



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

RENATA DINNIES SANTOS

**PRODUTO LÁCTEO CONTENDO FITOQUÍMICOS
BIOATIVOS DE EXTRATOS DE ESPECIARIAS**

Londrina

2007

RENATA DINNIES SANTOS

**PRODUTO LÁCTEO CONTENDO FITOQUÍMICOS
BIOATIVOS DE EXTRATOS DE ESPECIARIAS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Lúcia Helena da Silva Miglioranza.

Londrina

2007

RENATA DINNIES SANTOS

**PRODUTO LÁCTEO CONTENDO FITOQUÍMICOS BIOATIVOS DE EXTRATOS
DE ESPECIARIAS**

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Lúcia H. da Silva Miglioranza
Universidade Estadual de Londrina / DCTA

Prof^a. Dr^a. Sandra Garcia
Universidade Estadual de Londrina / DCTA

Prof. Dr. Gert Marcos Lubeck
PUC – Toledo/PR

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Dr^a. Lúcia Helena da Silva Miglioranza pelo apoio em todas as etapas deste trabalho.

Aos meus pais, Luiz Antonio e Zélia Maria, pela confiança e motivação.

Ao Guilherme, pelo apoio e incentivo.

Aos amigos e colegas, pela força e pela vibração em relação a esta jornada.

Aos professores do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Ao técnico de laboratório, Nelson, pelo auxílio no desenvolvimento das atividades práticas.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

A todos que, com boa intenção, colaboraram para a realização e finalização deste trabalho.

E a Deus, por me dar a vida e todos os companheiros (as) que nela encontrei.

SANTOS, Renata D.; MIGLIORANZA, Lúcia H. S. **Produto lácteo contendo fitoquímicos bioativos de extratos de especiarias**. 2007. 100 p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina – PR.

RESUMO

Compostos antioxidantes naturais, adicionados em alimentos, podem ter um impacto fisiológico sobre a saúde humana, principalmente porque podem reduzir o risco de doenças ou promover um retardamento dos danos provocados pelo efeito de radicais livres, como as doenças cardiovasculares, câncer intestinal, infecções intestinais, entre outras. *Rosemarinus officinalis* L. (alecrim) e *Origanum vulgare* (orégano) são duas especiarias ricas em compostos fenólicos com atividade antioxidante, que podem atuar nos processos de oxidação lipídica. Neste trabalho, foram otimizadas as condições de extração de compostos fenólicos das especiarias (*Rosemarinus officinalis* L. e *Origanum vulgare*), através de metodologia de superfície de resposta, variando-se a concentração de solvente (etanol) e o tempo de operação. Foi avaliada a atividade antioxidante nos extratos brutos (inibição do radical DPPH e dosagem de MDA) e desenvolvido um produto lácteo contendo os fitoquímicos bioativos dos extratos das especiarias, que foi avaliado sensorialmente. As condições ótimas de extração de compostos fenólicos foram 75% de etanol em 8 horas de operação para *Rosemarinus officinalis* L. ($0,46 \text{ mg/ml} \pm 0,01 \text{ p/v}$) e 40% de etanol em 7,5 horas de operação para *Origanum vulgare* ($2,57 \text{ mg/mL} \pm 0,02 \text{ p/v}$). O extrato de *Rosemarinus officinalis* L. apresentou maior atividade antioxidante tanto na dosagem de MDA quanto na inibição do radical DPPH. Os extratos concentrados foram adicionados, separadamente, a uma base de ricota, dando origem a um patê, que foi avaliado sensorialmente. O produto contendo extrato concentrado de alecrim ($9,60 \text{ mg/mL p/v}$) atingiu 76,0% de aceitação, com compostos fenólicos na concentração de 96 mg/100g de produto. O produto lácteo formulado com extrato de *Origanum vulgare* apresentou concentração de compostos fenólicos de 396 mg/100g de produto, com índice de aceitação de 91,1%.

Palavras-chave: antioxidantes, radicais livres, fitoquímicos bioativos, ácido rosmarínico, diterpenos fenólicos.

SANTOS, Renata D.; MIGLIORANZA, Lúcia H. S. **Dairy product containing bioactive phytochemicals from herbs extracts**. 2007. 100 p. Dissertation (Master in Food Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina – PR.

ABSTRACT

Natural antioxidants added to foods, may have a physiological impact on human health, particularly because they may reduce the risk of illnesses or they promote the delay of damaging free radicals effect, like cardiovascular diseases, intestinal cancer or infections symptoms. *Rosemarinus officinalis* L. (rosemary) and *Origanum vulgare* (oregano) are two herbs, both riches in phenolic compounds with antioxidant activity, which can act in the lipid oxidation processes. In this experiment, it was established the best conditions for phenolic compounds extraction from rosemary and oregano, through response surface methodology, varying solvent (ethanol) running time and its concentration. The antioxidant activity from raw extracts was evaluated (inhibition of DPPH radical and MDA dosage) and it was developed a dairy product containing the bioactive phytochemicals extracted, that were sensory evaluated. The best condition for phenolic compounds extraction, was 75% ethanol in 8 hours running time for rosemary ($0.46 \text{ mg/ml} \pm 0.01 \text{ w/v}$), and 40% ethanol in 7,5 hours running time for oregano ($2.57 \text{ mg/mL} \pm 0.02 \text{ w/v}$). The rosemary extract showed high antioxidant activity in both tests. The obtained extracts were added, separately, to a blend of ricotta, which was sensory evaluated. The product with concentrated rosemary extracts ($9,60 \text{ mg/mL w/v}$), reached 76,0% acceptance, having 96 mg/100g phenolic concentration in the final blend. The ricotta elaborated with *Origanum vulgare* extract, had 396 mg/100g phenolic compound final concentration, with 91,1% acceptance index.

Key-word: free radicals, antioxidants, bioactive phytochemicals, rosmarinic acid, phenolic diterpenes.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1	RADICAIS LIVRES E AS ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO	15
2.2	EFEITOS BIOLÓGICOS DOS RADICAIS LIVRES	18
2.2.1	Danos celulares causados por radicais livres de oxigênio	20
2.3	OXIDAÇÃO LIPÍDICA	22
2.4	ANTIOXIDANTES	27
2.4.1	Antioxidantes naturais	29
2.4.2	Compostos fenólicos	31
2.5	ESPECIARIAS	39
2.5.1	Alecrim (<i>Rosemarinus officinalis</i> L.)	39
2.5.2	Orégano (<i>Origanum vulgare</i>)	41
2.6	DESENVOLVIMENTO DE ALIMENTOS FUNCIONAIS	44
2.6.1	Avaliação Sensorial	46
2.7	PROTEÍNAS DO SORO DE LEITE COMO COMPONENTES FISIOLOGICAMENTE FUNCIONAIS	47
2.8	RICOTA.....	51
3	OBJETIVOS	52
3.1	OBJETIVO GERAL	52
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	52
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	53
4.1	MATÉRIAS-PRIMAS	53
4.2	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	53
4.2.1	Produção dos extratos de <i>Origanum vulgare</i> e <i>Rosemarinus officinalis</i> L.	53
4.3	FENÓLICOS TOTAIS.....	55
4.4	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	56
4.4.1	Sistema de inibição do radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH).....	56
4.4.2	Dosagem de MDA (malondialdeído)	56
4.5	DESENVOLVIMENTO DO PRODUTO LÁCTEO (PATÊ DE RICOTA).....	58

4.5.1 Obtenção da formulação-base	58
4.5.2 Concentração dos extratos	58
4.5.3 Formulações.....	58
4.5.4 Avaliação sensorial	59
4.5.5 Caracterização físico-química da ricota comercial e do produto final.....	60
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	63
5.1 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS DE <i>Origanum vulgare</i> E <i>Rosemarinus officinalis</i> L.	63
5.2 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	71
5.2.1 Sistema de inibição do radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH).....	71
5.2.2 Dosagem de MDA (malondialdeído)	72
5.3 DESENVOLVIMENTO DO PRODUTO LÁCTEO (PATÊ DE RICOTA).....	74
5.3.1 Concentração dos extratos	74
5.3.2 Caracterização físico-química da ricota comercial e do produto final.....	74
5.3.3 Avaliação sensorial	75
6 CONCLUSÃO.....	82
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83
APÊNDICE.....	96
APÊNDICE 1.....	97
APÊNDICE 2.....	99

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Radicais livres e danos celulares	19
Figura 2: Representação esquemática da autooxidação de lipídios contendo ácidos graxos poliinsaturados (LH) e suas consequências	23
Figura 3: Estrutura genérica de uma molécula flavonóide	32
Figura 4: Monofenol (ex. tocoferóis e tocotrienóis) e ácidos fenólicos como exemplos de antioxidantes naturais	33
Figura 5: Possíveis rotas dos polifenóis em humanos	38
Figura 6: Estrutura dos compostos carnosol e ácido carnósico	40
Figura 7: Estrutura do ácido rosmarínico	41
Figura 8: Estrutura dos compostos carvacrol e timol.....	42
Figura 9: Fluxograma do processo de extração de compostos fenólicos de <i>Origanum vulgare</i> e <i>Rosemarinus officinalis</i> L.....	54
Figura 10: Superfície de resposta para os efeitos de concentração de etanol e tempo de extração sobre a concentração de compostos fenólicos de <i>Rosemarinus officinalis</i> L.....	68
Figura 11: Superfície de resposta para os efeitos de concentração de etanol e tempo de extração sobre a concentração de compostos fenólicos de <i>Origanum vulgare</i>	69
Figura 12: Inibição do radical DPPH em extratos alcoólicos de <i>Origanum vulgare</i> e <i>Rosemarinus officinalis</i> L.....	71

Figura 13: Concentração de MDA (malondialdeído)73

Figura 14: Frequência das notas obtidas no teste de aceitação sensorial global para as amostras de patê de ricota (9 = gostei muitíssimo; 5 = não gostei nem desgostei; 1 = desgostei muitíssimo).....77

Figura 15: Avaliação dos atributos cor, sabor amargo, acidez, sabor salgado e textura/firmeza para as amostras de patê de ricota, (a) adicionado de extrato de *Origanum vulgare* e (b) adicionado de extrato de *Rosemarinus officinalis L*, utilizando a escala do ideal (5 = muito mais que o ideal; 3 = ideal; 1 = muito menos que o ideal)78

