

## **Avaliação do potencial Antioxidantes de fontes alimentícia**

### **Avaluation of potential antioxidants from food sources**

DOI:10.34117/bjdv7n9-351

Recebimento dos originais: 07/08/2021

Aceitação para publicação: 22/09/2021

#### **Mariane Prieto Lima da Silva**

Graduanda em Educação Física na Universidade Federal da Paraíba Instituição-Campus I Jardim Universitário, S/N - Castelo Branco, João Pessoa, PB, 58051-900  
E-mail: mariianeprieto@hotmail.com

#### **Leonor Alves de Oliveira da Silva**

Doutora em Microbiologia Aplicada pela Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho Professora Associada da UFPE cedida para Universidade Federal da Paraíba/CCEN/DBM -Campus I Jardim Universitário, S/N - Castelo Branco, João Pessoa, PB, 58051-900  
E-mail: laodls@yahoo.com.br

#### **RESUMO**

O Whey Protein tem sido uma substância recomendada para melhorar a saúde, onde com sua ingestão tornando-se um complemento nutricional com uma ampla quantidade de antioxidante e os nutrientes antioxidantes sendo de grande importância na prevenção de doenças e aumento da imunidade. Neste contexto o trabalho tem como objetivo avaliar amostras diferentes de suplementos alimentares do tipo Whey Protein, quanto a atividade antioxidante e quantidade de proteínas totais solúveis. As amostras foram compostas por seis Whey Protein diferentes designados A,B,C, D, E e F, todos foram submetidos extração com etanol PA por 24h a 30°C e sonicação e posteriormente filtradas e rotavaporadas a 40°C e por fim utilizadas na determinação de proteínas totais e atividade antioxidante. A atividade antioxidante foi determinada por três métodos: do ABTS; DPPH e Mo<sup>6+</sup>. Os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados de capacidade antioxidante foram expressos em % de inibição dos respectivos radicais livres. Todos os ensaios foram realizados em triplicata. Os resultados obtidos permitem inferir que existem no mercado diferentes tipos de suplementos alimentares com teores proteicos bastante diversificados e com diferentes atividades antioxidantes e que alguns Whey protein presentes no mercado apresentam um teor considerado de antioxidante podendo ser um suplemento alimentar podem ser de grande importância na prevenção de doenças e propiciando um aumento da imunidade.

**Palavras-Chave:** Whey Protein, Suplemento alimentar, DPPH, ABTS

#### **ABSTRACT**

Whey Protein has been a recommended substance to improve health, where with its ingestion it becomes a nutritional complement with a large amount of antioxidant and the antioxidant nutrients being of great importance in the prevention of diseases and increased immunity. In this context the work aims to evaluate different samples of Whey Protein type food supplements in terms of antioxidant activity and amount of total soluble

proteins. The samples were composed of four different Whey Proteins designated A,B,C, D, E and F, all of which were submitted to extraction with ethanol PA for 24 hours at 30°C and sonication and later filtered and rotaevaporized at 40°C and finally used in the determination of total proteins and antioxidant activity. The antioxidant activity was determined by three methods: ABTS; DPPH and Mo<sup>6+</sup>. The assays were performed in triplicate and the results of antioxidant capacity were expressed in % of inhibition of the respective free radicals. All the assays were performed in triplicate. The results obtained show that there are different types of food supplements on the market with very diverse protein levels and different antioxidant activities and that some Whey protein present on the market has a considered antioxidant content which can be a food supplement and can be of great importance in the prevention of diseases and providing an increase in immunity.

