- Grau de Hidrólise

As curvas da reação de hidrólise enzimática com Alcalase em função do tempo, nos diferentes ensaios do DCCR, estão apresentadas na Figura 6. Em todas as condições, a taxa de hidrólise é alta nos 30 minutos iniciais, reduz nos minutos seguintes e tende a ficar constante nos 30 minutos finais. Esse perfil é semelhante a outros estudos com hidrolisados proteicos com Alcalase (KONG & XIONG, 2006; DONG, ZENG, WANG *et al.*, 2008). Após 180 min de reação não houve aumento significativo no grau de hidrólise.

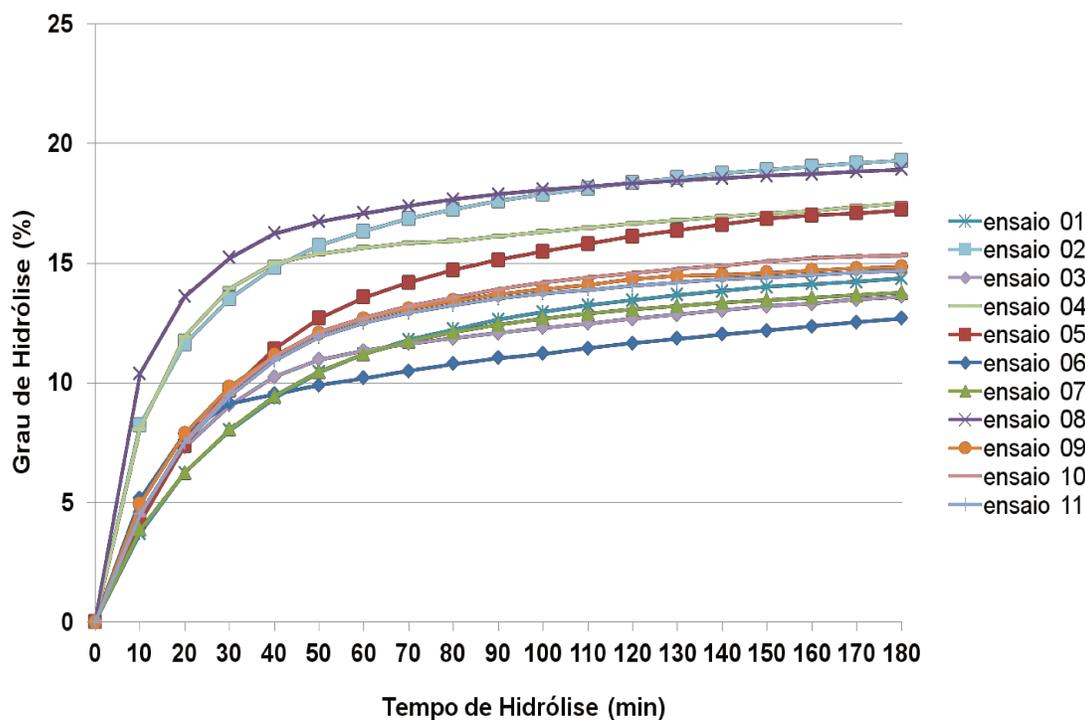


Figura 6. Curvas de hidrólise enzimática do concentrado proteico de linhaça (CPL) com Alcalase. As condições de cada ensaio estão descritas na Tabela 4.

Os resultados de GH em função da variação de pH e E:S realizados nas condições do DCCR encontram-se na Tabela 4.

Tabela 4. Matriz do DCCR e resposta para GH

Ensaio	Valores Codificados		Valores Reais		GH%
	pH	E:S	pH	E:S	
1	-1	-1	7,8	1:133	14,4
2	-1	1	7,8	1:48	19,3
3	1	-1	9,2	1:133	13,6
4	1	1	9,2	1:48	17,5
5	-1,41	0	7,5	1:90	17,3
6	1,41	0	9,5	1:90	12,7
7	0	-1,41	8,5	1:150	13,8
8	0	1,41	8,5	1:30	18,9
9	0	0	8,5	1:90	14,8
10	0	0	8,5	1:90	14,7
11	0	0	8,5	1:90	15,3

O Diagrama de Pareto (Figura 7) mostra o efeito das variáveis independentes no GH. A variável de maior impacto na resposta é a E:S linear, seguida pela variável pH linear e E:S quadrática. E:S, tanto linear quanto quadrática, influencia positivamente a

resposta, o que indica que o aumento na grandeza dessa variável também aumentará o GH. O efeito negativo da variável pH linear indica que o aumento dessa variável provocará uma redução no grau de hidrólise. O efeito da interação entre pH e E:S e da variável pH quadrática não foram significativos.

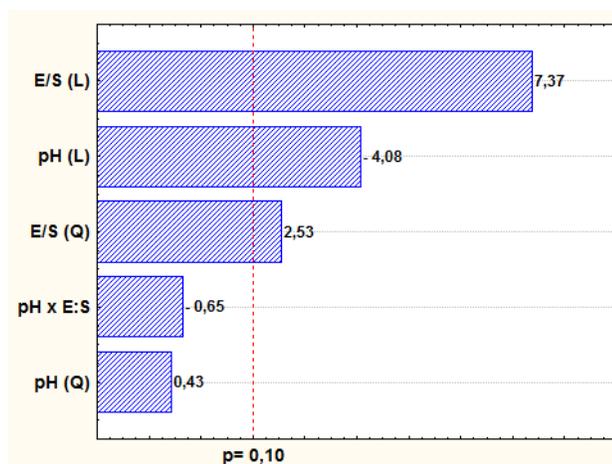


Figura 7. Diagrama de Pareto para Grau de Hidrólise (%) em função do pH e da E:S. L: linear. Q: quadrático. pH x E:S: Interação entre pH e E:S.

O modelo de segunda ordem com as variáveis codificadas, incluindo os parâmetros estatisticamente significativos ($p < 0,10$) está apresentado na Equação 8. A análise de variância do modelo está apresentada na Tabela 5.

$$\% \text{ GH} = 15,08 - 1,11(\text{pH}) + 2,01(\text{E:S}) + 0,78(\text{E:S})^2 \text{ (eq. 8)}$$

Tabela 5. ANOVA para a resposta Grau de Hidrólise (GH)

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	$F_{\text{calculado}}$ (10%)	$F_{\text{teórico}}$ (3, 7; 10%)	R^2
Regressão	46,16	3	15,39	32,17	3,07	93,3
Resíduos	3,35	7	0,48			
Total	49,51	10	4,95			

Os valores de R^2 (93,3%) e $F_{\text{calculado}}$ (32,17) sugerem um bom ajuste do modelo matemático (Tabela 5). As respostas obtidas com os ensaios de validação ($\% \text{ GH}_{\text{experimental}}$), quando comparadas às respostas previstas pela equação 8 ($\% \text{ GH}_{\text{previsto}}$),

apresentaram um erro relativo em torno de 10%, comprovando a validade do modelo para descrever o processo (Tabela 6).

Tabela 6. Resultados dos ensaios de validação para a resposta Grau de Hidrólise (GH)

Ensaio	Valores Codificados		Valores Reais		Respostas %GH		Erro Relativo (%)
	pH	E:S	pH	E:S	Experimental	Predito	
1	-0,705	0,705	8	1/060	18,3	17,7	3,22
2	-0,705	-0,705	8	1/120	16,1	14,8	7,63
3	0,705	-1,41	9	1/150	14,7	13,0	11,39
4	1,41	-1,41	9,5	1/150	13,4	12,2	8,41

A superfície de resposta (Figura 8) gerada a partir da equação 8 mostra que, dentro da faixa de valores estudada, obteve-se GH variando de 12,0 a 21,0%. O menor GH é obtido em pH na faixa de pH entre 9,0 e 9,5 e com E:S entre 1:120 e 1:150 e o maior em pH entre 7,5 e 8,0 e E:S de 1:60 a 1:30. A faixa de pH 7 a 8 corresponde à faixa ótima da Alcalase e, associada à E:S elevada, favorece maior hidrólise do concentrado. Para outras proteínas de origem vegetal hidrolisadas com Alcalase foi encontrado 25% de GH para gérmen de trigo (ZHU, ZHOU & QIAN, 2006), e 16% para o glúten (KONG & XIONG, 2006), determinado pelo método do pH-stat. Marambe *et al.* (2008) que produziram hidrolisados proteicos de linhaça utilizando *Flavourzyme* em diferentes condições de E:S (1,5 a 93,5) e tempo de hidrólise (0,7 a 23,3 h), obtiveram GH, calculado pelo método OPA entre 12 e 71%, valor acima do encontrado neste estudo. Essas diferenças no GH obtido com a mesma proteína ocorrem devido à especificidade da protease utilizada e pela diferença do método escolhido para mensurar o GH (ZHU, ZHOU & QIAN, 2006).

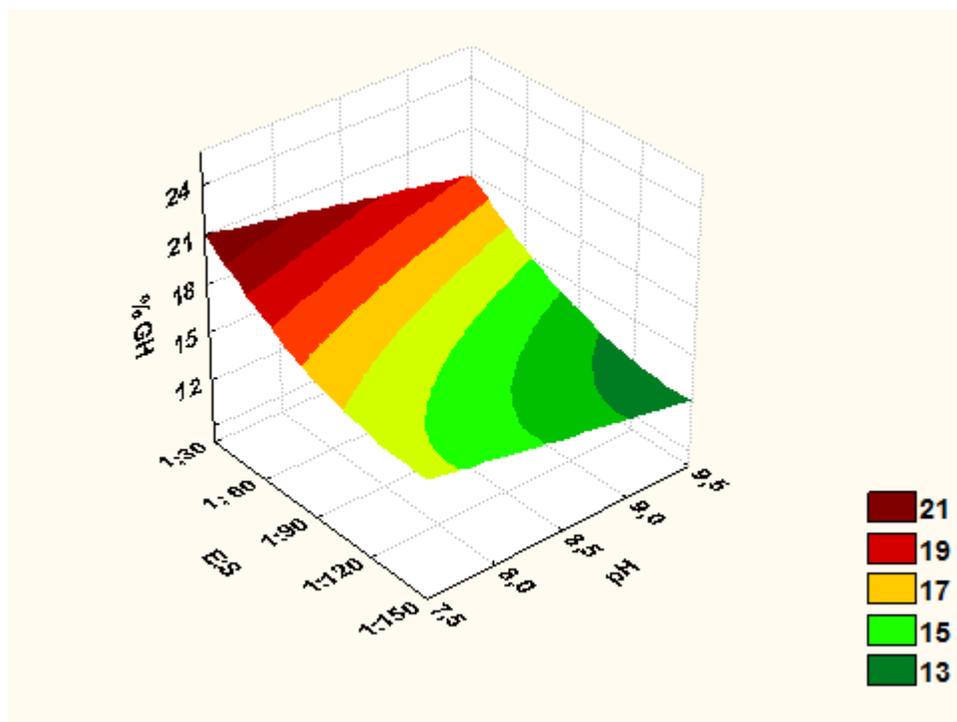


Figura 8. Superfície de Resposta para Grau de Hidrólise (%GH) em função do pH e da relação enzima: substrato (E:S)

Na Figura 9 estão apresentadas as eletroforeses em sistema SDS-PAGE Tricina em condições redutoras do CPL e dos hidrolisados produzidos nos 11 ensaios do DCCR.

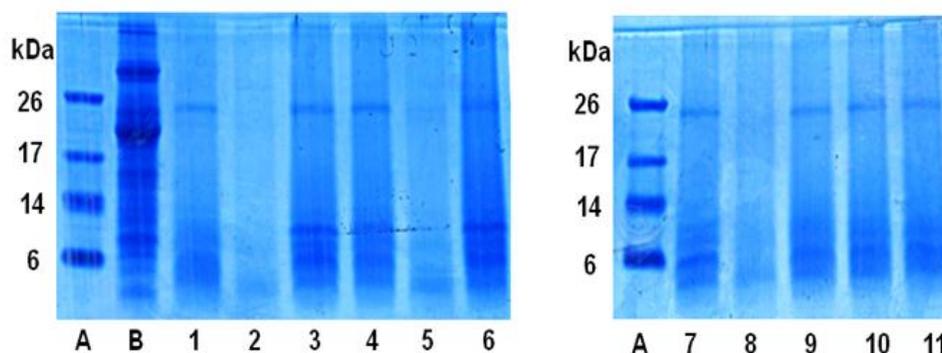


Figura 9. Eletroforese em sistema SDS-PAGE Tricina do concentrado proteico de linhaça (CPL) e dos hidrolisados dos 11 ensaios com Alcalase produzidos nas condições determinadas para o DCCR. P-Padrão; C- CPL; 1 a 11- hidrolisados correspondentes aos ensaios 1 a 11 do DCCR.

A Alcalase hidrolisou as frações de massa molecular superior a 26 kDa, correspondente às globulinas, visto que não se observa banda no início do gel de

separação dos hidrolisados. Também se observa nos perfis dos hidrolisados 1 a 11 o desaparecimento das bandas de massas moleculares entre 21 e 10 kDa, presentes no CPL. Nos perfis dos hidrolisados 2 e 8, se observa apenas uma banda difusa, de massa molecular < 6 kDa, sugerindo que as condições utilizadas levaram à maior hidrólise e formação de peptídeos de baixa massa molecular. Nos perfis dos hidrolisados 3 e 6 se observa uma banda próximo a 26 kDa, três bandas entre 9 e 6 kDa e outra inferior a 6 kDa. As bandas de massa moleculares ~26 kDa, possivelmente uma globulina, e inferiores a 10 kDa, possivelmente albuminas, também são visualizadas com maior intensidade no perfil do CPL, o que indica que elas são parcialmente resistentes à hidrólise com Alcalase. Os perfis dos hidrolisados obtidos na condição do ponto central (9 a 11) são iguais uma vez que eles são realizados para verificar a repetibilidade do processo. Esses perfis eletroforéticos condizem com os valores de GH dos hidrolisados obtidos em cada ensaio (Tabela 5), uma vez que quanto maior o GH, maior a quebra da proteína em peptídeos de baixa massa molecular.