Figura 16: Comparação dos atributos cor, sabor amargo, acidez, sabor salgado e textura/firmeza, de duas amostras de patê de ricota avaliadas pela escala do ideal (5 = muito mais que o ideal; 3 = ideal; 1 = muito menos que o ideal).....79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Fontes endógenas e exógenas de geração de radicais livres.....	18
Tabela 2: Vantagens e desvantagens dos antioxidantes naturais comparados aos sintéticos	30
Tabela 3: Antioxidantes naturais em alguns ingredientes alimentares.....	31
Tabela 4: Compostos fenólicos totais em extratos aquosos de ervas.....	34
Tabela 5: Proteínas do soro em leite de vaca	47
Tabela 6: Valores experimentais e níveis codificados para as variáveis independentes, para o planejamento fatorial 3^2	54
Tabela 7: Planejamento fatorial de segunda ordem para o processo de extração de compostos fenólicos de <i>Origanum vulgare</i> e <i>Rosemarinus officinalis</i> L.....	55
Tabela 8: Quantificação de MDA.....	57
Tabela 9: Formulações propostas para o patê de ricota	59
Tabela 10: Resposta da variável dependente (compostos fenólicos totais) para o primeiro planejamento.....	64
Tabela 11: Efeitos para <i>Rosemarinus officinalis</i> L. e <i>Origanum vulgare</i> para o primeiro planejamento	64
Tabela 12: Caminho da máxima inclinação ascendente para extração de compostos fenólicos de <i>Rosemarinus officinalis</i> L.	65

Tabela 13: Caminho da máxima inclinação ascendente para extração de compostos fenólicos de <i>Origanum vulgare</i>	65
Tabela 14: Resposta da variável dependente (compostos fenólicos totais) para o segundo planejamento com <i>Rosemarinus officinalis L.</i>	66
Tabela 15: Resposta da variável dependente (compostos fenólicos totais) para o segundo planejamento com <i>Origanum vulgare</i>	66
Tabela 16: Efeitos para <i>Rosemarinus officinalis L.</i> e <i>Origanum vulgare</i> no segundo planejamento	67
Tabela 17: Inibição do radical DPPH em extratos alcoólicos de <i>Origanum vulgare</i> e <i>Rosemarinus officinalis L.</i>	71
Tabela 18: Concentração de MDA (malondialdeído)	73
Tabela 19: Caracterização físico-química da ricota comercial (1) e do patê de ricota adicionado de extrato de <i>Origanum vulgare</i> (2) e <i>Rosemarinus officinalis L.</i> (3)	75
Tabela 20: Resultado do teste de aceitação sensorial global do patê de ricota adicionado de extratos de <i>Origanum vulgare</i> e <i>Rosemarinus officinalis L.</i>	76
Tabela 21: Resultado da avaliação sensorial dos atributos cor, sabor amargo, acidez, sabor salgado e textura/firmeza, de amostras de patê de ricota, utilizando a escala do ideal	79
Tabela 22: Intenção de compra do patê de ricota	81

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BHA	Hidroxianisol butilado
BHT	Hidroxitolueno butilado
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPPH	Radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil
EDTA	Ácido etilenodiaminotetraacético
EROS's	Espécies reativas de oxigênio
GRAS	<i>Generally regarded as safe</i> (geralmente reconhecido como seguro)
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
MDA	Malondialdeído
PG	Propil galato
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
TBHQ	Terc-butil hidroquinona

1 INTRODUÇÃO

A preocupação com a ação dos antioxidantes e a sua relação com os radicais livres se tornou essencial à compreensão de algumas patologias. Os radicais livres são átomos ou moléculas produzidos continuamente durante os processos metabólicos e atuam como mediadores para a transferência de elétrons em várias reações bioquímicas, desempenhando funções relevantes no metabolismo. A produção excessiva de radicais livres pode favorecer a ocorrência de lesões oxidativas em macromoléculas e estruturas celulares, e sua cronicidade pode estar envolvida com o desenvolvimento de numerosas doenças, como câncer, doenças coronarianas, arterosclerose, desordens inflamatórias, entre outras.

As lesões causadas pelos radicais livres nas células podem ser prevenidas ou reduzidas por meio da atividade de antioxidantes. O sistema de defesa antioxidante é formado por compostos enzimáticos e não-enzimáticos estando presentes tanto no organismo como nos alimentos ingeridos (SHAMI et al, 2004). Os antioxidantes podem agir diretamente na neutralização da ação dos radicais livres ou participar indiretamente de sistemas enzimáticos com essa função.

Diversos estudos têm demonstrado que o consumo de substâncias antioxidantes pode produzir uma ação protetora efetiva contra os processos oxidativos que naturalmente ocorrem no organismo. O uso de antioxidantes naturais em alimentos aumentou consideravelmente nos últimos anos. São compostos encontrados em praticamente todas as plantas, microrganismos, fungos e até mesmo em tecidos animais. A maioria são compostos fenólicos e os grupos mais importantes são os tocoferóis, flavonóides e ácidos fenólicos (RAJALAKSHIMI et al, 1996).

Os antioxidantes fenólicos naturais apresentam-se como uma alternativa para minimizar ou retardar a deterioração oxidativa em alimentos, além de elevar o valor funcional do alimento. São encontrados principalmente em frutas, vegetais, chás, vinhos e em várias ervas. A atividade antioxidante dos compostos fenólicos nas plantas é devida principalmente às suas propriedades redox e à

estrutura química, que desempenha um papel importante na neutralização de radicais livres, na ação quelante de metais e na absorção de oxigênio singlete e triplete (SHETTY et al, 2005).

As especiarias da família *Laminaceae* são muito bem reconhecidas pelas suas propriedades antioxidantes, especialmente alecrim, sálvia e orégano (ABDALLA et al, 2001).

A combinação de alimentos, como o leite, com moléculas biologicamente ativas, como compostos fenólicos, pode ser uma estratégia para reduzir o risco de distúrbios metabólicos que podem conduzir a doenças crônicas. As proteínas do soro são conhecidas por possuírem funcionalidade fisiológica devido principalmente ao alto conteúdo de aminoácidos essenciais (WHITNEY, 1988), e podem ser utilizadas como ingredientes alternativos para a formulação de alimentos e bebidas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 RADICAIS LIVRES E AS ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

Os primeiros estudos a respeito de radicais livres se deram por volta de 1924. No entanto, só nos anos setenta, começaram a surgir trabalhos relatando a importância dos radicais livres para os seres vivos, particularmente os aeróbios. Os principais estudos relacionaram sua atuação junto a aspectos da Biologia Celular e Molecular, Fisiologia e Patologia Humana (BAST et al, 1991).

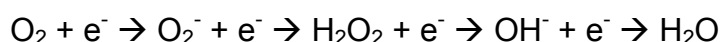
A importância dos radicais livres no metabolismo celular vem se tornando clara, em função de intensa investigação em vários campos, incluindo estudos da peroxidação lipídica, dos sistemas de oxidoredutase e no papel da superóxido dismutase. O interesse por radicais livres e antioxidantes tem se intensificado ultimamente, pelo possível papel dessas substâncias na patogênese de diversas doenças. Assim, estudos sobre os sistemas de oxirredução, envolvendo a peroxidação lipídica, espécies oxidantes, toxinas ambientais (xenobióticos) mediadas por radicais livres, e a relação desses sistemas com a arteriosclerose, inflamação, diabetes, câncer e outras doenças, bem como uma desejada proteção efetuada pelos antioxidantes, tem levado inúmeros autores a se dedicarem ao assunto, procurando estabelecer uma base fisiopatológica segura para os vários processos (VANNUCCHI et al, 1998).

O termo radical livre é frequentemente usado para designar qualquer átomo ou molécula com existência independente, contendo um ou mais elétrons não pareados, nos orbitais externos. Essa configuração faz dos radicais livres moléculas altamente instáveis, com meia-vida curtíssima e quimicamente muito reativas (BIANCHI et al, 1999).

O elétron livre que caracteriza o radical livre pode estar centrado em um átomo de H, O, N, C, S ou átomos de metais de transição. Na natureza existem duas importantes substâncias que podem gerar radicais livres, o oxigênio no estado fundamental (O_2) e o óxido nítrico (NO), que ocorre como poluente atmosférico, mas que também é sintetizado em diversas células e atualmente é identificado como o fator relaxante dependente do endotélio e um importante vasodilatador (HÖEHR et al, 2001).

Pelo fato da molécula de oxigênio ser um bi-radical (possuir dois elétrons livres nos orbitais p antiligantes), o oxigênio reage preferencialmente com moléculas de configuração eletrônica semelhante. Como a maioria das biomoléculas não são bi-radicais, possuindo um grande número de ligações covalentes, o oxigênio fica impedido (por restrição de “spin”) de reagir com as mesmas, evitando assim que alvos celulares importantes sejam lesados (HALLIWELL, 2006). No entanto, o oxigênio pode dar origem a diversas espécies reativas, seja por absorção de energia ou por transferência de elétrons. Na forma de oxigênio singlete, a restrição de “spin” desaparece, conferindo-lhe um maior poder oxidante (HÖEHR et al, 2001).

Uma outra via de formação de espécies reativas de oxigênio (ERO's) – oxidantes de maior importância biológica – consiste na redução unieletrônica do oxigênio à água, na qual a entrada de quatro elétrons na molécula de oxigênio promove o aparecimento do radical superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (OH^-), intermediários parcialmente reduzidos do oxigênio molecular, conforme o esquema abaixo (HALLIWELL, 2006).



O peróxido de hidrogênio não é considerado um radical livre verdadeiro, mas é capaz de atravessar facilmente as membranas celulares e induzir danos na molécula de DNA por meio de reações enzimáticas. Ao receber mais um elétron, normalmente proveniente do ferro ou do cobre, origina o radical hidroxila. Este último é, entre as espécies radicalares conhecidas, uma das mais reativas, pois necessita somente de mais um elétron para se estabilizar. Estas ERO's para se estabilizarem devem doar ou receber elétrons de uma ou outra molécula, tornando esta última uma espécie também radicalar e a consequência disto é a oxidação dos fosfolípidios de membranas celulares e subcelulares, do DNA e das proteínas (HÖEHR et al, 2001; FERREIRA et al, 1997; BIANCHI et al, 1999).

Os radicais livres podem ser gerados no citoplasma, nas mitocôndrias ou na membrana e o seu alvo celular (proteínas, lípidios, carboidratos e DNA) está relacionado com o seu sítio de formação (BIANCHI et al, 1999). Portanto a toxicidade do oxigênio, em praticamente todas as células aeróbias, decorre da formação de ERO's que podem interagir com diversas biomoléculas, com o objetivo de se estabilizarem (FERREIRA et al 1997; HALLIWELL, 2006). Em condições

normais, a concentração dessas espécies dentro das células é extremamente baixa pelo fato de existirem enzimas antioxidantes que as removem, ou impedem a sua formação. Estes radicais tendem a serem eliminados do organismo pelo conjunto das enzimas glutathione peroxidase, glutathione reductase, superóxido dismutase e pela catalase (HÖEHR et al, 2001).