**Keywords:** Whey Protein, Food Supplement, DPPH, ABTS.

## 1 INTRODUÇÃO

Os radicais livres são átomos ou moléculas que contêm um ou mais elétrons desemparelhados. Por esse motivo, os radicais livres reagem com outras moléculas, doando ou recebendo elétrons para se tornarem estáveis, podendo reduzir seus elétrons (oxidar) (Kumar 2017). Os radicais livres são liberados durante o metabolismo humano, sendo também produzidos por poluentes ambientais (atmosféricos, aquáticos, do solo), radiações (ultravioleta, gama, hertziana), entre outros. Podem estar relacionados ao consumo ou uso de toxinas como álcool, tabaco e drogas ou devido à alimentação inadequada, exposição a fertilizantes ou agrotóxicos (Coronado 2015). Também inclui o metabolismo de alguns produtos químicos e alto estresse físico ou psicológico (Moscals 2017). Os radicais livres são conhecidos por participarem da peroxidação lipídica, que causa a deterioração dos alimentos, envelhecimento e promoção do câncer. As espécies reativas de oxigênio também estão envolvidas na asma, inflamação, artrite, neurodegeneração, doença de Parkinson, doenças vasculares cardíacas e diabetes (Kumar, 2017; Alves, 2013). O exercício físico intenso e contínuo é acompanhado pela produção de radicais livres, ou seja, uma sequela do aumento do consumo de oxigênio que ocorre com o exercício e tem estreita relação com o dano muscular (Niki 2010). Antioxidantes são substâncias ou nutrientes que, presentes em baixa concentração, quando comparada com a de um substrato oxidável, têm capacidade de atrasar ou inibir a oxidação desse substrato de modo eficaz (Silva 2021). Os antioxidantes previnem a ação nociva dos radicais livres nas células, sendo compostos capazes de inibir ou retardar o processo de oxidação no organismo, combater o envelhecimento precoce e prevenir doenças (Mokrani

2016). O papel dos antioxidantes é neutralizar os radicais livres nas células biológicas, o radicais tendo um impacto negativo nos organismos vivos. Um papel especial na neutralização os efeitos do estresse oxidativo relacionados à presença de radicais livres são desempenhados por a enzima chamada superóxido dismutase (SOD) (Munteanu 2021).

Os seres vivos são o tempo todo "combatidos" por antioxidantes, que podem ser produzidos por organismos vivos ou obtidos a partir dos alimentos consumidos. Os antioxidantes podem ser encontrados em alimentos naturais, em suplementos vitamínicos e minerais. Diferentes estudos estão sendo realizados com o objetivo de avaliar o efeito da suplementação alimentar, utilizando compostos com atividade antioxidante, a fim de melhorar o desempenho e a resistência ao exercício físico (Soares 2019). É imprescindível que o praticante de atividade física tenha suas necessidades nutricionais atendidas, visto que existe uma relação direta entre alimentação, desempenho e eficiência. Neste contexto, existe uma grande variedade de suplementos alimentares no mercado, e o uso de suplementos de proteína energética é bastante comum e frequente, sendo a Whey Protein amplamente utilizada em vários alimentos pelos seus valores nutricionais, promotores da saúde e funcionais (Haraguchi 2006). As proteínas lácteas obtidas do soro do leite têm recebido considerável atenção por sua bioatividade antioxidante (Corrochano 2018; Zhang 2012).

Diante desse cenário, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antioxidante e os níveis de proteínas solúveis totais presentes em seis diferentes amostras de suplementos alimentares do tipo Whey Protein, visando contribuir com informações para estudos futuros.

## **2 METODOLOGIA**

### **2.1 PREPARO DAS AMOSTRAS EXTRATO**

Seis amostras distintas de whey protein (A,B,C,D,E e F) foram submetidos a extração com solvente orgânico etanol (PA) segundo metodologia adaptada de Shanmugam et al. (2019), na qual em três gramas de cada amostra foi adicionado 12 mL de etanol, incubada por 24h a 25 °C, posteriormente submetida por 1 minuto em um sonicador (50%). Após essa etapa as amostras foram filtradas, rota-evaporadas a 40°C e utilizadas na determinação de proteínas totais e atividades antioxidante.