5.2.2- Teor de substâncias redutoras do reagente Folin- Ciocalteau

O reagente de reagente Folin-Ciocalteau não é específico para compostos fenólicos e reage com outras substâncias como glicose, frutose, tirosina, fenilalanina, triptofano, ácido ascórbico e sulfitos (PRIOR, WU & SCHAICH, 2005) e por esta razão os resultados obtidos por esta análise não podem ser considerados como teor de fenólicos totais. Desta forma, eles foram considerados como substâncias redutoras do reagente Folin-Ciocalteau. Destaca-se também que a análise com este reagente foi proposta por Huang *et al.* (2005) como uma medida da capacidade redutora total das amostras.

O teor de substâncias redutoras dos extratos aquoso e metanólico dos diferentes hidrolisados obtidos em cada ensaio do DCCR está apresentado na Tabela 7.

Tabela 7. Teor de substâncias redutoras dos extratos aquoso e metanólico dos hidrolisados de linhaça obtidos nos ensaios 1 a 11 do DCCR

Ensaio	Valores Codificados		Valores Reais		Teor de substâncias redutoras (mg EAG/g HPL)	
	pH	E:S	pH	E:S	Extrato Aquoso	Extrato Metanólico
1	-1	-1	7,8	1:133	23,47 ± 0,90 ^a	19,61 ± 1,51 ^b
2	-1	1	7,8	1:48	22,79 ± 0,30 ^a	18,49 ± 0,39 ^b
3	1	-1	9,2	1:133	22,83 ± 0,40 ^a	16,75 ± 1,53 ^b
4	1	1	9,2	1:48	23,59 ± 0,93 ^a	18,47 ± 0,29 ^b
5	-1,41	0	7,5	1:90	23,99 ± 2,44 ^a	17,64 ± 0,40 ^b
6	1,41	0	9,5	1:90	20,68 ± 1,00 ^a	16,55 ± 0,73 ^b
7	0	-1,41	8,5	1:150	24,72 ± 0,81 ^a	18,98 ± 0,65 ^b
8	0	1,41	8,5	1:30	25,69 ± 1,12 ^a	20,32 ± 0,95 ^b
9	0	0	8,5	1:90	24,20 ± 1,13 ^a	19,52 ± 1,85 ^b
10	0	0	8,5	1:90	24,31 ± 1,63 ^a	20,04 ± 0,72 ^a
11	0	0	8,5	1:90	23,82 ± 0,86 ^a	18,90 ± 0,33 ^a

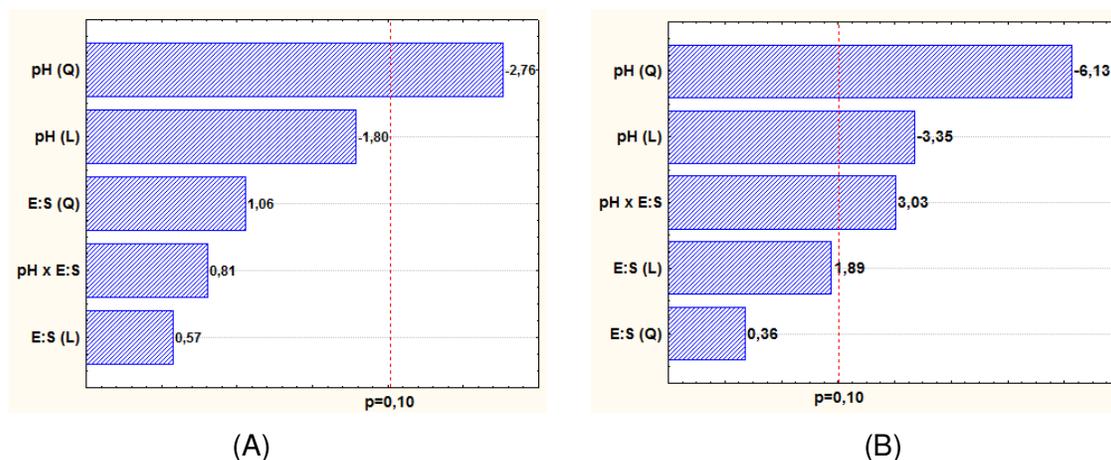
EAG: Equivalente de Ácido Gálico

Valores com letras diferentes, numa mesma linha, diferem entre si, $p < 0,05$.

Media ± desvio padrão 3 replicatas, cada uma com 3 repetições.

Para o teor de substâncias redutoras no extrato aquoso, a única variável que exerce impacto na resposta é a pH quadrática (Figura 10 A), sugerindo que aumento no pH provoca redução no teor de substâncias redutoras dos extratos aquosos de HPL.

Nos extratos metanólicos (Figura 10 B), o pH linear e quadrático exerceram um efeito negativo enquanto a interação entre pH e E:S exerceu efeito positivo sobre o teor de substâncias redutoras.

**Figura 10.** Diagrama de Pareto para teor de substâncias redutoras em função do pH e da relação enzima: substrato para os hidrolisados produzidos nos 11 ensaios do DCCR. A: Extrato aquoso. B: Extrato metanólico.

Os modelos de segunda ordem com as variáveis codificadas, incluindo os parâmetros estatisticamente significativos ($p < 0,10$) para teor de substâncias redutoras dos extratos aquoso e metanólico estão apresentados nas Equações 9 e 10, respectivamente. As análises de variância dos modelos estão apresentadas na Tabela 8.

$$FT_{\text{ext aquoso}} = 24,48 - 1,15(\text{pH})^2 \text{ (eq. 9)}$$

$$FT_{\text{ext metanólico}} = 19,55 - 0,55(\text{pH}) - 1,23 (\text{pH})^2 + 0,71(\text{pH})(\text{E:S}) \text{ (eq. 10)}$$

Tabela 8. ANOVA para a resposta teor de substâncias redutoras nos extratos aquoso e metanólico

Extrato	Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F _{calculado} (10%)	F _{teórico} (10%)	R ²
Aquoso	Regressão	8,24	1	8,24	9,02	3,36	50,0
	Resíduos	8,22	9	0,91			
	Falta de ajuste	8,09	7	1,16	16,57	9,34	
	Erro puro	0,13	2	0,07			
	Total	16,46	10	1,65			
Metanólico	Regressão	13,75	3	4,58			87,9
	Resíduos	1,90	7	0,27	16,91	3,07	
	Total	15,65	10	1,56			

Para o extrato aquoso, o valor de R² (50,0), F_{calculado} (9,02) para regressão e F_{calculado} (16,57) para a falta de ajuste indicam que o modelo matemático obtido não é válido. Para o extrato metanólico, os valores de R² (87,9%) e F_{calculado} (16,91) indicam bom ajuste do modelo matemático (Tabela 8).

A análise da superfície de resposta permite afirmar que, dentro da faixa de valores estudada, o maior teor de substâncias redutoras no extrato metanólico, 20 mg EAG/ g HPL, pode ser obtido na faixa de pH entre 7,5 a 9,5 e com E:S entre 1:60 e 1:30. O menor teor, 15 mg EAG/ g HPL, pode ser obtido nas condições extremas de pH (menor que 8,0 e maior que 9,0) e de E:S menor que 1:120. Portanto, as condições ótimas para obtenção de hidrolisados com maior teor de substâncias redutoras no extrato metanólico são pH próximo a 8,5 e relação E:S 1:30.

O teor de substâncias redutoras de todos os hidrolisados foi em média 20% maior no extrato aquoso que no extrato metanólico, exceto os obtidos nos ensaios 10 e 11 (Tabela 7). Variações no teor de substâncias redutoras ocorrem pela propriedade dos solventes utilizados na obtenção dos extratos (SUN & HO, 2005; NACZK & SHAHIDI, 2006) e também pela natureza dos compostos fenólicos e peptídeos presentes nos

hidrolisados. Michiels *et al.* (2012) mostraram que, para uma mesma amostra, o solvente escolhido é responsável por até 25% da variação no teor de substâncias redutoras nos extratos. Os HPL contêm peptídeos, que são predominantemente hidrofílicos, e também podem conter lignanas, principais compostos fenólicos da linhaça, que apesar de serem extraídas preferencialmente em misturas de solventes orgânicos, também são solúveis em água. No extrato metanólico, possivelmente há predominância de compostos fenólicos, em particular as lignanas, e peptídeos de caráter mais hidrofóbico.

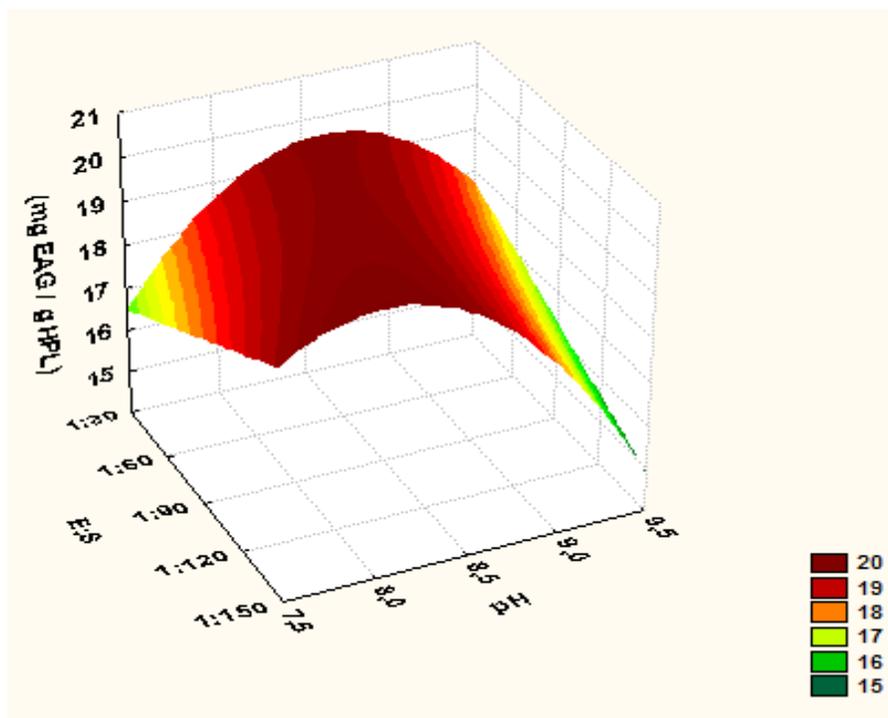


Figura 11. Superfície de Resposta para teor de substâncias redutoras dos hidrolisados proteicos de linhaça (HPL) em função do pH e da relação enzima: substrato no extrato metanólico.

EAG: Equivalentes do Ácido Gálico

O teor de substâncias redutoras nos extratos aquoso e metanólico dos hidrolisados obtidos nos ensaios não apresentou variação expressiva, 20,68 a 25,69 e 16,55 a 20,32 mg EAG/g de amostra, respectivamente. Esta pequena variação deve-se, possivelmente, as condições utilizadas na hidrólise que foram favoráveis à extração destes compostos. Quanto mais intensa a hidrólise, maior a formação de peptídeos de menor massa molecular, menor a superfície de contato da proteína disponível para interagir com os compostos fenólicos. O pH do meio também influencia a liberação de

compostos fenólicos. Quanto mais alcalino, mais facilmente eles serão liberados (MADHUJITH & SHAHIDI, 2009).

5.2.3- Atividade Antioxidante

A atividade antioxidante dos hidrolisados produzidos nas condições do DCCR, avaliada nos extratos aquoso e metanólico, determinado pelos métodos FRAP e ORAC, está apresentada na Tabela 9.

Tabela 9. Atividade Antioxidante determinada pelos métodos FRAP e ORAC dos extratos aquoso e metanólico dos hidrolisados produzidos nas condições do DCCR

Ensaio	Valores Codificados		Valores Reais		FRAP (mg SF/ g HPL)		ORAC (µmol TE/ g HPL)	
	pH	E:S	pH	E:S	Extrato	Extrato	Extrato	Extrato
					Aquoso	Metanólico	Aquoso	Metanólico
1	-1	-1	7,8	1:133	35,6 ± 2,0 ^a	33,0 ± 1,7 ^a	335,9 ± 27,1 ^a	335,8 ± 32,1 ^a
2	-1	1	7,8	1:48	33,7 ± 2,2 ^a	29,0 ± 0,9 ^b	331,7 ± 26,6 ^a	326,7 ± 32,8 ^a
3	1	-1	9,2	1:133	41,7 ± 2,5 ^a	35,6 ± 0,3 ^b	330,0 ± 28,6 ^a	291,8 ± 6,1 ^a
4	1	1	9,2	1:48	39,2 ± 4,6 ^a	34,7 ± 0,8 ^a	319,3 ± 16,3 ^a	314,3 ± 42,0 ^a
5	-1,41	0	7,5	1:90	32,4 ± 1,3 ^a	27,7 ± 1,0 ^b	251,4 ± 8,8 ^a	281,8 ± 39,6 ^a
6	1,41	0	9,5	1:90	41,1 ± 3,7 ^a	36,6 ± 2,6 ^a	271,8 ± 27,4 ^a	266,8 ± 10,8 ^a
7	0	-1,41	8,5	1:150	37,5 ± 1,0 ^a	38,6 ± 1,7 ^a	338,0 ± 42,1 ^a	320,4 ± 24,6 ^a
8	0	1,41	8,5	1:30	35,1 ± 3,4 ^a	36,2 ± 1,9 ^a	324,2 ± 20,1 ^a	291,2 ± 31,9 ^a
9	0	0	8,5	1:90	37,6 ± 3,1 ^a	37,7 ± 3,6 ^a	291,4 ± 19,8 ^a	331,9 ± 15,7 ^a
10	0	0	8,5	1:90	37,8 ± 2,4 ^a	38,5 ± 0,6 ^a	284,6 ± 25,3 ^a	353,5 ± 12,7 ^b
11	0	0	8,5	1:90	37,2 ± 1,1 ^a	38,0 ± 0,3 ^a	260,6 ± 23,9 ^a	347,1 ± 24,0 ^b

TE: Equivalentes de Trolox. SF: Sulfato Ferroso

Media ± desvio padrão 3 replicatas com 3 repetições. Valores com letras iguais, na mesma linha, para o mesmo método de atividade antioxidante, não diferem entre si.