2.2 EFEITOS BIOLÓGICOS DOS RADICAIS LIVRES

A formação de radicais livres *in vivo* ocorre via ação catalítica de enzimas, durante os processos de transferência de elétrons que ocorrem no metabolismo celular e pela exposição a fatores exógenos (Tabela 1) (BIANCHI et al, 1999).

Tabela 1: Fontes endógenas e exógenas de geração de radicais livres

Endógenas	Exógenas
Respiração aeróbia	Ozônio
Inflamações	Radiações gama e ultravioleta
Peroxisomos	Medicamentos
Enzimas do citocromo P 450	Dieta
	Cigarro

Fonte: BIANCHI et al, 1999

Devido à sua alta reatividade química, os radicais livres apresentam meia-vida razoavelmente curta em sistemas biológicos. Estudos extensivos utilizando sistemas-modelo e materiais biológicos *in vitro*, demonstram claramente que a reatividade dos radicais livres é capaz de causar distúrbios metabólicos e danificar a estrutura das membranas de várias formas (DESHPANDE et al, 1996). Os maiores distúrbios induzidos por radicais livres são mostrados na Figura 1.

A presença de radicais livres tem sido correlacionada com um grande número de doenças, indicando que estas espécies não têm um papel etiológico na grande maioria dos estados patológicos, mas que participam diretamente dos mecanismos fisiopatológicos que determinam a continuidade e as complicações presentes nestes processos (HÖEHR et al, 2001). Como exemplos de doenças relacionadas aos radicais livres, podem-se citar: câncer, doenças coronarianas, arterosclerose, diabetes, catarata, artrite, desordens inflamatórias, degeneração neurológica, envelhecimento, entre outras (DESHPANDE et al, 1996).

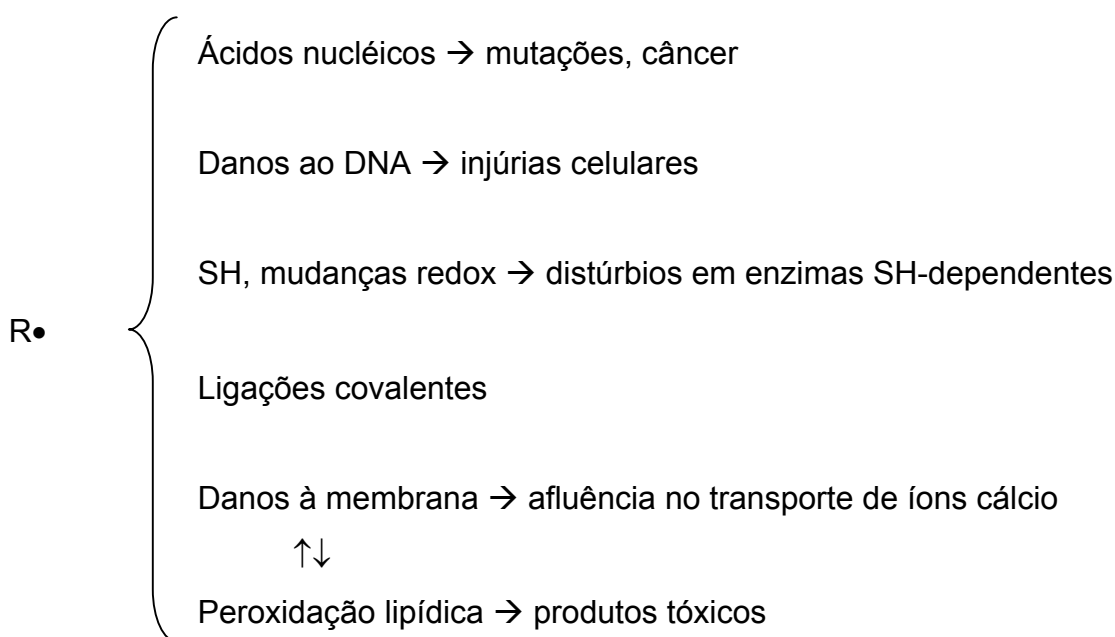


Figura 1: Radicais livres e danos celulares

Fonte: DESHPANDE et al, 1996

As espécies radicalares estão envolvidas nos mecanismos de reações inflamatórias ou atuam como segundos mensageiros para manter diversas funções celulares. Assim, o equilíbrio entre a formação e a remoção de espécies radicalares no organismo deve ser regulado de forma que as reações e processos metabólicos dependentes das mesmas possam ocorrer em um nível adequado para a manutenção da fisiologia das células (HALLIWELL, 2006).

O desequilíbrio entre a formação e a remoção dos radicais livres no organismo, decorrente da diminuição dos antioxidantes endógenos ou do aumento da geração de espécies, gera um estado pró-oxidante que favorece a ocorrência de lesões oxidativas em macromoléculas e estruturas celulares, inclusive podendo resultar em morte celular. Este tipo de lesão oxidativa é definida como estresse oxidativo, que designa uma condição na qual ocorre um desequilíbrio entre as concentrações de espécies pró e antioxidantes (HÖEHR et al, 2001).

2.2.1 Danos celulares causados por radicais livres de oxigênio

2.2.1.1 Reação de radicais livres com proteínas

A oxidação dos aminoácidos pelos radicais livres de oxigênio induz a mudanças físicas nas proteínas que eles compõem, que são distribuídas em três categorias: fragmentação, agregação e susceptibilidade à digestão proteolítica. O fenômeno da fragmentação devido aos radicais livres foi documentado com a albumina e o colágeno (MARX et al, 1986). As proteínas são seletivamente fragmentadas nos resíduos de prolina bem como nos aminoácidos histidina e arginina. O radical hidroxila pode ser o principal responsável pela agregação das proteínas, devido à sua capacidade de formar ligações cruzadas entre elas. A degradação proteolítica é o resultado das alterações grosseiras da conformação protéica que podem ocorrer pela ação dos radicais livres de oxigênio (ANDRADE Jr. et al, 2005).

2.2.1.2 Reação de radicais livres com lipídios

Os lipídios são provavelmente os mais susceptíveis das classes de biomoléculas atacadas pelos radicais livres. A destruição oxidativa (peroxidação lipídica) dos ácidos graxos poliinsaturados contidos nas membranas celulares, é lesiva porque se processa como uma reação em cadeia perpetuadora (OLSZEWER, 1995).

Estudos *in vitro* têm demonstrado que a peroxidação de ácidos graxos poliinsaturados usualmente envolve três processos operacionalmente definidos: iniciação (formação de um conjugado dieno pela subtração de um átomo de hidrogênio pelo radical livre), propagação (interação do oxigênio molecular com o carbono, com formação do radical hidroperóxido) e terminação (geração de produtos não-radicalares) (DESHPANDE et al, 1996; JADHAV et al, 1996; SHAHIDI et al, 2004a). O metabolismo dos hidroperóxidos produz malondialdeído (MDA), que pode ser usado como marcador da lipoperoxidação (MIRANDA et al, 2004).

A peroxidação lipídica é a maior fonte de produtos citotóxicos, como os aldeídos, produzidos pela decomposição de hidroperóxidos. Os principais ácidos graxos que sofrem peroxidação lipídica na célula são o linoleico, o araquidônico e o docosahexanóico, além de outros ácidos graxos poliinsaturados (ANDRADE Jr. et al, 2005; DESHPANDE et al, 1996).

2.2.1.3 Peroxidação de carboidratos

Sagone Jr. et al (1983) mostraram que a oxidação da glicose pode ser tanto um meio de varrer os radicais hidroperóxidos, quanto tornar-se fonte de radicais livres de oxigênio. Wolff et al (1984) demonstraram que monossacarídeos simples rapidamente sofrem auto-oxidação sob condições fisiológicas, formando os complexos dicarbonil e peróxido de hidrogênio. A glicose oxidada pode reagir com as proteínas, em um processo denominado glicosilação ou glicação.

2.2.1.4 Modificações do genoma

A lesão do DNA mitocondrial é a que mais merece destaque, pois a mitocôndria é a fonte mais importante de radicais livres de oxigênio, e o seu DNA está exposto a níveis elevados de radicais livres. Por este motivo, o DNA mitocondrial parece ser o alvo preferencial para muitos xenobióticos químicos carcinogênicos (ANDRADE Jr. et al, 2005). A lesão do DNA induzida pelo radical hidroxila inclui alterações de bases e quebra da molécula. Dos cinco principais componentes do DNA, a timina e a citosina são as bases mais susceptíveis aos danos causados pelo ataque do radical hidroxila, seguidas pela adenina, guanina e o açúcar desoxirribose (DESHPANDE et al, 1996).

2.3 OXIDAÇÃO LIPÍDICA

Todos os componentes celulares são susceptíveis às ERO's, porém a membrana é um dos mais atingidos em decorrência da oxidação lipídica, que acarreta alterações em sua estrutura e permeabilidade (FERREIRA et al, 1997). A maior susceptibilidade da membrana celular se deve ao elevado conteúdo de ácidos graxos insaturados. Com isso, há perda da seletividade na troca iônica e liberação do conteúdo de organelas, como as enzimas hidrolíticas dos lisossomas, e formação de produtos citotóxicos (como o malondialdeído), culminando com a morte celular (FERREIRA et al, 1997; JADHAV et al, 1996).

Segundo Jadhav et al (1996), a oxidação lipídica pode estar relacionada com doenças coronarianas, arterosclerose, câncer e processos de envelhecimento. Porém, nem sempre os processos de oxidação lipídica são prejudiciais, já que seus produtos são importantes na reação em cadeia a partir do ácido araquidônico (formação de prostaglandinas) e, portanto, na resposta inflamatória (FERREIRA et al, 1997).

A oxidação lipídica é um processo complexo que envolve reações químicas e bioquímicas, mediadas por radicais livres, oxigênio, íons metálicos, e, em sistemas biológicos, um número elevado de outros fatores (JADHAV et al, 1996).

A Figura 2 representa um esquema geral da autooxidação de lipídios insaturados e suas conseqüências na qualidade dos alimentos.

