



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

Anne Suellen Oliveira Pinto

**INTERFERÊNCIA DE NUTRIENTES SOBRE A CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DE
BEBIDA RICA EM COMPOSTOS FENÓLICOS**

Belém-PA

2009



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Anne Suellen Oliveira Pinto

**INTERFERÊNCIA DE NUTRIENTES SOBRE A CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DE
BEBIDA RICA EM COMPOSTOS FENÓLICOS**

Trabalho de Dissertação de Mestrado
apresentado ao Programa de Pós-graduação
em Ciência e Tecnologia de Alimentos da
Universidade Federal do Pará.

Orientador: Dr. Evaldo Silva
Co-Orientador: Prof. Dr. Hervé Rogez

Belém/PA
2009

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

Anne Suellen Oliveira Pinto

**INTERFERÊNCIA DE NUTRIENTES SOBRE A CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DE
BEBIDA RICA EM COMPOSTOS FENÓLICOS**

Banca Examinadora:

Dr. Evaldo Martins da Silva

Orientador

Prof. Dr. Hervé Rogez

Co-orientador

Prof. Dr. Jesus Nazareno Silva de Souza

Membro

Prof. Dr. Milton Nascimento da Silva

Membro

Data de Avaliação:

Dedico esta dissertação aos meus pais Raimundo Adonias Bentes Pinto e Adalzira Ribeiro de Oliveira que são meus exemplos de vida, fonte de inspiração, apoio e ensino diário. Dedico também aos meus amados Irmãos, Tias, primas e ao Roberto Freire, por sempre me estimularem a dar este grande passo.

Agradecimentos

Agradeço primeiro a Deus por realizar tantas obras em minha vida.

Aos meus Pais sou eternamente grata pelos conselhos, apoio, exemplo e carinho. Aos meus irmãos Alinne, Anderson, Márcio e Marcellly e as minhas tias e primas, obrigada por estarem sempre ao meu lado. Ao meu namorado Roberto Freire pelo amor e apoio a mim dedicado.

Aos meus orientadores EVALDO e HERVÉ muito obrigada por tudo que me ensinaram ao longo destes anos de convivência e posso dizer que o que aprendi foi além do profissionalismo, pois conviver com vocês é um ensinamento também para a vida pessoal, pois vocês são maravilhosos profissionais e amigos.

Aos Professores: Dr Milton Nascimento da Silva e Dr. Jesus Souza pelas sugestões por ocasião da Qualificação e, novamente, por aceitar integrar a atual banca e colaborar com esta dissertação.

Ao pessoal da USINA de alimentos pelo companheirismo, em especial, á Socorro, Antônio, Ivonete, Fagner, Braz, Carol, Stephano, Jonas, Marília, Rogério, Priscila e Tatiana.

Ás minhas amigas Camila Bastos, Evelyn Damasceno, Lorena Maciel, Thaís Franco e ao amigo Fábio Moura, muito obrigada pelo carinho e companheirismo de vocês durante estes anos.

Á CAPES pelo apoio financeiro e aos docentes do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos por contribuírem para minha capacitação profissional.

RESUMO

A preocupação em adotar medidas que previnam a oxidação em alimentos e no organismo humano tem intensificado o interesse nas propriedades antioxidantes de compostos naturais, como os compostos fenólicos (CFs) dos vegetais. Um dos problemas encontrados para avaliar a real contribuição destas substâncias na medida da capacidade antioxidante é a interferência de alguns nutrientes (proteínas, aminoácidos, açúcares, etc.) nesta medida. Estes podem apresentar tanto capacidade antioxidante em alguns métodos analíticos quanto interagir com os CFs. Neste estudo, testou-se, então, a capacidade antioxidante TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity) e FC (Folin Ciocalteu) de alguns nutrientes isoladamente (triptofano, tirosina, fenilalanina, metionina, glicose e frutose) e a combinação de misturas destes com uma mistura de padrões de CFs (ácido gálico, ácido ferrúlico, catequina e rutina), ou com a bebida chá verde. Dois grupos de planos experimentais foram delineados, sendo um por planejamento de mistura (simplex centróide) dos aminoácidos, e posteriormente estes diluídos em solução padrão de CFs, e outro por planejamento fatorial fracionário (Box-Behnken), com a combinação de níveis de todos os fatores (aminoácidos, açúcares e padrões de CFs ou chá verde). Os resultados TEAC e FC mostram que, entre os nutrientes analisados isoladamente, apenas o triptofano e tirosina apresentaram atividade em ambos os métodos. A frutose apresentou atividade apenas no método de FC, sendo esta muito menor que a dos aminoácidos. No plano de mistura dos aminoácidos, o triptofano e a tirosina apresentaram efeito significativo na atividade antioxidante, sendo efeito quadrático para o TEAC e linear para o FC. Quando as misturas dos aminoácidos eram diluídas na mistura de CFs, o triptofano e a tirosina influenciaram significativamente no método TEAC; já no método FC, os quatro aminoácidos apresentaram efeito linear estatisticamente significativo. No planejamento fatorial fracionário, os aminoácidos e os CFs (tanto padrões quanto chá verde) impactaram na capacidade antioxidante ($p < 0,001$), enquanto o açúcar apresentou efeito pouco expressivo. Analisando o efeito de mascaramento da capacidade antioxidante, tanto no planejamento fatorial quanto no de mistura, o método FC mascarou menos que o TEAC, sendo o mascaramento no método FC positivo, e negativo no TEAC.

ABSTRACT

The concern to adopt measures to prevent the oxidation in food and in the human body has intensified the interest in the antioxidant properties of natural compounds, such as phenolic compounds (CFs) of plants. One of the problems found in assessing the real contribution of these substances in the measurement of the antioxidant capacity is the interference of some nutrients (proteins, amino acids, sugars etc.) in this measure. These may have both antioxidant capacities in some analytical methods as interact with the CFs. Thus, in this study, it was tested the TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity) and FC (Folin Ciocalteu) antioxidant capacities of some nutrients (tryptophan, tyrosine, phenylalanine, methionine, glucose and fructose) alone, and the combination of mixtures thereof with a mixture of standards of CFs (gallic acid, Ferrulic acid, catechin and rutin), or with the beverage green tea. Two groups of experimental plans were outlined, one by mixture design (simplex centroid) of amino acids and then diluted in the standard solution of CFs, and another by fractional factorial design (Box-Behnken), with the combination of all levels of the factors (amino acids, sugars and standards of CFs or green tea). The TEAC and FC results show that among the nutrients analyzed separately, only the tryptophan and tyrosine showed activity in both methods. The fructose showed activity only in the FC method, which is much lower than that of amino acids. In the mixture of the amino acids, tryptophan and tyrosine showed a significant effect on antioxidant activity, with a quadratic effect for the TEAC and linear for the FC. When mixtures of amino acids were diluted in the mixture of CFs, the tryptophan and tyrosine significantly influence the TEAC method, while in the FC method, the four amino acids showed statistically significant linear effect. In the fractional factorial design, the amino acids and the phenolic compounds (both standard and green tea) influenced on antioxidant capacity ($p < 0.001$), while the sugar had little significant effect. Analyzing the masking effect on the antioxidant capacity in the factorial design and in the mixture one, the FC method suffered less masking than TEAC, being the masking positive in FC method, and negative in TEAC.

SIGLAS

CF	Composto fenólico
CFs	Compostos fenólicos
EAG	Equivalente ácido gálico
EC	Epicatequina
ECG	Epicatequina galato
EGC	Epigallocatequina
EGCG	Epigallocatequina galato
EROS	Espécies reativas oxigenadas
ET	Equivalente trolox
FC	Folin-Ciocalteu
FRAP	Ferric reducing antioxidant power
TEAC	Trolox equivalent antioxidant capacity
TOSC	Total oxidant scavenging capacity
TRAP	Total radical-trapping antioxidant parameter
UFPA	Universidade Federal do Pará

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1	COMPOSTOS FENÓLICOS	17
2.1.1	Considerações gerais	17
2.1.2	Estrutura e classificação	17
2.1.2.1	<i>Flavonóides</i>	18
2.1.2.2	<i>Ácidos fenólicos</i>	20
2.2	RADICAIS LIVRES	21
2.3	ANTIOXIDANTES	21
2.3.1	Aspectos gerais	21
2.3.2	Métodos para avaliar a capacidade antioxidante	22
2.3.2.1	<i>Método TEAC</i>	24
2.3.2.2	<i>Método de Folin-Ciocalteu</i>	26
2.4	INTERAÇÕES E INTERFERENTES NA MEDIDA DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE	27
2.4.1	Interações antioxidantes	27
2.4.2	Interferentes	28
2.4.2.1	<i>Açúcares e aminoácidos</i>	28
2.5	BEBIDAS RICAS EM POLIFENÓIS: O Chá Verde.....	34
3	MATERIAL E MÉTODOS	37
3.1	REAGENTES.....	37
3.2	CÁLCULO DAS CONCENTRAÇÕES DE INTERFERENTES E PREPARO DAS SOLUÇÕES PARA A AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE	37
3.2.1	Cálculo para concentração dos aminoácidos nas bebidas	37
3.2.2	Preparo da solução de aminoácidos e açúcares para a avaliação da atividade antioxidante.....	38
3.2.3	Preparação das misturas de padrões de compostos fenólicos	39
3.2.4	Preparação do chá verde.....	40
3.2.5	Atividades antioxidantes dos aminoácidos por plano de mistura	40
3.2.6	Atividade antioxidante dos aminoácidos por plano de mistura em presença de compostos fenólicos	41
3.2.7	Análise das atividades antioxidantes de misturas de aminoácidos, açúcares e compostos fenólicos	42
3.2.8	Análise das atividades antioxidantes de misturas de aminoácidos, açúcares e chá verde.....	43
3.3	EFEITO DO MASCARAMENTO	44
3.4	MEDIDA TEAC	44

3.5	MÉTODO DE FOLIN-CIOCALTEU	46
3.6	TRATAMENTO ESTATÍSTICO E MATEMÁTICO.....	47
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
4.1	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS AMINOÁCIDOS E AÇÚCARES ..	48
4.2	ATIVIDADES ANTIOXIDANTES DOS AMINOÁCIDOS POR PLANO DE MISTURA	52
4.3	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS AMINOÁCIDOS POR PLANO DE MISTURA EM PRESENÇA DE COMPOSTOS FENÓLICOS	56
4.3.1	Capacidade antioxidante do plano de mistura	56
4.3.2	Efeito do mascaramento	62
4.4	ANÁLISE DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTES DE MISTURAS DE AMINOÁCIDOS, AÇÚCARES E PADRÕES DE CFs.....	66
4.4.1	Capacidade antioxidante do plano fatorial fracionário com padrões de compostos fenólicos.....	66
4.4.2	Efeito do mascaramento	70
4.5	ANÁLISE DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTES DE MISTURAS DE AMINOÁCIDOS, AÇÚCARES E CHÁ VERDE.....	73
4.5.1	Capacidade antioxidante do plano fatorial fracionário com chá verde	73
4.5.2	Efeito do mascaramento	77
5	CONCLUSÃO	81
	BIBLIOGRAFIA	83

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura geral dos flavonóides.....	18
Figura 2. Principais classes de flavonóides.....	19
Figura 3. Reação de formação do radical ABTS ^{•+} e deste com o antioxidante trolox. (fonte. Arts <i>et al.</i> (2004)).....	25
Figura 4. Estrutura da prolina e seu anel pirolidina em destaque e estrutura do epigalocatequina galato e sua face hidrofóbica em destaque.....	31
Figura 5. Modelo para explicar a interação de proteínas- compostos fenólicos. compostos fenólicos são representados como tendo dois extremos que podem se ligar a proteínas (molécula fenólica). proteínas são representadas como tendo um número fixo de sítios vincutivo aos compostos fenólicos. fonte: Siebert; Troukhanova, Lynn (1996).....	32
Figura 6. possíveis mecanismos (I e II) envolvidos na inibição da agregação de taninos e proteínas por carboidratos. P-proteína, T-taninos,C- carboidrato.....	33
Figura 7. Estrutura dos principais flavan-3-óis do chá verde (<i>camelia sinensis</i>). fonte: Almajano, <i>et al</i> (2008).....	35
Figura 8. Evolução da porcentagem de inibição com tempo (s) e representação gráfica do cálculo de AUC.....	46
Figura 9. Evolução da atividade antioxidante da frutose pelo método de folin-ciocalteu em função de sua concentração.....	48
Figura 10. Evolução das atividades antioxidantes do triptofano pelos métodos de FC e TEAC em função de sua concentração.....	49
Figura 11. Evolução das atividades antioxidantes da tirosina pelos métodos de FC e TEAC em função de sua concentração.....	49
Figura 12. Estrutura da glicose (a) e frutose (b).....	50
Figura 13. Estrutura dos aminoácidos a)triptofano b) fenilalanina c) tirosina.....	51
Figura 14. Análise de resíduos para o modelo quadrático ajustado aos valores de TEAC.....	54
Figura 15. Rreação da quercetina com grupo (s) de aminoácidos de proteína (s) após a formação de quinona.....	61
Figura 16. Gráfico de pareto para os coeficientes de regressão do plano fatorial fracionário dos aminoácidos, açúcares e mistura de padrões de CFs sobre a resposta TEAC. (a linha vermelha delimita o nível de significância).....	69

Figura 17. Gráfico de pareto para os coeficientes de regressão do plano fatorial fracionário dos aminoácidos, açúcares e CF-chá verde sobre a resposta TEAC.....76

Figura 18. Gráfico de pareto para os coeficientes de regressão do plano fatorial fracionário dos aminoácidos, açúcares e CF-chá verde sobre a resposta FC.....77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Recomendações de ingestão diária de aminoácidos.	38
Tabela 2. Concentração dos interferentes nas bebidas.	39
Tabela 3. Plano de misturas simplex centróide aumentado de pontos para os aminoácidos com concentração total de 15,38 mM	41
Tabela 4. Planejamento fatorial fracionário do tipo Box-Behnken.	42
Tabela 5. Concentração real (mM) das variáveis do planejamento fatorial fracionário.	42
Tabela 6. Valores de TEAC e FC do plano de mistura dos aminoácidos.	52
Tabela 7. Anova dos modelos ajustado aos valores de TEAC e FC do plano de mistura dos aminoácidos.	53
Tabela 8. Anova para o modelo quadrático ajustado aos valores de TEAC e modelo linear ajustado aos valores de FC do plano de mistura dos aminoácidos.	53
Tabela 9. Coeficientes de regressão do plano de mistura dos aminoácidos sobre o valor de TEAC e FC.	55
Tabela 10. Valores de FC e TEAC para o plano de mistura dos ensaios de aminoácidos diluídos em mistura de padrões de cfs (catequina, ácido gálico, ácido ferrúlico e rutina)	57
Tabela 11. Anova para o modelo linear ajustado aos valores de TEAC e FC do plano de mistura dos aminoácidos diluídos na mistura de padrões de compostos fenólicos.	58
Tabela 12. Coeficientes de regressão do plano de mistura dos aminoácidos diluídos na mistura de padrões de compostos fenólicos sobre o valor de TEAC e FC.	59
Tabela 13. Resultados do mascaramento da capacidade antioxidante no TEAC e FC	63
Tabela 14. Valores de TEAC e FC para a análise do plano fatorial fracionário de aminoácidos, açúcares e padrões de CFs.	66
Tabela 15. Anova para os valores de TEAC e FC do plano fatorial fracionário dos aminoácidos, açúcares e padrões de CFS	67
Tabela 16. Efeitos e coeficientes de regressão para os valores de TEAC e FC do plano fatorial fracionário dos aminoácidos, açúcares e padrões de CF.	68
Tabela 17. Capacidade antioxidante das variáveis do planejamento fatorial, tomados isoladamente, avaliados para os métodos FC e TEAC.	70

Tabela 18. Efeito do mascaramento na atividade antioxidante do plano fatorial fracionário dos aminoácidos, açúcares e padrões de CFs.	71
Tabela 19. Valores de TEAC e FC para a análise do plano fatorial fracionário de aminoácidos, açúcares e adicionados de chá verde.	73
Tabela 20. Anova para os valores de TEAC e FC do plano fatorial fracionário dos aminoácidos, açúcares e adicionados de chá verde.	74
Tabela 21. Efeitos e coeficientes de regressão para os valores de teac e FC do plano fatorial fracionário dos aminoácidos, chá verde e açúcares.	75
Tabela 22. Capacidade antioxidante das variáveis do planejamento fatorial, tomados isoladamente, avaliados para os métodos FC e TEAC.	78
Tabela 23. Efeito do mascaramento na atividade antioxidante do plano fatorial fracionário dos aminoácidos, açúcares e CF-chá.	79

1 INTRODUÇÃO

O interesse por antioxidantes tem se intensificado nos últimos anos devido ao papel benéfico que essas substâncias podem exercer sobre a saúde humana e a qualidade dos alimentos. Assim, os antioxidantes têm sido muito pesquisados como uma medida para limitar o fenômeno de oxidação ocorrido em produtos alimentares e em sistema biológico em virtude da presença de radicais livres.

Muitas plantas são excelentes fontes de antioxidantes, no reino vegetal um dos mais numerosos e amplamente grupos de substâncias antioxidantes distribuídos são os compostos fenólicos. Dentre esses, os flavonóides apresentam maior potencial antioxidante quando comparado com as vitaminas C e E (SULTANA; ANWAR, 2008). Com isso, o consumo de bebidas ricas em compostos fenólicos vem aumentando, a exemplo do chá verde.

A determinação da capacidade antioxidante tornou-se um parâmetro essencial tanto para a ciência e tecnologia dos alimentos como para a nutrição. Por isso, existe atualmente uma necessidade de desenvolver uma metodologia padronizada para medir a capacidade antioxidante total dos alimentos vegetais (Perez-Jimenez *et al*, 2008).

A discussão acerca de diferentes metodologias provém de respostas diferentes com relação à atividade antioxidante de um composto puro ou de uma mistura complexa. Além do método utilizado, a resposta da capacidade antioxidante pode sofrer influência de interações que podem ocorrer entre os compostos fenólicos e outros constituintes dos alimentos (PEREZ, 2000).

Atualmente, é possível encontrar na literatura vários estudos que tentam esclarecer o comportamento antioxidante de alguns compostos individualmente. Porém, muito pouco é conhecido sobre os resultados da interação deles nas propriedades antioxidantes e, como consequência, na estabilidade dos alimentos (PINELO *et al.*, 2004). Sabe-se que os compostos antioxidantes podem apresentar comportamento sinérgico dependendo da

sua concentração e da metodologia aplicada para avaliar a atividade antioxidante (HEO *et al.*, 2007).

Além das interações entre os antioxidantes, a presença de certos nutrientes como proteínas, aminoácidos e carboidratos podem interagir com os antioxidantes modificando o valor da medida. Portanto, é importante conhecer o efeito de cada um destes nutrientes na capacidade antioxidante.

Assim, embora existam trabalhos que demonstram interações positivas e negativas dos compostos fenólicos sobre a atividade de antioxidantes, as propriedades destes em combinações com nutrientes ainda não é bem elucidada e estudos mais detalhados são necessários para de fato determinar a influência destes na atividade antioxidante (IACOPIN *et al.*, 2008).

Dessa forma, este trabalho tem como objetivo geral avaliar a capacidade antioxidante de alguns constituintes dos alimentos (açúcar, aminoácidos) e os efeitos resultantes de interações entre estes e padrões de compostos fenólicos ou chá verde na capacidade antioxidante, através de dois métodos analíticos (TEAC e FC). Como objetivos específicos, temos: determinar qual nutriente apresenta maior efeito sobre a capacidade antioxidante, verificar se a interação tem influência sobre o valor da atividade e se esta resulta em diminuição ou aumento; avaliar qual interação tem maior impacto sobre a capacidade antioxidante.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 COMPOSTOS FENÓLICOS

2.1.1 Considerações gerais

Os compostos fenólicos constituem o maior e mais distribuído grupo de metabólitos secundários do reino vegetal. Geralmente estão envolvidos na defesa contra a radiação ultravioleta, agressão por patógenos e ação sob o estresse oxidativo causado por espécies reativas do oxigênio (ERO) (HEO *et al*, 2007). Apresentam em sua estrutura pelo menos um anel benzênico com uma ou mais hidroxilas e, em geral, possuem propriedade antioxidante (MELLO; GUERRA, 2002).

Estudos mostram que eles apresentam um papel importante na prevenção de doenças crônicas degenerativas como câncer e doenças cardiovasculares. Este efeito benéfico está relacionado a quantidade consumida e a sua biodisponibilidade. As principais classes de compostos fenólicos são definidas de acordo com a natureza do seu esqueleto de carbono (SCALBERT; WILLIAMSON, 2000).

Em termos quantitativos, os principais antioxidantes dietéticos são os compostos fenólicos, seguido de vitaminas e de carotenóides, sendo suas respectivas ingestões diárias de cerca de 1 g, 110 mg, e 9,4 mg (SAURACALIXTO; GOÑI, 2006).

2.1.2 Estrutura e classificação

Os compostos fenólicos apresentam uma enorme diversidade de estruturas, tanto no nível dos esqueletos de carbono quanto dos grupos funcionais, que lhes são associados (SCALBERT; WILLIAMSON, 2000; SILVA 2006). Assim, podem ser classificados em diferentes classes, em função do número de anéis fenólicos na sua estrutura. Entre estes, temos: os ácidos hidroxibenzoicos, ácidos hidroxicinâmicos, estilbenos, flavonóides (flavonóis, flavanóis, antocianinas, proantocianidinas, etc.), etc. (ROBARDS, 1999).

A estrutura química dos compostos fenólicos irá afetar as suas propriedades biológicas tais como: biodisponibilidade, atividade antioxidante, interações com receptores celulares específicos e enzimas, entre outras propriedades (SCALBERT; WILLIAMSON, 2000).