Na faixa de valores estudada, para atividade antioxidante do extrato aquoso medida pelo método FRAP, o pH e E:S lineares exercem impacto sobre a resposta (Figura 12 A). Para o extrato metanólico, as variáveis pH linear e quadrática e relação E:S linear influenciam significativamente a atividade antioxidante (Figura 12 B).

Para a atividade antioxidante avaliada pelo método de ORAC, somente E:S quadrática exerce impacto significativo na resposta, o que significa que um aumento nessa variável produzirá HPL com maior atividade antioxidante no extrato aquoso (Figura 12 C). Para o extrato metanólico (Figura 12 D), redução no valor de pH resulta em HPL com maior atividade antioxidante, uma vez que a única variável que influencia significativamente a resposta é pH quadrática.

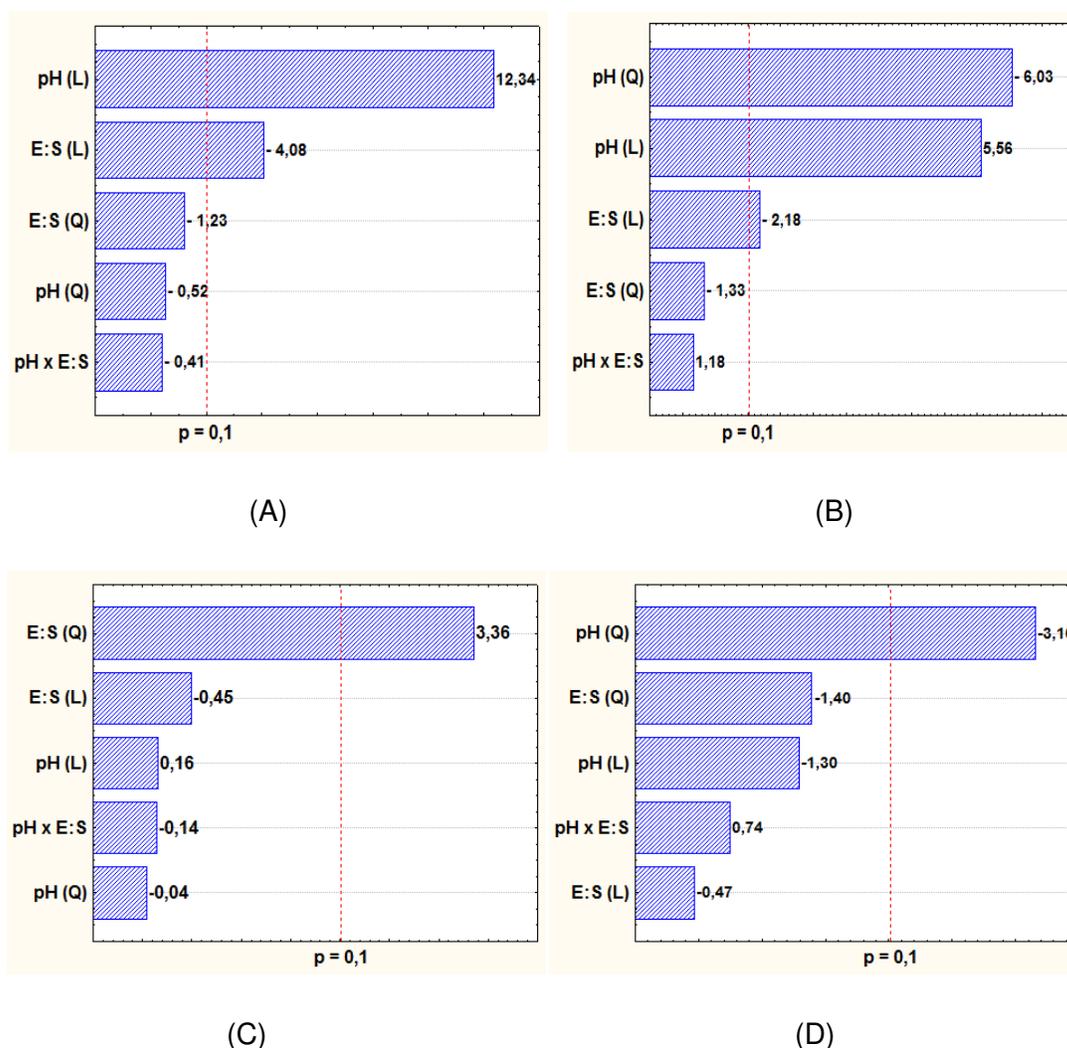


Figura 12. Diagrama de Pareto para Atividade Antioxidante em função do pH e da relação enzima: substrato para os hidrolisados produzidos nos 11 ensaios do DCCR. A: FRAP, extrato aquoso. B: FRAP, extrato metanólico. C: ORAC, extrato aquoso. D: ORAC, extrato metanólico.

Os modelos com as variáveis codificadas, incluindo os parâmetros estatisticamente significativos ($p < 0,10$) para atividade antioxidante, determinada por FRAP e ORAC, dos extratos aquoso e metanólico, estão apresentados nas Equações 11 a 14, respectivamente.

$$\text{FRAP}_{\text{ext aquoso}} = 37,15 + 2,98 (\text{pH}) - 0,98 (\text{E:S}) \text{ (eq.11)}$$

$$\text{FRAP}_{\text{ext metanólico}} = 37,35 + 2,62 (\text{pH}) - 3,16 (\text{pH})^2 - 1,02 (\text{E:S}) \text{ (eq. 12)}$$

$$\text{ORAC}_{\text{ext aquoso}} = 278,45 + 34,45(\text{E:S})^2 \text{ (eq. 13)}$$

$$\text{ORAC}_{\text{ext metanólico}} = 332,47 - 24,51 (\text{pH})^2 \text{ (eq. 14)}$$

As ANOVAs para atividade antioxidante, determinada para ambos os extratos, pelo método FRAP estão apresentadas na Tabela 12. Os valores de R^2 (96,8 e 89,7%) e $F_{\text{calculado}}$ (100,72 e 20,21) para os extratos aquoso e metanólico, respectivamente, sugerem um bom ajuste do modelo matemático (Tabela 10).

Tabela 10. ANOVA para a resposta Atividade Antioxidante, determinada pelo método de FRAP nos extratos aquoso e metanólico

Extrato	Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	$F_{\text{calculado}}$ (10%)	$F_{\text{teórico}}$ (10%)	R^2 (%)
Aquoso	Regressão	78,82	2	78,82	100,72	3,11	96,8
	Resíduos	3,13	8	0,39			
	Total	81,95	10	8,19			
Metanólico	Regressão	124,96	3	41,65	20,21	3,07	89,7
	Resíduos	14,43	7	2,06			
	Total	139,39	10	13,94			

A ANOVA para atividade antioxidante determinada pelo método de ORAC no extrato aquoso apresentou valores de $F_{\text{calculado}}$ (21,12) e R^2 (70%) que sugerem um bom ajuste do modelo. Para o extrato metanólico, a ANOVA não foi validada por apresentar um valor baixo valor de R^2 (47%)(Tabela 11).

Tabela 11. ANOVA para a resposta Atividade Antioxidante, determinada pelo método de ORAC nos extratos aquoso e metanólico

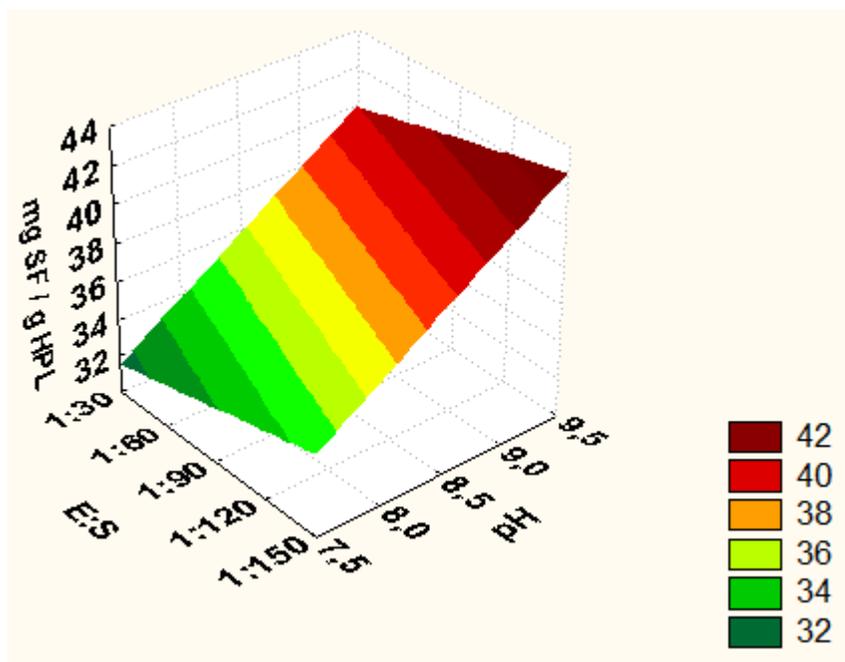
Extrato	Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	$F_{\text{calc.}}$ (10%)	$F_{\text{teórico}}$ (10%)	R^2 (%)
Aquoso	Regressão	7334,45	1	7334,45	21,12	3,36	70
	Resíduo	3125,15	9	347,24			
	Falta de ajuste	2600,58	7	371,51			
	Erro puro	524,57	2	262,29			
	Total	10459,61	10	1045,96			
Metanólico	Regressão	3715,06	1	3715,06	7,93	3,36	47
	Resíduo	4214,62	9	468,29			
	Falta de ajuste	3967,27	7	566,75			
	Erro puro	247,35	2	123,68			
	Total	7929,68	10	792,97			

Para os resultados dos ensaios de FRAP no extrato aquoso (Figura 13 A) a superfície de resposta mostra que, sob as condições estudadas, a melhor condição para se obter hidrolisados proteicos de linhaça com maior atividade antioxidante (42 mg SF/ g HPL) é quando a reação se dá em pH em torno de 9,5 e com E:S próximo de 1:150. Para o extrato metanólico (Figura 13 B), a maior atividade antioxidante do hidrolisado (40 mg

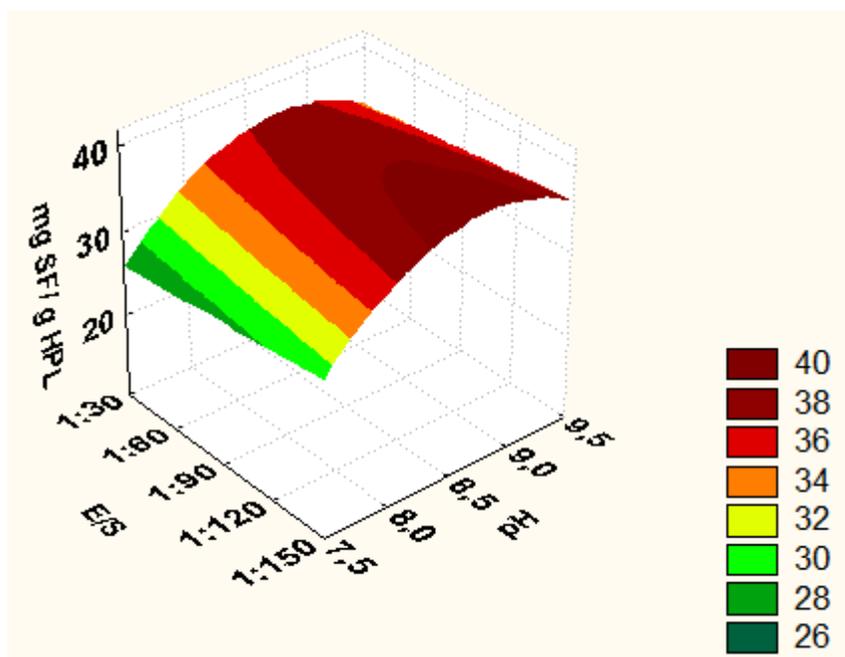
SF/ g HPL) é obtida quando a reação se dá em pH entre 8,5 e 9,0 e com E:S entre 1:90 a 1:150.

A superfície de resposta da atividade antioxidante determinada pelo método de ORAC no extrato aquoso está apresentada na Figura 14. Nas condições estudadas, a atividade antioxidante será máxima (340 $\mu\text{mol TE/ g HPL}$) para os hidrolisados obtidos quando a reação se dá na faixa de pH de 7,5 a 9,5 e com E:S próximo de 1:30 ou de 1:150.

Para a escolha dos hidrolisados de maior atividade antioxidante foram consideradas as condições que contemplassem, simultaneamente, a obtenção de hidrolisados com os valores mais altos de atividade antioxidante para os métodos FRAP e ORAC, tanto no extrato aquoso quanto no metanólico, determinadas neste estudo. Para isso, as Figuras 13 e 14 foram analisadas e observou-se que os hidrolisados de maior atividade antioxidante pelo método de FRAP serão aqueles produzidos quando a reação se dá em pH próximo a 9,0 e com E:S próximo a 1:150 e para o método de ORAC quando a reação se dá na faixa de pH de 7,5 a 9,5 e com E:S 1:150 ou 1:30. Assim, utilizando valores dentro da faixa ótima de pH e E:S para atividade antioxidante determinada por FRAP e ORAC foram estabelecidas duas condições de obtenção de hidrolisados com maior atividade antioxidante. A primeira quando a reação se dá em pH 8,5 e E:S 1:90, que corresponde ao ensaio do ponto central e por isso foi denominado de HPL 0. A segunda, quando a reação se dá em pH 9 e E:S 1:133, que corresponde ao ensaio 3, e por isso foi chamado de HPL 3.