## 2.2 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A atividade antioxidante (AA) *in vitro* dos extratos etanólicos foram determinadas por três métodos: utilizando do ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS); 2,2'-difênil-1-picril-hidrazilo (DPPH), e  $\text{Mo}^{6+}$ . Os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados de capacidade antioxidante foram expressos em % de inibição dos respectivos radicais livres. A atividade antioxidante pelo método ABTS foi determinada de acordo Sánchez-González et al. (2005) e Oliveira et al (2020), na qual a atividade antioxidante é medida através da captura do radical 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) ( $\text{ABTS}^+$ ), que pode ser gerado através de uma reação química, eletroquímica ou enzimática. Esse radical (de cor verde escura) pode reagir de forma enérgica com compostos doadores de hidrogênio, como compostos fenólicos, sendo convertido em uma forma não colorida ou de menor intensidade. Para a preparação do radical  $\text{ABTS}^+$ , foram adicionados, em um frasco âmbar, 5 mL de solução aquosa de ABTS [ácido 2,2 azino-bis (3-etilbenzotiazolina-ácido 6-sulfônico) 7 mM e 88  $\mu\text{L}$  da solução de persulfato de potássio 140 mM. O frasco foi deixado em repouso, no escuro, por aproximadamente 16 h, para estabilização da solução. A solução de  $\text{ABTS}^+$  foi diluída em álcool etílico até atingir uma absorvância de  $0,700 \pm 0,020$  a 734 nm. As amostras sofreram reação com a solução do radical  $\text{ABTS}^+$  (proporção 1:10) durante 6 min e as absorvâncias foram lidas a 734 nm (Biospectro, modelo SP-220). Foi construída uma curva padrão de Trolox (ácido 6-hidroxi-2-5-7-8-tetrametilcromo 2-carboxílico), com uma massa variando de 0,30  $\mu\text{g}$  a 3,32  $\mu\text{g}$ , em álcool etílico. O teste de DPPH é um dos métodos indiretos para se determinar a atividade antioxidante mais antigo sendo sugerido originalmente em 1950 para se descobrir os doadores de hidrogênio em matérias naturais. Mais tarde foi quantificado para determinar o potencial antioxidante de compostos fenólicos isolados e alimentos tão bem como amostras biologicamente relevantes. Esse método consiste em avaliar a capacidade antioxidante via atividade sequestradora do radical livre 2,2-difênil-1-picril-hidrazila DPPH. O radical DPPH possui coloração púrpura absorvendo a um comprimento de onda máximo de aproximadamente 516 nm. Por ação de um antioxidante (AH) ou uma espécie radicalar (R.), o DPPH. é reduzido formando difênil-picril-hidrazina, de coloração amarela, com conseqüente desaparecimento da absorção, podendo a mesma ser monitorada pelo decréscimo da absorvância. A partir dos resultados obtidos determina-se a porcentagem de atividade antioxidante ou sequestradora de radicais livres e/ou porcentagem de DPPH. remanescente no meio reacional. O DPPH apresenta-se como um método simples

podendo também ser usado para avaliar a atividade antioxidante de formas sintéticas (ex: nimesulida, dapsona e ácido acetilsalicílico), algas, quitosanas, etc., (KIM; THOMAS, 2006). Para o método DPPH, em 240 µL de cada amostra foi acrescido 1500 µL de solução etanólica do radical livre DPPH 0,04 mg/mL, e incubada por 30 minutos à temperatura ambiente, ao abrigo da luz (Oliveira, 2020). Como controle foi utilizada uma alíquota de 1500 µl de solução metanólica de DPPH adicionada de 240 µl de etanol. As absorbâncias foram lidas a 517 nm (Biospectro, modelo SP-220). Foi construída uma curva padrão de ácido ascórbico com concentrações variando de 4,0 µg/mL a 25 µg/mL, em álcool etílico. As atividades sequestrantes de radicais livres de DPPH e ABTS foram expressas em porcentagem de descoloração (% descoloração) pode ser expressa em porcentagem por comparação a um controle ou branco, segundo a seguinte equação:

$$\%ASRL = (\%Descoloração) = ((Ac-At)/Ac)*100$$

Onde Ac: absorbância controle ou branco; At: absorbância teste (amostra).

O método de avaliação de atividade antioxidante com formação do complexo fosfomolibdênio seguiu a metodologia descrita por Prieto (1999), na qual consistiu em adicionar 0,3 mL dos extratos (200 µg/mL), em 3 mL do reativo (molibdato de amônio 4 mM, fosfato de sódio 28 mM, ácido sulfúrico 0,6 M). Posteriormente incubou-se em banho-maria a 95 °C por 90 min. após resfriamento foi realizada uma leitura em espectrofotômetro UV a 695 nm, utilizando como branco 0,3 mL água e 3 mL do reativo. A substância referência utilizada foi ácido gálico. A capacidade de redução do extrato foi expressa em mg de equivalentes de ácido gálico por grama de extrato. A curva padrão foi construída utilizando ácido gálico de 1 a 50 µg.

### 2.3 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS SOLÚVEIS

O método foi executado conforme descrito por Lowry et al. (1951), utilizando-se as soluções de carbonato de sódio a 2% em hidróxido de sódio 0,1 mol L<sup>-1</sup>; sulfato de cobre 1%; tartarato de sódio e potássio 2%; solução contendo 2% de carbonato de sódio, 0,01% de sulfato de cobre e 0,02% de tartarato de potássio em hidróxido de sódio 0,1 mol L<sup>-1</sup> e o reagente de fenol Folin Ciocalteau diluído na proporção de 1:1 (v/v) em água ultrapura. A curva de calibração foi preparada com solução de albumina nas

concentrações de 0,15 a 2 mg/mL e efetuada as leituras em espectrofotômetro em comprimento de onda de 660 nm. As dosagens foram realizadas em triplicatas.