2.1.2.1 Flavonóides

Os flavonóides são amplamente distribuídos no reino vegetal. A estrutura de base dos flavonóides é um difenilpropano (C₆-C₃-C₆), que consiste em dois anéis benzênicos, A e B e um anel C com um átomo de oxigênio substituindo o carbono, como se pode visualizar na Figura 1 (RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1997; MANACH *et al*, 2004).

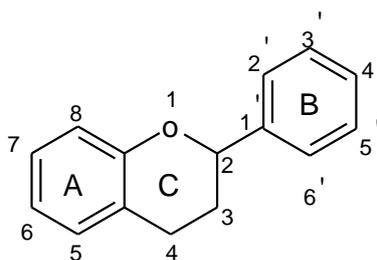


Figura 1. Estrutura geral dos flavonóides.

Os flavonóides são divididos em classes de acordo com o nível de oxidação do anel C. As principais classes dos flavonóides podem ser visualizadas na Figura 2. As mais importantes, em função de sua distribuição e ocorrência, são as antocianinas, os flavonóis, os flavanóis e as flavonas (ROBARDS *et al*, 1999; MANACH *et al*, 2004).

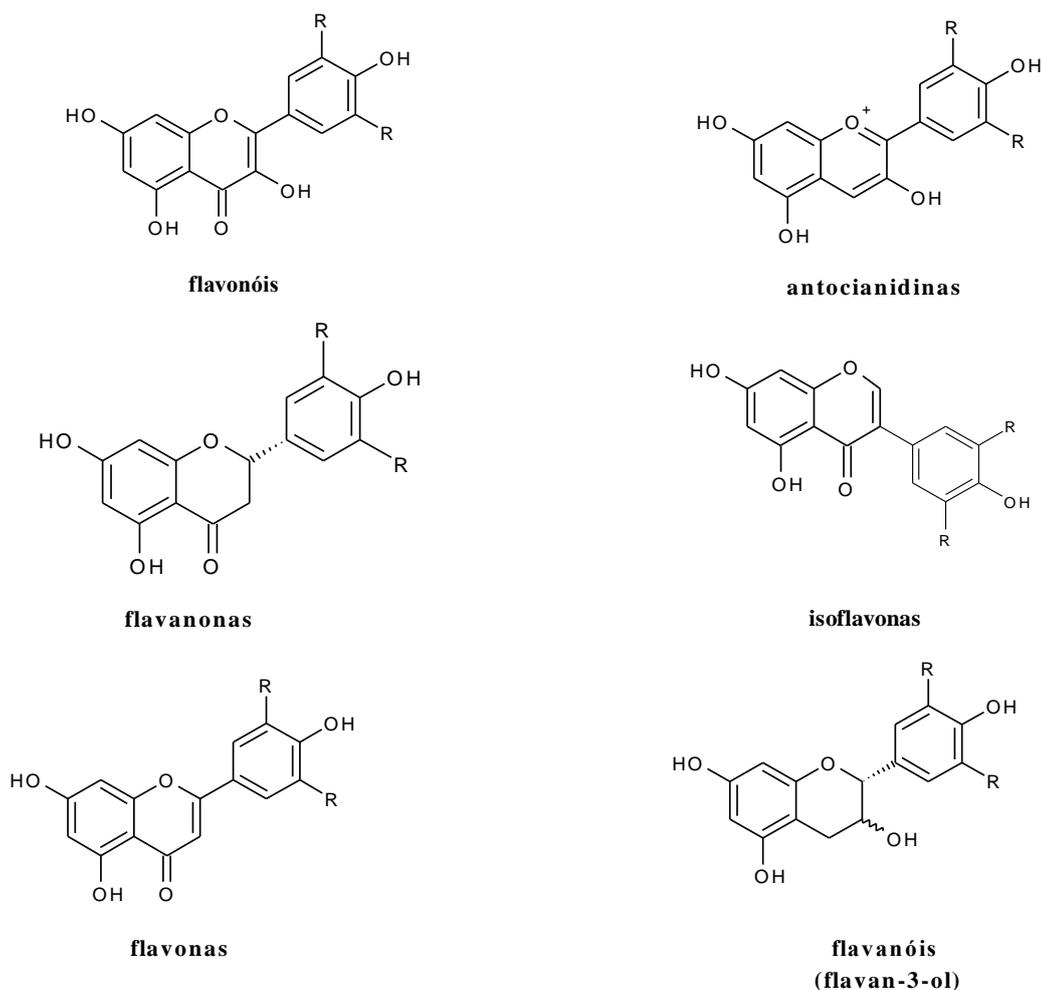


Figura 2. Principais classes de flavonóides.

Os flavonóides estão presentes em um grande número de alimentos de origem vegetal tais como legumes, frutas frescas, cereais, além de bebidas como vinho, cerveja e chá verde (MANACH *et al*, 2004).

Os flavonóis mais comuns são o campferol, a quercetina e a miricetina. A quercetina é o principal flavonol da dieta humana. Dentre as flavonas, a apigenina e a luteolina são as mais freqüentemente encontradas nos frutos (maça e morango) e vegetais (brócolis) (MELLO; GUERRA, 2002).

A classe dos flavanóis possui importantes componentes, sendo os mais abundantes as catequinas e as epicatequinas. Quando polimerizam são conhecidas como proantocianidinas ou taninos condensados. A catequina é abundante em folhas de vegetais, vinho tinto, chocolate, maçã e chá verde (SCALBERT; WILLIAMSON, 2000; MANACH *et al*, 2004;).

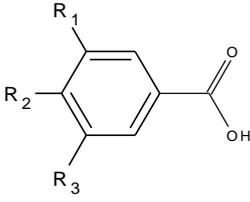
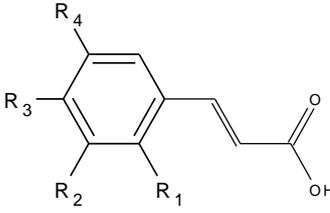
2.1.2.2 Ácidos fenólicos

Duas classes de ácidos fenólicos podem ser distinguidas: os derivados do ácido hidroxibenzóico e derivados do ácido hidroxicinâmico.

Os ácidos hidroxibenzóicos apresentam uma estrutura C₆-C₁ (Quadro 1). São amplamente distribuídos na natureza, no entanto, seu teor em plantas comestíveis é geralmente muito baixo, com a exceção de determinadas frutas vermelhas e cebolas (SCALBERT; WILLIAMSON, 2000).

Os ácidos hidroxicinâmicos apresentam estrutura química C₆-C₃ (Quadro 1). São mais comuns do que os ácidos benzóicos e consistem principalmente de ácido caféico e ferrúlico. Os ácidos hidroxicinâmicos são encontrados em todas as partes do fruto, embora a parte externa dos frutos apresente maior concentração, sendo que geralmente diminuem durante o amadurecimento (SCALBERT; WILLIAMSON, 2000; PENNINGTON, 2002).

Quadro 1. Estrutura e principais exemplos dos ácidos fenólicos.

ESTRUTURA	EXEMPLOS
<p><i>Estrutura de base dos ácidos hidroxibenzóicos</i></p> 	<p>Ácido gálico R₁= R₂= R₃=OH</p> <p>Ácido Vanílico R₁= H, R₂= OH, R₃= OCH₃</p>
<p><i>Estrutura de base dos ácidos hidroxicinâmicos</i></p> 	<p>Ácido caféico R₁= R₄=H, R₂=R₃=OH</p> <p>Ácido ferrúlico R₁=R₂=H, R₃=OH, R₄= OCH₃</p> <p>Ácido <i>p</i>-cumárico R₁=R₂=R₄=H, R₃=OH</p>

Fonte: PENNINGTON, 2002; RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1997

2.2 RADICAIS LIVRES

Radicais livres são quaisquer espécies químicas capazes de existir independentemente e que contêm um ou mais elétrons desemparelhados, o que os torna altamente reativos (JADHAVI *et al*, 1995).

Nos alimentos os radicais livres podem ser formados durante o processamento e/ou estocagem, a exemplo da oxidação dos lipídeos (*autoxidação*).

A maioria das degradações radicalares em alimentos e *in vivo* é iniciada por espécies químicas denominadas espécies reativas oxigenadas (EROS), em inglês *Reactive Oxygen Species* ou ROS. Estas são responsáveis pela maioria das degradações radicalares. O termo EROS denomina o conjunto de espécies reduzidas formadas a partir do oxigênio molecular (O_2) como o radical superóxido (O_2^{\bullet}), hidroxila (OH^{\bullet}), alcoxila (RO^{\bullet}) e peroxila (RO_2^{\bullet}), além de espécies não radicalares derivadas do oxigênio, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o oxigênio singleto (1O_2), o ácido hipocloroso (HOCl) e o ozônio (ROBARDS *et al*, 1999; PINCEMAIL *et al*, 2002).

2.3 ANTIOXIDANTES

2.3.1 Aspectos gerais

Por definição, antioxidante é “qualquer substância que, quando presente em baixa concentração comparada à do substrato oxidável, retarda ou previne significativamente a oxidação do substrato” (HALLIWEL, 1994). Em outros termos, são substâncias químicas capazes de doar átomos de hidrogênios e/ou elétrons aos radicais livres, se transformando em espécies químicas estáveis. A estabilidade da substância doadora, geralmente ocorre por ressonância (WICKS; WOOD; GARG, 2006).

Nos alimentos, a utilização de antioxidantes permite prolongar sua conservação mantendo, assim, as qualidades nutricionais dos alimentos, bem como evitando que haja a formação de produtos tóxicos.

Os antioxidantes podem atuar promovendo a remoção ou inativação dos radicais livres, através da doação de átomos de hidrogênio e/ou elétron a moléculas oxidantes. Podem também atuar como neutralizadores de oxigênio singlete, através de reações químicas estáveis entre o antioxidante e o oxidante. Atuam também como complexantes de íons metálicos através do compartilhamento do par de elétrons não compartilhado na estrutura molecular do antioxidante (HUANG; OU; PRIOR, 2005). Inibe a ação de enzimas oxidantes, como a xantina oxidase, que pode gerar espécies iniciadoras de reações radicalares (FRANKEL; MEYER, 2000). Existem também, diversas enzimas que atuam como antioxidante, reconhecendo especificamente as biomoléculas degradadas (DNA e proteínas), eliminando-as e substituindo-as (HALLIWELL, 1994).

Devido a crescentes limitações no uso de antioxidantes sintéticos e a acentuada consciência pública nas questões de saúde, a pesquisa de antioxidantes naturais tem se desenvolvido muito (RAJALAKSHMI *et al*, 1995; FRANKEL, 1996). Neste contexto, os antioxidantes naturais apresentam-se, então, como uma alternativa para minimizar os danos oxidativos nos seres vivos e prevenir a deterioração oxidativa dos alimentos (MELO; GUERRA, 2002).

Atividade antioxidante e capacidade antioxidante são termos muito utilizados na atualidade, mas que possuem diferentes significados. Atividade refere-se a uma constante de velocidade da reação entre a espécie antioxidante e a espécie oxidante e capacidade é a medida da quantidade (em mol) de radical livre capturado pelo antioxidante ou mistura de antioxidantes (WICKS; WOOD; GARG, 2006).

2.3.2 Métodos para avaliar a capacidade antioxidante

Diversos métodos têm sido propostos para medir a atividade ou capacidade antioxidante, no entanto, não existe um método padrão. Para se obter uma avaliação adequada da atividade antioxidante é necessária a utilização de diferentes métodos, incluindo diferentes mecanismos de inibição da oxidação. Esses métodos são necessários devido à dificuldade em medir

cada componente separadamente e também devido às interações potenciais entre diferentes antioxidantes, em amostras biológicas e alimentares (CAO; PRIOR, 1999; HUANG; OU; PRIOR, 2005).

Esta falta de métodos padronizados para avaliar a capacidade antioxidante torna difícil a comparação dos resultados de diferentes grupos de pesquisas (HUANG; OU; PRIOR, 2005).

De acordo com a reação química, a maioria dos métodos antioxidantes pode ser dividida em duas categorias: métodos baseados, sobretudo, na reação de transferência de átomo de hidrogênio e os que se baseiam predominantemente na reação de transferência de elétrons. Entretanto, os mecanismos das reações de transferência do elétron e de átomo de hidrogênio podem ser difíceis de distinguir. Aparentemente a reação de transferência de átomo de hidrogênio pode ser o resultado de uma transferência acoplada de elétron-próton (WICKS; WOOD; GARG, 2006; HUANG; OU; PRIOR, 2005).

O método baseado na transferência de elétrons desenvolve uma reação de redox com o oxidante, que é um indicativo do ponto final da reação (HUANG; OU; PRIOR, 2005):



A prova é o oxidante que captura o elétron do antioxidante, causando uma mudança de cor na prova. O grau de descoloração ou mudança de cor é proporcional a capacidade antioxidante (WICKS; WOOD; GARG, 2006).

O pH e o solvente são parâmetros muito importantes na medida da capacidade antioxidante. Em condições de pH baixo, a capacidade redutora é diminuída; já o tipo de solvente pode afetar a velocidade de captura do radical, o que pode interferir na medida da eficiência do antioxidante. Por essas razões, as condições na qual a análise será realizada devem ser bem estudadas e caracterizadas (WICKS; WOOD; GARG, 2006).

O método baseado na transferência de átomos de hidrogênio ocorre por reações de cinética competitiva (HUANG; OU; PRIOR, 2005).

O Quadro 2 apresenta alguns métodos utilizados para avaliar a capacidade antioxidante, classificados por tipo de mecanismo reacional predominante, segundo Huang; Ou; Prior (2005).

Quadro 2. Exemplos de métodos de avaliação da capacidade antioxidante *in vitro*. (HUANG; OU; PRIOR 2005)

MECANISMO DE REAÇÃO	MÉTODO
Transferência de átomo de hidrogênio	ORAC (oxygen radical absorbance capacity)
	TRAP (total radical-trapping antioxidant parameter)
	TOSC (total oxidant scavenging capacity)
Transferência de elétrons	FRAP (ferric reducing antioxidant power)
Transferência de átomo de hidrogênio e de elétrons	TEAC (trolox equivalent antioxidant capacity)
	DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)
	Método de Folin-Ciocalteu

Com o crescente interesse na eficácia e na função de antioxidantes naturais nos alimentos e sistemas biológicos, os testes da atividade antioxidante têm recebido mais atenção. Substratos diferentes, sistemas de composição e métodos analíticos são aplicados nos testes para avaliar a efetividade dos antioxidantes (WICKS; WOOD; GARG, 2006). Dentre os mais utilizados estão: ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity), TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity), DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) e método de Folin-Ciocalteu (FC).

2.3.2.1 Método TEAC

Dentre os vários métodos disponíveis para determinar a capacidade antioxidante de substâncias puras, bebidas, etc., a análise TEAC é a melhor análise quanto às exigências instrumentais e de tempo (WICKS; WOOD; GARG, 2006).

O princípio deste método baseia-se na capacidade de o antioxidante capturar o radical $ABTS^{+\bullet}$ (ácido 2,2'-azinobis (3-etilbenzeno-tiazolina-6-sulfônico)), azul-esverdeado, e convertê-lo em um produto incolor, daí ser chamado de método de descoloração. A cinética de diminuição da concentração do radical $ABTS^{+\bullet}$ é verificada pela descoloração do radical, por análise espectrofotométrica a 734 nm num tempo fixo, em pH neutro e à temperatura ambiente. O radical $ABTS^{+\bullet}$ é previamente gerado via reação de oxidação do ABTS com o agente oxidante persulfato de potássio (ARTS *et al.*, 2004)..O método fornece a capacidade antioxidante em comparação à capacidade antioxidante de captura do antioxidante Trolox, como pode ser visualizado na Figura 3 (ARTS *et al.*, 2004).

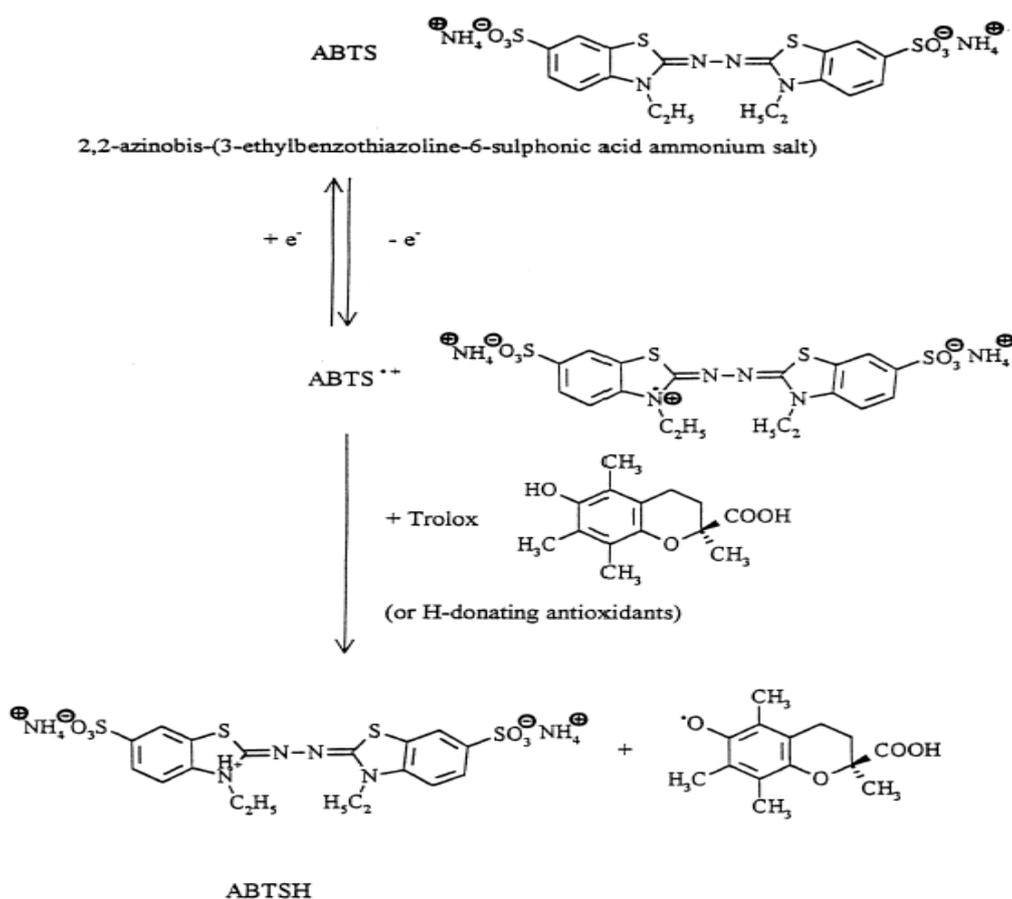


Figura 3. Reação de formação do radical $ABTS^{+\bullet}$ e deste com o antioxidante trolox. (Fonte. ARTS *et al.* (2004)).

A desvantagem do método é que quaisquer traços de íons podem, inevitavelmente, reduzir o ABTS^{•+} a ABTS, resultando em valores TEAC sobreestimado (VAN DEN BERG *et al*, 1999).

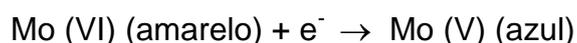
O valor TEAC pode não ser o real para reações lentas, pois se usando um ponto final de curta duração (4 ou 6 minutos) é possível que a reação não esteja terminada, resultando em menores valores (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005).

2.3.2.2 Método de Folin-Ciocalteu

O método de Folin-Ciocalteu (FC) foi por muitos anos usado como uma medida de polifenóis totais em produtos naturais, mas como o mecanismo básico é uma reação de oxidação/redução, pode ser considerado um método de medida da atividade antioxidante (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005).

A metodologia original foi desenvolvida em 1927, na qual a oxidação dos fenóis é feita por um reagente de molibdotungstênio, resultando em produtos coloridos com $\lambda_{MÁX}$ de 745 a 750nm. Singleton e Rossi (1965) propuseram um método que utiliza o reagente molibdotungstênio-fosfórico heteropoliânion, que reduz mais especificamente os fenóis, em meio básico (com solução de carbonato de sódio, pH ~ 10), sendo empregado geralmente o ácido gálico como padrão fenólico de referência.

A dissociação de um próton do fenol conduz a um ânion fenolato que é capaz de reduzir o reagente de Folin-Ciocalteu. Acredita-se que o molibdênio é o mais fácil a ser reduzido no complexo, ocorrendo, então, a reação de transferência de átomo de hidrogênio e elétron entre os redutores e o Mo (VI) (HUANG; OU; PRIOR, 2005):



O método de Folin-Ciocalteu pode sofrer interferência de algumas substâncias (ex. vitamina C, Cu(I), aminoácido, etc.) (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005).

2.4 INTERAÇÕES E INTERFERENTES NA MEDIDA DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE

A capacidade antioxidante total em frutas, legumes e seus produtos processados é atribuída a 3 diferentes tipos de interação: sinérgica, antagônica e aditiva (HEO *et al*, 2007). Um exemplo de interação sinérgica é a cooperação entre α -tocoferol (vitamina E) e o ácido ascórbico (vitamina C) na inibição da peroxidação lipídica. Neste caso, a vitamina E atua como antioxidante primário e, posteriormente o radical da vitamina E reage com a vitamina C regenerando a vitamina E. O antagonismo é observado na ação da glutathione que potencializa a atividade pró-oxidante da vitamina C em certas circunstâncias (ARTS *et al*, 2001).

2.4.1 Interações antioxidantes

Estudos vêm mostrando que misturas de compostos fenólicos podem interagir, e que suas interações podem afetar a capacidade antioxidante total de uma mistura (IACOPINI *et al*, 2008). Maciel (2006) analisando a atividade antioxidante TEAC, ORAC, DPPH e FC de algumas misturas de compostos fenólicos, observou um efeito aditivo sobre a resposta, sendo que a análise de FC obteve o maior número de interações estatisticamente significativas.