(A)



(B)

Figura 13. Superfície de Resposta para Atividade Antioxidante pelo método de FRAP em função do pH e da relação enzima: substrato (E:S). A: Extrato aquoso B: Extrato metanólico. SF: Sulfato ferroso

Os hidrolisados escolhidos HPL 0 e HPL 3 apresentaram 15 e 13% de GH, respectivamente, e estão entre os menores obtidos no presente estudo. Tang *et al.* (2009) ao estudarem a atividade antioxidante de hidrolisados de proteína de trigo sarraceno com Alcalase, também observaram que o hidrolisado de menor GH, 5%, foi o que apresentou maior atividade antioxidante avaliada pelo método do DPPH.

Um dos fatores preponderante para atividade antioxidante de hidrolisados é a composição e sequência dos aminoácidos nos peptídeos, mas o GH também deve ser considerado, visto que pode indicar a formação de peptídeos com diferentes massas moleculares (CHEN, MURAMOTO, YAMAUCHI *et al.*, 1996; LI, HAN & CHEN, 2008; DRYÁKOVÁ, PIHLANTO, MARNILA *et al.*, 2010). Comparando-se as superfícies de resposta obtida para o GH (Figura 8) com as obtidas para a atividade antioxidante (Figuras 13 e 14), verifica-se que nas condições com que se obteve maior GH (E:S 1:30/1:60 e pH 7,5/8,0), a atividade antioxidante foi menor. Apenas a atividade antioxidante do extrato aquoso medida por ORAC foi beneficiada pelo aumento do GH. A massa molecular dos peptídeos interfere na capacidade de neutralizar radicais livres, pois quanto maior o número de aminoácidos presentes na cadeia polipeptídica, maior o número de interações entre eles, dificultando o acesso das espécies reativas aos centros nucleofílicos. Ao mesmo tempo, peptídeos de baixa massa molecular e aminoácidos livres não apresentam elevada capacidade antioxidante, pois possuem solubilidade reduzida em meio lipofílico e principalmente porque a atividade antioxidante do peptídeo é produto do efeito sinérgico da combinação de aminoácidos com potencial antioxidante. Dentre os resíduos de aminoácidos com maior potencial antioxidante estão aqueles que apresentam em sua cadeia lateral um centro nucleofílico, como cisteína e metionina, que contém o grupo tiol, como os aminoácidos triptofano, tirosina e fenilalanina que contém anel aromático ou como a histidina que contém o grupo imidazol (CHEN, MURAMOTO, YAMAUCHI *et al.*, 1996).

Além disso, por se tratar de hidrolisado proteico de origem vegetal, a atividade antioxidante determinada pelo métodos de FRAP e ORAC também é devida à presença de compostos fenólicos liberados durante a hidrólise. Comparando as superfícies de resposta do teor de substâncias redutoras com as de atividade antioxidante (Figuras 11, 13 e 14), verifica-se que a região de maior liberação de compostos redutores coincide apenas com a região de maior atividade antioxidante pelo método FRAP (Figura 13 B). Isso sugere que, para a atividade antioxidante determinada pelos métodos de FRAP e

ORAC no extrato aquoso (Figuras 13 A e 14), os compostos antioxidantes comportam-se de forma diferente em relação aos compostos que estão reduzindo. Em relação à influência do GH na liberação de compostos redutores, ao comparar-se as Figuras 8 e 11, verifica-se que a região de maior GH (E:S 1:30/1:60 e pH 7,5/8,0) não se sobrepõe com as condições de maior liberação de compostos redutores em extrato metanólico (E:S 1:150/1:120 e pH 8,0/9,0), o que sugere que o maior GH não tem relação direta com a liberação de compostos com atividade redutora.

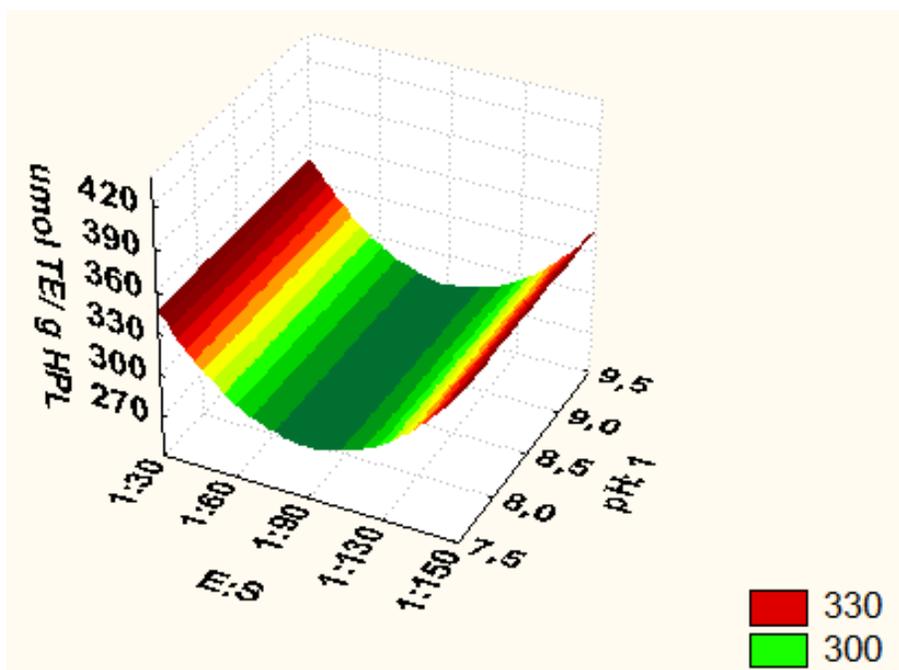


Figura 14. Superfície de Resposta para Atividade Antioxidante pelo método de ORAC em função do pH e da relação enzima: substrato (E:S) no extrato aquoso. TE: Equivalente de Trolox

O teor de substâncias redutoras no extrato aquoso foi aproximadamente 20% maior que no metanólico. No entanto, quando se compara os resultados dos extratos aquoso e metanólico de um mesmo hidrolisado, verifica-se que pelo método de FRAP, a capacidade foi igual, exceto para os ensaios 2, 3 e 5 (Tabela 10). Para a atividade antioxidante avaliada por ORAC, apenas os extratos dos HPL obtido nos ensaios 10 e 11 foram diferentes entre si. Diferença de polaridade dos solventes gera variações nos tipos de compostos presentes em cada extrato, provocando uma diferença de até 30% na atividade antioxidante de extratos diferentes de uma mesma amostra (MICHIELS, KEVERS, PINCEMAIL *et al.*, 2012).

O maior teor de substâncias redutoras nos extratos aquosos que nos metanólicos não foi determinante para que apresentassem maior atividade antioxidante, o que está em concordância com o estudo de Michiels, Kevers, Pincemail *et al.*, (2012) com diferentes extratos de maçã.

5.3- Caracterização e efeito da digestão *in vitro* no teor de substâncias redutoras e na atividade antioxidante da FLMD, CPL e HPL 0 e HPL 3

A FLMD, o CPL e os hidrolisados HPL 0 e HPL 3 foram submetidos à digestão *in vitro* para estudar as possíveis influências que o processo digestório pode exercer sobre o teor de substâncias redutoras e da atividade antioxidante dos produtos de linhaça. Durante a digestão, a atividade antioxidante apresentada por eles poderá aumentar, não alterar ou reduzir. Além disso, proteínas, peptídeos e compostos fenólicos são expostos a diversos agentes oxidantes provenientes do próprio alimento ou do processo digestório, que podem afetar a estabilidade e comprometer a capacidade dos alimentos de atuarem como redutores. Dessa forma, o estudo da digestão *in vitro* dos alimentos pode contribuir com informações que permitem inferir como será o comportamento deles *in vivo*.

5.3.1 – Perfil aminoacídico, eletroforético e cromatográfico

Considerando a importância da composição aminoacídica para atividade antioxidante, foi determinado o perfil de aminoácidos totais para a FLMD, CPL, HPL 0 e HPL 3, apresentado na Tabela 12.

A análise do perfil aminoacídico da FLMD e do CPL mostra que a proteína de linhaça contém predominantemente ácido aspártico (+ asparagina), ácido glutâmico (+ glutamina) e arginina e minoritariamente cisteína, histidina, lisina, metionina e tirosina. Composição semelhante foi obtida por Wanasundara & Shahidi (2003). A elevada quantidade de aminoácidos de cadeia ramificada, valina, leucina e isoleucina, em relação à quantidade de aminoácidos aromáticos aliada à baixa relação lisina/arginina confere à proteína de linhaça propriedades imunológicas, anti-câncer e anti colesterolêmicas (RABETAFIKA, VAN REMOORTEL, DANTHINE *et al.*, 2011).

Tabela 12. Composição aminoacídica da FLMD e do CPL (g aminoácido/100g de proteína)

Aminoácidos	FLMD*	CPL*	HPL 0*	HPL 3*
Ac. Aspártico (+ asparagina)	8,70 ± 0,33	11,03 ± 0,03	9,42 ± 1,24	11,50 ± 0,56
Ac. Glutâmico (+ glutamina)	21,08 ± 0,17	20,70 ± 0,24	19,87 ± 0,24	21,01 ± 0,22
Alanina	5,35 ± 0,01	4,91 ± 0,03	5,03 ± 0,06	4,96 ± 0,13
Arginina	13,28 ± 0,10	12,17 ± 0,04	12,68 ± 0,37	12,19 ± 0,23
Cistina	0,79 ± 0,01	0,80 ± 0,05	0,78 ± 0,08	0,55 ± 0,06
Fenilalanina	4,94 ± 0,02	5,64 ± 0,06	5,90 ± 0,25	5,54 ± 0,22
Glicina	6,51 ± 0,00	5,59 ± 0,06	3,73 ± 0,36	5,62 ± 0,21
Histidina	2,11 ± 0,08	2,11 ± 0,04	2,28 ± 0,06	2,18 ± 0,06
Isoleucina	5,82 ± 0,14	5,12 ± 0,06	5,39 ± 0,22	4,99 ± 0,03
Leucina	5,24 ± 0,26	5,88 ± 0,08	5,97 ± 0,17	5,95 ± 0,13
Lisina	4,03 ± 0,02	3,38 ± 0,08	3,31 ± 0,08	3,22 ± 0,18
Metionina	1,15 ± 0,04	1,76 ± 0,06	1,77 ± 0,08	1,66 ± 0,10
Prolina	3,31 ± 0,06	3,98 ± 0,04	4,03 ± 0,18	4,21 ± 0,12
Serina	5,32 ± 0,16	4,90 ± 0,04	4,73 ± 0,19	4,91 ± 0,12
Tirosina	2,57 ± 0,03	2,64 ± 0,04	2,86 ± 0,05	2,55 ± 0,04
Treonina	4,33 ± 0,07	3,65 ± 0,12	3,97 ± 0,07	3,63 ± 0,04
Valina	5,44 ± 0,02	5,74 ± 0,03	6,01 ± 0,15	5,33 ± 0,13
Total	99,99	100,00	99,99	100,00

* Média ± desvio padrão de 3 determinações

A Alcalase hidrolisa preferencialmente o lado carbóxi das ligações peptídicas dos aminoácidos glutamato, glutamina, metionina, leucina, tirosina e lisina (YANG, YANG, LI *et al.*, 2011). Essa especificidade faz da linhaça um bom substrato para esta protease, uma vez que ela apresenta em sua composição um alto teor de ácido glutâmico, além de metionina, leucina, tirosina e lisina.

Os hidrolisados HPL 0 e HPL 3 contém principalmente ácido aspártico (+ asparagina), ácido glutâmico (+ glutamina), arginina, e os hidrofóbicos, alanina, leucina, isoleucina e valina. A presença de elevado teor de aminoácidos hidrofóbicos favorece a solubilidade dos peptídeos em lipídeos, inibindo a peroxidação lipídica e preservando a integridade das membranas celulares (RAJAPAKSE, MENDIS, BYUN *et al.*, 2005; GAO, CAO & LI, 2010). A presença de Leu, Val, Ala nos peptídeos pode favorecer a capacidade de seqüestrar radical livre, assim como daqueles que contêm resíduos de His podem apresentar forte atividade antioxidante devido a decomposição dos grupos imidazol (GAO, CAO & LI, 2010). A arginina, por ser um aminoácido de caráter básico, confere ao peptídeo capacidade de doar prótons e quelar metais (ARCAN & YEMENICIOGLU, 2010).

As modificações causadas pelo processo de digestão *in vitro* foram acompanhadas por eletroforese em sistema SDS-PAGE Tricina e análise cromatográfica das amostras.

O perfil eletroforético das amostras está apresentado na Figura 15. Nos perfis das amostras FLMD e CPL observam-se várias bandas com massas moleculares > 6 kDa. Após a digestão dessas amostras, as bandas de massa molecular > 14 kDa desaparecem e apenas duas bandas, de massas moleculares entre 14 e 6 kDa, permanecem. No perfil eletroforético do digerido do HPL 0 observa-se uma banda difusa de aproximadamente 6 kDa, que também é visualizada no perfil dessa amostra antes da digestão. A permanência de bandas nos perfis dos digeridos sugere que essas frações são total ou parcialmente resistentes à hidrólise com pepsina e pancreatina. Diferentemente do ocorrido nas amostras anteriores, no perfil do HPL 3 a região de coloração intensa, entre 14 e 6 kDa, desaparece após a digestão, indicando que a ação das enzimas digestivas foram eficientes na formação de peptídeos de massa molecular inferior a 6 kDa.