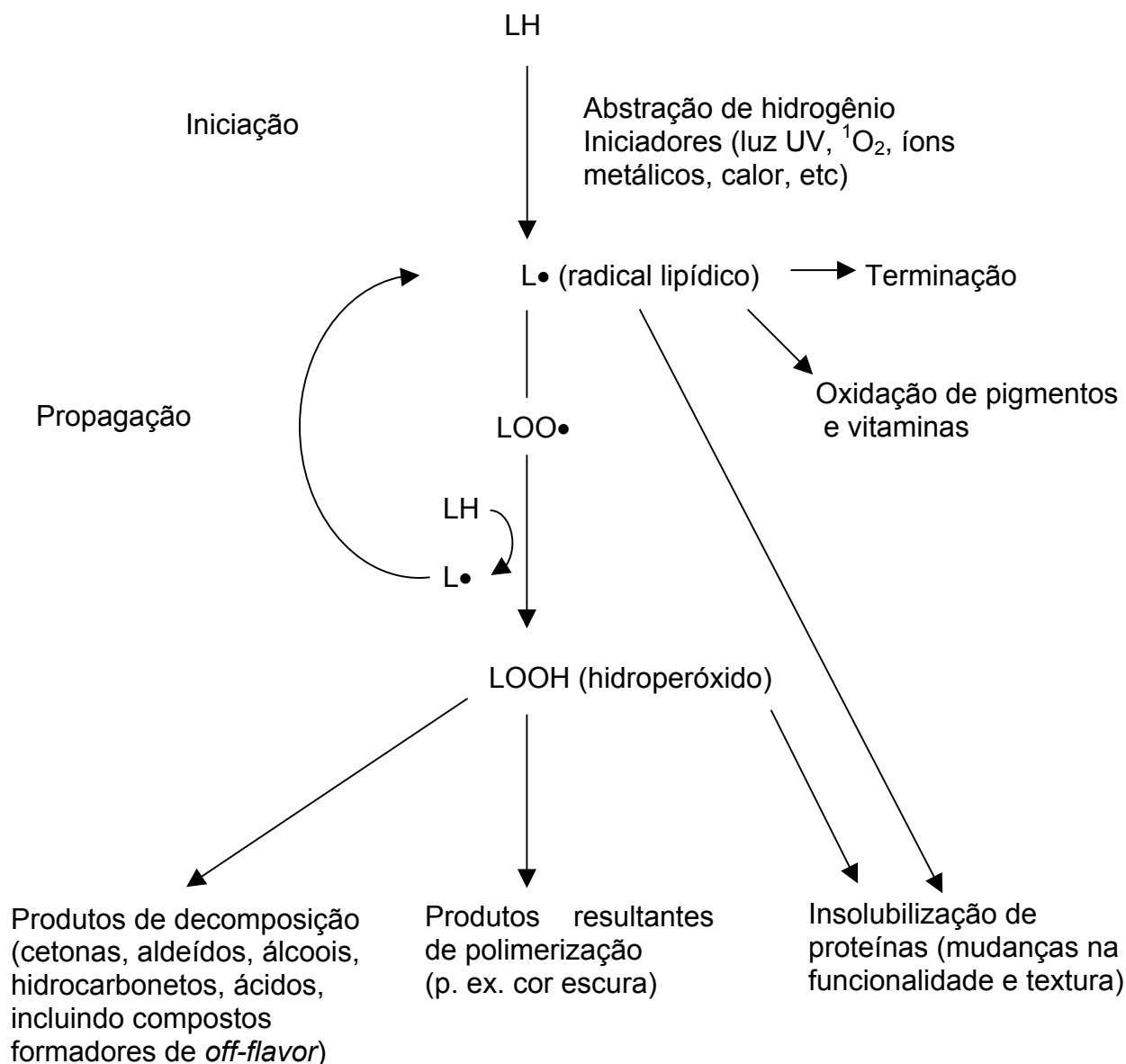


Figura 2: Representação esquemática da autooxidação de lipídios contendo ácidos graxos poliinsaturados (LH) e suas consequências

Fonte: SHAHIDI et al, 2004a

Iniciação

A oxidação lipídica inicia com a formação de radicais livres e com o seqüestro do hidrogênio do ácido graxo insaturado (LH) (FERREIRA et al, 1997).



(01)



A formação do radical lipídico $\text{L}\bullet$ é usualmente mediada por traços de metais, irradiação, luz ou calor. Da mesma forma, os hidroperóxidos lipídicos, que existem em quantidades traço mesmo antes da reação de oxidação, são quebrados para formar radicais como mostrado nas equações 2 e 3. Os hidroperóxidos lipídicos são formados através de vários caminhos, incluindo a reação do oxigênio singlete com lipídios insaturados ou a oxidação catalisada por lipooxygenase, de ácidos graxos insaturados (JADHAV et al, 1996).

Propagação

A propagação do processo de oxidação lipídica ocorre por meio de reações em cadeia que consomem oxigênio e formam novos radicais livres (radicais peróxido $\text{LOO}\bullet$) ou peróxidos (LOOH), como nas equações 4 e 5.



Os produtos $\text{L}\bullet$ e $\text{LOO}\bullet$ podem futuramente propagar novas reações de formação de radicais livres (FERREIRA et al, 1997; JADHAV et al, 1996).

O radical peróxido ($\text{LOO}\bullet$) inicia uma cadeia de reações com outras moléculas resultando na formação de hidroperóxidos lipídicos e radicais livres lipídicos. Essa reação, quando repetida várias vezes, produz um acúmulo de hidroperóxidos. A reação de propagação se torna um processo contínuo enquanto há disponibilidade de lipídios insaturados ou moléculas de ácidos graxos (FERREIRA et al, 1997; JADHAV et al, 1996; SHAHIDI et al, 2004a).

O sistema de propagação das reações em cadeia envolve uma reação bimolecular do radical com a molécula. Como os radicais lipídicos são altamente reativos, eles podem facilmente propagar a reação através de dois mecanismos: pela reação com uma molécula de oxigênio no estado triplete

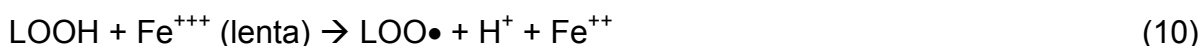
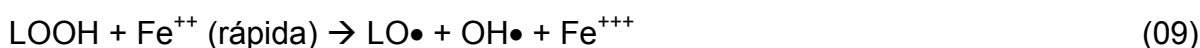
(equação 4) ou pela remoção de um átomo de hidrogênio (equação 5). O oxigênio molecular é particularmente susceptível ao ataque de radicais. A reação radical-oxigênio é muito rápida e requer praticamente zero de energia de ativação. Com isso, há o favorecimento da formação de radicais peróxido ($\text{LOO}\bullet$), cuja concentração se torna maior do que de radicais $\text{L}\bullet$, na maioria dos sistemas alimentares contendo oxigênio (JADHAV et al, 1996; SHAHIDI et al, 2004a).

Terminação

A terminação da oxidação se dá quando ocorre uma redução na quantidade de lipídios ou ácidos graxos insaturados presentes. Os radicais livres presentes ligam-se uns aos outros, formando um composto estável (FERREIRA et al, 1997).



O radical hidroxila ($\text{OH}\bullet$) é frequentemente reconhecido como a espécie iniciadora e a mais importante da lipoperoxidação (HALLIWELL et al, 1995). A oxidação lipídica pode ser catalisada por íons ferro, por conversão de hidroperóxidos lipídicos (LOOH) em radicais altamente reativos (alcoxila, $\text{LO}\bullet$ e peroxila, $\text{LOO}\bullet$) que, por sua vez, iniciam nova cadeia de reações denominada ramificação. Essas reações, que podem ser rápidas ou lentas, dependem da valência do ferro (equações 09 e 10) (FERREIRA et al, 1997; SHAHIDI et al, 2004a).



Entretanto, estudos recentes indicam que há necessidade de uma relação equimolar $\text{Fe}^{+++} : \text{Fe}^{++}$ no meio, para que ocorra a oxidação lipídica. A presença de íons cobre e de enzimas específicas como as monoxigenases e certas

oxidases também podem acelerar os processos oxidativos (JADHAV et al, 1996; HALLIWELL et al, 1995).

2.4 ANTIOXIDANTES

Os antioxidantes podem ser definidos como qualquer substância que, presente em baixas concentrações, quando comparada a um substrato oxidável, atrasa ou inibe a oxidação desse substrato de maneira eficaz. O sistema de defesa antioxidante é formado por compostos enzimáticos e não-enzimáticos, estando presentes tanto no organismo (localizados dentro das células ou na circulação sanguínea) como nos alimentos ingeridos (SHAMI et al, 2004).

O uso de antioxidantes em alimentos é governado por leis próprias de cada país ou por padrões internacionais. Embora muitos compostos naturais e sintéticos possuam propriedades antioxidantes, apenas alguns são aceitos como GRAS (reconhecidos como seguros) para uso em alimentos (RAJALAKSHMI et al, 1996).

Os antioxidantes agem em diferentes níveis na seqüência oxidativa, que envolve moléculas de lipídios. Eles podem reduzir a concentração de oxigênio, interceptar o oxigênio singlete, prevenir o início da cadeia de reações oxidativas e decompor produtos primários da oxidação em espécies não-radicalares (SHAHIDI et al, 2004b).

De acordo com o modo de ação, os antioxidantes podem ser classificados como redutores da taxa de propagação de radicais livres (antioxidantes primários), quelantes de íons metálicos, ou seqüestradores de oxigênio, que reagem com oxigênio em sistemas fechados (antioxidantes secundários) e como antioxidantes sinérgicos (GORDON, 2001; SHAHIDI et al, 1995).

* Antioxidantes primários: são aqueles que interrompem a formação de radicais livres através da doação de hidrogênio ou de elétrons (equações 11 a 15) (RAJALAKSHMI et al, 1996). Reagem com radicais lipídicos de alta energia convertendo-os em produtos mais estáveis termodinamicamente e com radicais peróxi e alcóxi, inibindo a propagação do processo de oxidação (SHAHIDI et al, 1995; RAJALAKSHMI et al, 1996). Os antioxidantes primários incluem compostos fenólicos (como BHA – hidroxianisol butilado, BHT – hidroxitolueno butilado, TBHQ – terc-butil hidroquinona, PG - propil galato) e tocoferóis (vitamina E) (GORDON, 2001). Os antioxidantes primários são efetivos em baixas concentrações, e em

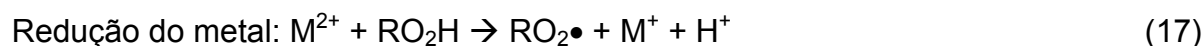
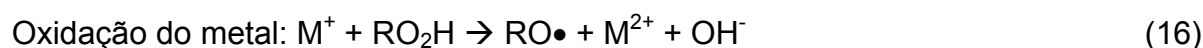
concentrações elevadas podem se tornar pró-oxidantes (RAJALAKSHMI et al, 1996).



* Antioxidantes secundários: atuam por meio de vários mecanismos (GORDON, 2001):

a) como absorvedores de O_2 : ácido ascórbico, por exemplo.

b) como agentes quelantes de íons metálicos: agentes que têm a propriedade de formar complexos com íons metálicos (Fe^{3+} e Cu^{2+}) que atuam como pró-oxidantes, como por exemplo, EDTA (ácido etilenodiaminotetraacético), ácido fítico, nitratos e nitritos. Esses agentes quelantes inibem o ciclo redox do metal e ocupam todas as posições reativas de coordenação (equações 16 e 17).



c) na decomposição de hidroperóxidos em compostos estáveis (RAJALAKSHMI et al, 1996).

d) na absorção de radiação ultravioleta.

e) desativando o oxigênio singlete.