Heo *et al*. (2007) medindo a capacidade antioxidante pelo método TEAC de algumas combinações de dois ou três CFs, também observou efeito aditivo.

Dessa forma, para se obter um valor real da capacidade antioxidante é importante conhecer as interações dos CFs que mais influenciam na resposta dos métodos e em quais métodos estas interações mais afetam.

2.4.2 Interferentes

2.4.2.1 Açúcares e aminoácidos

É importante considerar também as interações entre os compostos fenólicos e a eventual presença, na amostra, de alguns nutrientes (proteínas, aminoácidos, peptídeos, açúcares etc.) que podem reagir com os antioxidantes, modificando assim os valores da capacidade antioxidante. Trabalhos recentes vêm investigando não só a interação destes compostos fenólicos com os nutrientes, mas a capacidade destas moléculas isoladamente (BUMBER *et al*, 2000; PEREZ-JIMÉNEZ; SAURA-CALIXTO, 2006; LUO; FANG, 2008).

Algumas proteínas provenientes de certos alimentos têm apresentado a capacidade de capturar EROs. Além disso, vários aminoácidos, por exemplo, tirosina, metionina, histidina, prolina e triptofano, são considerados como antioxidantes, embora em casos específicos (por exemplo, alta concentração), também podem agir como pró-oxidantes (PIHLANTO, 2006).

Estudo realizado por Dávalos *et al* (2004) sobre a capacidade antioxidante ORAC-FL de peptídeos derivados de ovo cru mostram alta atividade, sendo que a atividade de alguns destes peptídeos se deve, principalmente, à presença da tirosina, que apresenta na estrutura do anel aromático um grupo hidroxila que pode contribuir para o mecanismo de transferência de átomos de hidrogênio para o radical livre. Foram encontradas também atividades antioxidantes nos peptídeos de proteínas do leite entre outros (PIHLANTO, 2006).

No entanto, não há estudos conclusivos sobre a relação dos aminoácidos com a atividade antioxidante. Recentemente, Perez *et al* (2007) estudaram a capacidade antioxidante de méis e encontraram uma boa correlação entre aminoácido livre e a atividade antioxidante ($r = 0.825$, $p < 0.001$). Os aminoácidos que mostraram maior correlação ($r > 0,80$) com a capacidade antioxidante das amostras de méis foram o ácido aspártico, ácido glutâmico, glicina, treonina.

Outros constituintes dos alimentos que podem interferir na medida da capacidade antioxidante são os carboidratos. Estudos vêm indicando que alguns polissacarídeos e açúcares simples (frutose, glicose, sacarose) apresentam esta capacidade. Como exemplos se têm os trabalhos de Luo; Fang (2008), que identificaram e testaram a capacidade antioxidante dos polissacarídeos de ginseng, e Luo (2008) que identificou a estrutura e a atividade antioxidante de uma fração de polissacarídeos de *Dioscorea nipponica*.

Perez-Jiménez; Saura-Calixto (2006) analisaram a influência de aminoácido e açúcar (isoladamente e em mistura de compostos fenólicos) na atividade antioxidante ORAC, TEAC, DPPH, FRAP. Os resultados mostraram que, apesar de a glicose, isoladamente, não apresentar nenhum valor ORAC e TEAC ela mostra um efeito aditivo na capacidade antioxidante de misturas de polifenóis (ácido gálico 1M e catequina 1M). Sharma; Kumar; Rao (2008) estudaram a influência do açúcar na capacidade antioxidante do chá preto e observaram que o chá adicionado de açúcar teve sua atividade antioxidante reduzida quando medida pelo método DPPH.

Apesar de trabalhos mostrarem a influência destes constituintes, ainda é pouco conhecido o tipo de interação e o mecanismo pelo qual eles interferem na atividade antioxidante, principalmente com relação aos açúcares. Em investigações recentes, foi demonstrado que as proteínas e compostos fenólicos podem interagir com base em interações não covalentes, tais como ligações π , ligações hidrogênicas e hidrofóbicas ou interações iônicas. Além dessas, foi assumido também que a ligação covalente pode desempenhar um papel importante nas interações proteína-composto fenólico (HURELL; FINOT, 1984; SIEBERT, TROUKHANOVA; LYNN, 1996; SIEBERT, 1999; ROHN; RAWEL; KROLL, 2004).

Alguns trabalhos têm discutido um conceito de *mascamamento*, o qual corresponde a uma diminuição da atividade antioxidante de antioxidantes fenólicos, que pode resultar de interações com proteínas (ARTS, HAENEN, VOSS, BAST, 2001; ARTS *et al.*, 2002). Foi mostrado que a adição de quercetina em plasma (rico em proteínas) aumentou a capacidade antioxidante

TEAC do plasma, mas o aumento foi inferior à capacidade antioxidante que o flavonóide tinha sozinho. O mascaramento foi definido, então, como a diferença relativa entre o aumento medido na capacidade antioxidante devido à adição de um antioxidante comparado ao aumento calculado baseado num efeito aditivo (ARTS, HAENEN, VOSS, BAST; 2001). Porém, nenhuma caracterização do complexo proteína-composto fenólico foi realizada, nem do mecanismo envolvido que explique os valores inferiores aos esperados.

Na grande maioria dos trabalhos, o mecanismo ou tipo de interação estudado é voltado ao impacto que compostos fenólicos e proteínas/peptídeos causam no turvamento de bebidas (SIEBERT; TROUKHANOVAL, LYNN, 1996; CHARLTON, *et al.* 2002; FREITAS; CARVALHO, MATEUS, 2003). O interesse das investigações ocorre por que o turvamento é um problema ligado à perda de qualidade sensorial no processamento de bebidas ricas nestes compostos, tais como o vinho, cerveja e sucos de frutas. Além disso, estudos da interação composto fenólico-proteína visam compreender o fenômeno da adstringência, o qual está claramente relacionado com as interações entre os compostos fenólicos e outras espécies naturalmente presentes na cavidade bucal e, em especial, as proteínas. Atualmente, as investigações voltadas ao impacto na capacidade antioxidante ainda é incipiente.

Um esquema para a interação entre polifenol e proteínas salivares rica em prolina tem sido proposto por Charlton *et al.* (2002). Neste esquema, a interação se dá em três fases, a fase inicial é a complexação do peptídeo por moléculas de compostos fenólicos solúveis para formação de agregados. Esses agregados são formados pela ligação entre a face hidrofóbica do anel aromático do CF com o anel pirolidina do resíduo da prolina (Figura 4).

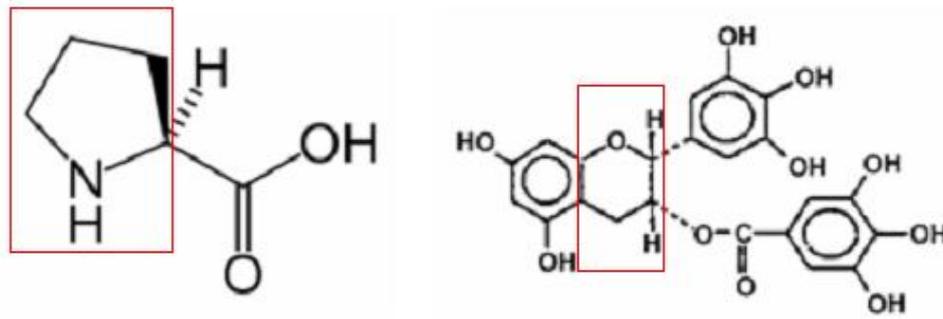


Figura 4. Estrutura da prolina e seu anel pirolidina em destaque e estrutura do epigalocatequina galato e sua face hidrofóbica em destaque.

A segunda fase exige um segundo CF que irá “revestir” a molécula de peptídeo, conduzindo a uma duplicação do tamanho do complexo, o que o torna insolúvel. Na terceira etapa, um pequeno número destes dímeros de peptídeos agregados se junta. Por último, ocorre a espontânea agregação destes aglomerados insolúveis tornando o complexo maior, precipitando-o.

Siebert; Troukhanova, Lynn (1996) estudando o turvamento resultante da interação entre gelatina (com proteína rica em prolina) e ácido tânico mostra que esta interação irá depender da proporção e do tipo de proteína e do composto fenólico envolvido. A Figura 5 ilustra como a proporção entre estes dois compostos influencia na turbidez.

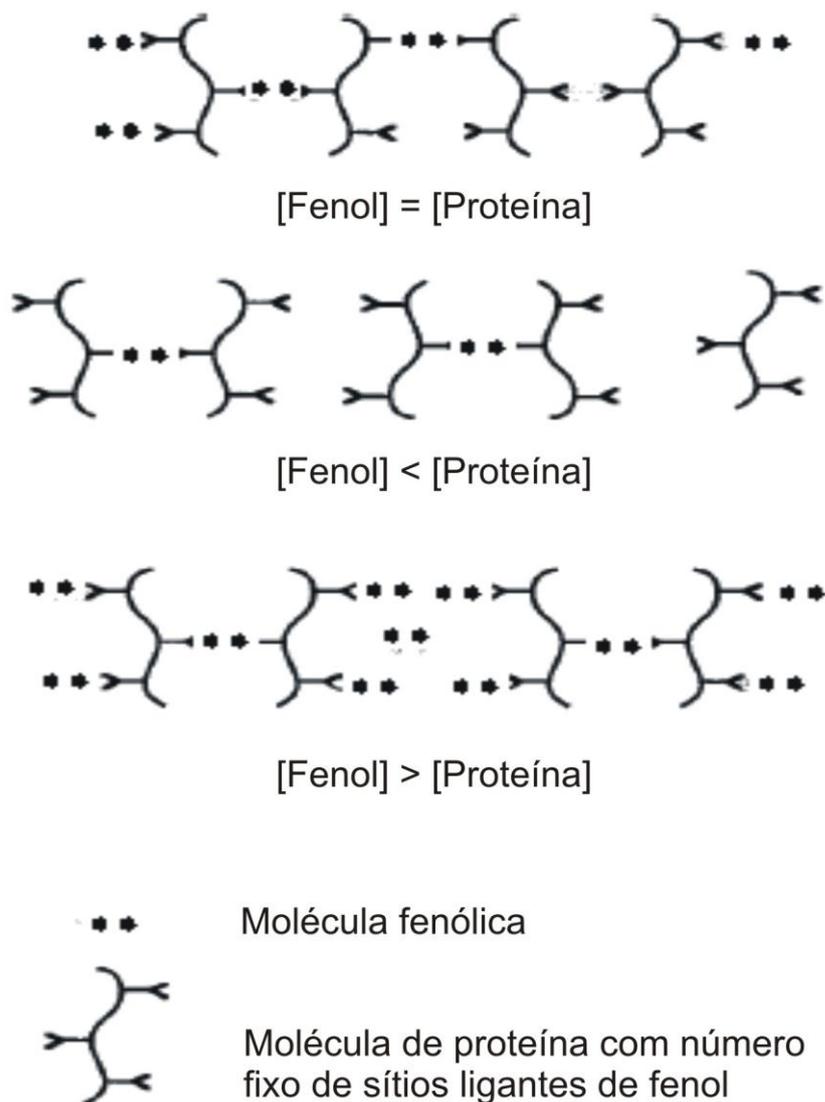


Figura 5. Modelo para explicar a interação de proteínas- compostos fenólicos. Compostos fenólicos são representados como tendo dois extremos que podem se ligar a proteínas (molécula fenólica). Proteínas são representadas como tendo um número fixo de sítios vinculativo aos compostos fenólicos. Fonte: Siebert; Troukhanova, Lynn (1996).

De modo geral, o esquema acima pode ser usado para explicar a interação entre proteínas e compostos fenólicos, que por sua vez, finda no turvamento ou turbidez. A maior turbidez é alcançada quando a proporção de CF e proteína são iguais, pois permite que os compostos fenólicos formem uma ponte entre duas proteínas, aumentando o tamanho da molécula e precipitando o complexo. Porém, no caso onde a proporção de proteína é maior, todos os sítios de ligação das proteínas estão ligados, impossibilitando a formação de

dímeros. Quando a proporção de CF é maior, a formação de dímeros também é dificultada.

Este precipitado pode ainda ser redissolvido ou impedido de se formar por atuação dos carboidratos (MATEUS; CARVALHO; LUÍS, FREITAS, 2004). Estes autores propõem que alguns carboidratos podem atuar impedindo a interação entre proteínas e compostos fenólicos para a formação de precipitados. A Figura 6 explica como o carboidrato pode atuar neste complexo proteína-compostos fenólicos. Observa-se que, de fato, o carboidrato atua como um escudo que impede a ligação entre os compostos fenólicos e a proteína.

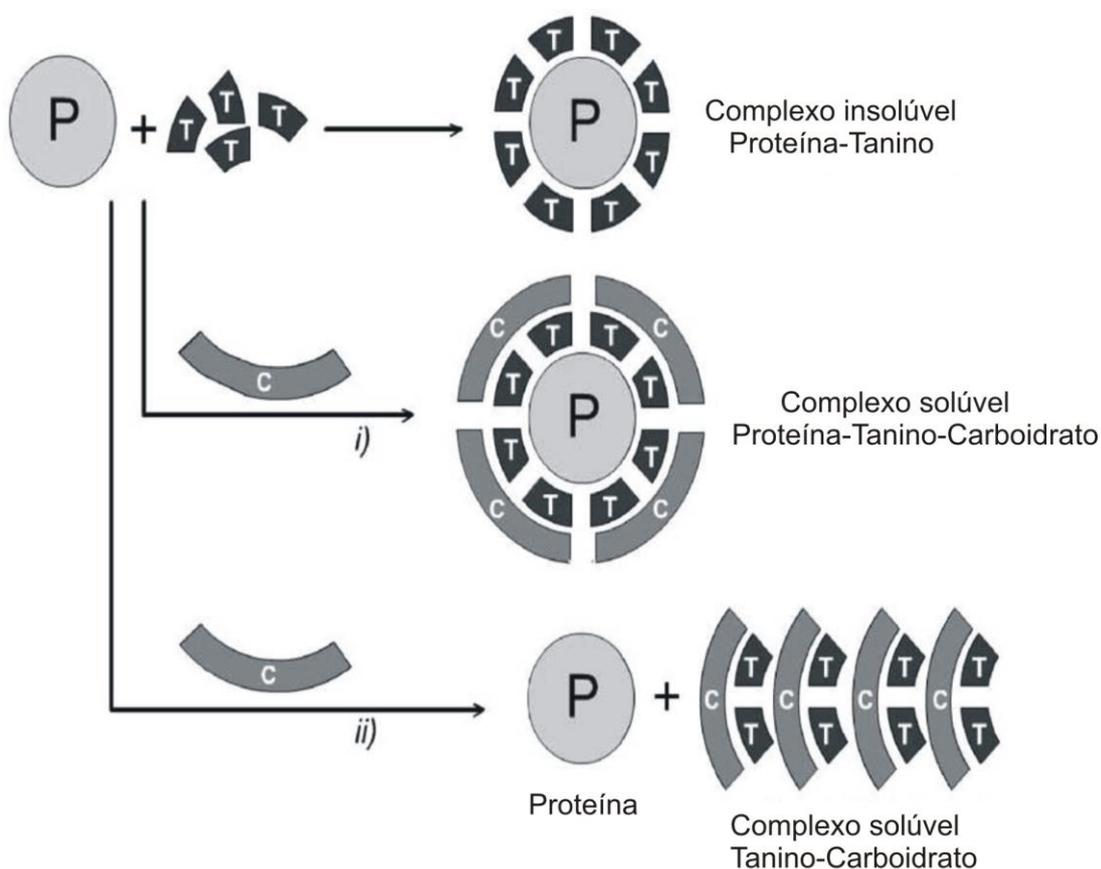


Figura 6. Possíveis mecanismos (I e II) envolvidos na inibição da agregação de taninos e proteínas por carboidratos. P-proteína, T-taninos, C-carboidrato.

Como exposto anteriormente, a maioria dos trabalhos enfatiza principalmente a interação destes componentes no turvamento. Com base nisso, este trabalho propõem estudar a influencia na capacidade antioxidante da possível interação dos polifenóis com alguns aminoácidos e com açúcares e a influencia de cada composto isolado na capacidade antioxidante.

Ressalta-se que esses estudos sobre o turvamento são com proteínas e carboidratos, sendo que no presente trabalho será estudada a interação dos compostos fenólicos com aminoácidos e açúcares simples. Decidiu-se trabalhar com monômeros pela necessidade de se conhecer primeiramente quais aminoácidos e açúcares podem influenciar na atividade antioxidante, antes de se partir para o estudo com componentes mais complexos, como proteínas e carboidratos.

2.5 BEBIDAS RICAS EM POLIFENÓIS: O Chá Verde

O chá verde é uma bebida oriental, milenar, que representa uma das maiores fontes de polifenóis da dieta desses povos. Devido a seus benefícios nutracêuticos, o chá vem sendo largamente consumido em todos os países. Este chá é obtido a partir de folhas de *Camellia sinensis*, que são expostas ao calor para inativar as enzimas oxidativas (SAITO *et al*, 2007; ATOUI *et al*, 2005).

Muitos tipos de chá são produzidos a partir de folhas de *Camellia sinensis*, sendo os três principais tipos: verde (não-fermentado), oolong (semi-fermentado) e preto (fermentado). O chá verde é uma infusão de folhas secas em água aquecida, e o processo de cocção inativa as enzimas presentes nas folhas, evitando a oxidação enzimática de catequinas. O chá preto provém de folhas fermentadas; durante esse processamento, boa parte das catequinas presentes nas folhas sofre oxidação, o que é muito importante para o desenvolvimento de cor e sabor da bebida. A oxidação enzimática é causada por ação da polifenoloxidase. No chá Oolong, as folhas sofrem cocção e secagem. As características de Chá Oolong estão entre preto e chá verde (WANG; PROVAN; HELLIWELL, 2000).

O crescente interesse pela bebida deve-se principalmente a estudos que mostram que esta apresenta uma boa fonte de flavonóides e a relação inversa entre seu consumo e o risco de doenças degenerativas como câncer, doenças do coração entre outras (BARBOSA, 2007).

A principal classe de flavonóides encontradas no chá são flavonóis e flavanóis. Os principais flavanóis encontrados nas folhas do chá verde são: epigalocatequina galato (EGCG), (-)-epigalocatequina (EGC), (-)-epicatequina galato (ECG) e (-)-epicatequina (EC) (Fig. 7). A EGCG é o flavanol mais abundante e biologicamente ativo do chá verde, cerca de 40% do total de flavanóis sendo EGCG (ALMAJANO, *et al*, 2008).

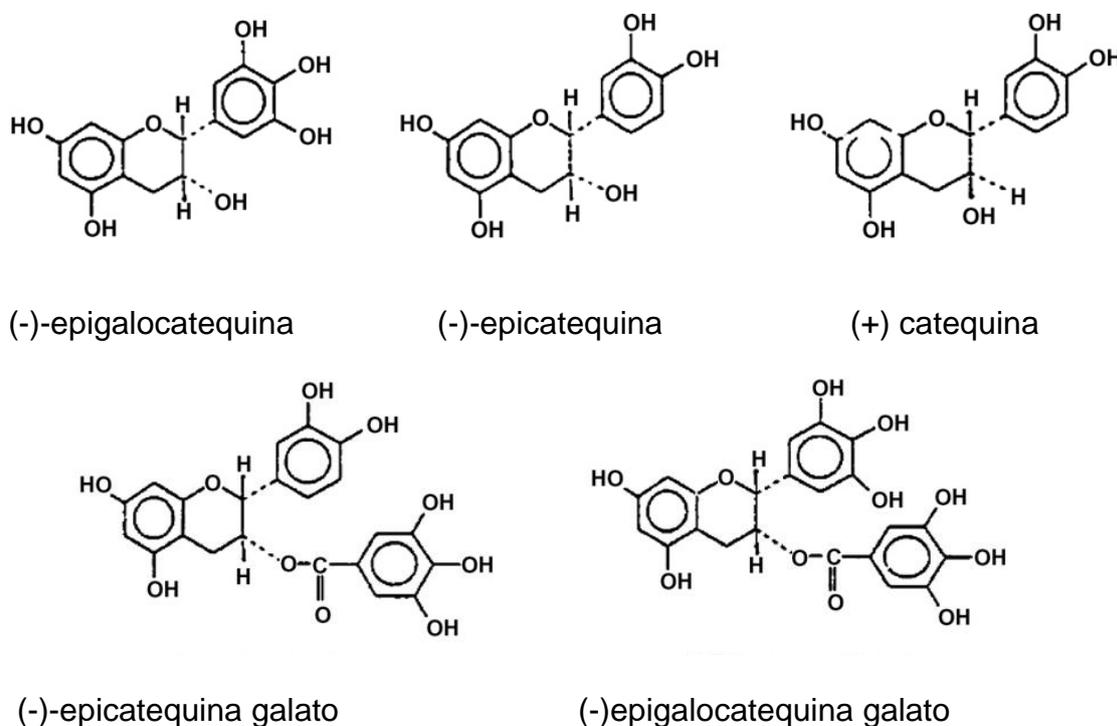


Figura 7. Estrutura dos principais flavan-3-óis do chá verde (*Camelia sinensis*).
Fonte: ALMAJANO, *et al* (2008).

A medida da atividade antioxidante pelo método de DPPH mostrou que a atividade é decrescente na ordem: epigalocatequina galato > (-)-epicatequina galato (ECG) > (-)-epigalocatequina (EGC) > (-)-epicatequina (EC) > catequina (C).