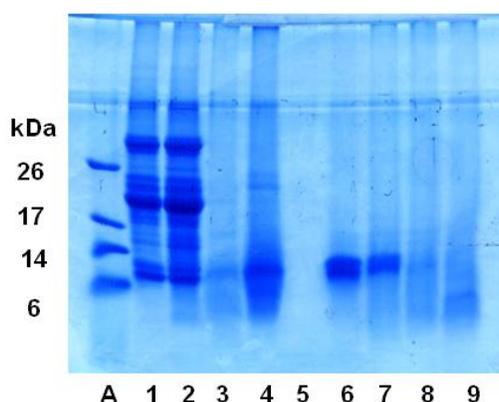
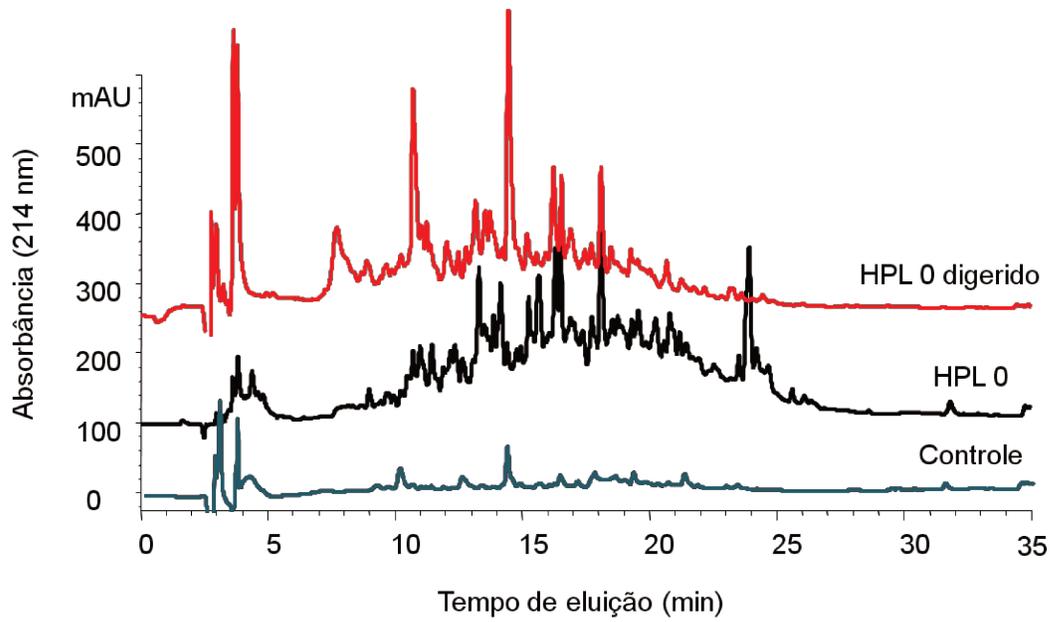
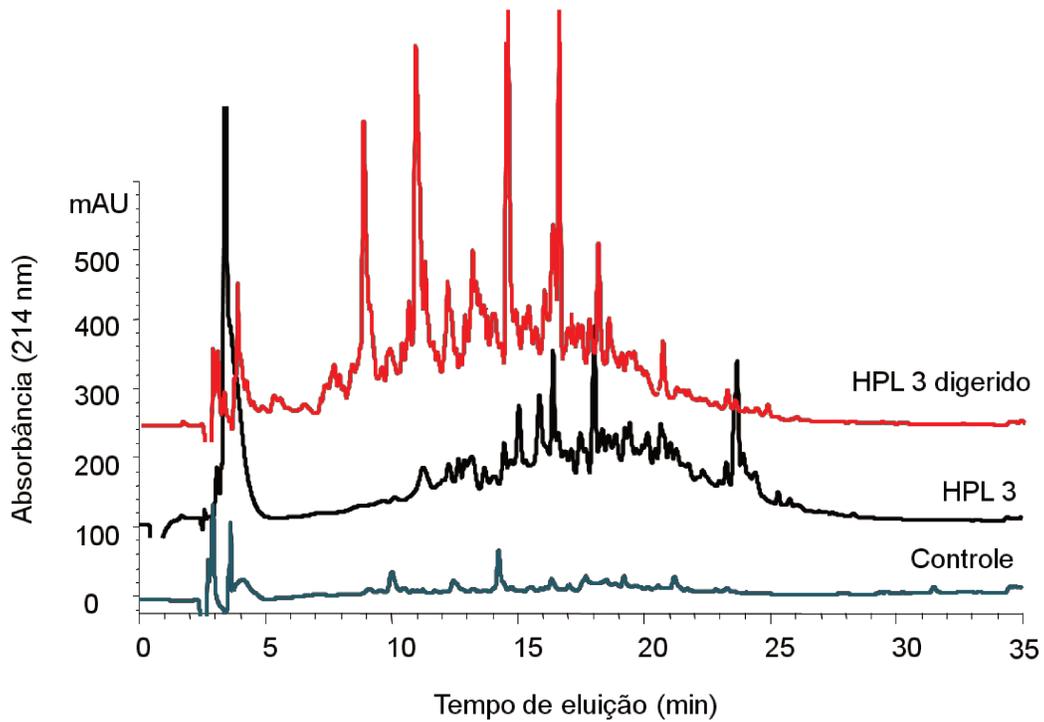


Figura 15. Eletroforese SDS-PAGE Tricina das amostras Farinha de linhaça marrom desengordurada (FLMD), Concentrado proteico de linhaça (CPL) e Hidrolisado proteico de linhaça (HPL) de maior atividade antioxidante antes e após a digestão. Amostras: A- Padrão; 1- FLMD, 2- CPL, 3-HPL 0, 4- HPL 3 antes da digestão *in vitro*; 5- controle digestão; 6- FLMD, 7- CPL, 8- HPL 0, 9- HPL 3 após a digestão *in vitro*.

Os perfis cromatográficos dos hidrolisados HPL 0 e HPL 3 antes da digestão são semelhantes (Figura 16), com a maioria dos picos eluindo entre 10 a 30 min. Os principais picos do cromatograma do HPL 0 têm tempos de eluição 13, 16, 17, 18 e 24 min e do HPL 3, os 5 principais eluem em 12, 15, 16, 17 e 24 min. O tempo de eluição dos componentes da amostra depende da polaridade da fase móvel, que diminui à medida que o tempo de corrida aumenta. Dessa forma, nos HPL 0 e 3 predominam peptídeos de média hidrofobicidade.



(A)



(B)

Figura 16. Perfil cromatográfico dos hidrolisados proteicos de linhaça (HPL) de maior atividade antioxidante, antes e após a digestão. A- HPL 0. B- HPL 3. Controle: processo digestório realizado sem amostra

Os cromatogramas dos HPL 0 e 3 após a digestão intestinal também são semelhantes. Diferentemente do perfil cromatográfico das amostras antes da digestão *in vitro*, há um número maior de picos que se concentram entre os tempos de eluição 5 e 20 min. Essa mudança de perfil sugere que após a digestão os peptídeos foram hidrolisados em outros de menores massas moleculares, aumentando sua solubilidade em solventes hidrofílicos.

5.3.2- Teor de substâncias redutoras do reagente Folin-Ciocalteu

O teor de substâncias redutoras das amostras FLMD, CPL, HPL 0 e HPL 3, nos extratos aquoso e metanólico, antes e após a digestão, estão apresentados na Tabela 13. Antes da digestão, a FLMD apresentou 1,38 e 0,68 mg EAG/ g amostra no extrato aquoso e metanólico, respectivamente. O valor encontrado para o extrato metanólico foi inferior a 2,7 e 3,25 mg EAG/ g de farinha de linhaça integral relatado por Medina (2011) após extrações de 24 e 48h respectivamente. Em extrato metanólico 80%, Velioglu *et al.* (1998) encontraram 4,73 mg EAG/ g de semente de linhaça. Essa diferença no teor de substâncias redutoras pode ser justificada pela perda de parte dos compostos fenólicos durante o processo de desengorduramento da farinha. Siger *et al.*, (2008) encontrou 1,14 mg de equivalentes de ácido caféico / 100 g de óleo de linhaça, reportando presença de ácido ferúlico e vanílico e Herchi *et al.*, (2011) de lignanas.

O teor de substâncias redutoras no CPL determinado nos extratos aquoso e metanólico foi, respectivamente, 2 e 3 vezes maior que na FLMD ($p < 0,05$). Essa diferença pode ser atribuída à ocorrência de compostos fenólicos ligados à proteína vegetal. Possivelmente no processo de obtenção do concentrado a separação dos fenólicos das proteínas não ocorreu de forma que esses compostos estão mais concentrados no CPL que na FLMD. Gamel *et al.*, (2006) observaram esse mesmo comportamento em relação à farinha de amaranto e seu concentrado proteico e Tang *et al.*, (2009) para o trigo sarraceno e seu isolado proteico.

Em relação aos hidrolisados HPL 0 e HPL 3, o teor de substâncias redutoras é 8 vezes maior que o encontrado nos extratos do CPL ($p < 0,05$). Isso sugere que a hidrólise do CPL com Alcalase é eficiente na liberação não só de peptídeos, mas também de compostos fenólicos que estão associados à proteína de linhaça.

Após a digestão, o teor de substâncias redutoras da FLMD no extrato aquoso aumentou 9 vezes e no extrato metanólico ficou 17 vezes maior ($p < 0,05$). Isso sugere que as enzimas do processo digestório liberaram peptídeos, compostos fenólicos e açúcares, compostos reativos com o reagente de Folin-Ciocalteu. O mesmo comportamento foi observado para o CPL, para o qual foi observado aumento em 20 vezes no teor de substâncias redutoras ($p < 0,05$) em ambos os extratos após a digestão.

Em relação aos hidrolisados, o processo digestório provocou aumento de 30% ($p < 0,05$) apenas no teor de substâncias redutoras do extrato metanólico do HPL 3. Possivelmente os peptídeos presentes nesse hidrolisado, que tem menor GH, apresentaram mais sítios para as enzimas pepsina e a pancreatina que o HPL 0, favorecendo a formação de novos peptídeos, exposição de aminoácidos aromáticos e liberação de compostos fenólicos. Segundo Tang *et al.*, (2009), com aumento do GH de proteínas vegetais pode provocar o rompimento do complexo proteína-polifenol e, concomitantemente, promover a liberação de peptídeos de baixa massa molecular e compostos fenólicos.

Após a digestão *in vitro*, o teor de substâncias redutoras do CPL se igualou ao dos hidrolisados ($p < 0,05$). Este resultado mostra que tanto a Alcalase quanto o processo digestório são capazes de liberar compostos com atividade redutora, principalmente fenólicos, da proteína de linhaça.

Tabela 13. Teor de substâncias redutoras das amostras FLMD, CPL, HPL 0 e HPL 3 antes e após a digestão *in vitro*

Amostras	Teor de substâncias redutoras (mg EAG / g amostra)			
	Antes da digestão		Após a digestão	
	Extrato Aquoso	Extrato Metanólico	Extrato Aquoso	Extrato Metanólico
FLMD	1,38 ± 0,14 ^{a,A}	0,68 ± 0,05 ^{c,A}	10,37 ± 0,58 ^{b,A}	12,21 ± 0,72 ^{d,A}
CPL	2,66 ± 0,28 ^{a,B}	2,19 ± 0,10 ^{c,B}	24,74 ± 1,87 ^{b,B}	24,66 ± 2,08 ^{d,B}
HPL 0	24,11 ± 0,26 ^{a,C}	19,49 ± 0,57 ^{c,C}	24,06 ± 0,32 ^{a,B}	21,47 ± 0,76 ^{c,B}
HPL 3	22,83 ± 0,40 ^{a,D}	16,75 ± 0,53 ^{c,D}	23,51 ± 0,58 ^{a,B}	21,27 ± 0,92 ^{d,B}

EAG: Equivalentes de Ácido Gálico. FLMD: Farinha de linhaça marrom desengordurada. CPL: Concentrado proteico de linhaça. HPL: Hidrolisado proteico de linhaça.

Letras diferentes, na mesma linha, para o mesmo extrato, diferem entre si ($p < 0,05$).

Letras diferentes, na mesma coluna, diferem entre si ($p < 0,05$).

Média ± desvio padrão de 3 replicatas com 3 repetições

5.3.3- Atividade antioxidante

A atividade antioxidante determinada pelo método de FRAP e ORAC, antes e após a digestão das amostras FLMD, CPL e os hidrolisados HPL 0 e HPL 3 estão apresentadas nas Tabelas 14 e 15.

Antes da digestão a FLMD apresentou capacidade de reduzir o íon férrico e sequestrar o radical peroxil. A capacidade antioxidante contra o radical peroxil da FLMD nos extratos aquoso e metanólico foi de 40,87 e 26,97 $\mu\text{mol TE/ g}$ FLMD. Esse valor é similar ao relatado para o grão de soja, 54,09 $\mu\text{mol TE/ g}$, inferior ao encontrado para lentilha 72,82 $\mu\text{mol TE/ g}$ e superior ao encontrado para semente de amendoim 31,66 $\mu\text{mol TE/ g}$ (U.S. DEPARTMENT OF AGRICULTURE, 2010).

Tabela 14. Atividade antioxidante determinada pelo método de FRAP das amostras FLMD, CPL, HPL 0 e HPL 3 antes e após a digestão *in vitro*

Amostras	FRAP (mg SF / g amostra)			
	Antes da digestão		Após a digestão	
	Extrato Aquoso	Extrato Metanólico	Extrato Aquoso	Extrato Metanólico
FLMD	5,87 \pm 0,15 ^{a,A}	3,87 \pm 0,30 ^{c,A}	18,10 \pm 0,79 ^{b,A}	30,57 \pm 2,27 ^{d,A}
CPL	12,97 \pm 0,34 ^{a,B}	10,53 \pm 0,35 ^{c,B}	31,10 \pm 1,94 ^{b,B}	34,79 \pm 1,65 ^{d,B}
HPL 0	37,52 \pm 0,30 ^{a,C}	38,05 \pm 0,39 ^{c,C}	47,05 \pm 1,06 ^{b,C}	48,32 \pm 1,63 ^{d,C}
HPL 3	41,65 \pm 2,54 ^{a,D}	35,56 \pm 0,28 ^{c,D}	48,10 \pm 2,20 ^{a,C}	48,86 \pm 0,15 ^{d,C}

SE: Sulfato Ferroso. FLMD: Farinha de linhaça marrom desengordurada. CPL: Concentrado proteico de linhaça. HPL: Hidrolisado proteico de linhaça.