* Antioxidantes sinérgicos: os antioxidantes sinérgicos podem ser classificados, de maneira geral, como absorvedores de oxigênio e agentes quelantes. Eles atuam por diversos mecanismos, como por exemplo, doando hidrogênio ao radical fenóxi, regenerando o antioxidante primário. Portanto, antioxidantes fenólicos podem ser usados em baixas concentrações se um sinérgico é adicionado simultaneamente no alimento (RAJALAKSHMI et al, 1996). Os absorvedores de oxigênio, como o ácido

ascórbico, ascorbil palmitato, sulfitos e eritorbatos reagem com oxigênio livre, removendo-o de sistemas fechados. O ácido ascórbico também atua como sinérgico com antioxidantes primários, especialmente os tocoferóis, regenerando sua atividade (GORDON, 2001; RAJALAKSHMI et al, 1996). Os compostos quelantes EDTA, ácido cítrico e os polifosfatos, atuam como efetivos agentes sinérgicos na presença de antioxidantes primários e na absorção de oxigênio. Um par de elétrons em sua estrutura promove a ação quelante, formando complexos estáveis com íons metálicos pró-oxidantes como o ferro e o cobre (RAJALAKSHMI et al, 1996).

2.4.1 Antioxidantes naturais

O uso empírico de compostos naturais como antioxidantes é bastante antigo. A popularidade do uso de fumaça e condimentos na preservação caseira de alimentos como carne, peixe, queijo e outros alimentos ricos em gordura é devida, pelo menos parcialmente, ao reconhecimento do efeito de retardamento da rancidez por esses tratamentos. É difícil definir o termo “antioxidantes naturais”, mas geralmente o termo refere-se a substâncias que ocorrem naturalmente e podem ser extraídas de tecidos animais ou vegetais (YANISHLIEVA-MASLAROVA, 2001a).

Os antioxidantes naturais são encontrados em praticamente todas as plantas, microrganismos, fungos e até mesmo em tecidos animais. A maioria são compostos fenólicos e os grupos mais importantes são os tocoferóis, flavonóides e ácidos fenólicos (YANISHLIEVA-MASLAROVA, 2001a; RAJALAKSHIMI et al, 1996).

A partir dos anos 80, o interesse em encontrar antioxidantes naturais para o emprego em produtos alimentícios ou para uso farmacêutico aumentou consideravelmente, com o intuito de substituir antioxidantes sintéticos (DEGÁSPARI et al, 2004).

Segundo Rajalakshimi et al (1996), consumidores e produtores de alimentos têm optado por produtos e ingredientes com alegação “natural”, por serem considerados “seguros”. Shetty et al (2004) afirmam que recentemente foram relatadas propriedades carcinogênicas referentes à antioxidantes sintéticos. Conseqüentemente, maior atenção tem sido dada às pesquisas envolvendo antioxidantes naturais, bem como à identificação e incorporação desses compostos em alimentos.

Yanishlieva-Maslarova (2001a) relacionou algumas vantagens e desvantagens dos antioxidantes naturais comparados aos antioxidantes sintéticos (Tabela 2).

Tabela 2: Vantagens e desvantagens dos antioxidantes naturais comparados aos sintéticos

Vantagens	Desvantagens
Prontamente aceitos pelos consumidores, por serem considerados seguros e “sem química”	Normalmente são mais caros se purificados, e menos eficientes se não purificados
Não são requeridos testes para reconhecê-los como GRAS (seguro)	As propriedades de diferentes preparações não purificadas podem variar A segurança não é conhecida Muitos podem alterar a cor e sabor no produto

Fonte: YANISHLIEVA-MASLAROVA, 2001a

Muitos ingredientes alimentares contém compostos antioxidantes (Tabela 3). Entretanto, esses ingredientes só podem ser usados em produtos onde eles são compatíveis com a textura, cor e sabor do produto final. Com isso, a identificação e purificação desses compostos se tornam essenciais para o seu uso efetivo em escala comercial (RAJALAKSHIMI et al, 1996).

Tabela 3: Antioxidantes naturais em alguns ingredientes alimentares

Fonte	Antioxidante
Óleos e sementes oleaginosas	Tocoferóis e tocotrienóis, fenólicos do óleo de gergelim (3,4-metilenedioxifenol) e substâncias relacionadas, fosfolipídios
Aveia e farelo de arroz	Vários compostos derivados de lignina
Frutas e vegetais	Ácido ascórbico, ácidos hidroxicarboxílicos, flavonóides, carotenóides
Especiarias, ervas, chás, cacau	Compostos fenólicos
Proteínas e hidrolisados protéicos	Aminoácidos, dihidropiridinas, produtos da reação de Maillard

Fonte: RAJALAKSHIMI et al, 1996

2.4.2 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são antioxidantes primários que reagem como seqüestradores de radicais livres e bloqueadores de reações em cadeia (MOREIRA et al, 2004). São produtos do metabolismo secundário dos vegetais e constituem boas fontes de antioxidantes na dieta humana. Devido ao potencial carcinogênico das formas sintéticas, os antioxidantes fenólicos naturais apresentam-se como uma alternativa para minimizar ou retardar a deterioração oxidativa em alimentos, além de elevar o valor funcional do alimento (BOTSOGLU et al, 2002).

Estruturalmente, os compostos fenólicos compreendem um anel aromático, com um ou mais grupos hidroxila, formando desde moléculas simples a compostos altamente polimerizados. Devido a esta grande diversidade estrutural, este grupo de compostos é comumente denominado “polifenóis”. Muitos dos compostos fenólicos de ocorrência natural estão presentes na forma conjugada com mono e polissacarídeos, ligados a um ou mais grupos fenólicos, e também podem ocorrer como derivados funcionais na forma de ésteres ou metil-ésteres (SAMMAN et al, 2006).

Os tocoferóis são antioxidantes monofenólicos que ocorrem abundantemente na natureza. São formados de oito diferentes compostos pertencentes a duas famílias, tocóis e tocotrienóis, referidos como α , β , γ ou δ , dependendo do número e posição de grupos metil ligados ao anel. Nos tocóis, a cadeia lateral é saturada, enquanto que nos tocotrienóis ela é insaturada (SHAHIDI et al, 2004a).

A vitamina E, ou α -tocoferol, apresenta atividade antioxidante superior aos outros compostos pertencentes a este grupo, atuando na prevenção da oxidação de ácidos graxos poliinsaturados e de componentes lipídicos de células e de membranas (JOHNSON, 2001; SHAHIDI et al, 1995).

Os flavonóides ocorrem na natureza como metabólitos secundários dos vegetais e são encontrados em praticamente todas as partes da planta. A estrutura química desses compostos caracteriza-se pela configuração C6-C3-C6 (Figura 3) e vários subgrupos são classificados com base nos grupos substituintes dos anéis presentes na estrutura (JOHNSON, 2001; RAJALAKSHIMI et al, 1996). Essencialmente a estrutura consiste em dois anéis aromáticos A e B ligados por uma ponte de três carbonos, usualmente na forma de um anel heterocíclico C.

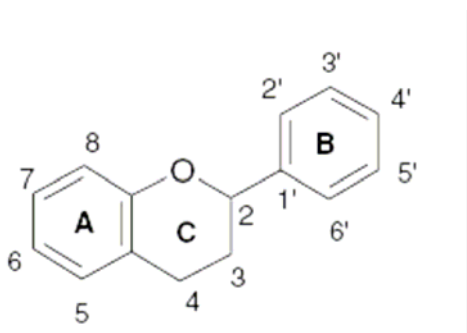


Figura 3: Estrutura genérica de uma molécula flavonóide

Fonte: SAMMAN et al, 2006

Os maiores subgrupos dos flavonóides são flavonóis, antocianinas, flavonas, isoflavonas, catequinas e proantocianidinas (MADHAVI et al, 1996b). Os flavonóides participam dos mecanismos de doação de hidrogênio, captura de radicais e como agentes quelantes (MADHAVI et al, 1996a).

As antocianinas e antocianidinas são produtos metabólicos de flavononas e fazem parte do grupo flavonóide. A atividade de captura de radicais

das antocianinas (forma glicosídica) é em geral melhor que a atividade das antocianidinas. A diferença nas estruturas moleculares dos açúcares pode causar configurações estruturais nas antocianinas que podem intensificar ou reduzir a habilidade de formar radicais estáveis (HALL III, 2001).

Os ácidos monofenólicos e fenólicos (Figura 4) participam dos processos de doação de hidrogênio e captura de radicais. A atividade antioxidante dos ácidos fenólicos se deve à presença principalmente de grupos hidroxila, sendo que a posição e o grau de hidroxilação são determinantes na atividade antioxidante. A introdução de um segundo grupo hidroxila nas posições *orto* ou *para* aumenta a atividade antioxidante, o que faz com que os polifenóis sejam mais eficientes que os monofenóis (HALL III, 2001; RAJALAKSHIMI et al, 1996).

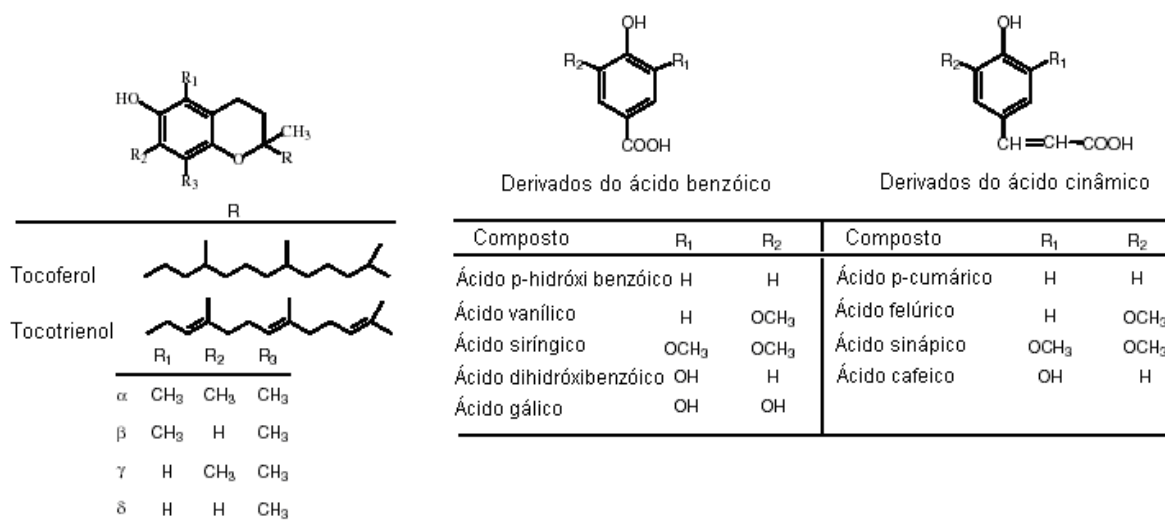


Figura 4: Monofenol (ex. tocoferóis e tocotrienóis) e ácidos fenólicos como exemplos de antioxidantes naturais

Fonte: HALL III, 2001

A efetividade dos antioxidantes naturais depende do envolvimento do hidrogênio fenólico nas reações de oxidação, da estabilidade do radical antioxidante natural formado durante as reações e das substituições químicas presentes na estrutura. Os grupos substituintes na estrutura são provavelmente a contribuição mais importante na habilidade dos antioxidantes naturais em participarem do controle das reações de oxidação e da formação de radicais estáveis (HALL III, 2001; SHETTY et al, 2004).