## 2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todas as experiências foram realizadas em triplicado. A ANOVA de uma via com o teste de Tukey foi realizada seguida de teste de comparação múltipla quando apropriado. Os valores IC50 foram realizados com o software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA). A significância da diferença foi aceita em  $p < 0,05$ .

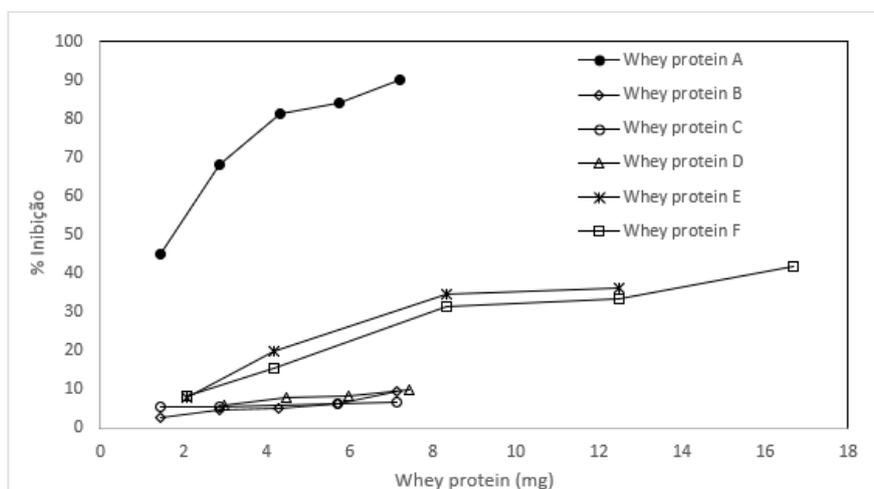
## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Sabendo-se que existe uma relação entre nutrição e atividade física muito acentuada que gera benefícios não apenas quanto à perda de peso devido à elevação do gasto energético, mas também propicia resultados positivos para o sistema metabólico e cardiovascular (Macedo, 2019). O whey Protein tem sido uma substância recomendada para melhorar a saúde, tornando-se um complemento nutricional muito consumido por diferentes grupos de pessoas que buscam um equilíbrio nutricional e uma vida mais saudável.

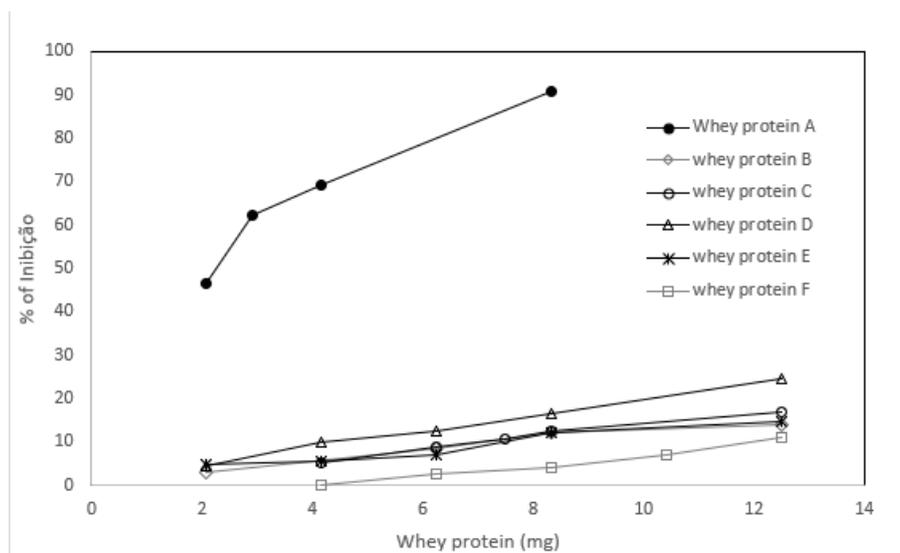
No presente trabalho foi analisado o poder antioxidantes de diferentes whey protein. Os teores de atividade antioxidante pelos métodos ABTS e DPPH obtida das seis amostras distintas de whey protein (A, B, C, D, E e F) estão apresentados na Figura 1.

Figura 1. Atividade antioxidante pelo método ABTS (A) e DPPH(B) dos extratos etanólicos das seis amostras distintas de whey Protein (Whey protein A, Whey protein B, Whey protein C, Whey protein D, Whey protein E e Whey protein F).