Letras minúsculas diferentes, na mesma linha, para o mesmo extrato, diferem entre si ($p < 0,05$).

Letras maiúsculas diferentes, na mesma coluna, diferem entre si ($p < 0,05$).

Média \pm desvio padrão de 3 replicatas com 3 repetições

A capacidade do CPL em neutralizar os radicais livres, determinada pelo método de FRAP, é 2 vezes maior no extrato aquoso e 3 vezes maior no extrato metanólico, que nos mesmos extratos de FLMD. A capacidade de sequestrar radical peroxil do extrato metanólico do CPL é 1 vez maior que a do mesmo extrato da FLMD. Essa diferença possivelmente se deve à maior concentração de proteínas e compostos fenólicos no CPL, que são as principais substâncias com potencial antioxidante presentes na linhaça (WANASUNDARA & SHAHIDI, 2003).

Tabela 15. Atividade antioxidantes determinada pelo método de ORAC das amostras FLMD, CPL, HPL 0 e HPL 3 antes e após a digestão *in vitro*

Amostras	ORAC ($\mu\text{mol TE} / \text{g amostra}$)			
	Antes da digestão		Após a digestão	
	Extrato Aquoso	Extrato Metanólico	Extrato Aquoso	Extrato Metanólico
FLMD	40,87 \pm 1,30 ^{a,A}	26,97 \pm 3,57 ^{c,A}	188,39 \pm 23,43 ^{b,A}	279,36 \pm 6,72 ^{d,A}
CPL	64,57 \pm 9,93 ^{a,A}	60,55 \pm 14,27 ^{c,B}	421,24 \pm 49,20 ^{b,A,B}	436,84 \pm 7,98 ^{d,B}
HPL 0	300,09 \pm 21,18 ^{a,B}	325,52 \pm 31,67 ^{c,C}	485,12 \pm 38,07 ^{b,B}	391,13 \pm 17,11 ^{d,C}
HPL 3	330,01 \pm 28,61 ^{a,C}	291,82 \pm 6,13 ^{c,D}	515,10 \pm 19,23 ^{b,B}	365,98 \pm 18,56 ^{d,C}

TE: Equivalente de Trolox. FLMD: Farinha de linhaça marrom desengordurada. CPL: Concentrado proteico de linhaça. HPL: Hidrolisado proteico de linhaça.

Letras diferentes, na mesma linha, para o mesmo extrato, diferem entre si ($p < 0,05$).

Letras diferentes, na mesma coluna, diferem entre si ($p < 0,05$).

Média \pm desvio padrão de 3 replicatas com 3 repetições

O aumento na atividade antioxidante dos hidrolisados foi de até 4 vezes quando avaliada pelo método de FRAP e até 6 vezes pelo método de ORAC, que a atividade antioxidante apresentada do CPL ($p < 0,05$). Esse resultado evidencia que a hidrólise das proteínas pela Alcalase leva à produção de hidrolisado com capacidade antioxidante maior que a encontrada na matéria prima original. Esse comportamento também foi observado por Tironi *et al.*, (2010) que relataram que o isolado proteico de amaranto apresentou capacidade de sequestro do radical ABTS⁺ inferior ao seu hidrolisado e por Jamdar *et al.*, (2010) que observaram maior capacidade de quelar metais e poder redutor para os hidrolisados de amendoim do que para o seu concentrado proteico.

A capacidade antioxidante do HPL 3, determinada pelos método de FRAP, foi 10% maior que a encontrada para o HPL 0 em ambos os extratos ($p < 0,05$). Para o método de ORAC, a capacidade do HPL 3 foi 10% maior no extrato aquoso e 12% menor no extrato metanólico em relação ao HPL 0. A capacidade antioxidante dos hidrolisados HPL 0 e HPL 3, determinada pelo método de ORAC em ambos os extratos, foi de $\sim 300 \mu\text{mol TE} / \text{g HPL}$. Roblet *et al.*, (2012) encontraram valor superior ($\sim 700 \mu\text{mol TE} / \text{g}$) para hidrolisados proteicos de soja com peptídeos de massa molecular $> 10 \text{ kDa}$. Essa diferença pode ser atribuída à composição e sequência aminoacídica distintas das proteínas de soja e linhaça, bem como a presença de diferentes compostos fenólicos que podem estar associados a elas.

Após a digestão, houve aumento na atividade antioxidante da FLMD avaliada tanto pelo método de FRAP como ORAC de 4 vezes no extrato aquoso e 10 vezes no extrato

metanólico. Para o CPL, o aumento foi de 3 vezes para ambos os extratos para atividade medida pelo FRAP e 8 vezes para ambos os extratos para a atividade medida pelo ORAC. Comportamento similar foi observado por Huang *et al.*, (2010) que reportaram que a ovotransferrina apresentou aumento de 8 vezes na capacidade de seqüestro do radical peroxil após a digestão *in vitro*.

Em relação aos hidrolisados, houve aumento ($p < 0,05$) em torno de 40% na atividade antioxidante medida por FRAP e ORAC para ambos os extratos, exceto para o extrato aquoso do HPL 3 avaliado pelo método de FRAP. Orsini Delgado *et al.*, (2011) também observaram aumento na atividade antioxidante de hidrolisados proteicos de amaranto com Alcalase após a digestão, pelos métodos de ABTS⁺ e ORAC.

O aumento na atividade antioxidante das amostras após a digestão, determinada por FRAP e ORAC, foi mais expressivo nas amostras FLMD e CPL. Este resultado deve-se à liberação de peptídeos e compostos fenólicos pelas enzimas digestivas, que foi mais intenso nas amostras não previamente hidrolisadas. Uma possível explicação para menor efeito da ação das enzimas digestivas sobre os hidrolisados se deve a ampla especificidade da Alcalase que pode ter atuado sobre os sítios de ação específicos da pepsina e pancreatina (ORSINI DELGADO, TIRONI & AÑÓN, 2011), liberando os compostos fenólicos e formando peptídeos de baixa massa molecular com atividade antioxidante.

Dentre todas as amostras digeridas, os hidrolisados apresentaram a maior atividade antioxidante medida por FRAP (50 mg SF/ g amostra), seguida do CPL, que foi 10% inferior. Para o método de ORAC, o CPL apresentou a maior atividade (~430 $\mu\text{mol TE/ g amostra}$), 30% superior aos hidrolisados. Considerando que a metodologia de determinação da atividade antioxidante por ORAC tem maior similaridade com o mecanismo de oxirredução que ocorre *in vivo* (MAGALHÃES, SEGUNDO, REIS *et al.*, 2008), esses resultados sugerem o uso do CPL como melhor produto protéico da linhaça com potencial antioxidante na formulação de nutracêuticos e alimentos funcionais. Também é possível inferir que as enzimas digestivas são tão ou mais eficientes que a Alcalase na produção de peptídeos com potencial antioxidante e liberação de compostos fenólicos.

6- Conclusões

No processo de obtenção do hidrolisado protéico com Alcalase a variável pH influi negativamente e a E:S positivamente no GH, o que significa que com valores de pH variando de 7,5 a 9,5 e E:S variando de 1:150 a 1:30, o GH será maior quanto menor o valor de pH e maior a E:S.

Os hidrolisados proteicos apresentaram, em ambos os extratos, maior teor de compostos redutores determinados pelo reagente de Folin-Ciocalteu em relação ao concentrado e à farinha. Folin-Ciocalteu. Os hidrolisados com maior atividade antioxidante, avaliada nos extratos aquoso e metanólico, determinada pelos métodos de FRAP e ORAC, são os obtidos nas condições de pH 8,5/E:S 1:90 e pH 9,2/E:S 1:133 e menores valores de grau de hidrólise.

A farinha e o concentrado protéico apresentaram atividade antioxidante, determinada pelo método de FRAP e ORAC, em ambos os extratos, porém menor que a dos hidrolisados. Isso que mostra que a hidrólise da proteína pela Alcalase potencializa sua atividade antioxidante. A digestão *in vitro* resultou no aumento do teor de substâncias redutoras nos extratos aquoso e metanólico da farinha, concentrado protéico e dos hidrolisados. Após a digestão *in vitro*, o teor destes compostos nos extratos do concentrado foi semelhante nos dos hidrolisados, indicando que o processo digestório foi mais eficaz que a Alcalase para liberação de substâncias antioxidantes.

Dentre todas as amostras digeridas, os hidrolisados apresentaram a maior atividade antioxidante medida por FRAP e o CPL, a maior atividade determinada pelo método de ORAC. Uma vez que a metodologia de determinação da atividade antioxidante por ORAC tem maior proximidade com o mecanismo de oxirredução que ocorre *in vivo*, esses resultados sugerem o uso do CPL como o melhor subproduto protéico da linhaça com potencial antioxidante na formulação de nutracêuticos e alimentos funcionais.

7- Referências Bibliográficas

ADLER-NISSEN, J. The influence of peptide chain length on taste and functional properties of enzymatically modified soy protein. **ACS Symposium Series**, v. 92, p. 125-146, 1979.

ALMEIDA, K. C. L. D.; BOAVENTURA, G. T.; GUZMAN-SILVA, M. A. A linhaça (*Linum usitatissimum*) como fonte de ácido \pm -linolênico na formação da bainha de mielina. **Revista de Nutrição**, v. 22, p. 747-754, 2009.

AOAC. Association of Official Methods Analytical Chemists. **Official Methods of Analysis of the Association Chemistry**, 1997.

ARCAN, I.; YEMENICIOGLU, A. Effects of controlled pepsin hydrolysis on antioxidant potential and fractional changes of chickpea proteins. **Food Research International**, v. 43, n. 1, p. 140-147, 2010.

BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, v. 99, n. 1, p. 191-203, 2006.

BERMÚDEZ-SOTO, M. J.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A.; GARCÍA-CONESA, M. T. Stability of polyphenols in chokeberry (*Aronia melanocarpa*) subjected to in vitro gastric and pancreatic digestion. **Food Chemistry**, v. 102, n. 3, p. 865-874, 2007.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, n. 8, p. 911-917, 1959.

BOUAYED, J.; HOFFMANN, L.; BOHN, T. Total phenolics, flavonoids, anthocyanins and antioxidant activity following simulated gastro-intestinal digestion and dialysis of apple varieties: Bioaccessibility and potential uptake. **Food Chemistry**, v. 128, n. 1, p. 14-21, Sep 2011.

BRADFORD, M. M. A rapide and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-251, 1976.

CANADA, F. C. O. Canada a flax leader. 2010. Disponível em: < <http://flaxcouncil.ca> >. Acesso em: 21 de maio, 2010.

CERIELLO, A.; MOTZ, E. Is Oxidative Stress the Pathogenic Mechanism Underlying Insulin Resistance, Diabetes, and Cardiovascular Disease? The Common Soil Hypothesis Revisited. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 24, n. 5, p. 816-823, May 1 2004.

CHEN, H.-M.; MURAMOTO, K.; YAMAUCHI, F.; NOKIHARA, K. Antioxidant Activity of Designed Peptides Based on the Antioxidative Peptide Isolated from Digests of a Soybean Protein. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, n. 9, p. 2619-2623, 1996.

CHETANA; SUDHA, M. L.; BEGUM, K.; RAMASARMA, P. R. NUTRITIONAL CHARACTERISTICS OF LINSEED/FLAXSEED (*LINUM USITATISSIMUM*) AND ITS

APPLICATION IN MUFFIN MAKING. **Journal of Texture Studies**, v. 41, n. 4, p. 563-578, 2010.

CHUNG, M. W. Y.; LEI, B.; LI-CHAN, E. C. Y. Isolation and structural characterization of the major protein fraction from NorMan flaxseed (*Linum usitatissimum* L.). **Food Chemistry**, v. 90, n. 1-2, p. 271-279, 2005.

CUNNANE, S.; HAMADEH, M.; LIEDE, A.; THOMPSON, L.; WOLEVER, T. et al. Nutritional attributes of traditional flaxseed in healthy young adults. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 61, n. 1, p. 62-68, January 1 1995.

CUNNANE, S. C.; GANGULI, S.; MENARD, C.; LIEDE, A. C.; HAMADEH, M. J. et al. High α -linolenic acid flaxseed (*Linum usitatissimum*): some nutritional properties in humans. **British Journal of Nutrition**, v. 69, p. 443-453, 1993.

DÁVALOS, A.; GÓMEZ-CORDOVÉS, C.; BARTOLOMÉ, B. Extending Applicability of the Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC-Fluorescein) Assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 1, p. 48-54, 2004.

DEMARK-WAHNEFRIED, W.; POLASCIK, T. J.; GEORGE, S. L.; SWITZER, B. R.; MADDEN, J. F. et al. Flaxseed Supplementation (Not Dietary Fat Restriction) Reduces Prostate Cancer Proliferation Rates in Men Presurgery. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v. 17, n. 12, p. 3577-3587, December 2008 2008.

DEV, D. K.; QUENSEL, E. Functional Properties of Linseed Protein Products Containing Different Levels of Mucilage in Selected Food Systems. **Journal of Food Science**, v. 54, n. 1, p. 183-186, 1989.

DIPLOCK, A. T.; CHARULEUX, J.-L.; CROZIER-WILLI, G.; KOK, F. J.; RICE-EVANS, C. et al. Functional food science and defence against reactive oxidative species. **British Journal of Nutrition**, v. 80, n. SupplementS1, p. S77-S112, 1998.