Os flavanóis contribuem para a amargura e adstringência da infusão de chá verde. Quase todas as características de fabrico do chá, incluindo o seu sabor, cor e aroma, são associadas direta ou indiretamente com modificações dos flavanóis (WANG; PROVAN; HELLIWELL, 2000).

Os principais flavonóis nas folhas do chá são quercetina, kaempferol e miricetina. Flavonóis são predominantemente presentes na forma glicosilada. As presenças de pelo menos 14 glicosídeos de miricetina, quercetina e kaempferol no chá verde e preto, foram relatadas. Os açúcares presentes podem ser: glicose, ramnose, galactose, arabinose e frutose. Os flavonóis não-glicosilados não são encontrados em quantidades significativas no chá verde devido a sua baixa solubilidade em água (WANG; PROVAN; HALLIWELL, 2000).

Não há como definir o teor de flavanol e flavonol em chás, as grandes variações nas concentrações não se devem apenas a diferentes regiões de cultivo do chá, mas também aos diferentes maneiras de preparo das infusões além da variabilidade analítica (MATSUBARA; RODRIGUEZ-AMAYA, 2006; WANG; PROVAN; HALLIWELL, 2000).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 REAGENTES

- ABTS (ácido 2,2'-azinobis (3-etilbenzeno-tiazolina-6-sulfônico) (Sigma, Steinheim, Alemanha)
- Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) (Sigma, Steinheim, Alemanha)
- Persulfato de potássio P.A (Synth, São Paulo, Brasil)
- Ácido ferrúlico (Sigma, Steinheim, Alemanha)
- Ácido gálico (Sigma, Steinheim, Alemanha)
- Catequina (Fluka, Buchs, Suíça)
- Rutina (Sigma, Steinheim, Alemanha)
- Metionina, L-Fenilalanina, L-Triptofano L-Tirosina (Sigma, Steinheim, Alemanha)
- D-Glicose, D-Frutose D-Sacarose (Sigma, Steinheim, Alemanha)
- Reagente de Folin-Ciocalteu (Sigma, Steinheim, Alemanha).

3.2 CÁLCULO DAS CONCENTRAÇÕES DE INTERFERENTES E PREPARO DAS SOLUÇÕES PARA A AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE

A interferência de nutrientes não fenólicos (aminoácidos, açúcares) foi testada isoladamente, em misturas de padrões de compostos fenólicos e em bebida rica em polifenóis (chá verde).

3.2.1 Cálculo para concentração dos aminoácidos nas bebidas

As concentrações dos aminoácidos a serem adicionados nas bebidas foram estabelecidas a partir das recomendações de ingestão diária da FAO (2002) (Tabela 1, coluna 2), dada em Kg de massa corporal. Em seguida, estas recomendações foram projetadas para uma pessoa de 70 Kg (Tabela 1, coluna 3). Calculou-se então qual seria a quantidade recomendável numa refeição de base, considerando-se um volume de 200 ml de uma bebida (nos quais estes nutrientes são diluídos, como numa xícara de chá verde, sopa, açaí, etc.), a qual proporcionaria 20% das quantidades diárias (Tabela 1, coluna 4). Finalmente, expressou-se a concentração molar dos aminoácidos no volume de 200mL da bebida (Tabela 1, coluna 5).

Tabela 1. Recomendações de ingestão diária de aminoácidos.

Aminoácidos	mg/Kg/dia ^a	Adulto de 70Kg (mg)	Por ingestão (mg/200mL) ^b	Conc. média por refeição (mM) ^c
Triptofano	4	280	56	1.371
Tirosina	12,5	875	175	4.020
Fenilalanina	12,5	875	175	5.297
Metionina	10	700	140	4.691

^a Fonte FAO (2002); ^b 200 mL corresponde ao volume ingerido de bebidas, como chá verde;

^c Equivalente ao consumo médio por ingestão de 200 ml de bebida.

Para os estudos posteriores, foi levado em consideração este valor médio de concentração molar consumido por refeição, obtido a partir das recomendações da FAO.

3.2.2 Preparo da solução de aminoácidos e açúcares para a avaliação da atividade antioxidante

Este preparo das soluções visa avaliar a influência de cada aminoácido e açúcar isoladamente e verificar a linearidade entre a concentração e a atividade antioxidante. Para avaliar a linearidade entre as respostas, foram utilizadas 5 concentrações diferentes de aminoácidos e açúcares (Tabela 2). As concentrações de aminoácidos foram estipuladas a partir da concentração média por refeição (Tabela 1, Coluna 5). Este valor foi considerado como o valor central, a partir do qual se calculou, em progressão geométrica (PG) de razão 2, sendo dois valores acima e abaixo, como mostra a Tabela 2. No entanto, para o aminoácido triptofano a concentração do valor médio consumido por refeição (Tabela 2, Coluna 5) foi considerado como o valor mínimo a partir do qual se calculou, em PG de razão 2 as outras concentrações. Isto foi necessário para poder obter a concentração de triptofano de 15,38 mM, que será utilizada em estudos posteriores.

A concentração dos açúcares também foi calculada em PG de razão 2, sendo considerado o valor mínimo de acordo com as quantidades ingeridas, a partir da qual calculou-se as outras concentrações crescentes.

As amostras para este estudo foram diluídas em água ultra pura e colocadas em banho ultra-som por 5 minutos para a total diluição.

Tabela 2. Concentração dos interferentes nas bebidas.

Interferentes	Conc 1*	Conc 2	Conc 3	Conc 4	Conc 5
Triptofano	1.371	2.742	5.484	10,960	21,930
Tirosina	1.005	2.010	4.020	8.040	16.080
Fenilalanina	1.324	2.648	5.296	10.592	21.184
Metionina	1.173	2.346	4.691	9.382	18.764
Glicose	0,027	0,055	0,111	0,222	0,444
Frutose	0,027	0,055	0,111	0,222	0,444
Sacarose	0,027	0,055	0,111	0,222	0,444

* Concentração dos aminoácidos em milimolar (mM) e dos açúcares em molar (M)

3.2.3 Preparação das misturas de padrões de compostos fenólicos

As misturas de padrões de compostos fenólicos foram realizadas utilizando os padrões de quatro classes diferentes de compostos fenólicos: rutina (Flavonóis), ácido gálico (ácido benzóico), ácido caféico (ácido cinâmico) e catequina (flavanóis).

Devido à solubilidade dos aminoácidos e açúcares serem maior em água, e a mistura de padrões de CFs ser em metanol, a mistura final com os padrões foi preparada em solução aquosa com 45% de metanol.

Cada solução foi preparada separadamente na concentração de 10mM. As soluções de ácido gálico e catequina foram solubilizadas em solução aquosa 20% metanol, o ácido ferrúlico em 40 % metanol e rutina em 100% metanol, estas proporções permitiram a melhor solubilização dos padrões. A preparação dos polifenóis em diferentes concentrações de metanol foi necessária por que a rutina é solubilizada apenas em metanol puro, tal preparação permite que se alcance uma proporção final de 45% metanol, quando se mistura os padrões de CFs na proporção 1:1:1:1. As misturas, porém, eram feitas apenas no dia de análise, sendo as soluções mãe estocadas sob nitrogênio a -10°C.

3.2.4 Preparação do chá verde

O chá verde foi obtido em estabelecimento comercial de Belém, sendo as folhas originadas da china. Para o preparo do chá, 5 L de água ultra pura foram aquecidas a 100°C e então adicionada de 50g de folhas do chá; após um tempo de contato de 10 minutos a infusão foi filtrada rapidamente em papel-filtro (Qualy , diâmetro 15 cm, poro 14 µm), com auxílio de vácuo. Em seguida o chá foi conservado sob atmosfera de nitrogênio a -10 °C até seu uso para análise. Nestas condições, o chá obtido apresentou valor de FC de 24,95 mM EAG e TEAC de 64,66 mM ET.

3.2.5 Atividades antioxidantes dos aminoácidos por plano de mistura

Para esta etapa do trabalho, foi estabelecido um planejamento experimental com auxílio do programa STATISTICA 7.1 (Statsoft, Tulsa, OK) sob Windows 2000, usando a metodologia de mistura Simplex Centróide, aumentada de pontos centrais. Esta ferramenta estatística permite trabalhar com combinação de compostos e verificar os efeitos de interação entre os componentes, que neste caso serão os aminoácidos.

Nesta primeira etapa foram utilizadas as soluções dos aminoácidos em solução aquosa 45% metanol, sem a presença dos CFs. Para o plano de mistura foi estabelecido como concentração máxima, a soma das concentração média por refeição (mM) de cada aminoácido (Tabela 1, coluna 5), o que resulta em uma concentração de 15,38 mM.

As soluções eram preparadas no dia de análise, e a partir da solução com a concentração máxima (15,38mM), obtinham-se os outros ensaios de acordo com as requeridas proporções de aminoácidos exigidas pelo planejamento. A Tabela 3 mostra o plano experimental com a proporção de cada aminoácido na mistura.

Tabela 3. Plano de misturas simplex centróide aumentado de pontos para os aminoácidos com concentração total de 15,38 mM.

Ensaio	Triptofano	Tirosina	Fenilalanina	Metionina
E1	1* (15,38)**	0	0	0
E2	0	1	0	0
E3	0	0	1	0
E4	0	0	0	1
E5	0,5 (7,69)	0,5	0	0
E6	0,5	0	0,5	0
E7	0,5	0	0	0,5
E8	0	0,5	0,5	0
E9	0	0,5	0	0,5
E10	0	0	0,5	0,5
E11	0,33 (5,12)	0,33	0,33	0
E12	0,33	0,33	0	0,33
E13	0,33	0	0,33	0,33
E14	0	0,33	0,33	0,33
E15.1	0,25 (3,84)	0,25	0,25	0,25
E15.2	0,25	0,25	0,25	0,25
E15.3	0,25	0,25	0,25	0,25
E16	0,625 (9,61)	0,125	0,125	0,125
E17	0,125 (1,92)	0,625	0,125	0,125
E18	0,125	0,125	0,625	0,125
E19	0,125	0,125	0,125	0,625

*Valores codificados **Valores reais (mM)

Foram acrescentadas duas replicatas no ponto central (mistura equimolar dos quatro compostos) e as análises realizadas de forma randomizada.

3.2.6 Atividade antioxidante dos aminoácidos por plano de mistura em presença de compostos fenólicos

O planejamento experimental foi o mesmo utilizado no item 3.2.5, com o diferencial que nesta etapa os aminoácidos foram diluídos na solução de mistura de padrões de CFs (10 mM). O preparo desta solução de mistura dos padrões foi de acordo com o descrito no item 3.2.3. No dia da análise, cada aminoácido era pesado isoladamente para alcançar sua concentração máxima (15,38 mM) e diluído na solução de mistura de padrões de CFs (10 mM). Posteriormente as soluções eram levadas ao ultra som por 5 minutos. Para obter as outras concentrações dos ensaios da Tabela 3, volumes proporcionais aos valores codificados eram misturados.

Para o tratamento dos resultados da capacidade antioxidante foi descontado em cada ensaio a contribuição da mistura de padrões.

3.2.7 Análise das atividades antioxidantes de misturas de aminoácidos, açúcares e compostos fenólicos

Após a avaliação da capacidade antioxidante dos aminoácidos em planos de misturas foi realizado um planejamento fatorial fracionário do tipo Box-Behnken para avaliar o impacto dos 3 fatores *mistura de CFs, aminoácidos e açúcares* na capacidade antioxidante. Este plano não considera as variáveis como componentes de misturas, mas como variáveis quantitativas contínuas e independentes. O planejamento e suas proporções e concentrações (mM) utilizadas estão expostas nas Tabela 4 e 5.

Tabela 4. Planejamento fatorial fracionário do tipo Box-Behnken.

Ensaio	Aminoácido	Açúcar	CFs
E1	-1*	-1	0
E2	1	-1	0
E3	-1	1	0
E4	1	1	0
E5	-1	0	-1
E6	1	0	-1
E7	-1	0	1
E8	1	0	1
E9	0	-1	-1
E10	0	1	-1
E11	0	-1	1
E12	0	1	1
E13.1	0	0	0
E13.2	0	0	0
E13.3	0	0	0

*Valor codificado

Tabela 5. Concentração real (mM) das variáveis do planejamento fatorial fracionário.

Valores codificados	Valores reais de concentração das variáveis		
	Aminoácidos (mM)	Açúcares (mM)	CFs (mM)
-1	5,12	50	5
0	10,25	100	10
1	15,38	150	15

Cada solução foi preparada separadamente e três vezes mais concentrada (~ 45mM) que a concentração máxima (~ 15mM). A solução de mistura de padrões de CFs foi preparada do mesmo modo que o exposto no item 3.2.3 modificando apenas a concentração (Tabela 5, coluna 4). A solução de aminoácido foi preparada com a mistura dos aminoácidos: triptofano, tirosina, fenilalanina e metionina. A concentração de cada um foi de acordo com a estabelecida pela FAO (Tabela 1, coluna 5), a soma resultando em uma concentração máxima de 15,38 mM (Tabela 5). A solução de açúcar constou de uma mistura equimolar de frutose e glicose. Após o preparo, as amostras eram misturadas nas proporções estabelecidas pelo planejamento (Tabela 4).

Para poder obter uma boa solubilização de todos os componentes as soluções de padrões de CFs, aminoácido e açúcar foram preparadas em solução aquosa com 45%, 5% e 50% de metanol, respectivamente.

3.2.8 Análise das atividades antioxidantes de misturas de aminoácidos, açúcares e chá verde

Após o planejamento utilizando as variáveis *açúcar*, *aminoácido* e *padrões de CFs*, realizou-se um novo planejamento modificando apenas a variável CF, que em vez de utilizar padrões de CFs, utilizou-se o chá verde. A utilização de uma matriz alimentar é um modo de estender o estudo anterior feito com padrões, além disso, este planejamento experimental tenta simular uma situação real uma vez que esta bebida é passível de ser consumida com leite (rico em proteínas, peptídeos e aminoácidos) e açúcar.

O tipo de planejamento foi o mesmo apresentado na Tabela 4 e a concentração de açúcar e aminoácido é igual à apresentada na Tabela 5. Para a concentração de CF no chá verde (CF-chá), não há como utilizar as mesmas proporções de concentrações dos padrões utilizados no estudo anterior, pois se tratando de uma matriz alimentar não se tem com exatidão a concentração de CFs. Dessa forma foi estabelecido que a concentração de 1 (valor codificado) corresponderia ao valor 3 vezes diluído do chá obtido de acordo com o descrito no item 3.2.4. o valor de 0 (zero) corresponderia a 4,5 vezes

mais diluído e -1 nove vezes diluído, deste modo a proporção de CFs, aminoácido e açúcar seria a mesma do estudo anterior (Tabela 4).

3.3 EFEITO DO MASCARAMENTO

Em nosso estudo, calculou-se também o efeito do mascaramento para avaliar o percentual de variação entre uma amostra com aminoácido e CFs e/ou açúcar, no caso do planejamento fatorial, com as atividades isoladas de cada um destes componentes.

O mascaramento foi medido pela diferença relativa entre o aumento medido na capacidade antioxidante devido à adição de um antioxidante comparado ao aumento calculado baseado num efeito aditivo, conforme proposto inicialmente por Arts, Haenen, Voss, Bast, 2001. A Equação 1 abaixo foi utilizada para calcular o % de mascaramento:

$$Mascaramento (\%) = \frac{CAO_{exp} - CAO_{calc}}{Média (CAO_{exp})} * 100 \quad \text{(Equação 1)}$$

Onde: CAO_{exp} é valor da capacidade antioxidante obtido experimentalmente pela mistura de aminoácidos, padrões de CFs e/ou açúcar; CAO_{calc} é o valor calculado da capacidade antioxidante devido a um efeito aditivo esperado das capacidades obtidas dos componentes isoladamente.

Para o caso do plano de mistura o valor calculado será a soma dos valores TEAC e FC dos ensaios do plano de mistura dos aminoácidos sem a presença dos CFs com o valor TEAC e FC isolado dos CFs.

Para o planejamento fatorial fracionário o valor calculado será a soma do valor TEAC e FC de cada variável correspondente ao ensaio mostrado nas Tabelas 4 e 5.

3.4 MEDIDA TEAC

A atividade antioxidante determinada pelo método TEAC foi realizada de acordo com o procedimento proposto por Re *et al* (1999), usando o radical cátion ABTS⁺ acompanhando a absorbância a 750 nm, em espectrofotômetro

de micro placa (Biotrak- Molecular Devices, Sunny vale, CA) conforme adaptada por Silva *et al* (2007).

A solução estoque de ABTS^{•+} (7 mM) foi preparada em um balão volumétrico de 10mL em água ultra-pura, acrescentando 1mL de solução de persulfato de potássio (25,4mM) como agente oxidante. Esta solução deve ser mantida ao abrigo de luz por no mínimo 16 horas, para a formação total de radicais.

A solução de trabalho do ABTS^{•+} foi obtida diluindo a solução estoque em PBS 7,4 até atingir absorvância entre 0,39-0,42 (caminho óptico de 0,56cm).

A partir da solução estoque do trolox (40mM), preparada em PBS 7,4, realizou-se diluições com 5 concentrações diferentes de 4 μ M, 8 μ M, 12 μ M, 16 μ M, 20 μ M, para obter a curva de calibração.

Para a análise, 10 μ L de amostra previamente diluída em PBS 7,4, foi adicionada à microplaca e em seguida, adicionou-se 190 μ L de ABTS^{•+}, sendo a medida da absorvância feita a cada 12 segundos durante 6 minutos. A análise foi realizada em triplicata e o %CV máximo aceito foi de 12%.

Para a solução de PBS 7,4 prepara-se uma solução estoque de K₂HPO₄ (775M) e KH₂PO₄ (0,225 M) em água ultra pura. No dia da análise prepara-se a solução de trabalho, para tal deve-se transferir 25 mL de cada solução estoque em um balão de 250 mL, neste balão adicionar também 2,1915 g de NaCl (0,149 M) depois completar o volume com água ultra pura e verificar o pH.

Utilizou-se o cálculo da área sob a curva (AUC) de inibição da absorvância na medida TEAC, a diluição da amostra deve estar em uma faixa que gere uma porcentagem de inibição entre 20% e 80% da absorvância inicial. O cálculo AUC da amostra e do Trolox é mostrada na Equação 2 e ilustrada na Figura 8.

$$AUC = \left(\% Inb_{(t=0)} \times 0.5 + \sum_{i=2}^{36} \% Inb_{(t=10 \times i)} \right) \times 10 \quad \text{(Equação 2)}$$

Sendo % *Inb* a porcentagem de inibição no tempo *t* (s) e que é dada por:

$$\% Inb = \frac{A_{branco} - A_{amostra}}{A_{branco}} \times 100 \quad \text{(Equação 3)}$$

Finalmente, o resultado TEAC foi expresso em μM de Equivalente Trolox ($\mu\text{M TE}$) e foi calculado pela equação:

$$TEAC (\mu\text{M}_{ET}) = \frac{AUC \text{ Amostra}}{\alpha} * d \quad \text{(Equação 4)}$$

Onde: *d*: Fator de diluição; *AUC*: Área sob a curva; α : Coeficiente angular da reta de calibração do trolox.

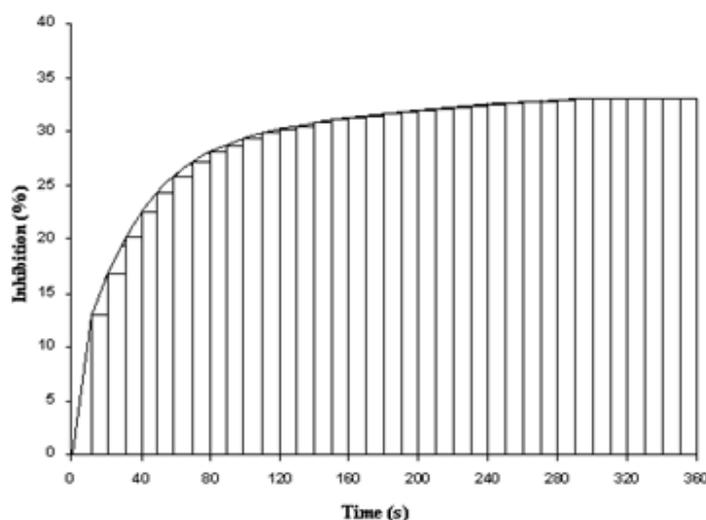


Figura 8. Evolução da porcentagem de inibição com tempo (s) e representação gráfica do cálculo de AUC .

3.5 MÉTODO DE FOLIN-CIOCALTEU

O conteúdo em polifenóis totais das amostras foi determinado pelo método colorimétrico de Folin-Ciocalteu descrito por Singleton; Rossi (1965). Este mesmo método é usado como atividade antioxidante em todas as misturas.

A mistura para a reação foi de: 250µL de amostra (água destilada para o branco), 125µL de solução de Folin-Ciocalteu 1N e 625 µL de carbonato de sódio (Na₂CO₃) a 75g/L. Após o período de incubação de 30 minutos, 200 µL foram repassados para os poços da microplaca (96 poços, transparente, Nalge Nunc International, Rochester, NY) e a absorbância lida a 750nm em espectrofotômetro BIOTRAK (Molecular Devices, Sunnyvale,CA). A análise foi realizada em triplicata e o %CV máximo foi de 12%.

O resultado foi calculado a partir da curva de calibração obtida com o ácido gálico e expresso em mM de Equivalentes Ácido Gálico (mM EAG).

3.6 TRATAMENTO ESTATÍSTICO E MATEMÁTICO

Os resultados obtidos foram submetidos a estudos de correlação, testes de diferenças de médias, análises de variância. Foram utilizados os programas Statistica Kernel Release 7.1 (StatSoft Inc., Tulsa, OK) for Windows e Excel Versão for Windows (Microsoft Corporation, 2003).