A)



B)



O valor de IC 50% pelo método ABTS foi definido como massa em mg de extrato requerida para decrescer a concentração inicial de ABTS em 50%, estes valores foram determinados nas seis amostras e estão apresentados na Tabela 1. Todos os seis extratos etanólicos obtidos dos diferentes whey protein estudado neste trabalho apresentam capacidade de reduzir o radical ABTS onde o Whey protein A se destacou apresentando menor IC50% com valor de  $1,088 \pm 0,002$  mg. Dryáková et al. 2010, trabalhando com a mesma metodologia detectou atividades antioxidantes em hidrolisados de whey protein obtendo um valor de 0,1mg/mL.

Tabela 1- Valores de IC50 de diferentes extrato etanólico de whey protein utilizando a metodologias DPPH e ABTS.

Whey protein	IC 50 DPPH (mg)	IC 50 ABTS (mg)
A	$1,66 \pm 0,00$	$1,08 \pm 0,00$
B	$44,23 \pm 0,03$	$45,10 \pm 0,01$
C	$35,32 \pm 0,01$	$206,85 \pm 0,08$
D	$25,95 \pm 0,01$	$57,11 \pm 0,02$
E	$46,56 \pm 0,02$	$16,67 \pm 0,01$
F	$42,58 \pm 0,01$	$19,58 \pm 0,01$

No presente trabalho avaliou-se o potencial antioxidante dos diferentes extratos utilizando a metodologia do DPPH, para tanto construiu-se um gráfico relacionando o percentual de inibição do radical livre DPPH em função da concentração do padrão ácido ascórbico, (Figura 1B). A capacidade de sequestro do radical DPPH dos extratos etanólicos de Whey Protein foram calculados e os resultados estão apresentados na Tabela 1. Kerasiotti et al., 2014 trabalhando com mesma metodologia estudou o efeitos

antioxidantes da whey protein nas células c2C12 e detectou em valor de atividade antioxidante pelo método DPPH correspondente a 3,1 mg proteína/mL.

Vários trabalhos citados na literatura utilizam as referidas técnicas para analisar atividade antioxidante em diferentes alimentos o presente trabalho corrobora com os dados obtidos na literatura, detectando que o suplemento alimentar Whey protein tem atividade antioxidante (Kerasioti et al., 2016; Kreatsouli et al., 2019).

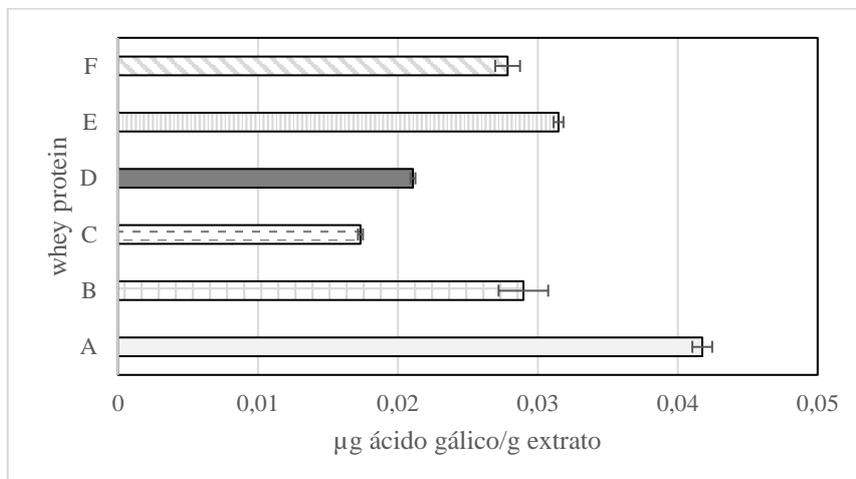
A utilização de whey protein como suplemento alimentar apresenta propriedades antioxidantes eficientes em níveis moleculares e teciduais, apresentando capacidade em neutralizar radicais livres como DPPH , ABTS bem como OH e O<sub>2</sub> que normalmente existem no organismo (Niero et al., 2018).

De acordo com Oliveira et al 2016 o método de redução pelo complexo fosfomolibdênio, se baseia na redução do molibdênio (Mo) VI a V, por substância(s) ativa(s), e formação de um complexo de Mo(V)+fosfato (Mohamed, 2007; Prieto, 1999). Para avaliar a metodologia de fosfomolibdênio construiu-se um gráfico no qual pode ser medida a capacidade antioxidante total utilizando o método de formação do complexo fosfomolibdênio utilizando o padrão de ácido gálico conforme está presente na Figura 2.