Os compostos fenólicos são encontrados principalmente em frutas, vegetais, chás, vinhos e em várias ervas. O conteúdo total de compostos fenólicos presente nas plantas é influenciado por diversos fatores intrínsecos (gênero, espécie, cultivar) e extrínsecos (condições de cultivo, colheita, armazenamento) (SAMMAN et al, 2006). Na Tabela 4 encontra-se o conteúdo de compostos fenólicos totais em extratos aquosos de várias ervas.

Tabela 4: Compostos fenólicos totais em extratos aquosos de ervas

Nome comum	Nome científico	Fenólicos totais (mg GAE/g peso fresco)*
Sálvia	<i>Salvia officinalis</i>	1,34 ± 0,09
Hortelã Pimenta	<i>Mentha piperita</i>	2,26 ± 0,16
Orégano da Grécia	<i>Origanum vulgare</i> ssp. <i>Hirtum</i>	11,80 ± 0,60
Mangerona	<i>Origanum majoricum</i>	11,65 ± 0,29
Capim-limão	<i>Melissa officinalis</i>	1,26 ± 0,04
Tomilho limão	<i>Thymus citriodorus</i>	1,78 ± 0,03
Orégano mexicano	<i>Poliomintha longiflora</i>	17,51 ± 0,22
Alecrim	<i>Rosemarinus officinalis</i>	2,19 ± 0,15

* Dados expressos em miligrama de ácido gálico (GAE) por grama de peso fresco

Fonte: adaptado de WANG et al, 2001

A ingestão diária de antioxidantes fenólicos tem desempenhado um papel importante na redução do risco de desenvolvimento de algumas doenças crônicas relacionadas ao estresse oxidativo, como problemas cardiovasculares, câncer, infecções e mal de Alzheimer (AKYON, 2002; SHETTY et al, 2005). Além disso, alguns fenólicos naturais têm mostrado efeito antimicrobiano e antifúngico (SHETTY et al, 2005). Dietas ricas em frutas e vegetais têm sido associadas à baixa incidência de doenças degenerativas, incluindo câncer e doenças cardiovasculares, devido ao conteúdo relativamente alto de compostos fenólicos nesses alimentos (SHETTY et al, 2004).

Os compostos fenólicos oriundos das plantas possuem grande relevância para aplicações nutricionais e terapêuticas. A compreensão da importância dos efeitos nutricionais e terapêuticos dos antioxidantes fenólicos é

essencial ao desenvolvimento de alimentos funcionais, os quais visam promover benefícios à saúde. Este fato tem se tornado cada vez mais significativo, já que os alimentos estão se transformando em verdadeiras armas para a prevenção de várias doenças (SHETTY et al, 2003).

As plantas aromáticas, como ervas e especiarias, são ricas em compostos fenólicos, e têm sido amplamente utilizadas para aumentar a vida de prateleira dos alimentos e na medicina tradicional como tratamento para várias doenças (ABDALLA et al, 2001; SHETTY et al, 2005).

O efeito antioxidante de especiarias e ervas foi inicialmente evidenciado por Chipault et al (1952), em 32 especiarias, das quais o alecrim e a sálvia foram consideradas as mais eficazes. Posteriormente, esta ação foi comprovada no orégano e no tomilho, no gengibre, na pimenta, na mostarda, na canela, no coentro, entre outros (MELO et al, 2003).

As especiarias da família *Laminaceae* são muito bem reconhecidas pelas suas propriedades antioxidantes, especialmente alecrim, sálvia e orégano (ABDALLA et al, 2001).

A atividade antioxidante dos compostos fenólicos nas plantas é principalmente devida às suas propriedades redox e à estrutura química, que desempenha um papel importante na neutralização de radicais livres, na ação quelante de metais e na absorção de oxigênio singlete e triplete, pelo deslocamento ou decomposição de peróxidos (SHETTY et al, 2005). As propriedades antioxidantes das especiarias estão correlacionadas também com a sua ação junto ao processo de peroxidação lipídica em alimentos (MOREIRA et al, 2004).

Várias espécies de ervas contêm, além dos compostos fenólicos, compostos fitoquímicos (ácido ascórbico, carotenóides e compostos nitrogenados). Muitos desses fitoquímicos possuem atividade antioxidante significativa, que está relacionada à baixa incidência de câncer em várias populações (WANG et al, 2001).

2.4.2.1 Mecanismo de ação dos antioxidantes fenólicos

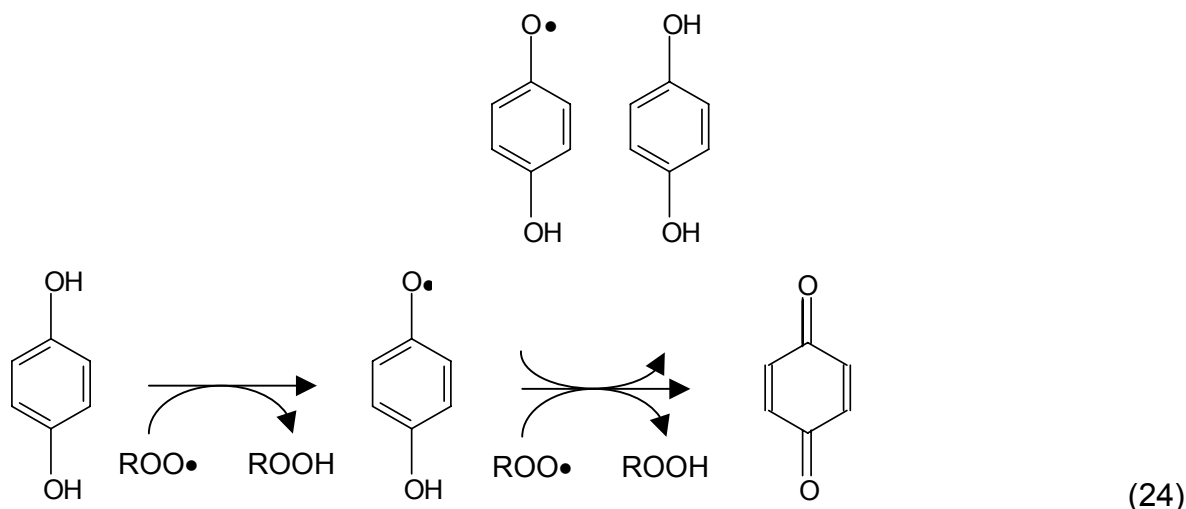
O primeiro estudo cinético detalhado para atividade antioxidante foi conduzido por Boland e ten-Have (1947), que postularam as reações 18 e 19 para os antioxidantes primários. Os antioxidantes fenólicos (AH) interferem na oxidação lipídica através da rápida doação de um átomo de hidrogênio aos radicais lipídicos (equações 18 e 19). As reações posteriores competem com a propagação das reações em cadeia, 22 e 23 (SHAHIDI et al, 2004a).



Essas reações são naturalmente exotérmicas. A energia de ativação aumenta com o aumento da energia de dissociação das ligações A-H e L-H. Entretanto, a eficiência do antioxidante aumenta com a redução da força da ligação A-H. O radical fenóxi resultante não necessita iniciar uma nova reação ou ser sujeito à rápida oxidação pela cadeia de reações. Por isso, os antioxidantes fenólicos são excelentes doadores de hidrogênio ou de elétron. Os seus radicais intermediários são relativamente estáveis devido à deslocalização por ressonância e devido à ausência de sítios adequados para ataque pelas moléculas de oxigênio (SHAHIDI et al, 2004a; SHAHIDI et al, 1995).

O radical fenóxi formado pela reação de um fenólico com um radical lipídico é estabilizado pela deslocalização de elétrons não-pareados ao redor do anel aromático (equação 24). Entretanto, o fenol é inativo como antioxidante. A substituição de átomos de hidrogênio nas posições *orto* e *para* por grupos alquila aumenta a densidade eletrônica do grupo OH por efeito indutivo, e deste modo, aumenta a reatividade para os radicais lipídicos (SHAHIDI et al, 2004a; SHAHIDI et al, 1995).

Os substituintes nucleofílicos, como os radicais metil, terc-butil e metóxi, aumentam a atividade antioxidante dos fenóis, enquanto os substituintes eletrofílicos, como os halogênios e grupos nitro, reduzem a atividade antioxidante (OHKATSU et al, 2001).



2.4.2.2 Absorção e metabolismo dos compostos fenólicos

A ingestão diária de compostos fenólicos é influenciada grandemente pelos hábitos e preferências individuais. A média diária de ingestão de compostos fenólicos é de 1g, sendo as principais fontes as frutas, vegetais, legumes e algumas ervas (SHAHIDI et al, 2004b; SCALBERT et al, 2000).

Os efeitos benéficos dos compostos fenólicos para a saúde dependem de sua absorção e metabolismo, que por sua vez são determinados pela estrutura química, tamanho molecular e solubilidade (SAMMAN et al, 2006).

Porém, informações sobre a biodisponibilidade e absorção de compostos fenólicos é ainda diversa, fragmentada e controversa. A Figura 5 mostra as possíveis rotas do metabolismo de polifenóis ingeridos por humanos; as enzimas, fenol-sulfotransferases, catecol-O-transferases, β -glucosidases, lactase-phloridzin-oxidases e UDP-glucorinosil-transferases estão envolvidas no metabolismo de polifenóis (SCALBERT et al, 2000).