Os modelos matemáticos utilizados nos planos de misturas foram: o modelo linear, quadrático e cúbico especial (equação 5, 6 e 7), afim de descrever os dados experimentais.

Modelo Linear:

$$y = b_1 * x_1 + b_2 * x_2 + b_3 * x_3 \quad \text{(Equação 5)}$$

Modelo Quadrático:

$$y = b_1 * x_1 + b_2 * x_2 + b_3 * x_3 + b_{12} * x_1 * x_2 + b_{13} * x_1 * x_3 + b_{23} * x_2 * x_3 \quad \text{(Equação 6)}$$

Modelo cúbico especial:

$$y = b_1 * x_1 + b_2 * x_2 + b_3 * x_3 + b_{12} * x_1 * x_2 + b_{13} * x_1 * x_3 + b_{23} * x_2 * x_3 + b_{123} * x_1 * x_2 * x_3 \quad \text{(Equação 7)}$$

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS AMINOÁCIDOS E AÇÚCARES

A primeira etapa deste estudo visou conhecer a atividade antioxidante dos açúcares e aminoácidos isoladamente e a avaliar sua correlação com a concentração. Os aminoácidos foram diluídos isoladamente em água nas concentrações apresentadas na Tabela 2.

Dos componentes analisados, a glicose e sacarose não apresentaram atividade em nenhum dos métodos, sendo a frutose o único açúcar que apresentou atividade antioxidante. No entanto esta atividade foi observada apenas para o método FC (Figura 9). Entre os aminoácidos, somente o triptofano e a tirosina apresentaram atividade tanto pelo método TEAC quanto pelo FC (Figuras 10 e 11).

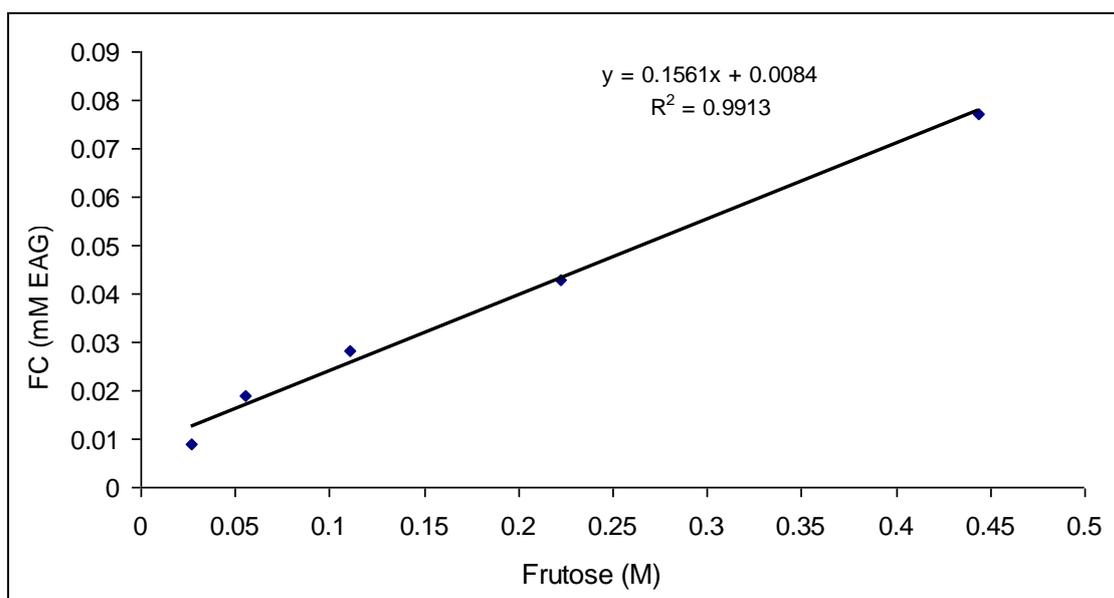


Figura 9. Evolução da atividade antioxidante da frutose pelo método de Folin-Ciocalteu em função de sua concentração.

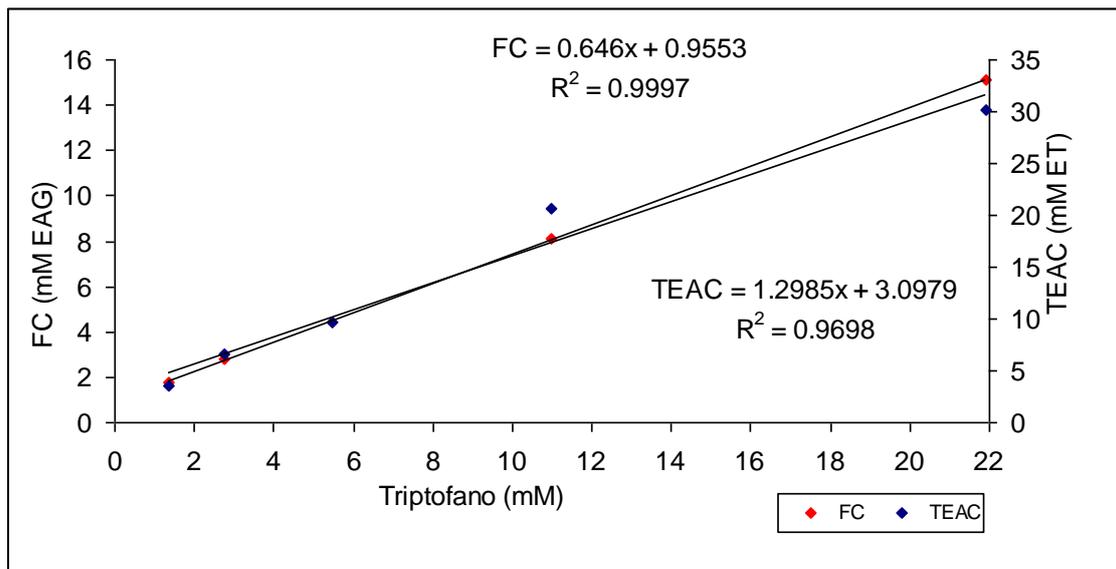


Figura 10. Evolução das atividades antioxidantes do triptofano pelos métodos de FC e TEAC em função de sua concentração.

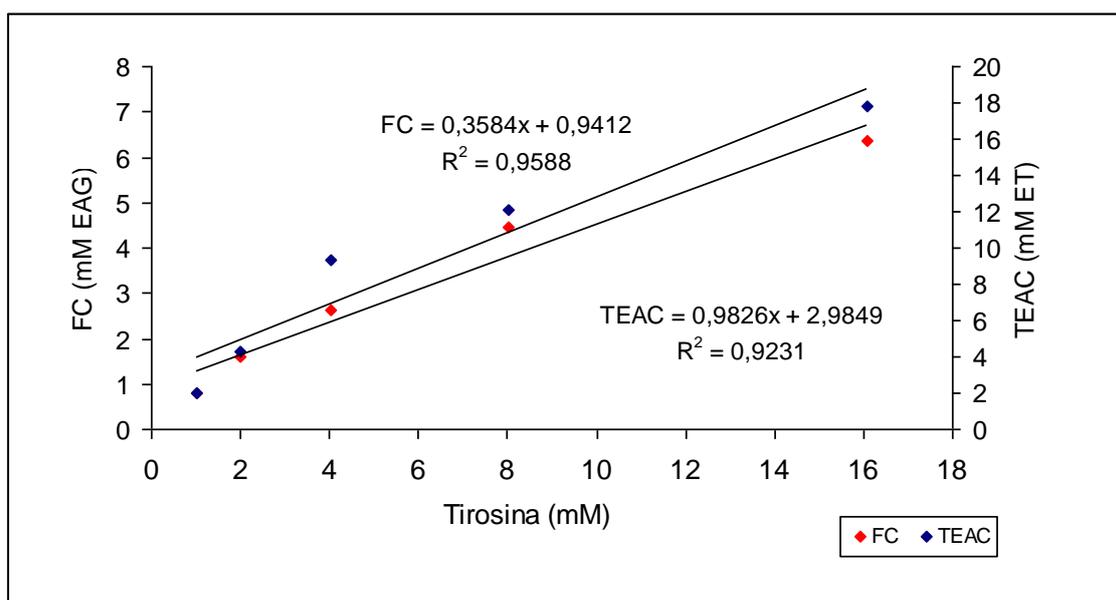


Figura 11. Evolução das atividades antioxidantes da tirosina pelos métodos de FC e TEAC em função de sua concentração.

Analisando os gráficos, percebe-se que a concentração dos compostos correlaciona-se linearmente com as duas atividades antioxidantes.

O motivo de a frutose ter sido o único açúcar a apresentar atividade antioxidante pode ser explicado pelo fato de ela ser um açúcar redutor e sendo o FC um método de oxirredução, a frutose pode ter a habilidade de doar um

elétron e o átomo de hidrogênio para estabilizar o radical. Entretanto, não foi observada atividade antioxidante para a glicose, o que mostra que não são todos os açúcares redutores que apresentam atividade antioxidante.

Uma possível explicação que pode ser levada em consideração é a estrutura dos açúcares, devendo a frutose ter maior facilidade em doar um elétron que a glicose (Figura 12).

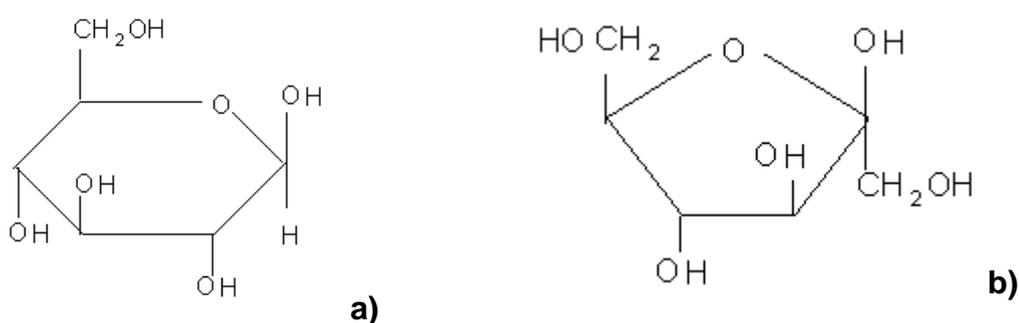


Figura 12. Estrutura da glicose (a) e frutose (b).

O fato de o triptofano e a tirosina serem os únicos aminoácidos a apresentarem atividade antioxidante pode ser explicado pelas suas estruturas químicas. O hidrogênio ligado ao nitrogênio do grupo pirol do triptofano é doado ao radical livre, estabilizando-o, enquanto que para a tirosina sua hidroxila pode atuar como doador de elétrons (Figura 13).

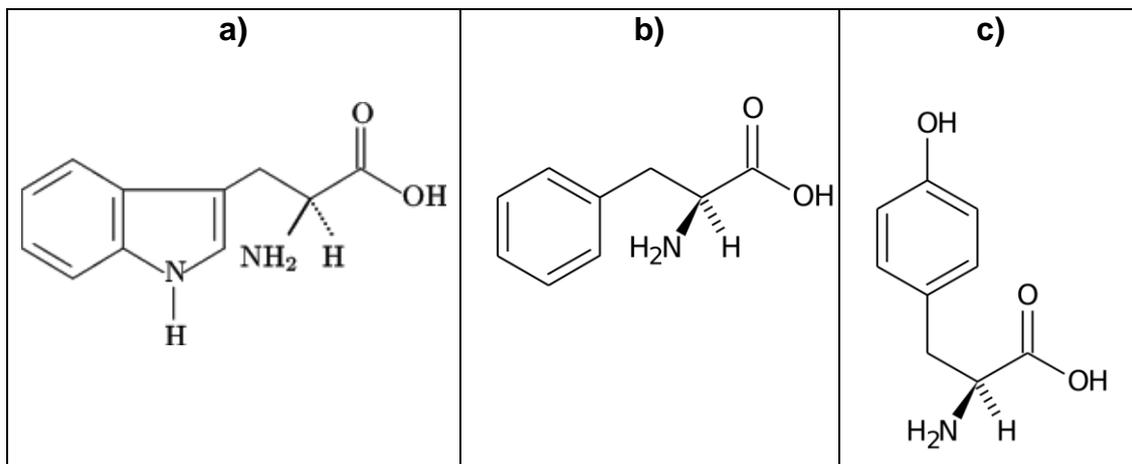


Figura 13. Estrutura dos aminoácidos a)Triptofano b) Fenilalanina c) Tirosina

O fato de a fenilalanina não possuir atividade antioxidante, mesmo sendo um aminoácido que participa da biossíntese dos polifenóis, pode ser devido à ausência de um grupo doador, como, por exemplo, uma hidroxila ligada ao anel benzênico.

Apesar de o triptofano e tirosina estarem em menor concentração em relação à frutose, a capacidade antioxidante em ambos os métodos foram maiores para os aminoácidos, devido à possível estabilização dos aminoácidos por ressonância eletrônica.

Enfim, esses resultados indicam que alguns aminoácidos e açúcares presentes em certos alimentos podem interferir nos métodos TEAC e FC, resultando em valores superestimados quando se quer imputar esta atividade aos fitoquímicos presentes. Pérez-Jiménez; Saura-Calixto (2006) analisando o efeito de alguns constituintes dos alimentos na atividade antioxidante (TEAC e ORAC) também encontraram que o triptofano isoladamente interfere no método TEAC, enquanto que a glicose isolada não apresenta qualquer valor, o que confirma o presente estudo.

Essas interferências de aminoácidos e açúcares estão presentes em matrizes alimentares como o mel (PEREZ *et al*, 2007).

4.2 ATIVIDADES ANTIOXIDANTES DOS AMINOÁCIDOS POR PLANO DE MISTURA

A Tabela 6 mostra os valores TEAC e FC das análises realizadas para o estudo de como os aminoácidos interagem entre eles na atividade antioxidante.

Tabela 6. Valores de TEAC e FC do plano de mistura dos aminoácidos.

Ensaio	Trip	Tyr	Phe	Met	TEAC (mM ET)	FC (mM EAG)
E1	1* (15,38)**	0	0	0	29,52	9,59
E2	0	1	0	0	27,74	9,79
E3	0	0	1	0	ND*	ND***
E4	0	0	0	1	ND	ND
E5	0,5 (7,69)	0,5	0	0	30,60	8,74
E6	0,5	0	0,5	0	33,43	4,95
E7	0,5	0	0	0,5	9,97	4,82
E8	0	0,5	0,5	0	11,66	4,57
E9	0	0,5	0	0,5	17,58	4,79
E10	0	0	0,5	0,5	ND	ND
E11	0,333 (5,12)	0,333	0,333	0	23,99	5,72
E12	0,333	0,333	0	0,333	21,29	6,13
E13	0,333	0	0,333	0,333	12,74	3,30
E14	0	0,333	0,333	0,333	13,21	3,01
E15.1	0,25 (3,84)	0,25	0,25	0,25	18,97	4,57
E15.2	0,25	0,25	0,25	0,25	18,39	4,18
E15.3	0,25	0,25	0,25	0,25	18,81	4,69
E16	0,625 (9,61)	0,125	0,125	0,125	31,28	7,05
E17	0,125 (1,92)	0,625	0,125	0,125	25,87	6,95
E18	0,125	0,125	0,625	0,125	11,28	4,54
E19	0,125	0,125	0,125	0,625	15,38	4,22

*Valores codificados **Valores reais (mM) ***ND: Não determinado

Os ensaios 3, 4 e 10 não puderam ser determinados nos dois métodos. Eles correspondem às condições em que tanto o triptofano quanto a tirosina não estão presentes. Os demais valores mostram, contudo, que a grande maioria dos aminoácidos isolados ou combinados apresenta capacidade antioxidante nos dois métodos, sendo que o triptofano e a tirosina apresentam maior capacidade antioxidante.

Na Tabela 7, estão apresentados os valores da Análise de Variância das misturas dos aminoácidos sobre os valores FC e TEAC para os três tipos de

modelos empregados em estudos de mistura: modelo linear, quadrático e cúbico parcial. Na tabela 8 esta análise de variância dos modelos significativos.

Tabela 7. ANOVA dos modelos ajustado aos valores de TEAC e FC do plano de mistura dos aminoácidos.

	SQ	GL	MQ	F	p	R-Sqr	R-Sqr ajustado
TEAC							
Linear	643.21	3	214.40	8.60	0.002	0.648	0.573
Quadrático	274.36	6	45.73	4.90	0.022	0.925	0.840
Cúbico parcial	37.80	4	9.45	1.02	0.491	0.963	0.842
Total ajustado	992.28	17	58.36				
FC							
Linear	62.13	3	20.71	41.04	0.000	0.898	0.876
Quadrático	4.84	6	0.81	2.90	0.083	0.968	0.932
Cúbico parcial	1.16	4	0.29	1.09	0.467	0.985	0.935
Total ajustado	69.20	17	4.07				

SQ: soma dos quadrado; GL: Graus de liberdade; MQ: Média dos quadrados

Tabela 8. ANOVA para o modelo quadrático ajustado aos valores de TEAC e modelo linear ajustado aos valores de FC do plano de mistura dos aminoácidos.

	SQ	GL	MQ	F	p
TEAC R²=0,925					
Modelo	917.58	9	101.95	10.92	0.001
Erro total	74.70	8	9.34		
Lack of fit	74.52	6	12.42	137.12	0.007
Erro puro	0.18	2	0.09		
Total ajustado	992.28	17	58.37		
FC R²=0,898					
Modelo	62.13	3	20.71	41.04	0.000
Erro total	7.07	14	0.50		
Lack of fit	6.93	12	0.58	8.36	0.112
Erro puro	0.14	2	0.07		
Total ajustado	69.20	17	4.07		

A análise de variância (Tabela 8) indica que o modelo linear proposto para o método FC apresenta bom ajuste para os dados experimentais através da não-significância do *lack of fit*, apesar do não tão elevado valor do coeficiente

de determinação ($R^2 = 0,898$), enquanto que para o método TEAC a significância do *lack of fit* indica que o modelo quadrático (Tabela 7) não apresenta bom ajuste para os dados experimentais (Tabela 8). A análise foi realizada utilizando o modelo quadrático por apresentar o maior coeficiente de determinação ($R^2 = 0,925$). A falta de ajuste pode ter ocorrido devido ao fato de não serem apresentados os dados dos ensaios 3 (fenilalanina), 4 (metionina) e 10 (fenilalanina e metionina 1:1) e os baixos desvios padrão das replicatas do ponto central. Entretanto, como este teste de *lack of fit* é um teste muito restritivo para explicar a adequação do modelo, por este motivo foi realizada a análise de resíduos (Figura 14).

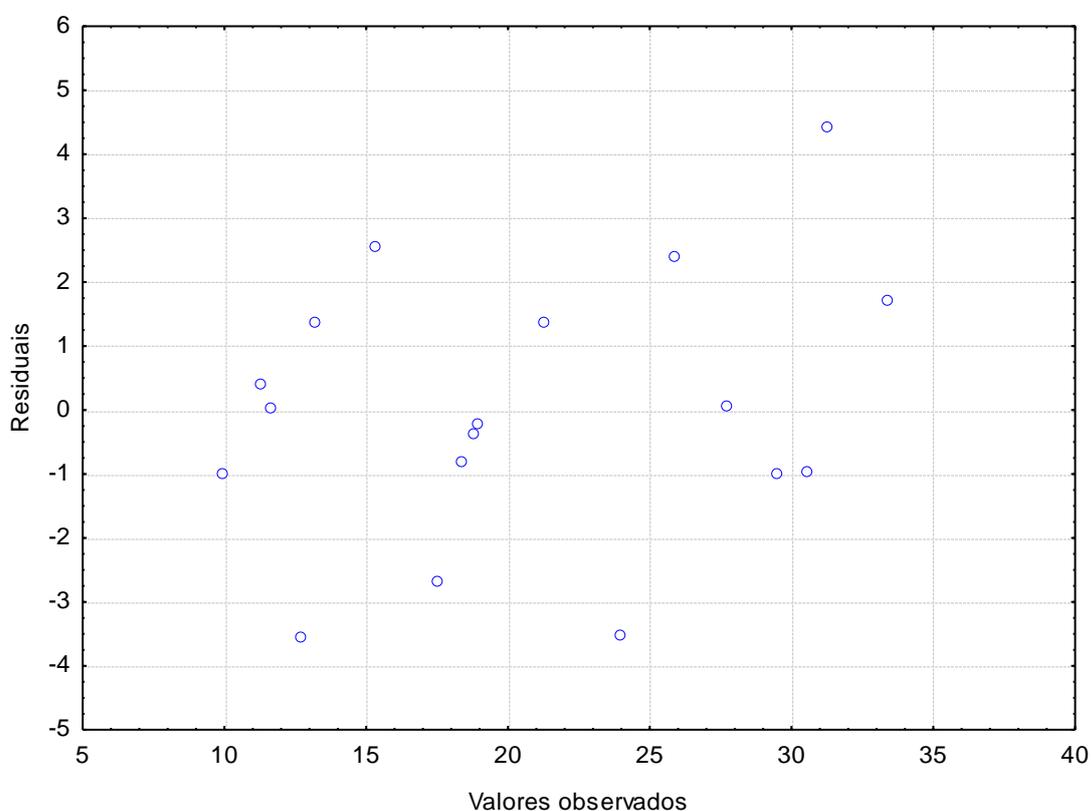


Figura 14. Análise de resíduos para o modelo quadrático ajustado aos valores de TEAC.

A análise mostra que os valores estão bem distribuídos e não tendencioso o que permite validar os resultados obtidos; no entanto, o modelo quadrático só permite que os valores sejam preditos dentro do domínio experimental.

A Tabela 9 mostra os coeficientes de regressão dos aminoácidos sobre o valor das atividades antioxidantes FC e TEAC.