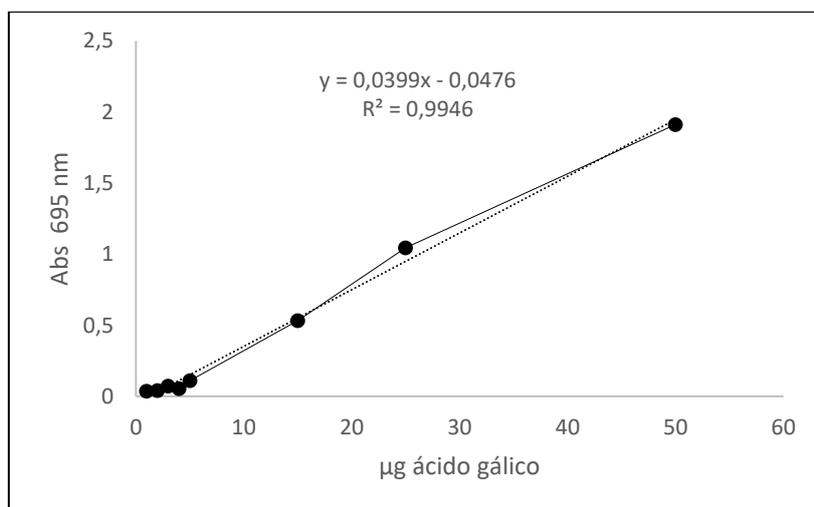
O método de fosfomolibdênio, mede a capacidade antioxidante total, é considerado reprodutível, de baixo custo, livre da interferência de solventes e sem qualquer limitação, foi ajustado à determinação da capacidade antioxidante manifestada nos extratos etanólicos das amostras estudadas no presente trabalho e suas atividades antioxidantes estão apresentados na figura 2, a capacidade de redução do extrato foi expressa em mg de equivalentes de ácido gálico por grama de extrato.

Figura 2. Atividade antioxidante dos extratos etanólicos pelo método de fosfomolibdênio (A) e Reta padrão de ácido gálico como metodologia de dosagem Fosfomolibdênio (B).

A)



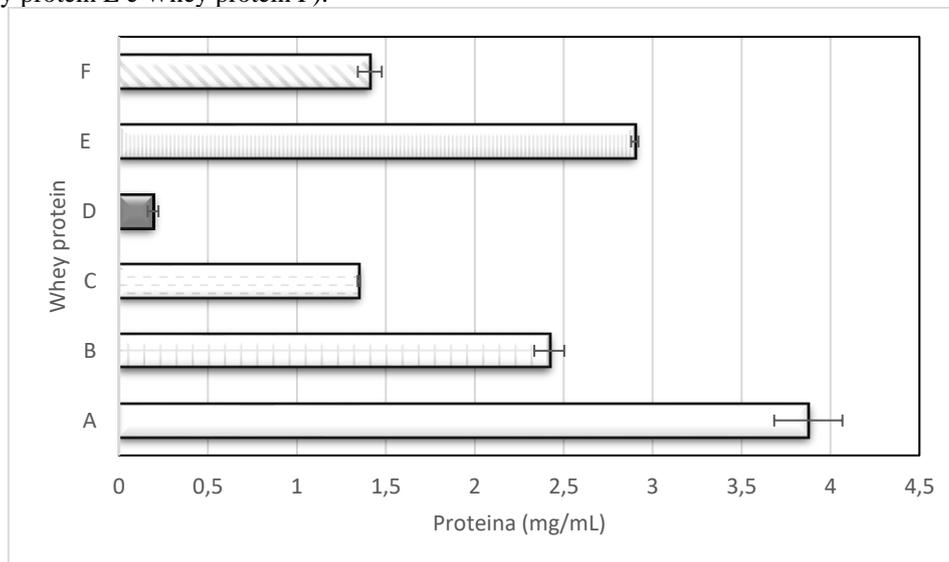
B)



Para todas as amostras foram realizadas quantificações proteicas totais solúveis pelo método de Lowry, visando determinar a concentração proteica no extrato etanólico das diferentes mostras de Whey protein estudada que em condições alcalinas as substâncias presentes no reagente colorimétrico Folin Ciocalteu interagem com as proteínas da amostra gerando um complexo de cor azul que pode ser medido num espectrofotômetro no comprimento de onda de 750 nm. A técnica é bastante sensível, No experimento realizado, elaborou-se uma curva padrão com albumina de soro bovino (BSA) como solução padrão, onde obteve-se um fator de calibração médio para calcular a concentração de proteínas nas amostras e estes valores estão apresentados na Figura 3,

onde foi possível detectar maior concentração proteica no extrato A com valores de 3,875 ± 0,019 mg/mL.