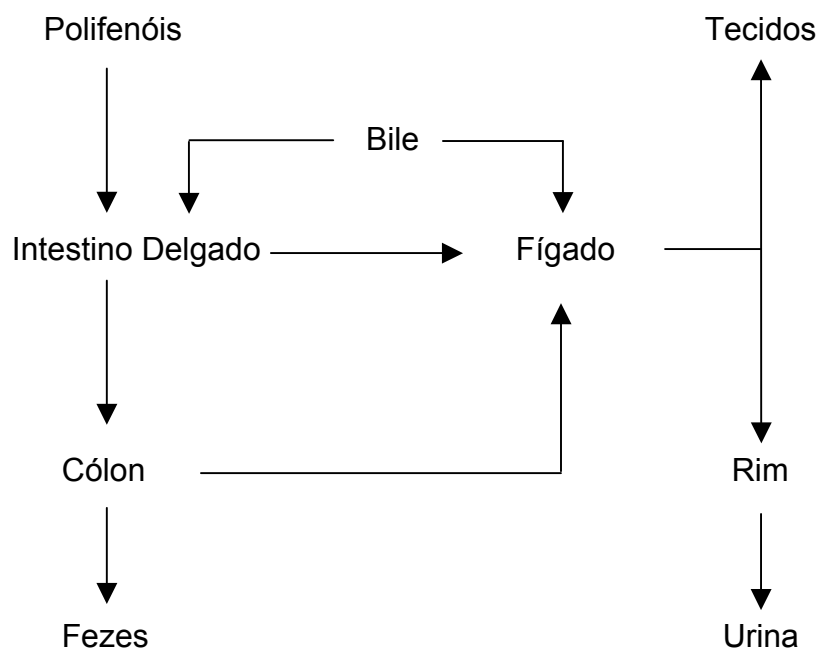


Figura 5: Possíveis rotas dos polifenóis em humanos

Fonte: SCALBERT et al, 2000

A absorção e biodisponibilidade de polifenóis no organismo dependem do seu metabolismo no intestino delgado, o qual é influenciado por fatores como tamanho molecular, lipofilicidade, solubilidade e pKa, assim como o tempo de trânsito gastrointestinal, permeabilidade da membrana, pH do lúmen e metabolismo “*first-pass*” (via de absorção que depende de ação do fígado) (SHAHIDI et al, 2004b). Somente os polifenóis não absorvidos no estômago e no intestino delgado e os metabólitos excretados de volta para o intestino delgado são degradados pela microflora do intestino (SCALBERT et al, 2000; RICE-EVANS et al, 1997).

2.5 ESPECIARIAS

2.5.1 Alecrim (*Rosemarinus officinalis* L.)

O alecrim é uma das ervas mais utilizadas no processamento de alimentos. É a única erva permitida comercialmente para ser usada como antioxidante na Europa e nos Estados Unidos (YANISHLIEVA-MASLAROVA, 2001b), além de ser uma das ervas com maior atividade antioxidante (MEIRELES et al, 2005).

A primeira utilização de extratos de alecrim como antioxidante foi relatada por Rac e Ostric em 1955. Berner e Jacobson obtiveram uma patente em 1973 para produção de extratos de alecrim para uso como antioxidante, utilizando óleo como solvente (RAJALAKSHMI et al, 1996; YANISHLIEVA-MASLAROVA, 2001b).

Segundo Thorsen et al (2003), o extrato de alecrim apresenta interesse comercial para a indústria de alimentos como fonte natural de antioxidantes. A qualidade como antioxidante e o preço dos extratos comerciais de alecrim estão diretamente relacionados com o conteúdo, primeiramente, de ácido carnósico, seguido do conteúdo total de diterpenos fenólicos incluindo o carnosol. Comercialmente, os extratos de alecrim estão disponíveis na forma de pó, solúvel em óleos e gorduras e insolúvel em água (SHAHIDI et al, 1995; RAJALAKSHMI et al, 1996).

As propriedades antioxidantes do alecrim são muito bem reconhecidas. Ele é considerado um antioxidante lipídico e um quelante de metais, além de atuar na absorção de radicais superóxido (MADHAVI et al, 1996b; SCHWARZ, 2002).

A atividade antioxidante dos extratos das folhas de alecrim se deve principalmente à presença dos diterpenos fenólicos carnosol e ácido carnósico (Figura 6). Outros diterpenos fenólicos como rosmanol, epirosmanol e metoxiepirosmanol estão presentes em quantidades menores e contribuem também para a atividade antioxidante dos extratos de alecrim (THORSEN et al, 2003). Segundo Shahidi et al (1995) e Schwarz (2002), durante o armazenamento e

extração de compostos fenólicos do alecrim, o ácido carnósico é parcialmente convertido em carnosol ou outros diterpenos, como o rosmanol e o epirosmanol.

Cavero et al (2005) realizaram um estudo para avaliar a atividade antioxidante de extratos de alecrim obtidos via extração com fluido supercrítico. Segundo os autores, o composto mais abundante encontrado nos extratos de alecrim foi o ácido carnósico, perfazendo 34 a 78% do total dos compostos quantificados por HPLC. De acordo com este estudo, pôde-se estabelecer uma relação linear positiva entre a atividade antioxidante e a concentração de ácido carnósico, ou seja, quanto maior a concentração de ácido carnósico, maior a atividade antioxidante, avaliada pelo método de inibição do radical DPPH. Os resultados obtidos indicam ainda que a atividade antioxidante dos extratos de alecrim pode ser afetada, positiva ou negativamente, pela presença de outros compostos, derivados ou não do ácido carnósico.

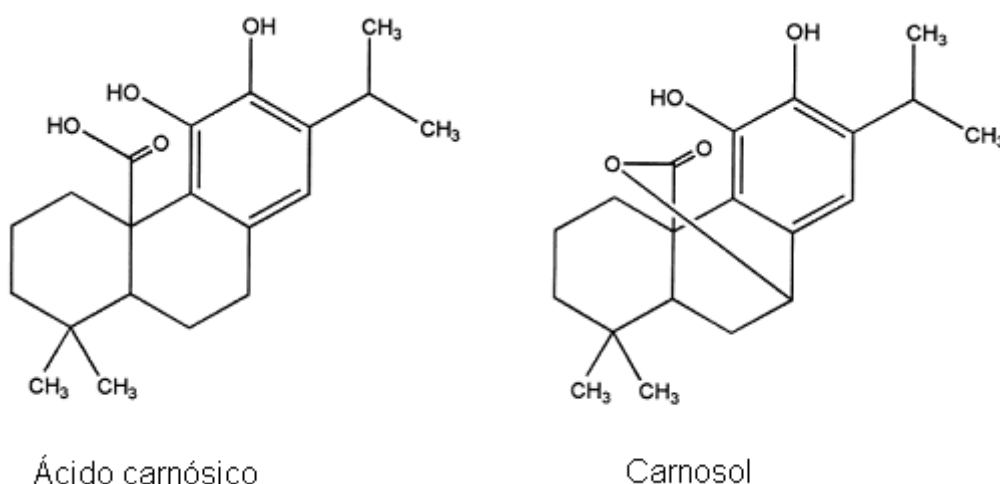
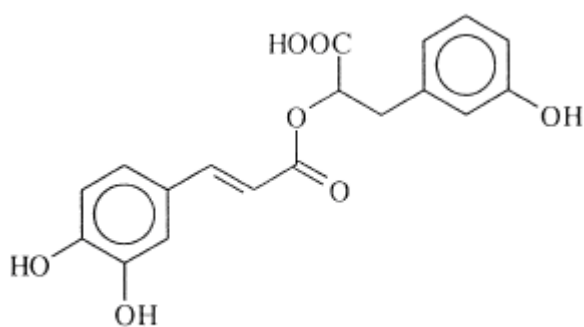


Figura 6: Estrutura dos compostos carnosol e ácido carnósico

Fonte: THORSEN et al (2003)

O ácido rosmarínico (Figura 7), um éster do ácido cafeico, aparece como um componente importante nos extratos de alecrim por possuir atividade antioxidante superior ao α -tocoferol e ao BHT (WANG et al, 2001). Segundo Shetty e McCue (2003), o ácido rosmarínico apresenta, além de propriedades antioxidantes, propriedades antiinflamatórias e propriedades potenciais antidiabéticas.



Ácido rosmarínico

Figura 7: Estrutura do ácido rosmarínico

Fonte: YANISHLIEVA-MASLAROVA, 2001b

2.5.2 Orégano (*Origanum vulgare*)

O orégano é muito utilizado como condimento e seu sabor e odor são muito apreciados em todo o mundo, além de possuir propriedades antimicrobianas e antioxidantes (YANISHLIEVA-MASLAROVA, 2001b). Orégano desidratado, assim como os extratos obtidos por meio de solventes com polaridades diferentes (hexano, diclorometano, metanol), têm sido avaliados quanto à ação antioxidante em lipídios em sistemas modelo e em alimentos (YANISHLIEVA-MASLAROVA, 2001b ; MADHAVI et al, 1996a).

Segundo Kulisic et al (2004), os compostos presentes em maior quantidade no óleo essencial de orégano são os monoterpenos fenólicos carvacrol (32%) e timol (35%) (Figura 8) e a atividade antioxidante desta especiaria é devida, principalmente, à presença desses compostos. De acordo com os mesmos autores, o óleo essencial de orégano pode ser usado como antioxidante natural potencial na indústria de alimentos.

Vários estudos referentes à atividade antioxidante de óleos essenciais extraídos de plantas aromáticas mostraram que o óleo essencial de orégano possui considerável ação antioxidante no processo de oxidação lipídica (KULISIC et al, 2004). Segundo Arcila-Lozano et al (2004), os extratos de orégano têm se mostrado efetivos, e em alguns casos a níveis superiores aos exibidos pelo propil galato, BHT e BHA. Entretanto, sua aplicação industrial é limitada devido ao aroma e sabor que pode conferir aos alimentos.



Figura 8: Estrutura dos compostos carvacrol e timol

Fonte: YANISHLIEVA-MASLAROVA, 2001b

O efeito positivo do orégano na saúde humana tem sido atribuído à sua atividade antioxidante tanto no óleo essencial quanto na fração fenólica solúvel (SHETTY et al, 2005). Kikuzaki e Nakatani (1988) isolaram cinco compostos fenólicos diferentes no extrato metanólico de folhas de orégano, sendo que o ácido rosmarínico estava presente em maior concentração. O ácido rosmarínico tem sido considerado um importante antioxidante, além de possuir propriedades antiinflamatórias.

Sahin et al (2004) avaliaram a atividade biológica do óleo essencial e do extrato metanólico de *Origanum vulgare* ssp. *vulgare*. O estudo sugeriu que a espécie analisada possui compostos com atividade antimicrobiana e propriedades antioxidantes e pode ser usada para preservação e/ou aumento da vida-de-prateleira de produtos crus ou processados, assim como em produtos farmacêuticos e em terapias naturais.