Tabela 9. Coeficientes de regressão do plano de mistura dos aminoácidos sobre o valor de TEAC e FC.

	Coeficiente	Erro padrão	t	p
TEAC				
(A) Triptofano	30.53	2.95	10.35	0.000
(B) Tirosina	27.70	2.95	9.39	0.000
(C) Fenilalanina	-6.07	11.10	-0.55	0.599
(D) Metionina	13.76	11.10	1.24	0.250
AB	9.89	13.23	0.75	0.476
AC	77.944	24.39	3.20	0.013
AD	-44.69	24.39	-1.83	0.104
BC	3.31	24.39	0.14	0.895
BD	-1.83	24.39	-0.07	0.942
CD	-1.07	29.37	-0.04	0.972
FC				
(A) Triptofano	8.99	0.50	17.90	0.000
(B) Tirosina	8.91	0.50	17.73	0.000
(C) Fenilalanina	1.00	0.70	1.43	0.175
(D) Metionina	1.02	0.70	1.46	0.167

*Os coeficientes referem-se a uma variação normalizados de 1 equivalente a uma adição total de 15,38mM do referido composto.

A análise confirma que pelos métodos TEAC e FC os aminoácidos triptofano e tirosina apresentaram efeito estatisticamente significativo ($p < 0,001$) sobre a capacidade antioxidante, enquanto que a fenilalanina e a metionina não mostraram efeito. Para o método TEAC um efeito positivo de interação entre triptofano e Fenilalanina (AC) foi detectado ($p < 0,05$).

A contribuição do triptofano e tirosina na capacidade antioxidante mostra que uma concentração de 15,38 mM destes aminoácidos contribui para o aumento do valor TEAC em 30,526 mM ET e 27,697 mM ET, respectivamente. No método FC este aumento é na ordem de 8,994 mM EAG e 8,911 mM EAG para o triptofano e tirosina, respectivamente.

Vale ressaltar que estes valores de coeficientes são valores comparados com padrões de referências, ou seja, padrões com alta atividade antioxidante.

Meucci e Mele (1997) também verificaram que os aminoácidos triptofano, tirosina, cisteína e homocisteína apresentaram capacidade antioxidante pelo método TEAC. Além deste, vários trabalhos semelhantes vêm mostrando a capacidade antioxidante de aminoácidos e peptídeos (PIHLANTO, 2006; PEREZ-JIMENEZ, SAURA-CALIXTO, 2006), como as proteínas/peptídeos encontradas nos ovos, leite entre outras fontes alimentares (PIHLANTO, 2006; DÁVALOS; BARTOLOMÉ, LÓPEZ-FANDINO, 2004). No entanto, o mecanismo antioxidante e as propriedades antioxidantes não são conhecidos.

4.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS AMINOÁCIDOS POR PLANO DE MISTURA EM PRESENÇA DE COMPOSTOS FENÓLICOS

4.3.1 Capacidade antioxidante do plano de mistura

Após a análise dos ensaios com os aminoácidos isolados e combinados, realizaram-se os ensaios com as misturas de aminoácidos diluídos em solução de padrões de CFs. Os dados das atividades antioxidantes nestes ensaios estão apresentados na Tabela 10. Conforme mencionado, para a análise da capacidade antioxidante pelo programa STATISTICA, é descontado em cada ensaio a contribuição da capacidade da mistura de padrões de CFs, com isso se obtém a real contribuição de cada aminoácido. A comparação deste resultado com os valores da capacidade antioxidante dos aminoácidos isolados (Tópico 4.2) permite avaliar se há uma interação entre os compostos fenólicos e os aminoácidos.

Tabela 10. Valores de FC e TEAC para o plano de mistura dos ensaios de aminoácidos diluídos em mistura de padrões de CFS (catequina, ácido gálico, ácido ferrúlico e rutina)

Ensaio	Trp	Tir	Phe	Met	FC (mM EAG)		TEAC (mM ET)	
					Adicionado CF	Descontado CF	Adicionado CF	Descontado CF
E1	1* (15,38)**	0	0	0	24.14	10.65	69.00	28.25
E2	0	1	0	0	23.48	9.99	64.73	23.99
E3	0	0	1	0	14.71	1.23	47.61	6.87
E4	0	0	0	1	14.97	1.48	43.33	2.58
E5	0,5 (7,69)	0,5	0	0	23.18	9.69	66.96	26.22
E6	0,5	0	0,5	0	19.28	5.80	60.27	19.52
E7	0,5	0	0	0,5	18.88	5.40	44.79	4.05
E8	0	0,5	0,5	0	20.54	7.06	47.74	7.00
E9	0	0,5	0	0,5	20.21	6.73	47.90	7.16
E10	0	0	0,5	0,5	13.66	0.18	41.44	0.70
E11	0,33 (5,12)	0,33	0,33	0	21.62	8.14	51.66	10.92
E12	0,33	0,33	0	0,33	20.77	7.28	59.66	18.92
E13	0,33	0	0,33	0,33	16.81	3.32	45.89	5.15
E14	0	0,33	0,33	0,33	18.48	5.00	44.21	3.47
15	0,25 (3,84)	0,25	0,25	0,25	19.49	6.00	52.22	11.47
E15.1	0,25	0,25	0,25	0,25	19.33	5.85	54.76	14.02
E15.2	0,25	0,25	0,25	0,25	20.24	6.75	52.03	11.29
E16	0,625 (9,61)	0,125	0,125	0,125	19.79	6.30	66.37	25.63
E17	0,125 (1,92)	0,625	0,125	0,125	21.97	8.49	59.29	18.55
E18	0,125	0,125	0,625	0,125	18.20	4.72	55.90	15.16
E19	0,125	0,125	0,125	0,625	17.33	3.84	43.58	2.84
Mistura de CF						13,48		40,74

* Valores codificados ** Valores reais (mM)

As Tabelas 11 e 12 apresentam respectivamente ANOVAs e os coeficientes de regressão do plano de mistura dos aminoácidos sobre o valor da atividade antioxidante. Lembrando que a toda a análise estatística deste tópico foi realizada considerando o valor dos ensaios descontado da mistura de padrões de CFs.

A análise de variância foi realizada apenas para o modelo linear por ser o único modelo significativo e com bom ajuste aos dados experimentais.

Tabela 11. ANOVA para o modelo linear ajustado aos valores de TEAC e FC do plano de mistura dos aminoácidos diluídos na mistura de padrões de compostos fenólicos.

	SQ	GL	MQ	F	p
TEAC $R^2=0,7686$					
Modelo	1161.06	3	387.02	18.83	0.000
Erro total	349.39	17	20.55		
Lack of fit	344.73	15	22.98	9.87	0.096
Erro puro	4.66	2	2.33		
Total ajustado	1510.45	20	75.52		
FC $R^2=0,9339$					
Modelo	147.27	3	49.09	79.91	0.000
Erro total	10.44	17	0.61		
Lack of fit	9.97	15	0.66	2.83	0.292
Erro puro	0.47	2	0.23		
Total ajustado	157.71	20	7.89		

Tabela 12. Coeficientes de regressão do plano de mistura dos aminoácidos diluídos na mistura de padrões de compostos fenólicos sobre o valor de TEAC e FC.

*

	Coeficiente	Erro padrão	t	p
TEAC				
(A) Triptofano	27.96	3.04	9.19	0.000
(B) Tirosina	20.93	3.04	6.88	0.000
(C) Fenilalanina	4.82	3.04	1.59	0.131
(D) Metionina	-3.47	3.04	-1.14	0.270
FC				
(A) Triptofano	9.71	0.53	18.46	0.000
(B) Tirosina	10.94	0.53	20.79	0.000
(C) Fenilalanina	1.70	0.53	3.23	0.005
(D) Metionina	1.25	0.53	2.38	0.029

Os coeficientes referem-se a uma variação normalizados de 1, equivalente a uma adição total de 15,38mM do referido composto

Para o método TEAC é observado que os aminoácidos triptofano e tirosina são os únicos a apresentarem efeito sobre a capacidade antioxidante, mesmo resultado obtido para a análise dos aminoácidos isolados (Tabela 9). Comparando os resultados dos dois planejamentos (Tabela 9 e Tabela 12), observa-se que os valores dos coeficientes para o planejamento com padrões de CFs são menores que os coeficientes da análise dos aminoácidos isolados. Essa diminuição do coeficiente quando há presença dos padrões de CFs aponta uma possível interação negativa entre os aminoácidos e os CFs.

Para o método de FC é observado que todos os aminoácidos apresentam uma contribuição estatisticamente significativa na capacidade antioxidante. Observa-se que 15,35 mM destes aminoácidos contribuem para um valor FC de 9,71 mM EAG e 10,93 mM EAG, para o triptofano e tirosina, respectivamente. Estes valores são um pouco maiores que os obtidos para o planejamento com aminoácidos isolados (Tabela 9, pág. 53), indicando uma possível interação aditiva entre os aminoácidos e os CFs no método de FC.

A concentração de 15,38 mM de fenilalanina e metionina aumentam em 1,70 mM EAG e 1,25 mM de EAG, respectivamente. Como mencionado, pode haver interação entre aminoácidos e CFs, o que leva a crer que esta capacidade

antioxidante não é resultado desses aminoácidos em si, mas oriunda da interação desses com os compostos fenólicos.

A partir desses resultados, é possível afirmar que os aminoácidos triptofano e tirosina de fato, apresentam atividade antioxidante, enquanto que a fenilalanina e metionina apresentam uma leve interação com os polifenóis.

Em trabalhos desenvolvidos por Dávalos, Bartolomé e López-Fandino (2004) com peptídeos de ovos, os quatro aminoácidos (Trp, Tyr, Phe, Met) são citados por apresentar atividade antioxidante, muito embora esse estudo não tenha tratado de aminoácidos livres.

Os trabalhos relacionados a esta interação dos CFs com componentes dos alimentos estudam, principalmente, o turvamento e a precipitação decorrentes da interação com proteínas (ricas em prolina). Apenas alguns poucos trabalhos mostram como a interação afeta a atividade antioxidante. Todos esses trabalhos, no entanto, se limitam à interação proteína-CF, não havendo estudos com aminoácido.

Entre os poucos trabalhos que abordam a interação CF-proteína na atividade antioxidante, está o de Rohn, Rawel, Kroll (2004) que estudaram a influência, na atividade antioxidante TEAC, da interação entre quercetina e Albumina Bovina Sérica (BSA). Eles verificaram que o grau de derivatização (ligação covalente da quercetina a BSA antes das medidas de capacidade antioxidante) modifica significativamente a capacidade antioxidante. Uma diminuição nas ligações covalentes quercetina-BSA (derivatização) reduz a atividade antioxidante dos derivados de BSA-quercetina.

Nesses estudos com proteína, Rohn, Rawel, Kroll (2004) mostram um mecanismo de reação como a possível explicação para a capacidade antioxidante dos derivados de BSA-quercetina, conforme Figura 15.

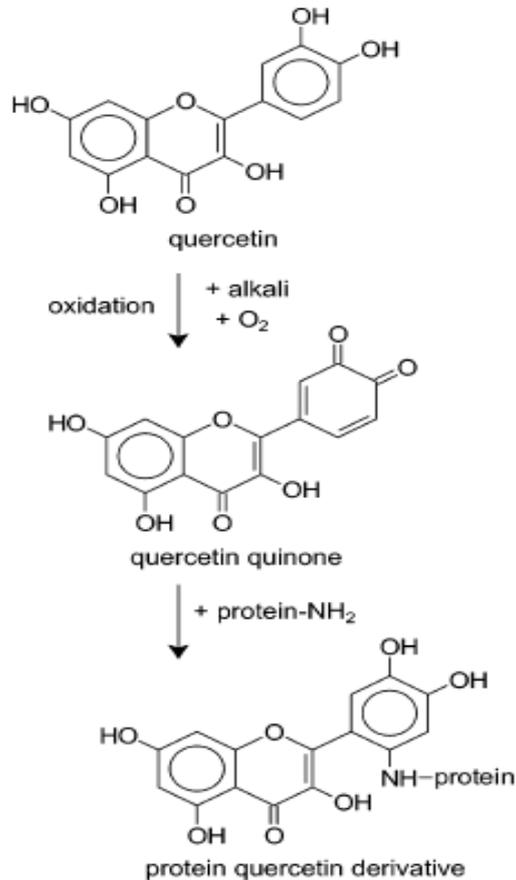


Figura 15. Reação da quercetina com grupo (s) de aminoácidos de proteína (s) após a formação de quinona.

De acordo com o esquema proposto, o primeiro passo é a oxidação da quercetina à respectiva quinona, em meio alcalino e em presença de oxigênio. A reação desta quinona com as cadeias laterais nucleofílica das proteínas, como a lisina, cisteína e, triptofano irá conduzir a um derivado proteína-fenol. Este derivado formado é, por sua vez, um potencial antioxidante, devido à sua capacidade de tornar-se um radical livre, podendo capturar mais radicais ABTS^{•+}. No entanto, quando esta ligação levar à formação de polímeros (precipitados), a capacidade antioxidante é diminuída. O impedimento estérico também é responsável pela diminuição da reatividade com os radicais ABTS^{•+}.

Guardadas as diferenças entre proteínas e aminoácidos, este esquema pode explicar o fato de o método de FC apresentar uma interação aditiva, pois este método apresenta as condições necessárias (pH alcalino) para a formação das quinonas e posterior reação com o aminoácido.

Outro tipo de ligação que pode ocorrer na interação dos compostos fenólicos e proteínas é a ligação hidrofóbica. Charlton *et al.* (2002) mostraram que esta ligação pode ocorrer na fase inicial da interação. Ela ocorre com a parte hidrofóbica do anel aromático dos CFs e no caso específico da prolina, ocorrerá com o anel piperidina (Figura 4). Por ser uma ligação fraca, ela não contribui facilmente à saída de hidrogênios para estabilizar os radicais livres.

Estas duas ligações, covalente e hidrofóbica, entre outras, podem ocorrer de forma paralela. No entanto, podemos sugerir que a ligação covalente, que favorece o aumento da atividade antioxidante (desde que não haja formação de precipitados) deva ocorrer no método FC, pois se percebe que os valores FC com CFs são maiores. Além disso, o estudo do mascaramento (4.3.2) mostra mais valores positivos que negativos. No caso do método TEAC, o qual apontou para uma diminuição da capacidade antioxidante quando há presença de aminoácidos e CFs, podemos supor que este método seria mais propício ao tipo de ligação hidrofóbica devido ocorrer em valores de pH neutro e apresentar menores valores na presença de CF.

4.3.2 Efeito do mascaramento

O efeito do mascaramento é um conceito que também pode explicar a influência dos aminoácidos e CFs na capacidade antioxidante e foi levado em consideração para avaliar a interferência dos aminoácidos na capacidade antioxidante. O efeito deste mascaramento pode ser observado na Tabela 13.

Tabela 13. Resultados do mascaramento da capacidade antioxidante no TEAC e FC.

Ensaio	Trp	Tyr	Phe	Met	Valor experimental (mM)		Valor calculado (mM)		Mascaramento (%)	
					TEAC	FC	TEAC	FC	TEAC	FC
E1	1* (15,38)**	0	0	0	69.00	24.14	70.26	23.08	-1.84	4.50
E2	0	1	0	0	64.73	23.48	68.48	23.28	-5.80	0.86
E3	0	0	1	0	47.61	14.71	40.78	13.48	14.36	8.73
E4	0	0	0	1	43.33	14.97	40.76	13.48	5.93	10.41
E5	0,5 (7,69)	0,5	0	0	66.96	23.18	71.34	22.22	-6.54	4.20
E6	0,5	0	0,5	0	60.27	19.28	74.17	18.44	-23.07	4.48
E7	0,5	0	0	0,5	44.79	18.88	50.71	18.30	-13.21	3.11
E8	0	0,5	0,5	0	47.74	20.54	52.40	18.05	-9.78	12.88
E9	0	0,5	0	0,5	47.90	20.21	58.32	18.27	-21.75	10.09
E10	0	0	0,5	0,5	41.44	13.66	40.78	13.48	1.60	1.30
E11	0,33 (5,12)	0,33	0,33	0	51.66	21.62	64.73	19.21	-25.30	11.81
E12	0,33	0,33	0	0,33	59.66	20.77	62.03	19.61	-3.96	5.72
E13	0,33	0	0,33	0,33	45.89	16.81	53.48	16.78	-16.55	0.15
E14	0	0,33	0,33	0,33	44.21	18.48	53.95	16.50	-22.02	11.34
E15	0,25 (3,84)	0,25	0,25	0,25	52.22	19.49	59.71	18.05	-14.35	7.63
E15.1	0,25	0,25	0,25	0,25	54.76	19.33	59.13	17.67	-7.97	9.00
E15.2	0,25	0,25	0,25	0,25	52.03	20.24	59.55	18.17	-14.46	10.76
E16	0,625 (9,61)	0,125	0,125	0,125	66.37	19.79	72.02	20.53	-8.52	-3.70
E17	0,125 (1,92)	0,625	0,125	0,125	59.29	21.97	66.61	20.43	-12.35	7.26
E18	0,125	0,125	0,625	0,125	55.90	18.20	52.02	18.02	6.95	1.02
E19	0,125	0,125	0,125	0,625	43.58	17.33	56.12	17.70	-28.76	-2.15
Mistura de padrões de CF					40,74	13,48				

* Valores codificados ** Valores reais (mM)

O valor calculado foi obtido pela soma dos valores apresentados nos ensaios do plano de mistura dos aminoácidos (Tabela 6) com o valor experimental da solução padrão de compostos fenólicos (apresentado na última linha da Tabela 13). Em seguida, é calculado o valor do mascaramento de acordo com a equação 1.

A solução de mistura de padrões de CFs apresentou valor de FC e TEAC de 13,48 e 40,74 mM, respectivamente. Percebe-se que para o FC, a maioria dos valores do mascaramento foi positiva, ou seja, o valor experimental foi maior que o valor calculado, isso indica que a mistura de polifenóis e aminoácidos aumenta a atividade antioxidante. No TEAC o mascaramento apresentou mais valores negativos, indicando que a mistura diminui a atividade antioxidante.

O que pode explicar este fato é o pH utilizado em cada método, pois o valor do pH além de influenciar na interação aminoácido e CFs como mencionado, também tem forte influencia na estrutura do aminoácido. Em pH neutro, as moléculas de aminoácidos podem existir em sua maioria na forma ionizada, em que o grupo amina se encontra protonado ($-\text{NH}_3^+$) e o ácido carboxílico desprotonado a carboxilato ($-\text{COO}^-$). Em pH alcalino, o grupo amina estará na forma desprotonada. Como o método de FC ocorre em pH alcalino (pH ~10), neste pH a estrutura do aminoácido permite menor repulsão entre o aminoácido e o composto fenólico, o que facilita uma interação entre o aminoácido e os CFs e, como mencionado (Figura 15), esta interação pode levar a um valor aditivo na capacidade antioxidante, o que pode explicar os valores de mascaramento positivos para o método de FC.

Além disso, deve-se lembrar, que a análise de FC foi utilizada por alguns anos para a quantificação de aminoácidos, principalmente, triptofano e tirosina e atualmente é um método muito utilizado para quantificação de CFs. Uma vez que este método quantifica tanto aminoácido quanto CFs, espera-se uma correlação entre a concentração destes componentes e o valor de FC, o que contribui para que este método apresente menores valores de mascaramento.

É notado também que o FC apresenta menor mascaramento, sendo que o valor máximo é de 12,9%, bem inferior (em valores absolutos) ao encontrado para o

TEAC que foi de 25,1%. Ressalta-se que o erro experimental permitido para estes métodos é de 12%, além disso, os ensaios de aminoácidos isolados foram preparados em dias diferentes, logo esta diferença pode ser proveniente de diferenças desde a pesagem, diluição, erro experimental até ser realmente resultado do mascaramento. Em outras palavras, parte deste mascaramento pode ser atribuída à variabilidade experimental.

Pérez-Jiménez; Saura-Calixto (2006) analisando a interferência de nutrientes na capacidade antioxidante de mistura de padrões fenólicos (catequina:ácido gálico), pelos métodos TEAC e ORAC encontraram efeito aditivo na capacidade antioxidante da mistura quando adicionada de nutrientes, principalmente com relação ao triptofano.

Embora tenham trabalhado com proteínas, e o presente trabalho lide com os aminoácidos, Arts *et al.* (2002) verificaram que a capacidade antioxidante da catequina isolada foi maior que qualquer combinação com proteína. Estes autores também verificaram que a capacidade antioxidante TEAC foi mascarada em 31,4% pela interação entre chá verde e β -caseína. Neste mesmo trabalho, a combinação da catequina com quatro proteínas diferentes (albumina, α , β e κ -caseína) também foi avaliada, sendo que o mascaramento foi maior com albumina e β -caseína.

Enfim, os resultados de mascaramento pelo método de FC, aliado a inexistência de interações significativas entre os aminoácidos, sugerem a idéia de descontar a interferência dos aminoácidos na análise de FC com padrões de CFs, a fim de obter o valor proximal da contribuição dos compostos fenólicos presentes. Tal discussão será mais investigada no tópico seguinte.

Outro fato que se constata, é que o efeito de mascaramento proposto por Arts, Haenen, Voss, Bast, 2001 pode ser o equivalente do efeito aditivo proposto por HEO *et al.*, 2007.

4.4 ANÁLISE DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTES DE MISTURAS DE AMINOÁCIDOS, AÇÚCARES E PADRÕES DE CFs

4.4.1 Capacidade antioxidante do plano fatorial fracionário com padrões de compostos fenólicos

Após a análise, por plano de mistura, da interferência dos aminoácidos na atividade antioxidante, avaliou-se esta interferência entre aminoácidos, padrões de CFs e açúcares. Este estudo utilizou o planejamento fatorial fracionário (tipo Box-Behnken), que permite avaliar a importância dos efeitos das variáveis sobre a resposta, sendo que o tipo fracionário reduz à metade o número de ensaios que seriam necessários se utilizado um planejamento completo.