Figura 3. Quantificação de proteínas Totais (mg/mL) pelo método de Lowry dos extratos etanólicos das seis amostras distintas de whey Protein (Whey protein A, Whey protein B, Whey protein C, Whey protein D, Whey protein E e Whey protein F).



Tendo em vista a procura por uma alimentação de boa qualidade e muitas vezes associadas a suplementações que tragam benefícios a saúde. Bem como a utilização de compostos antioxidantes encontrados na dieta que aumentam os mecanismos de defesa contra os radicais livres. Neste contexto o whey protein é uma proteína derivada do soro do leite que é muito comum em suplementações que apresentam atividades antioxidantes. Neste enfoque é necessário a realização de mais estudos na temática abordada, no intuito de conscientizar os praticantes de atividade física e os consumidores de suplementos alimentares, sobre os efeitos positivos que a ingestão desses compostos podem trazer ao seu organismo e como efeito protetor contra diversos tipos de patologias.

#### 4 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nas condições de realização desta pesquisa permitem inferir que: existem no mercado diferentes tipos de suplementos alimentares com teores proteicos bastante diversificados e com diferentes atividades antioxidantes, agregando valor nutricional e funcional de grande benefício na melhoria da qualidade de vida, entretanto existem poucos estudos relacionando a atividade antioxidante em suplementos alimentares ricos em proteínas, fazendo necessário dar continuidade ao tema avaliado.

## REFERÊNCIAS

- ALVES, L.F. Production of Phytotherapeutics in Brazil: History, Problems and Perspectives. *Revista Virtual de Química*, 5, 450-513, 2013.
- CORROCHANO, A.R., BUCKIN, V.† KELLY, P.M.\* and GIBLIN L. Invited review: Whey proteins as antioxidants and promoters of cellular antioxidant pathways. *J. Dairy Sci.* 101:4747–4761, 2018.
- CORONADO H, MARTA, VEGA Y LEÓN, SALVADOR, GUTIÉRREZ T, REY, VÁZQUEZ F, MARCELA, & RADILLA V, CLAUDIA. Antioxidantes: perspectiva actual para la salud humana. *Revista chilena de nutrición*, 42(2), 206-212, 2015.
- DRYÁKOVÁ, A; PIHLANTO, A.; MARNILA, P.; ČURDA, L.; KORHONEN, HJT. Antioxidant properties of whey protein hydrolysates as measured by three methods. *European Food Research and Technology*, v. 230, 6,p. 865-874, 2010.
- HARAGUCHI, F.K; ABREU, W.C; DE PAULA, H. Whey protein: composition, nutritional properties, applications in sports and benefits for human health. *Rev. Nutr.*, Campinas, 19(4):479-488, jul./ago., 2006.
- KERASIOTI E, STAGOS D, PRIFTIS A, AIVAZIDIS S, TSATSAKIS AM, HAYES AW, KOURETAS D. Antioxidant effects of whey protein on muscle C2C12 cells. *Food Chem.* 2014.
- KERASIOTI, E.; STAGOS, D.; GEORGATZI,V.; BREGOU, E.; PRIFTIS, A.; KAFANTARIS,I.; KOURETAS, D. Antioxidant Effects of Sheep Whey Protein on Endothelial Cells. *OxidativeMedicineandCellularLongevity*, 10 pages, 2016.
- KREATSOULI, K.; FOUSTERI, Z.; ZAMPAKAS, K.; KERASIOTI, E.; VESKOUKIS, A.S; MANTAS, C.; GKOUTSIDIS, P.; LADAS, D.; PETROTOS, K.; KOURETAS, D.; STAGO, D. A Polyphenolic Extract from Olive Mill Wastewaters Encapsulated in Whey Protein and Maltodextrin Exerts Antioxidant Activity in Endothelial Cells. *Antioxidants*, 8, 280, 2019.
- KUMAR, S., SHARMA, S. & VASUDEVA, N. Review on antioxidants and evaluation procedures. *Chin. J. Integr. Med.*, 2017.
- LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* Nov;193(1):265-75,1951.
- MACEDO, J. L.; SILVA, D.J.S.; SANTOS, L.S.; RAMOS, S.M.N.; OLIVEIRA, N.S.L.; ASSUNÇÃO, M.J.S.M. Consumo de antioxidantes por praticantes de atividade física. *Revista Brasileira de Nutrição Esportiva*, São Paulo. v. 13. n. 80. p.550, 2019.
- MOHAMED, R.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Antioxidant capacity of extracts from wild and crop plants of the Mediterranean region. *Journal of food science*, v. 72, n.1, p.S059-63, 2007.