DONG, S.; ZENG, M.; WANG, D.; LIU, Z.; ZHAO, Y. et al. Antioxidant and biochemical properties of protein hydrolysates prepared from Silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*). **Food Chemistry**, v. 107, n. 4, p. 1485-1493, 2008.

DRYÁKOVÁ, A.; PIHLANTO, A.; MARNILA, P.; ČURDA, L.; KORHONEN, H. J. T. Antioxidant properties of whey protein hydrolysates as measured by three methods. **European Food Research and Technology**, v. 230, n. 6, p. 865-874, 2010.

ELIAS, R. J.; KELLERBY, S. S.; DECKER, E. A. Antioxidant Activity of Proteins and Peptides. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 48, n. 5, p. 430 - 441, 2008.

FRANZINI, L.; ARDIGÒ, D.; VALTUEÑA, S.; PELLEGRINI, N.; DEL RIO, D. et al. Food selection based on high total antioxidant capacity improves endothelial function in a low cardiovascular risk population. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. In Press, Corrected Proof, 2010.

GAHLER, S.; OTTO, K.; BÖHM, V. Alterations of Vitamin C, Total Phenolics, and Antioxidant Capacity as Affected by Processing Tomatoes to Different Products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 27, p. 7962-7968, 2003.

GAMEL, T. H.; LINSSEN, J. P.; MESALLAM, A. S.; DAMIR, A. A.; SHEKIB, L. A. Seed treatments affect functional and antinutritional properties of amaranth flours. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 86, n. 7, p. 1095-1102, 2006.

GAO, D.; CAO, Y.; LI, H. Antioxidant activity of peptide fractions derived from cottonseed protein hydrolysate. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 90, n. 11, p. 1855-1860, 2010.

GORINSTEIN, S.; VARGAS, O.; JARAMILLO, N.; SALAS, I.; AYALA, A. et al. The total polyphenols and the antioxidant potentials of some selected cereals and pseudocereals. **European Food Research and Technology**, v. 225, n. 3, p. 321-328, 2007.

HALLIWELL, B.; AESCHBACH, R.; LÖLIGER, J.; ARUOMA, O. I. The characterization of antioxidants. **Food and Chemical Toxicology**, v. 33, n. 7, p. 601-617, 1995.

HERCHI, W.; SAWALHA, S.; ARRÁEZ-ROMÁN, D.; BOUKHCHINA, S.; SEGURA-CARRETERO, A. et al. Determination of phenolic and other polar compounds in flaxseed oil using liquid chromatography coupled with time-of-flight mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 126, n. 1, p. 332-338, 2011.

HERNÁNDEZ-LEDESMA, B.; AMIGO, L.; RECIO, I.; BARTOLOMÉ, B. ACE-Inhibitory and Radical-Scavenging Activity of Peptides Derived from β -Lactoglobulin f(19-25). Interactions with Ascorbic Acid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 9, p. 3392-3397, 2007.

HO, C. H. L.; CACACE, J. E.; MAZZA, G. Extraction of lignans, proteins and carbohydrates from flaxseed meal with pressurized low polarity water. **LWT - Food Science and Technology**, v. 40, n. 9, p. 1637-1647, 2007.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 6, p. 1841-1856, 2005.

HUANG, W.-Y.; MAJUMDER, K.; WU, J. Oxygen radical absorbance capacity of peptides from egg white protein ovotransferrin and their interaction with phytochemicals. **Food Chemistry**, v. 123, n. 3, p. 635-641, 2010.

ISSA, A. Y.; VOLATE, S. R.; WARGOVICH, M. J. The role of phytochemicals in inhibition of cancer and inflammation: New directions and perspectives. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, n. 5, p. 405-419, 2006.

JAMDAR, S. N.; RAJALAKSHMI, V.; PEDNEKAR, M. D.; JUAN, F.; YARDI, V. et al. Influence of degree of hydrolysis on functional properties, antioxidant activity and ACE inhibitory activity of peanut protein hydrolysate. **Food Chemistry**, v. 121, n. 1, p. 178-184, 2010.

JENKINS, D. J.; KENDALL, C. W.; VIDGEN, E.; AGARWAL, S.; RAO, A. V. et al. Health aspects of partially defatted flaxseed, including effects on serum lipids, oxidative

measures, and ex vivo androgen and progestin activity: a controlled crossover trial. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 69, n. 3, p. 395-402, March 1 1999.

JEONG, S.-M.; KIM, S.-Y.; KIM, D.-R.; JO, S.-C.; NAM, K. C. et al. Effect of Heat Treatment on the Antioxidant Activity of Extracts from Citrus Peels. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 11, p. 3389-3393, 2004.

JOHNSON, P.; PEERLKAMP, N.; KAMAL-ELDIN, A.; ANDERSSON, R. E.; ANDERSSON, R. et al. Polymeric fractions containing phenol glucosides in flaxseed. **Food Chemistry**, v. 76, n. 2, p. 207-212, 2002.

KITTS, D. D.; WEILER, K. Bioactive Proteins and Peptides from Food Sources. Applications of Bioprocesses used in Isolation and Recovery. **Current Pharmaceutical Design**, v. 9, n. 16, p. 1309, 2003.

KONG, B.; XIONG, Y. L. Antioxidant Activity of Zein Hydrolysates in a Liposome System and the Possible Mode of Action†. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 16, p. 6059-6068, 2006/08/01 2006.

KORHONEN, H.; PIHLANTO, A. Bioactive peptides: Production and functionality. **International Dairy Journal**, v. 16, n. 9, p. 945-960, 2006.

KRAUSE, J.-P.; SCHULTZ, M.; DUDEK, S. Effect of extraction conditions on composition, surface activity and rheological properties of protein isolates from flaxseed (*Linum usitatissimum* L). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 82, n. 9, p. 970-976, 2002.

KRIS-ETHERTON, P. M.; HECKER, K. D.; BONANOME, A.; COVAL, S. M.; BINKOSKI, A. E. et al. Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. **The American Journal of Medicine**, v. 113, n. 9, Supplement 2, p. 71-88, 2002.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. **Nature**, v. 27, p. 680-685, 1970.

LI, X.-X.; HAN, L.-J.; CHEN, L.-J. In vitro antioxidant activity of protein hydrolysates prepared from corn gluten meal. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 88, n. 9, p. 1660-1666, 2008.

LI, Y.; JIANG, B.; ZHANG, T.; MU, W.; LIU, J. Antioxidant and free radical-scavenging activities of chickpea protein hydrolysate (CPH). **Food Chemistry**, v. 106, n. 2, p. 444-450, 2008.

LIMÓN-PACHECO, J.; GONSEBATT, M. E. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 674, n. 1-2, p. 137-147, 2009.

LIU, R. H. Whole grain phytochemicals and health. **Journal of Cereal Science**, v. 46, n. 3, p. 207-219, 2007.

MADHUJITH, T.; SHAHIDI, F. Antioxidant potential of barley as affected by alkaline hydrolysis and release of insoluble-bound phenolics. **Food Chemistry**, v. 117, n. 4, p. 615-620, 2009.

MAGALHÃES, L. M.; SEGUNDO, M. A.; REIS, S.; LIMA, J. L. F. C. Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. **Analytica Chimica Acta**, v. 613, n. 1, p. 1-19, 2008.

MANDALARI, G.; TOMAINO, A.; RICH, G. T.; LO CURTO, R.; ARCORACI, T. et al. Polyphenol and nutrient release from skin of almonds during simulated human digestion. **Food Chemistry**, v. 122, n. 4, p. 1083-1088, 2010.

MARAMBE, P.; SHAND, P.; WANASUNDARA, J. An In-vitro Investigation of Selected Biological Activities of Hydrolysed Flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) Proteins. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 85, n. 12, p. 1155-1164, 2008.

MARTÍNEZ-CAYUELA, M. Oxygen free radicals and human disease. **Biochimie**, v. 77, n. 3, p. 147-161, 1995.

MARTOS, G.; CONTRERAS, P.; MOLINA, E.; LÓPEZ-FANDIÑO, R. Egg White Ovalbumin Digestion Mimicking Physiological Conditions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 9, p. 5640-5648, 2010.

MEDINA, M. B. Simple and Rapid Method for the Analysis of Phenolic Compounds in Beverages and Grains. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 5, p. 1565-1571, 2011.

MICHIELS, J. A.; KEVERS, C.; PINCEMAIL, J.; DEFRAIGNE, J. O.; DOMMES, J. Extraction conditions can greatly influence antioxidant capacity assays in plant food matrices. **Food Chemistry**, v. 130, n. 4, p. 986-993, 2012.

MIGUEL, M.; ALONSO, M. J.; SALAICES, M.; ALEIXANDRE, A.; LÓPEZ-FANDIÑO, R. Antihypertensive, ACE-inhibitory and vasodilator properties of an egg white hydrolysate: Effect of a simulated intestinal digestion. **Food Chemistry**, v. 104, n. 1, p. 163-168, 2007.

MÖLLER, N.; SCHOLZ-AHRENS, K.; ROOS, N.; SCHREZENMEIR, J. Bioactive peptides and proteins from foods: indication for health effects. **European Journal of Nutrition**, v. 47, n. 4, p. 171-182, 2008.

MORRIS, D. H. **Descrpción y Composición de la Linaza**. Linaza - Una Recopilación sobre sus Efectos em la Salud y Nutrición. CANADA, F. C. O.: 9-21 p. 2007.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 41, n. 5, p. 1523-1542, 2006.

OKARTER, N.; LIU, C.-S.; SORRELLS, M. E.; LIU, R. H. Phytochemical content and antioxidant activity of six diverse varieties of whole wheat. **Food Chemistry**, v. 119, n. 1, p. 249-257, 2010.

OOMAH, B. D. Flaxseed as a functional food source. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 81, n. 9, p. 889-894, 2001.

OOMAH, B. D.; MAZZA, G. Compositional changes during commercial processing of flaxseed. **Industrial Crops and Products**, v. 9, p. 29-37, 1998.

OOMAH, B. D.; MAZZA, G.; CUI, W. Optimization of Protein Extraction from Flaxseed Meal. **Food Research International**, v. 27, p. 355:361, 1994.

ORSINI DELGADO, M. C.; TIRONI, V. A.; AÑÓN, M. C. Antioxidant activity of amaranth protein or their hydrolysates under simulated gastrointestinal digestion. **LWT - Food Science and Technology**, v. 44, n. 8, p. 1752-1760, 2011.

OU, B.; HUANG, D.; HAMPSCH-WOODILL, M.; FLANAGAN, J. A.; DEEMER, E. K. Analysis of Antioxidant Activities of Common Vegetables Employing Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) and Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) Assays: A Comparative Study. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 11, p. 3122-3128, 2002.

OZSOY, N.; YILMAZ, T.; KURT, O.; CAN, A.; YANARDAG, R. In vitro antioxidant activity of *Amaranthus lividus* L. **Food Chemistry**, v. 116, n. 4, p. 867-872, 2009.

PANYAM, D.; KILARA, A. Enhancing the functionality of food proteins by enzymatic modification. **Trends in Food Science & Technology**, v. 7, n. 4, p. 120-125, 1996.

PEÑA-RAMOS, E. A.; XIONG, Y. L.; ARTEAGA, G. E. Fractionation and characterisation for antioxidant activity of hydrolysed whey protein. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 84, n. 14, p. 1908-1918, 2004.

POPOVA, I. E.; HALL, C.; KUBÁTOVÁ, A. Determination of lignans in flaxseed using liquid chromatography with time-of-flight mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 2, p. 217-229, 2009.

PRIOR, R. L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 10, p. 4290-4302, 2005/05/01 2005.

RABETAFIKA, H. N.; VAN REMOORTEL, V.; DANTHINE, S.; PAQUOT, M.; BLECKER, C. Flaxseed proteins: Food uses and health benefits. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 46, n. 2, p. 221-228, 2011.

RAJAPAKSE, N.; MENDIS, E.; BYUN, H.-G.; KIM, S.-K. Purification and in vitro antioxidative effects of giant squid muscle peptides on free radical-mediated oxidative systems. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 16, n. 9, p. 562-569, 2005.

RAMARATHNAM, N.; OSAWA, T.; OCHI, H.; KAWAKISHI, S. The contribution of plant food antioxidants to human health. **Trends in Food Science & Technology**, v. 6, n. 3, p. 75-82, 1995.

ROBBINS, R. J. Phenolic acids in foods: An overview of analytical methodology. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 10, p. 2866-2887, 2003.

ROBERTS, C. K.; SINDHU, K. K. Oxidative stress and metabolic syndrome. **Life Sciences**, v. 84, n. 21-22, p. 705-712, 2009.

ROBLET, C.; AMIOT, J.; LAVIGNE, C.; MARETTE, A.; LESSARD, M. et al. Screening of in vitro bioactivities of a soy protein hydrolysate separated by hollow fiber and spiral-wound ultrafiltration membranes. **Food Research International**, n. 0, 2012.

SAMARANAYAKA, A. G. P.; KITTS, D. D.; LI-CHAN, E. C. Y. Antioxidative and Angiotensin-I-Converting Enzyme Inhibitory Potential of a Pacific Hake (*Merluccius productus*) Fish Protein Hydrolysate Subjected to Simulated Gastrointestinal Digestion and Caco-2 Cell Permeation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 3, p. 1535-1542, 2010.

SANNAVEERAPPA, T.; WESTLUND, S.; SANDBERG, A.-S.; UNDELAND, I. Changes in the Antioxidative Property of Herring (*Clupea harengus*) Press Juice during a Simulated Gastrointestinal Digestion. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 26, p. 10977-10985, 2007.

SAURA-CALIXTO, F.; SERRANO, J.; GOÑI, I. Intake and bioaccessibility of total polyphenols in a whole diet. **Food Chemistry**, v. 101, n. 2, p. 492-501, 2007.

SCHÄGER, H.; JAGOW, G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. **Analytical Biochemistry**, n. 166, p. 368-379, 1987.