Nesta primeira etapa as variáveis utilizadas foram os aminoácidos, mistura de padrões de CFs e açúcares. O resultado destas análises está exposto na Tabela 14.

Tabela 14. Valores de TEAC e FC para a análise do plano fatorial fracionário de aminoácidos, açúcares e padrões de CFs.

Ensaio	Aminoácido	Açúcar	CFs	TEAC (mM ET)	FC (mM EAG)
E1	-1*	-1	0	32.08	14.85
E2	1	-1	0	42.73	16.32
E3	-1	1	0	37.46	15.15
E4	1	1	0	38.24	17.53
E5	-1	0	-1	20.15	7.93
E6	1	0	-1	34.48	10.61
E7	-1	0	1	43.55	20.87
E8	1	0	1	47.75	23.74
E9	0	-1	-1	20.89	9.99
E10	0	1	-1	31.47	10.13
E11	0	-1	1	52.46	22.97
E12	0	1	1	53.40	23.40
E13	0	0	0	33.12	16.66
E13.1	0	0	0	32.81	16.96
E13.2	0	0	0	35.16	17.59

*valores codificados

As Tabelas 15 e 16 apresentam, respectivamente, as ANOVAs e os coeficientes de regressão do plano fatorial fracionário.

Tabela 15. ANOVA para os valores de TEAC e FC do plano fatorial fracionário dos aminoácidos, açúcares e padrões de CFs.

	SQ	GL	MQ	F	p
TEAC					
(1) Aminoácido (L)	112,15	1	112,15	55,19	0,018
Aminoácido (Q)	0,56	1	0,56	0,27	0,653
(2) Açúcar (L)	19,26	1	19,26	9,48	0,091
Açúcar (Q)	44,31	1	44,31	21,81	0,043
(3) Padrões de CF (L)	1016,37	1	1016,37	500,18	0,002
Padrões de CF (Q)	19,76	1	19,76	9,72	0,089
1L x 2L	24,32	1	24,32	11,97	0,074
1 L x 3L	25,64	1	25,64	12,62	0,071
2L x 3L	23,21	1	23,21	11,42	0,078
Lack of fit	55,82	3	18,61	9,16	0,100
Error	4,06	2	2,03		
Total SS	1340,71	14			
FC					
(1) Aminoácido (L)	11,02	1	11,02	48,13	0,020
Aminoácido (Q)	3,48	1	3,48	15,18	0,060
(2) Açúcar (L)	0,54	1	0,54	2,35	0,265
Açúcar (Q)	0,07	1	0,07	0,3	0,637
(3) Padrões de CF (L)	342,1	1	342,1	1493,5	0,000
Padrões de CF (Q)	0,35	1	0,35	1,54	0,341
1L x 2L	0,2	1	0,2	0,89	0,445
1 L x 3L	0,01	1	0,01	0,04	0,865
2L x 3L	0,02	1	0,02	0,1	0,783
Lack of fit	0,47	3	0,16	0,69	0,639
Erro	0,46	2	0,23		
Total SS	358,48	14			

L-linear; Q- Quadrático

Tabela 16. Efeitos e coeficientes de regressão para os valores de TEAC e FC do plano fatorial fracionário dos aminoácidos, açúcares e padrões de CF.

	Efeito	Erro padrão	t	p	coeficiente
TEAC					
Mean/Interc.	37,89	0,41	92,07	0.000	37,89
(1) Aminoácido (L)	7,49	1,01	7,43	0.018	3,74
Aminoácido (Q)	-0,39	0,74	-0,52	0.653	-0,19
(2) Açúcar (L)	3,1	1,01	3,08	0.091	1,55
Açúcar (Q)	-3,46	0,74	-4,67	0.043	-1,73
(3) Padrões de CF (L)	22,54	1,01	22,36	0.002	11,27
Padrões de CF (Q)	-2,31	0,74	-3,12	0.089	-1,16
1L x 2L	-4,93	1,43	-3,46	0.074	-2,47
1 L x 3L	-5,06	1,43	-3,55	0.071	-2,53
2L x 3L	-4.82	1.43	-3.38	0.078	-2.41
FC					
Mean/Interc.	16,12	0,14	116,72	0.000	16,12
(1) Aminoácido (L)	2,35	0,34	6,94	0.020	1,17
Aminoácido (Q)	0,97	0,25	3,9	0.060	0,49
(2) Açúcar (L)	0,52	0,34	1,53	0.265	0,26
Açúcar (Q)	0,14	0,25	0,55	0.637	0,07
(3) Padrões de CF (L)	13,08	0,34	38,65	0.001	6,54
Padrões de CF (Q)	0,31	0,25	1,24	0.341	0,15
1L x 2L	0,45	0,48	0,94	0.445	0,23
1 L x 3L	0,09	0,48	0,19	0.865	0,05
2L x 3L	0,15	0,48	0,31	0.783	0,08

L-linear; Q- Quadrático

A análise de variância indica que o modelo linear e quadrático proposto para as variáveis nos métodos FC e TEAC apresentam bom ajuste para os dados experimentais através da não-significância do *lack of fit* (Tabela 15). Em planejamento fracionário, este efeito quadrático indica que a capacidade antioxidante passa por um ponto de máximo (ou de mínimo) a partir do qual o valor pode decrescer (ou crescer). No entanto, se o efeito linear possuir maior influência na resposta (no presente caso, a capacidade antioxidante), o efeito quadrático pode ser negligenciável.

A análise dos efeitos e dos coeficientes para o método de FC mostra que a mistura de padrões de CFs foi a variável que apresentou o maior efeito linear, com aumento de 13,08 mM EAG sobre a capacidade antioxidante, enquanto que o aminoácido teve esse efeito em torno de 6 vezes menor (2,32 mM EAG). O açúcar não apresentou qualquer efeito significativo neste método.

No método TEAC, o aminoácido e os padrões de CFs também apresentaram efeito linear estatisticamente significativo, sendo novamente os padrões de CFs com valores bem superior (3 vezes) ao aminoácido. Neste método, também foi observado que açúcar apresentou um efeito quadrático, no entanto, nota-se pelo gráfico de pareto (Figura 16) que o efeito desta variável sobre a resposta é menor que o aminoácido e os padrões de CFs. Além disso, o valor de p desta variável foi bem próximo ao limite mínimo de significância ($p < 0,05$), o que minimiza o efeito desta variável na capacidade antioxidante.

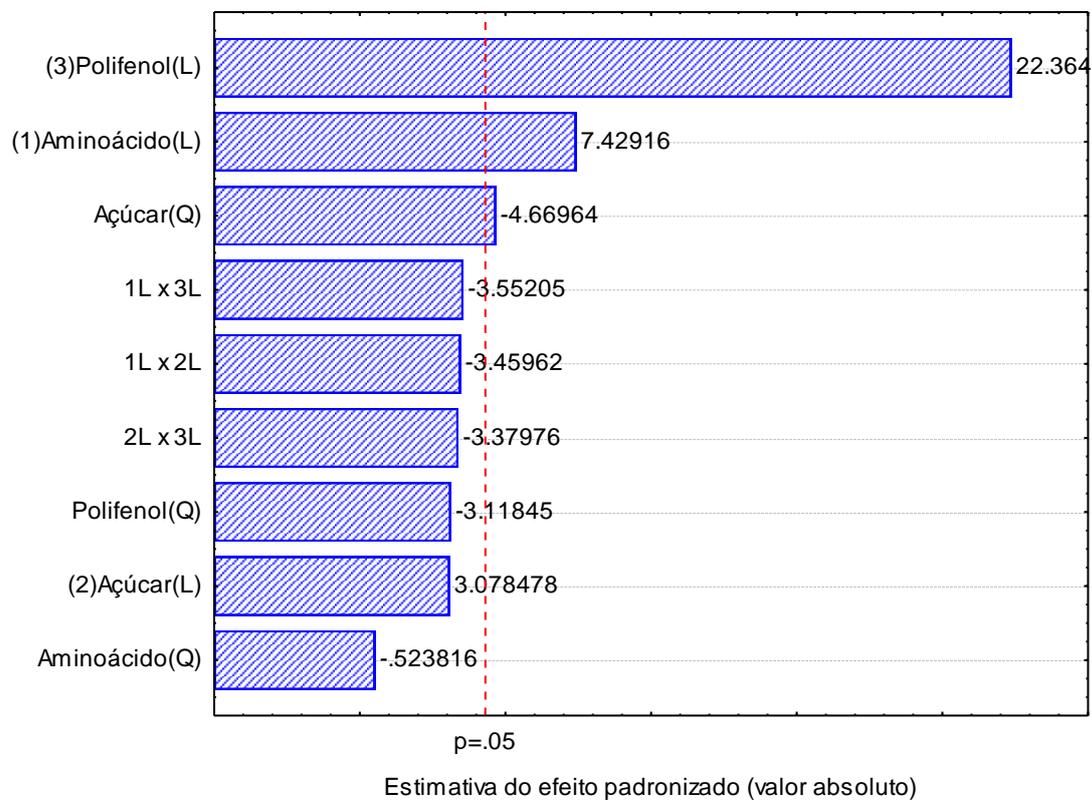


Figura 16. Gráfico de pareto para os coeficientes de regressão do plano fatorial fracionário dos aminoácidos, açúcares e mistura de padrões de CFs sobre a resposta TEAC. (a linha tracejada delimita o nível de significância)

O açúcar, mesmo estando em concentração largamente superior à mistura de padrões de CFs, apresenta pouca influência sobre a capacidade antioxidante.

4.4.2 Efeito do mascaramento

O primeiro passo para o cálculo do mascaramento é obter a capacidade antioxidante calculada (CAO_{calc}) para cada ensaio. Esta é obtida a partir da soma dos valores de cada componente isolado (ver Tabela 17) que corresponde ao valor codificado do ensaio (Tabela 18, colunas 2, 3 e 4). Por exemplo, para o ensaio E1 da Tabela 18 correspondente aos níveis -1, -1 e 0, do aminoácido, açúcar e CFs, respectivamente, soma-se o valor FC ou TEAC de cada um destes componentes mostrado na Tabela 17. Assim, para o TEAC, temos: $E1 = 34,20 \rightarrow 2,80 + 0 + 31,40$; para o FC: $E1 = 14,90 \rightarrow 1,13 + 0 + 13,78$. De posse do valor calculado, calcula-se o mascaramento conforme a Equação 1.

Os valores calculados e mascaramento dos métodos FC e TEAC podem ser observados na Tabela 18.

Tabela 17. Capacidade antioxidante das variáveis do planejamento fatorial, tomados isoladamente, avaliados para os métodos FC e TEAC.

Valores codificados	Valores FC das variáveis (mM EAG)			Valores TEAC das variáveis (mM ET)		
	Aminoácidos	Açúcares	CFs	Aminoácidos	Açúcares	CFs
-1	1,13	ND*	6,41	2,80	ND	14,80
0	2,03	ND	13,78	6,20	ND	31,40
1	3,23	ND	20,76	10,61	ND	46,21

*ND- Não determinado

Tabela 18. Efeito do mascaramento na atividade antioxidante do plano fatorial fracionário dos aminoácidos, açúcares e padrões de CFs.

Ensaio	aminoácido	açúcar	CFs	Valor experimental		Valor calculado (mM)		Mascaramento (%)	
				TEAC (mM ET)	FC (mM EAG)	TEAC (mM ET)	FC (mM EAG)	TEAC(mM ET)	FC(mM EAG)
E1	-1*	-1	0	32.10	14.85	34.20	14.90	-6.33	-0.38
E2	1	-1	0	42.73	16.32	42.01	17.00	1.69	-4.07
E3	-1	1	0	37.46	15.15	34.20	14.90	9.11	1.66
E4	1	1	0	38.24	17.53	42.01	17.00	-9.39	3.03
E5	-1	0	-1	20.15	7.93	17.60	7.54	13.50	5.12
E6	1	0	-1	34.48	10.61	25.41	9.64	30.28	9.62
E7	-1	0	1	43.55	20.87	49.01	21.88	-11.81	-4.72
E8	1	0	1	47.70	23.74	56.82	23.98	-17.45	-1.04
E9	0	-1	-1	20.89	10.13	21.00	8.44	-0.52	18.18
E10	0	1	-1	31.47	10.13	37.60	8.44	-17.76	18.18
E11	0	-1	1	52.46	22.97	52.41	22.79	0.10	0.79
E12	0	1	1	53.40	23.40	52.41	22.79	1.87	2.65
E13	0	0	0	33.12	16.66	37.60	15.81	-12.67	5.24
E13.1	0	0	0	32.80	16.96	37.60	15.81	-13.64	7.00
13.2	0	0	0	35.41	17.59	37.60	15.81	-5.99	10.68

De modo geral, observa-se que o valor do mascaramento para o método FC é pequeno, uma vez que apenas dois pontos apresentaram mascaramento superior a 12%. Além disso, se considerarmos que o erro experimental permitido para este método é de 12%, parte deste mascaramento pode ser atribuída à variabilidade experimental, o que mostra que a possível interação existente entre os aminoácidos, açúcares e padrões de CFs não tiveram grande influência na capacidade antioxidante.

Para o método TEAC, o mascaramento já foi um pouco mais expressivo e apresentou mais valores negativos que o FC. No estudo anterior com plano de mistura também foi verificado que o método TEAC apresentou valores mais expressivos e negativos, indicando que a mistura diminui a atividade antioxidante.

Com base neste estudo é constatado que os aminoácidos e os compostos fenólicos apresentam maiores influências na atividade antioxidante, enquanto que o açúcar não possui grande efeito nos métodos analíticos. Isso já era esperado, visto que no primeiro estudo de linearidade a frutose havia apresentado uma baixa atividade e a glicose não apresentou resposta, apesar de estarem com concentração na ordem de molar. É observado que a mistura de açúcar (glicose e frutose) não pode ser analisado isoladamente (Tabela 17).

O fato de o valor experimental com a mistura das três variáveis está bem próximo do calculado que é a soma de cada uma das três variáveis, comprova que o aminoácido e o polifenol foram as variáveis que mais contribuíram para a capacidade antioxidante.

4.5 ANÁLISE DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTES DE MISTURAS DE AMINOÁCIDOS, AÇÚCARES E CHÁ VERDE

4.5.1 Capacidade antioxidante do plano fatorial fracionário com chá verde

Após o planejamento utilizando as variáveis *açúcar*, *aminoácido* e *padrões de compostos fenólicos*, realizou-se um novo planejamento experimental modificando apenas a variável polifenol que, em vez de se utilizar padrões de compostos fenólicos, utilizou-se os compostos fenólicos do chá verde (CF-chá verde), ou seja, a infusão das folhas desta planta rica nestes fotoquímicos. Além disso, os níveis de concentração dessas variáveis é que estão sendo modificados, e não a proporção relativa de cada um dos tipos de aminoácidos ou açúcares, como foi feito no estudo anterior (plano de mistura). Os resultados desta análise estão apresentados na Tabela 19.

Tabela 19. Valores de TEAC e FC para a análise do plano fatorial fracionário de aminoácidos, açúcares e adicionados de chá verde.

Ensaio	Aminoácido	Açúcar	CFs	TEAC (mM ET)	FC (mM EAG)
E1	-1*	-1	0	13,67	7,06
E2	1	-1	0	16,82	10,12
E3	-1	1	0	13,83	6,43
E4	1	1	0	16,68	9,74
E5	-1	0	-1	8,65	4,65
E6	1	0	-1	13,42	7,20
E7	-1	0	1	24,44	11,0
E8	1	0	1	29,38	14,4
E9	0	-1	-1	10,65	5,31
E10	0	1	-1	12,5	5,46
E11	0	-1	1	25,41	11,0
E12	0	1	1	25,55	11,4
E13	0	0	0	14,13	9,27
E13.1	0	0	0	14,32	8,82
E13.2	0	0	0	13,66	9,24

As Tabelas 20 e 21 apresentam as ANOVAs e os coeficientes de regressão do plano fatorial fracionário, respectivamente, sobre as respostas TEAC e FC.

Tabela 20. ANOVA para os valores de TEAC e FC do plano fatorial fracionário dos aminoácidos, açúcares e adicionados de chá verde.

	SQ	GL	MQ	F	p
TEAC R² = 0,992					
(1) Aminoácido (L)	30,85	1	30,85	269	0.004
Aminoácido (Q)	2,54	1	2,54	22,1	0.042
(2) Açúcar (L)	0,51	1	0,51	4,5	0.169
Açúcar (Q)	0,55	1	0,55	4,8	0.161
(3) CF-Chá verde (L)	443,47	1	443,4	3866,4	0.000
CF-Chá verde (Q)	62,27	1	62,27	542,9	0.002
1L x 2L	0,02	1	0,02	0,2	0.710
1 L x 3L	0,01	1	0,01	0,1	0.829
2L x 3L	0,73	1	0,73	6,4	0.127
Lack of fit	4,17	3	1,39	12,1	0.077
Error	0,23	2	0,11		
Total SS	543,2	14			
FC R² =0,991					
(1) Aminoácido (L)	19,03	1	19,03	306,41	0.003
Aminoácido (Q)	0,05	1	0,05	0,86	0.453
(2) Açúcar (L)	0,02	1	0,02	0,32	0.626
Açúcar (Q)	2,94	1	2,94	47,4	0.020
(3) CF-Chá verde (L)	79,65	1	79,65	1282,85	0.001
CF-Chá verde (Q)	0,03	1	0,03	0,44	0.573
1L x 2L	0,02	1	0,02	0,25	0.664
1 L x 3L	0,19	1	0,19	3,05	0.223
2L x 3L	0,02	1	0,02	0,37	0.607
Lack of fit	0,78	3	0,26	4,21	0.198
Error	0,12	2	0,06		
Total SS	102,99	14			

L- linear; Q-quadrático.

Tabela 21. Efeitos e coeficientes de regressão para os valores de TEAC e FC do plano fatorial fracionário dos aminoácidos, chá verde e açúcares.

	Efeito	Erro padrão	t	p	coeficiente
TEAC					
Mean/Interc.	17,58	0,1	179,86	0.000	17,58
(1) Aminoácido (L)	3,93	0,24	16,4	0.004	1,96
Aminoácido (Q)	-0,83	0,18	-4,7	0.042	-0,41
(2) Açúcar (L)	0,51	0,24	2,11	0.169	0,25
Açúcar (Q)	-0,38	0,18	-2,18	0.161	-0,19
(3) CF-Chá verde (L)	14,89	0,24	62,18	0.000	7,45
CF-Chá verde (Q)	-4,11	0,18	-23,3	0.002	-2,05
1L x 2L	-0,15	0,34	-0,43	0.710	-0,07
1 L x 3L	0,08	0,34	0,25	0.829	0,04
2L x 3L	-0,86	0,34	-2,53	0.127	-0,43
FC					
Mean/Interc.	8,65	0,07	120,27	0.000	8,65
(1) Aminoácido (L)	3,08	0,18	17,5	0.003	1,54
Aminoácido (Q)	-0,12	0,13	-0,93	0.453	-0,06
(2) Açúcar (L)	-0,1	0,18	-0,57	0.626	-0,05
Açúcar (Q)	0,89	0,13	6,88	0.020	0,45
(3) CF-Chá verde (L)	6,31	0,18	35,82	0.001	3,16
CF-Chá verde (Q)	-0,09	0,13	-0,67	0.573	-0,04
1L x 2L	0,13	0,25	0,5	0.664	0,06
1 L x 3L	0,44	0,25	1,75	0.223	0,22
2L x 3L	0,15	0,25	0,6	0.607	0,08

L- linear; Q-quadrático.

Em ambos os métodos são observados a não significância do *lack of fit*, ou seja, o modelo proposto é apropriado para descrever a variabilidade das respostas. Isso é reforçado pelos elevados coeficientes de determinação ($R^2 > 0,99$) e pela análise dos resíduos (resultados não mostrados).

Em relação aos coeficientes de regressão, é observado que no método TEAC apenas o CF-Chá verde e o aminoácido apresentam efeito estatisticamente significativo, sendo que estas variáveis apresentaram ambos efeito linear positivo e quadrático negativo. No entanto, o efeito quadrático tem menor impacto sobre a atividade antioxidante se comparado com o efeito linear. O efeito linear do CF-Chá verde contribui para um aumento de 14,89 mM ET na capacidade antioxidante enquanto que o efeito quadrático desta mesma variável apresenta um ponto no qual há uma diminuição da capacidade antioxidante com o aumento da concentração de CFs do Chá verde em -4,11 mM ET, após este ponto a capacidade antioxidante

aumenta linearmente. Para o aminoácido, o efeito linear mostra que o aumento na concentração do aminoácido aumenta a capacidade antioxidante em 3,93 mM ET e o efeito quadrático mostra que há um ponto onde há uma pequena diminuição da capacidade antioxidante em -0,83 mM ET, após este ponto a capacidade antioxidante aumenta linearmente com a concentração dos aminoácidos.

No método de FC, o aminoácido e os CFs do Chá verde apresentaram efeito significativo apenas para o modelo linear, no entanto, para o açúcar este método apresentou um leve efeito significativo para o modelo quadrático.

As Figuras 17 e 18 mostram o gráfico de pareto das variáveis sobre a atividade antioxidante TEAC e FC, reforçando a menor influência do efeito quadrático em relação ao efeito linear.