MOKRANI A., MADANI K. Effect of solvent, time and temperature on the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacity of peach (*Prunus persica* L.) fruit. *Separation and Purification Technology*, v. 162, p. 6876, 2016.

MOSCAL, S.S.; SANCHES, R.A.;COMUNE, A.C.C. A IMPORTÂNCIA DOS ANTIOXIDANTES NA NEUTRALIZAÇÃO DOS RADICAIS LIVRES: uma revisão. *Revista Saúde em Foco – Edição nº 9 – Ano: 2017.*

MUNTEANU, I.G.; APETREI, C. Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity: A Review. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 3380, 2021.

NIERO, G; CURRÒ, S; COSTA, A.; PENASA, M; CASSANDRO,M; BOSELLI,C; GIANGOLINI, G. AND DE MARCHI, M.. Phenotypic characterization of total antioxidant activity of buffalo, goat, and sheep milk. *J. Dairy Sci.* 101:4864–4868, 2018.

NIKI, E. Assessment of Antioxidant Capacity in Vitro and in Vivo. *Free Radical Biology and Medicine*, 49, 503-515, 2010.

OLIVEIRA, V.B.1, , ZUCHETTO, M., OLIVEIRA, C.F., PAULA, C.S., DUARTE, A.F.S., MIGUEL, M.D., MIGUEL, O.G. Efeito de diferentes técnicas extrativas no rendimento, atividade antioxidante, doseamentos totais e no perfil por clae-dad de dicksonia sellowiana (presl.). *Hook, dicksoniaceae. Rev. Bras. Pl. Med., Campinas*, v.18, n.1, supl. I, p.230-239, 2016.

OLIVEIRA, J.F SILVA, M.L.S; TEIXEIRA,L.M.C; SILVA, L.A.O. Atividade antioxidante e antimicrobiana de *Streptomyces hygroscopicus*. *Braz. J. of Develop., Curitiba*, v. 6, n. 8, p. 55097-55106 aug. 2020.

PRIETO P, PINEDA M, AGUILAR M. Spectrophotometric quantification of antioxidant capacity through the formation of a fosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Anal Biochem* 269: 337-341, 1999.

SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, I. et al. In vitro antioxidant activity of brewed using different procedures: Italian, espresso and filter. *Food Chemistry, Oxford*, v. 90, n. 1/2, p. 133-139, Jan./ Feb. 2005

SHANMUGAM S; SHANKAR K; RAMACHANDIRAN S., NAIDU K., KALIMUTHU K., MUTHUVE A. In Vitro Studies and Characterization of Tissue Protein from Green Mussel, *Perna viridis* (Linnaeus, 1758) for Antioxidant and Antibacterial Potential. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 21, 2019.

SILVA, A. R. R. DA; BRITO, P. D. DE. Níveis séricos de antioxidantes e sua suplementação em pessoas vivendo com HIV: revisão integrativa. *Revista Ciências em Saúde*, v. 11, n. 2, p. 43-50, 23 jun. 2021.

SOARES T.C., VILARINHO M.F.S.B., SOARES T.C, ROCHA L.A., SANTANA L.C.B., SILVA L.A.A., FARIAS R.K.C., SILVA N.C., SOUSA M.M.C., SILVA K.H.R., CÂMARA G.B., LIMA V.M., BARROS I.S., ROCHA G.C., OLIVEIRA V.A. Efeitos da suplementação das vitaminas C e E na prática de atividade física: uma revisão

sistemática. Revista Eletrônica Acervo Saúde / Electronic Journal Collection Health, Vol. 11 (7), p.1-12, 2019.

ZHANG, Q. X.; LING, Y. F; SUN, Z;ZHANG, L; YU, H. X S. M. KAMAU, AND R.. LU, R.R. Protective effect of whey protein hydrolysates against hydrogen peroxide-induced oxidative stress on PC12 cells. *Biotechnol. Lett.* 34:2001–2006. 2012.