SIGER, A.; NOGALA-KALUCKA, M.; LAMPART-SZCZAPA, E. The content and antioxidant activity of phenolic compounds in cold-pressed plant oils. **Journal of Food Lipids**, v. 15, n. 2, p. 137-149, 2008.

SINGH, K. K.; MRIDULA, D.; REHAL, J.; BARNWAL, P. Flaxseed: A Potential Source of Food, Feed and Fiber. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 51, n. 3, p. 210-222, 2011.

SOARES, L. L.; PACHECO, J. T.; BRITO, C. M. D.; TROINA, A. D. A.; BOAVENTURA, G. T. et al. Avaliação dos efeitos da semente de linhaça quando utilizada como fonte de proteína nas fases de crescimento e manutenção em ratos. **Revista de Nutrição**, v. 22, p. 483-491, 2009.

SOLER-RIVAS, C.; RAMÍREZ-ANGUIANO, A. C.; REGLERO, G.; SANTOYO, S. Effect of cooking, in vitro digestion and Caco-2 cells absorption on the radical scavenging activities of edible mushrooms. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 44, n. 11, p. 2189-2197, 2009.

STRUIJS, K.; VINCKEN, J.-P.; VERHOEF, R.; VAN OOSTVEEN-VAN CASTEREN, W. H. M.; VORAGEN, A. G. J. et al. The flavonoid herbacetin diglucoside as a constituent of the lignan macromolecule from flaxseed hulls. **Phytochemistry**, v. 68, n. 8, p. 1227-1235, 2007.

SUN, T.; HO, C.-T. Antioxidant activities of buckwheat extracts. **Food Chemistry**, v. 90, n. 4, p. 743-749, 2005.

TAGLIAZUCCHI, D.; VERZELLONI, E.; BERTOLINI, D.; CONTE, A. In vitro bio-accessibility and antioxidant activity of grape polyphenols. **Food Chemistry**, v. 120, n. 2, p. 599-606, 2010.

TANG, C.-H.; PENG, J.; ZHEN, D.-W.; CHEN, Z. Physicochemical and antioxidant properties of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) protein hydrolysates. **Food Chemistry**, v. 115, n. 2, p. 672-678, 2009.

TARKO, T.; DUDA-CHODAK, A.; TUSZYŃSKI, T. Simulation of Phenolic Compounds Transformations and Interactions in an In Vitro Model of the Human Alimentary Tract. **Food Science and Technology International**, v. 15, n. 3, p. 235-241, June 1, 2009 2009.

TEDESCHI, C.; CLEMENT, V.; ROUVET, M.; VALLES-PAMIES, B. Dissolution tests as a tool for predicting bioaccessibility of nutrients during digestion. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 4, p. 1228-1235, 2009.

THAIPONG, K.; BOONPRAKOB, U.; CROSBY, K.; CISNEROS-ZEVALLOS, L.; HAWKINS BYRNE, D. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, n. 6-7, p. 669-675, 2006.

TIRONI, V. A.; AÑÓN, M. C. Amaranth proteins as a source of antioxidant peptides: Effect of proteolysis. **Food Research International**, v. 43, n. 1, p. 315-322, 2010.

U.S. DEPARTMENT OF AGRICULTURE, A. R. S. Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) of Selected Foods, Release 2. **Nutrient Data Laboratory**, 2010. Disponível em: < <http://www.ars.usda.gov/nutrientdata/orac> >. Acesso em: 1º janeiro de 2012.

UDENIGWE, C. C.; LU, Y.-L.; HAN, C.-H.; HOU, W.-C.; ALUKO, R. E. Flaxseed protein-derived peptide fractions: Antioxidant properties and inhibition of lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in murine macrophages. **Food Chemistry**, v. 116, n. 1, p. 277-284, 2009.

VALKO, M.; RHODES, C. J.; MONCOL, J.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biological Interactions**, v. 160, n. 1, p. 1-40, 2006.

VALTUEÑA, S.; PELLEGRINI, N.; FRANZINI, L.; BIANCHI, M. A.; ARDIGÒ, D. et al. Food selection based on total antioxidant capacity can modify antioxidant intake, systemic inflammation, and liver function without altering markers of oxidative stress. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 87, n. 5, p. 1290-1297, May 1, 2008 2008.

VELIOGLU, Y. S.; MAZZA, G.; GAO, L.; OOMAH, B. D. Antioxidant Activity and Total Phenolics in Selected Fruits, Vegetables, and Grain Products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 10, p. 4113-4117, 1998/10/01 1998.

WANASUNDARA, P.; SHAHIDI, F. Optimization of Hexametaphosphate-Assisted Extraction of Flaxseed Protein Using Response Surface Methodology. **Journal of Food Science**, v. 61, p. 604-607, 1996.

WANASUNDARA, P.; SHAHIDI, F. Flaxseed Proteins. In: (Ed.). **Flaxseed in Human Nutrition, Second Edition**: AOCS Publishing, 2003. ISBN 978-1-893997-38-7.

WHITE, J. A.; HART, R. J.; FRY, J. C. An evaluation of the waters pico-tag system for the amino-acid-analysis of food materials. **Journal of Automatic Chemistry** v. 8, n. 4, p. 170-177, 1986.

WICKENS, A. P. Ageing and the free radical theory. **Respiration Physiology**, v. 128, n. 3, p. 379-391, 2001.

YANG, B.; YANG, H.; LI, J.; LI, Z.; JIANG, Y. Amino acid composition, molecular weight distribution and antioxidant activity of protein hydrolysates of soy sauce lees. **Food Chemistry**, v. 124, n. 2, p. 551-555, 2011.

YOU, L.; ZHAO, M.; CUI, C.; ZHAO, H.; YANG, B. Effect of degree of hydrolysis on the antioxidant activity of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) protein hydrolysates. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 10, n. 2, p. 235-240, 2009.

YOU, L.; ZHAO, M.; REGENSTEIN, J. M.; REN, J. Changes in the antioxidant activity of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) protein hydrolysates during a simulated gastrointestinal digestion. **Food Chemistry**, v. 120, n. 3, p. 810-816, 2010.

ZHANG, Z.-S.; LI, D.; WANG, L.-J.; OZKAN, N.; CHEN, X. D. et al. Optimization of ethanol-water extraction of lignans from flaxseed. **Separation and Purification Technology**, v. 57, n. 1, p. 17-24, 2007.

ZHU, K.; ZHOU, H.; QIAN, H. Antioxidant and free radical-scavenging activities of wheat germ protein hydrolysates (WGPH) prepared with alcalase. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 6, p. 1296-1302, 2006.

ZHU, L.; CHEN, J.; TANG, X.; XIONG, Y. L. Reducing, Radical Scavenging, and Chelation Properties of in Vitro Digests of Alcalase-Treated Zein Hydrolysate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 8, p. 2714-2721, 2008.

ANEXO - DETERMINAÇÃO DO EXTRATO HIDROFÓBICO

Durante os processos de extração da proteína e obtenção do hidrolisado, parte dos compostos fenólicos presentes na linhaça podem ser arrastados junto com a proteína ou liberados devido à ação enzimática da Alcalase durante a obtenção do hidrolisado (WANASUNDARA & SHAHIDI, 2003). Como tanto os peptídeos formados como os compostos fenólicos tem potencial atividade antioxidante, julgamos importante avaliar tanto os compostos hidrofílicos como os hidrofóbicos. Para definição dos solventes a serem utilizados para avaliação da atividade antioxidante, foi realizado um experimento preliminar para definição dos solventes a serem utilizados para avaliação da atividade antioxidante. Para isto foram avaliados extratos aquoso, etanólicos e metanólicos em diferentes concentrações.

Para obtenção do extrato aquoso, a FLMD foi suspensa em água deionizada a 1% (m/v), agitadas em agitador magnético por 30 min, centrifugadas a $35.735 \times g$ por 30 min, a 10°C em centrífuga modelo RC5C (Sorvall Instruments Dupont, Wilmington, EUA) e filtradas em filtro de papel comum. O volume final foi completado para o volume inicial (10 mL) com água deionizada e foram armazenados a -20°C até sua utilização.

Foram feitas soluções etanólicas e metanólicas nas concentrações de 70, 85 e 100% para obtenção dos diferentes extratos alcoólicos. A FLMD foi dispersa em solução alcoólica, colocadas em erlenmeyer, agitadas em banho termostático Dubinoff (Marconi, Piracicaba, Brasil) a 60°C por 60 min. Os extratos foram centrifugados a $35.735 \times g$ por 30 min a 10°C em centrífuga modelo RC5C (Sorvall Instruments Dupont, Wilmington, EUA) e filtrados em papel de filtro comum. O volume final foi completado para o volume inicial (10 mL) com solução alcoólica e foram armazenados a -20°C até sua utilização.

O teor de substâncias redutoras foi determinado utilizando-se o reagente de Folin-Ciocalteu, conforme descrito por Medina *et al.*, (2011). Para a determinação, 450 μL de água foram misturados a 50 μL de amostra ou padrão, seguidos da adição de 50 μL do reagente de Folin-Ciocalteu. A mistura foi agitada em vórtex e deixada em repouso por 5 min. Em seguida foi adicionado 500 μL de 7,5% Na_2CO_3 e 200 μL de água. A mistura foi novamente agitada em vórtex e deixada em repouso por 90 min. A absorbância foi lida em

765 nm, em leitor de microplaca Synergy™ HT Multi-Mode Microplate Reader. As determinações foram feitas em três repetições em triplicatas.

Para a determinação da concentração de substâncias redutoras nas amostras foi construída uma curva padrão de ácido gálico, nas concentrações de 50 a 600 µg/mL. O teor de substâncias redutoras foi expresso em mg de equivalentes de ácido gálico EAG/g de amostra.

O teor de proteína foi determinado por Bradford (1976). Uma solução de 500mL do reagente de Bradford foi preparado dissolvendo-se 50 mg de Comassie Blue G250 em 50 mL de solução etanólica 95%, seguido da adição de 50 mL de ácido fosfórico 85% e água deionizada para completar o volume. O reagente foi filtrado em filtro de papel comum. Para a análise, 5 mL de reagente de Bradford foi misturado a 0,1 mL de extrato, a mistura agitada em vórtex e após 5 minutos foi feita leitura de absorbância a 595 nm em Espectrofotômetro UV-Vis (DU – 70 Beckman, Fullerton, CA, EUA).

Foi construída uma curva de calibração com albumina de soro bovino (Sigma Aldrich, St Louis, EUA) com 20 a 100 µg/mL. As determinações foram feitas em triplicata.

Os resultados da extração de compostos fenólicos e teor de proteína por Bradford (1976) dos extratos hidrofóbicos em diferentes concentrações e da água estão apresentados na Tabela 16.

Tabela 16. Teor de proteína por Bradford e teor de substâncias redutoras da FLMD em diferentes extratos

Extratos	Média de proteína no extrato (mg/mL)*	EAG/ g de FLMD (mg)*
Metanólico 70%	0,25 ± 0,1 ^{a,b}	0,99 ± 0,1 ^b
Metanólico 85%	0,25 ± 0,1 ^{a,b}	0,99 ± 0,2 ^b
Metanólico 100 %	0,22 ± 0,0 ^a	0,66 ± 0,0 ^a
Aquoso	22,76 ± 0,3 ^c	3,21 ± 0,4 ^c
Etanólico 70%	0,28 ± 0,1 ^b	0,69 ± 0,1 ^a
Etanólico 85%	0,24 ± 0,0 ^{a,b}	0,70 ± 0,0 ^a
Etanólico 100%	0,25 ± 0,1 ^{a,b}	0,62 ± 0,1 ^a

*Teste estatístico paramétrico Anova, *post hoc* Tukey, $p < 0,05$. Extratos com mesma letra, na mesma coluna, não diferem entre si.

FLMD: Farinha de linhaça marrom desengordurada

EAG: Equivalentes de Ácido Gálico.

Os solventes hidrofóbicos escolhidos para teste foram o etanol e o metanol, considerando os estudos com as lignanas, principais compostos fenólicos da linhaça. Elas foram extraídas em diferentes solventes como etanol (ZHANG, LI, WANG *et al.*, 2007), metanol (POPOVA, HALL & KUBÁTOVÁ, 2009; HERCHI, SAWALHA, ARRÁEZ-ROMÁN *et al.*, 2011) ou combinação de solventes, como 1,4-dioxano/etanol (JOHNSSON, PEERLKAMP, KAMAL-ELDIN *et al.*, 2002). Como solvente hidrofílico foi escolhido a água.

Tendo em vista que o extrato alcoólico é utilizado para análise dos compostos fenólicos (MICHIELS, KEVERS, PINCEMAIL *et al.*, 2012), o melhor solvente é aquele que apresentar, ao mesmo tempo, o maior teor de substâncias redutoras e o menor teor de proteínas. A menor concentração de proteínas foi encontrada no metanólico 100%, mas a maior quantidade de substâncias redutoras está nos extratos metanólico 70 e 85%. Os extratos etanólicos foram descartados, pois apesar de apresentarem teor de proteína semelhante aos dos extratos metanólicos, indicando que a extração de substâncias redutoras, principalmente compostos fenólicos foi menos eficiente. Dessa forma, o solvente escolhido para as análises de capacidade redutora e atividade antioxidante foi o metanólico 70%. De acordo com Gorinstein *et al.*, (2007) o uso de um solvente mais polar como o metanol pode melhorar a extração de compostos fenólicos e permitir uma avaliação mais fidedigna do potencial antioxidante.

O extrato aquoso apresentou teor de proteínas maior que os extratos alcoólicos, evidenciando a maior afinidade da proteína por solventes de caráter hidrofílico. Isso possivelmente justifica o elevado teor de substâncias redutoras nesse extrato quando comparado aos demais, uma vez que os aminoácidos aromáticos também são capazes de reduzir o reagente Folin-Ciocalteu (MEDINA, 2011).