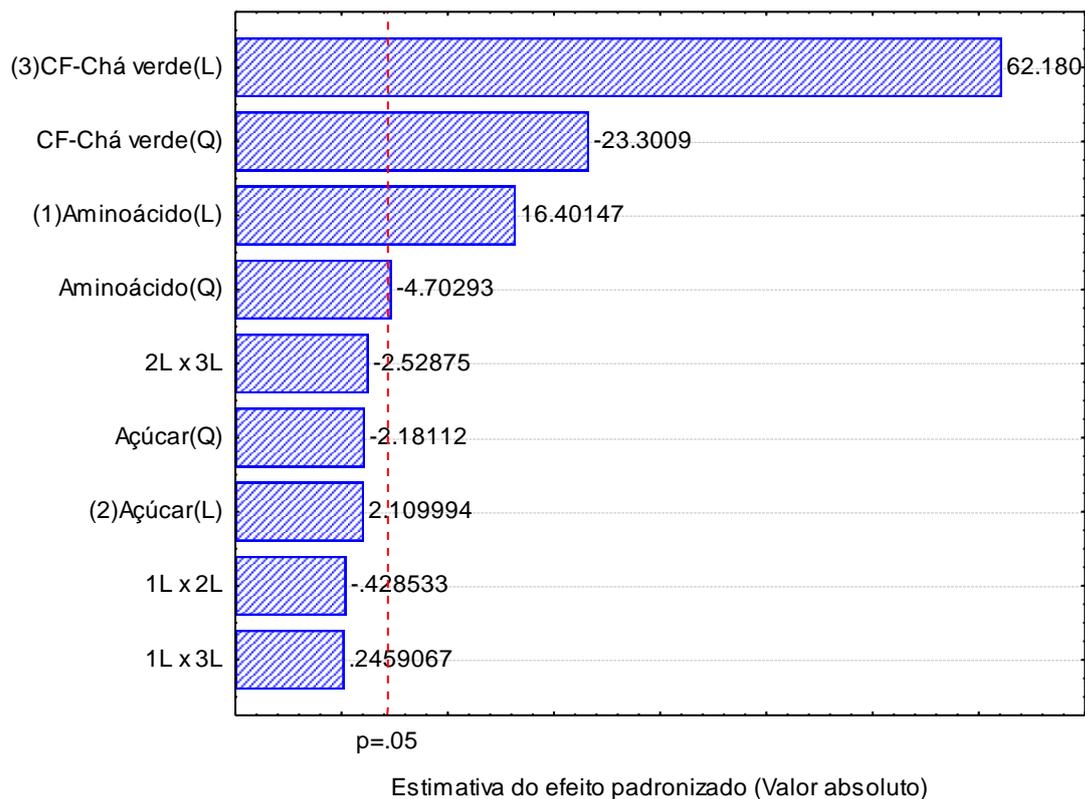


Figura 17. Gráfico de pareto para os coeficientes de regressão do plano fatorial fracionário dos aminoácidos, açúcares e CF-Chá verde sobre a resposta TEAC.

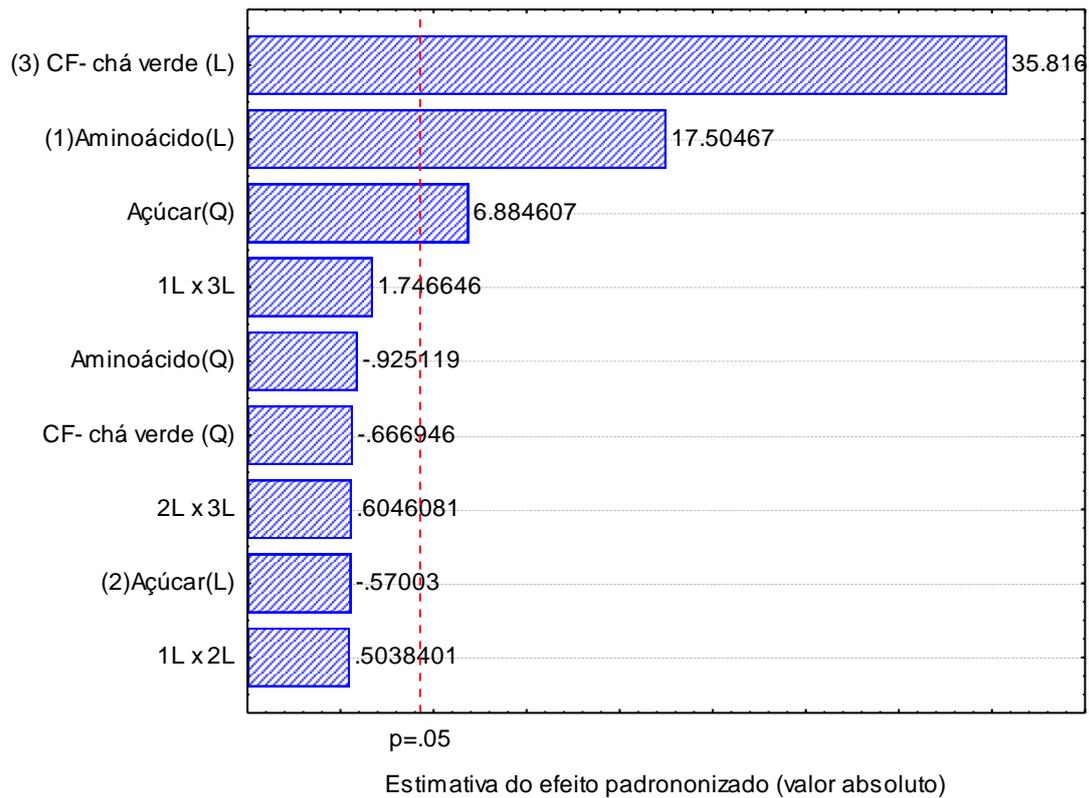


Figura 18. Gráfico de Pareto para os coeficientes de regressão do plano fatorial fracionário dos aminoácidos, açúcares e CF-Chá verde sobre a resposta FC.

Estas figuras ilustram que de fato o CF-Chá verde e o aminoácido apresentaram maior efeito, principalmente o efeito linear.

Sharma; Kumar; Rao (2008) analisando a influência da adição de leite, principalmente proteína caseína, e açúcar na atividade antioxidante de chá preto, observou que este chá adicionado de açúcar apresentou menor redução na medida de FC, enquanto que o leite apresentou maior redução. Haslam (1989) explica que essa redução da atividade do chá quando adicionado de leite pode ser devido a interações das folhas do chá com as proteínas, o que pode levar ao mascaramento da atividade antioxidante (HASLAM, 1989 *apud* SHARMA; KUMAR; RAO 2008).

4.5.2 Efeito do mascaramento

O cálculo para o mascaramento procedeu da mesma forma que no item 4.4.2. O valor de FC e TEAC de cada componente isolado pode ser observado na Tabela 22, para os níveis -1, 0 e 1.

Tabela 22. Capacidade antioxidante das variáveis do planejamento fatorial, tomados isoladamente, avaliados para os métodos FC e TEAC.

Valores codificados	Valores FC das variáveis (mM EAG)			Valores TEAC das variáveis (mM ET)		
	Açúcares	Açúcares	CF-chá verde	Aminoácidos	Açúcares	CF-chá verde
-1	1.20	ND*	2.93	2.30	ND	6.71
0	2.42	ND	6.16	5.96	ND	10.40
1	4.08	ND	8.32	9.76	ND	21.55

*ND- Não determinado

Os valores calculados de mascaramento a partir da equação 1 estão apresentados na Tabela 23.

Tabela 23. Efeito do mascaramento na atividade antioxidante do plano fatorial fracionário dos aminoácidos, açúcares e CF-Chá.

Ensaio	Aminoácido	Açúcar	CFs	Valor experimental		Valor calculado (mM)		Mascaramento (%)	
				TEAC (mM ET)	FC (mM EAG)	TEAC (mM ET)	FC (mM EAG)	TEAC (mM ET)	FC (mM EAG)
E1	-1*	-1	0	13.67	7.06	12.70	7.36	7.38	-4.23
E2	1	-1	0	16.82	10.12	20.16	10.24	-18.09	-1.15
E3	-1	1	0	13.83	6.43	12.70	7.36	8.53	-13.52
E4	1	1	0	16.68	9.74	20.16	10.24	-18.87	-4.94
E5	-1	0	-1	8.65	4.65	9.01	4.13	-4.12	11.93
E6	1	0	-1	13.42	7.20	16.47	7.01	-20.40	2.71
E7	-1	0	1	24.44	11.00	23.85	9.52	2.45	14.41
E8	1	0	1	29.38	14.41	31.31	12.40	-6.35	15.05
E9	0	-1	-1	10.65	5.31	12.67	5.35	-17.32	-0.88
E10	0	1	-1	12.50	5.46	12.67	8.44	-1.31	-42.93
E11	0	-1	1	25.41	11.00	27.51	10.74	-7.94	2.34
E12	0	1	1	25.55	11.45	27.51	10.74	-7.39	6.37
E13	0	0	0	14.13	9.27	16.36	8.58	-14.66	7.63
E13.1	0	0	0	14.32	8.82	16.36	8.58	-13.28	2.73
E13.2	0	0	0	13.66	9.24	16.36	8.58	-17.96	7.36

Os valores do mascaramento para os dois métodos são mais expressivos que nos estudos anteriores. O maior mascaramento para o estudo com chá verde deve-se ao fato de esta variável ser uma matriz alimentar, logo com maior complexidade, pois apresenta em sua composição, vários componentes que também podem contribuir para a interferência nesses métodos analíticos.

5 CONCLUSÃO

O presente estudo mostrou a interferência de alguns constituintes dos alimentos (açúcar, aminoácidos) na capacidade antioxidante e os efeitos resultantes de interações entre estes e padrões de compostos fenólicos ou chá verde na capacidade antioxidante, através dos métodos TEAC e FC. Entre as principais conclusões, tem-se:

- A análise dos nutrientes isolados mostrou que apenas a frutose, triptofano e tirosina apresentaram atividade antioxidante TEAC e FC, sendo esta atividade maior para os aminoácidos e evoluindo de forma linear com a concentração;
- Na análise dos aminoácidos por plano de mistura, os aminoácidos triptofano e tirosina apresentaram efeito significativo sobre a atividade antioxidante FC e TEAC;
- Para os aminoácidos por plano de mistura, em presença de padrões de compostos fenólicos, apenas triptofano e tirosina foram significativos no método TEAC e no método de FC todos os aminoácidos foram significativos sendo que os aminoácidos fenilalanina e metionina apresentaram efeito bem pequeno sobre a capacidade antioxidante;
- No mascaramento, os métodos FC e TEAC apresentaram, em sua maioria, valores de mascaramento positivos e negativos, respectivamente. O mascaramento para método de FC foi menor se comparado ao TEAC;
- O baixo mascaramento e a não significância de interações entre os aminoácidos, indicou a possibilidade de se descontar o valor da interferência destes aminoácidos na resposta dos dois métodos analíticos;
- Na presença simultânea de aminoácido, açúcar e padrões de CFs, as variáveis aminoácido e padrões de CFs foram altamente significativas e expressivas com efeito linear sobre a capacidade antioxidante para ambos os métodos e o açúcar tendo um pequeno efeito quadrático;

- Em mistura de aminoácido, açúcar e Chá verde o método TEAC varia significativamente em função da concentração do aminoácido e dos compostos fenólicos do chá verde;
- O estudo do mascaramento tanto do planejamento fatorial quanto do plano de mistura mostra que o método FC possui menos interferência na atividade antioxidante, para o método TEAC este efeito de interferência é bem maior.

BIBLIOGRAFIA

ADAMS, A.; TEHRANI, K. A.; KERSIENE, M.; VENSKUTONIS, R.; KIMPE, ALMAJANO, M. P.; CARBO, JIMÉNEZ, R. J. A.; Gordon, M. H. Antioxidant and antimicrobial activities of tea infusions. **Food Chemistry** 108: 55–63, 2008.

ARTS, M. T. J. T.; HAENEN, G. R.M.M. ; VOSS, H. ; BAST, A. Antioxidant capacity of reaction products limits the applicability of the Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) assay Mariken. **Journal Chemistry and Chemical Toxicology**. 42 : 45–49, 2004.

ARTS, M.J. T. J.; HAENEN, G. R. M. M. ; WILMS, . L. C.; BEETSTRA, S. A. J. N.; HEIJNEN, C. G. M.; VOSS, H.; BAST Interactions between Flavonoids and Proteins: Effect on the Total Antioxidant Capacity. **J. Agric. Food Chem.** 50, 1184-1187, 2002.

ARTS, M.J.T.J.; HAENEN, G.R.M.M.; VOSS, H.-P.; BAST, A. Masking of antioxidant capacity by the interaction of flavonoids with protein. **Journal food and chemical toxicology** 39: 787–791, 2001.

ATOUI, A. K. ABDELHAK MANSOURI A, GEORGE BOSKOU B,1, PANAGIOTIS KEFALAS A,* Tea and herbal infusions: Their antioxidant activity and phenolic profile Food Chemistry 89 27–36, 2005.

BARBOSA, D. S. Green tea polyphenolic compounds and human health. **Journal of Consumer Protection and Food Safety** 2: 407 – 413, 2007.

BUMBER, A. A.; KORNIENKO, I. V.; . PROFATILOVA, I. A; VNUKOV, V. V.; KORNIENKO, I. E. E GARNOVSKII, A. D. POLAROGRAPHIC. Study of the Antioxidant Activity of Amino Acids and Proteins, 2000.

CAO, G.; PRIOR, R.L. Measurement of oxygen radical absorbance capacity in biological samples. **Methods in Enzymology**, v. 299, p. 50-62, 1999.

CHARLTON, A. J. ; BAXTER, N. J.; KHAN, M. L.; MOIR, A. J. G.; HASLAM, E.; DAVIES, □ A P. e WILLIAMSON, M. P. Polyphenol/Peptide Binding and Precipitation **J. Agric. Food Chem.** 50, 1593 □ 1601, 2002.

DÁVALOS, A.; GÓMEZ-CORDOVÉS, C.; BARTOLOMÉ, B. Extending applicability of the Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC-Fluorescein) assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 52, pp 48-54, 2004.

FAO/WHO/UNU. Expert Consultation on Protein and Amino Acid Requirements in Human Nutrition. Geneva, Switzerland, 2002.

FRANKEL, E.N. Antioxidants in lipids foods and their impact on food quality. **Food Chemistry**, v. 57, p. 51-55, 1996.

FRANKEL, E.N.; MEYER, A.S., The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants, **Journal of Food Science and Agricultural**. 80: 1925-1941, 2000.

FREITAS, V.; CARVALHO, E. ; MATEUS, N. Study of carbohydrate influence on protein–tannin aggregation by nephelometry.. **Food Chemistry**. v. 81 503–509, 2003

HALLIWELL, B. Free Radicals and Antioxydant: A personal view, **Nutrition Reviews**, 52, pp 253-265, 1994

HAMILTON, R.J.; KAMU, C.; PRISK, E.; PADLEY, F.B.; PIERCE, H. HEO,H.J.; KIM , Y. J.; CHUNG, D.; KIM,D.O. Antioxidant capacities of individual and combined phenolics in a model system. **Journal Food Chemistry Food Chemistry** 104: 87–92, 2007.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant Capacity Assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 53, 1841-1856, 2005.

HURELL, R. F.; FINOT, P. A. Nutritional consequences of the reactions between proteins and oxidised polyphenolic acids. **Adv. Exp. Med. Biol.** 177, 423-435, 1984.

IACOPINI, P.; BALDI, M. ; STORCHI, P.; SEBASTIANI, L. Catechin, epicatechin, quercetin, rutin and resveratrol in red grape: Content, In vitro antioxidant activity and interactions. **Journal of Food Composition and Analysis** in press, 2008.

JADHAVI, S.J.; NIMBALKAR, S.S.; KULKARNI, A.D.; MADHAVI, D.L. Lipid oxidation in biological and food systems. In: MADHAVI, D.L.; DESHPANDE, S.S.; SALUNKHE, D.K. **Food antioxidants – technological, toxicological and health perspectives**. New York: Marcel Dekker, Inc., p. 5-63, 1995.

LUO, D. ; FANG Structural identification of ginseng polysaccharides and testing of their antioxidant activities. **Carbohydrate Polymers** 72: 376–381, 2008.

LUO, D. Identification of structure and antioxidant activity of a fraction of polysaccharide purified from *Dioscorea nipponica* Makino . **Carbohydrate Polymers** 71: 544–549, 2008.

MANACH, C.; SCALBERT, A.; MORAND, C.; RÉMÉSY, C.;JIMEÉNEZ. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr*,79:727– 47, 2004

MATEUS, N.; CARVALHO, E.; LUÍS, C.; FREITAS, V. Influence of the tannin structure on the disruption effect of carbohydrates on protein–tannin aggregates. **Analytica Chimica Acta** 513 135–140, 2004.

MATSUBARA, S.; RODRIGUEZ-AMAYA2, D.B. Teores de catequinas e teaflavinas em chás comercializados no Brasil. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, 26(2): 401-407, abr.-jun. 2006

MELO, E.A.; GUERRA, N.B. Ação antioxidante de compostos fenólicos naturalmente presente em alimentos. **Boletim da SBCTA**, 36 (1), pp. 1-11, 2002.

MEUCCI, E. ; MELE, M. C. Amino acids and plasma antioxidant capacity. *Short Communication*. **Amino Acids** 12:373-377, 1997.

PENNINGTON, J.A.T. Food composition databases for bioactive food components. **Journal of food composition and analysis**, 15, 419-434, 2002

PEREZ, R. A.; IGLESIAS,M.T.; PUEYO, E.; GONZALEZ, M.; LORENZO, C. **Amino Acid Composition and Antioxidant Capacity of Spanish Honeys**. J. Agric. Food Chem. 55, 360-365, 2007.

PÉREZ-JIMÉNEZ , J.; SAURA-CALIXTO, F. Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays. **Food Research International** 39 791–800, 2006.

PEREZ-JIMENEZ, J; ARRANZ, S; TABERNERO, M; DIAZ- RUBIO, M. E.;SERRANO, J.; GONI, I.; SAURA-CALIXTO, F. Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: Extraction, measurement and expression of results. **Food Research International** 41: 274–285, 2008.

PIHLANTO, A. Antioxidative peptides derived from milk proteins. **Journal International Dairy** 16 : 1306–1314,2006.

PINCEMAIL, J; BONJEAN, K; CAYEUX, K; DEFRAIGNE J. Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante Physiological action of antioxidant defences. **Nutrition clinique et métabolisme** 16 : 233–239, 2002.

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**, 10, pp 4290-4302, 2005.

RAJALAKSHMI, D.; NARASIMHAN, S.; MADHAVI, D.L.; DESHPANDE, S.S.; SALUNKHE, D.K Sources and methods of evaluation. In: **Food antioxidants – technological, toxicological and health perspectives**. New York: Marcel Dekker, Inc. p.65-157, 1995.

RE, R; Pellegrini N; Proteggente A; Pannala A; Yang, M; Rice-Evans CA. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Rad Biol Med** 26:1231–1237, 1999.

RICE-EVANS, C.A.; MILLER, N.J; PAGANGA, G. Catherine A Rice-Evans, Nicholas J. Miller and George Paganga, Antioxidant properties of phenolic Compounds. **Trends in plant science**. 2(4), 1997.

ROBARDS, K.; PRENZLER, P. D.; TUCKER, G.; SWATSITANG, P.; GLOVER, W. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. **Food Chemistry**. 66. 401-436. 1999

ROHN, S.; RAWEL, .M. e KROLL, J. Antioxidant Activity of Protein-Bound Quercetin. **J. Agric. Food Chem**. 52, 4725-4729, 2004.

SAITO, S. T.; GOSMANN, G.; SAFFI, J. PRESSER, M.; RICHTER, M. F; BERGOLD, A.M. Characterization of the Constituents and Antioxidant Activity of Brazilian Green Tea (*Camellia sinensis* var. *assamica* IAC-259 Cultivar) Extracts. **J. Agric. Food Chem** 55: 9409–9414, 2007.

SAURA-CALIXTO; GOÑI. Antioxidant capacity of the Spanish Mediterranean diet. **Food Chemistry**, 94(3), 442–447, 2006

SCALBERT, A.; WILLIAMSON, G. **Dietary Intake and Bioavailability of Polyphenols. Journal nutrition**. 2000

SHARMA, H. V.; KUMAR, L. V.; RAO, J. M. Influence of milk and sugar on antioxidant potential of black tea. **Food Research International** 41 124–129, 2008.

SIEBERT, K. J. Effects of protein-polyphenol interactions on beverage haze, stabilization, and analysis. **J. Agric. Food Chem**. 47, 353-362, 1999.

SIEBERT, K. J.; TROUKHANOVA, N. V. ; LYNN, P. Y. Nature of Polyphenol-Protein Interactions **J. Agric. Food Chem**. V. 44, 1996

SILVA, E.M.; SOUZA, J.N.S.; ROGEZ, H.; REES, J.F.; LARONDELLE, Y. Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonian region. **Food Chemistry**, 101, 1012-1018, 2007.

SILVA, Evaldo Martins. **Otimização de métodos de análise de antocianinas: atividade antioxidante e quantificação rápida**. 2002. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal do Pará. Belém, 2002.

SULTANA, B.; ANWAR, F. Flavonols (kaempferol, quercetin, myricetin) contents of selected fruits, vegetables and medicinal plants. **Food Chemistry** 108: 879–884, 2008

VAN DEN BERG, R.; HAENEN, G. R.M.M; VAN DEN BERG, H.; BAST, A. Applicability of an improved Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures. **Food Chemistry**. 66: 511–517, 1999.

WANG, H.; PROVAN, J.P.; HELLIWELL, K. Tea flavonoids: their functions, utilisation and analysis. **Trends in Food Science & Technology** 11: 152-160, 2000.

WICKS, L., K., M.; WOOD, L., G.; GARG, M., L. Review Methodology for the determination of biological antioxidant capacity *in vitro*: a review. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. 86:2046–2056, 2006.