Wang et al (2001) determinaram a atividade antioxidante de várias espécies de orégano (*P. longiflora*, *Origanum vulgare* ssp. *hirtum* e *Origanum x majoricum*). O estudo revelou que essas espécies possuem uma quantidade relativamente alta de compostos fenólicos e elevada atividade antioxidante. A atividade antioxidante foi maior que para o α -tocoferol e equivalente à atividade do BHA contra a oxidação do ácido linoleico. Os extratos das espécies de orégano analisadas apresentaram alta concentração de ácido rosmarínico (214,8 – 154,6 mg/100g em peso fresco) e ácido hidroxicinâmico. Os ácidos rosmarínico e hidroxicinâmico têm demonstrado possuir forte atividade antioxidante, sendo que a atividade antioxidante do ácido rosmarínico é superior à do α -tocoferol e do BHT.

A avaliação da atividade antioxidante de extrato etanólico de *Origanum vulgare* por Tsimidou et al (2002) indicou que este possui alta capacidade de absorção de radicais livres. Esta capacidade coincide com um alto conteúdo de compostos fenólicos, mas não é proporcional. Com o uso de cromatografia em camada delgada, foi verificado que o principal componente do extrato era o ácido rosmarínico, enquanto três diferentes bandas de flavonóides foram também identificadas. O estudo mostrou ainda que o extrato etanólico de *Origanum vulgare* inibiu 99,1% da atividade sequestrante do radical DPPH.

Existem muitos estudos sobre a atividade antimicrobiana dos extratos de diferentes espécies de orégano. De acordo com Arcila-Lozano et al (2004), os óleos essenciais das espécies do gênero *Origanum* apresentam atividade contra bactérias gram negativas como *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Yersinia enterocolitica* e *Enterobacter cloacae*, e gram positivas como *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Listeria monocytogenes* e *Bacillus subtilis*. Os compostos fenólicos carvacrol e timol possuem os níveis mais altos de atividade contra microrganismos gram negativos, exceto para *P. aeruginosa*, sendo o timol mais ativo (SIVROPOULOU et al, 1996).

2.6 DESENVOLVIMENTO DE ALIMENTOS FUNCIONAIS

O binômio dieta-saúde representa um novo paradigma no estudo dos alimentos. Pesquisas recentes têm mostrado que a dieta é um dos fatores que pode influenciar significativamente o risco e a severidade de várias doenças. Neste contexto, surge a compreensão de que a alimentação adequada exerce um papel além do que fornecer energia e nutrientes essenciais, enfatizando também a importância dos constituintes não-nutrientes, que em associação, são identificados pela promoção de efeitos fisiológicos benéficos, podendo reduzir o risco ou retardar doenças tais como as cardiovasculares, câncer, infecções intestinais, obesidade, dentre outras (PADILHA et al, 2004; WALZEM, 2004).

Deste modo, os alimentos que contêm essas propriedades são denominados alimentos funcionais, nutracêuticos, alimentos planejados, alimentos para a saúde e outros sinônimos correlatos. Entretanto, o termo mais adequado à categoria de alimentos fisiologicamente ativos, é o de alimentos funcionais, considerando que “cêutico” recorda medicamentos e “planejados” sugere artificial ou sintético (BIDLACK et al, 1999).

Segundo Borges (2001) os alimentos funcionais devem exercer um efeito metabólico ou fisiológico que contribua para a saúde física e para a redução do risco de desenvolvimento de doenças crônicas. Nesse sentido, devem fazer parte da alimentação usual e proporcionar efeitos positivos, obtidos com quantidades não tóxicas e que exerçam tais efeitos mesmo após a suspensão da ingestão e que não se destinem a tratar ou curar doenças, estando seu papel ligado à redução do risco de contrair doenças.

Os alimentos funcionais diferem dos alimentos para a saúde convencionais de várias formas. Primeiramente, os alimentos convencionais para a saúde são tipicamente apresentados como tipos de alimentos que contribuem para uma dieta saudável, como por exemplo, produtos com teor de gordura reduzido, com alto teor de fibras, ou vegetais, sem enfatizar o papel isolado de algum componente. Em alimentos funcionais, os componentes particulares estão diretamente conectados com efeitos fisiológicos bem definidos e o benefício para a saúde está ligado a um componente específico. Em segundo lugar, a funcionalidade cria um

aspecto novo no alimento sem necessariamente mudar a qualidade sensorial do produto (URALA et al, 2004; KLEEF et al, 2005).

Os alimentos funcionais podem fornecer uma oportunidade de combinar alimentos com moléculas biologicamente ativas como estratégia para reduzir o risco de distúrbios metabólicos que podem conduzir a doenças crônicas. Entretanto, para serem agentes efetivos na prevenção de doenças, os alimentos funcionais devem seguir alguns critérios: eles devem ser (1) formulados para satisfazer as necessidades metabólicas de consumidores específicos, (2) possuir atributos compatíveis com a avaliação do impacto sobre determinada patologia que se quer mensurar, e (3) proporcionar benefício suficiente para o consumidor, para que se justifique um consumo a longo prazo (WALZEM, 2004).

A primeira etapa no desenvolvimento de um alimento funcional consiste na identificação da doença ou desconforto físico ou mental que se deseja combater e possíveis associações com o consumo de certos tipos de alimentos por uma dada população. Ao final dessa primeira etapa tem-se a identificação do foco principal: ingrediente “funcional” → problema ou doença. Nesse momento, torna-se necessário definir o tipo específico de alimento que receberá a suplementação para tornar-se funcional (DREWNOWSKI et al, 1997).

Após a seleção do alimento que receberá a suplementação, deve-se definir a dosagem do ingrediente funcional, considerando-se seu consumo médio diário pela população-alvo. É importante que haja compatibilidade sensorial, nutricional, funcional e fisiológica entre o ingrediente funcional e o alimento, isto é, pH, solubilidade, forma física, estabilidade, sabor, cor, odor, textura, consistência, etc (DREWNOWSKI et al, 1997; BYRNE, 1995).

Segundo a Resolução nº 18, de 30 de abril de 1999, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), a comprovação da alegação de propriedades funcionais ou de saúde pode ser baseada em evidências abrangentes da literatura científica, organismos internacionais de saúde e legislação internacionalmente reconhecida sobre as propriedades e características do produto.

O alimento funcional estará, então, tecnicamente pronto para entrar no mercado, cabendo a outros setores a responsabilidade de fazê-lo da melhor forma, explorando adequadamente a alegação funcional que irá diferenciá-lo dos demais produtos já conhecidos pelo consumidor.

2.6.1 Avaliação Sensorial

A análise sensorial é uma ferramenta utilizada para o desenvolvimento de novos produtos, reformulação dos produtos já estabelecidos no mercado, estudo de vida de prateleira (*shelf life*), determinação das diferenças e similaridades apresentadas entre produtos concorrentes, identificação das preferências dos consumidores por um determinado produto e, finalmente, para otimização e melhoria da qualidade (LANZILOTTI et al, 1999).

As características sensoriais de um produto alimentício desempenham um papel importante em sua qualidade global, refletindo diretamente na aceitação do produto pelos consumidores. Atualmente, o consumidor tem se tornado cada vez mais exigente na escolha de qualquer produto, influenciado grandemente pela qualidade sensorial. Desta forma, torna-se importante conhecer um alimento não somente do ponto de vista dos parâmetros físicos e químicos, mas também da aceitabilidade sensorial que se encontra intimamente ligada ao processo tecnológico (NAGATO et al, 2003).

Testes sensoriais afetivos têm como objetivo medir atitudes subjetivas como aceitação ou preferência de produtos, de forma individual ou em relação a outros. Avaliam o grau com que os consumidores gostam ou desgostam dos produtos de modo global ou de um determinado atributo relacionado à aparência, aroma, sabor e textura (MIELGAARD et al, 1987).

Dentre os métodos sensoriais disponíveis para se avaliar a aceitação e preferência dos consumidores com relação a um ou mais produtos, a escala hedônica é o método afetivo mais utilizado devido à confiabilidade e validade de seus resultados, bem como sua simplicidade em ser usada pelos provadores (STONE & SIDEL, 1985).

A escala do ideal é um método afetivo bastante utilizado para avaliar a intensidade de determinados atributos. Nesta análise, a equipe de provadores avalia as amostras e registra suas respostas em escalas específicas, o quão ideal estas amostras encontram-se, em relação ao atributo que se deseja avaliar (textura, sabor, odor, etc.) (CARDELLO et al, 2004).

2.7 PROTEÍNAS DO SORO DE LEITE COMO COMPONENTES FISIOLÓGICAMENTE FUNCIONAIS

O leite, produto de secreção das glândulas mamárias, é um fluido viscoso constituído de uma fase líquida e partículas em suspensão, formando uma emulsão natural, estável em condições normais de temperatura ou de refrigeração. Possui elevado valor nutritivo, sendo o único alimento que satisfaz as necessidades nutricionais do recém-nascido de cada espécie (SGARBIERI, 2004).

Aproximadamente 20% da fração total de proteínas do leite consiste em um grupo heterogêneo denominado proteínas do soro. Esse grupo heterogêneo é constituído de várias proteínas (Tabela 5), muitas das quais são conhecidas por possuírem funcionalidade fisiológica (JELEN et al, 1998). O alto valor biológico das proteínas do soro é devido principalmente ao alto conteúdo de aminoácidos essenciais (WHITNEY, 1988).

Tabela 5: Proteínas do soro em leite de vaca

Fração	Concentração (g/L)	Percentual do total de proteínas no leite (v/v)
Proteínas do soro (total)	6,0	19,3
β - lactoglobulina	3,2	10,0
α – lactalbumina	1,2	3,1
Albumina sérica	0,3	1,2
Imunoglobulinas	0,7	2,0
Outras*	0,8	2,4

* Lactoferrina, lisozima e lactoperoxidase

Fonte: Adaptado de JELEN et al, 1998

A alta qualidade nutricional das proteínas do soro é reconhecida há muito tempo e são consideradas como um dos componentes mais desejáveis na dieta de atletas que desejam aumentar a massa muscular (JELEN et al, 1998). Estudos referentes aos efeitos fisiológicos específicos das proteínas do soro como produto funcional na nutrição humana, têm aumentado constantemente. Um desses estudos, realizado da Austrália, concentrou-se na idéia de que as proteínas do soro

– ou alguns componentes desse grupo protéico – podem possuir propriedades fisiológicas na prevenção do câncer (O’CONNOR et al, 2000).

O uso de proteínas do soro como ingredientes específicos em alimentos funcionais lácteos ou não, tem aumentado devido a melhorias nos processos tecnológicos em produzir concentrados protéicos atrativos comercialmente, isolados protéicos, ou mais recentemente, frações protéicas enriquecidas individualmente (JELEN et al, 1998).

As duas proteínas presentes em maior quantidade no soro, α -lactalbumina e β -lactoglobulina, são proteínas globulares que perfazem aproximadamente 70-80% do conteúdo total de proteínas (BRODKORB et al, 2006) e possuem propriedades fisiológicas bem definidas. A α -lactalbumina atua como coenzima na síntese de lactose pela formação do complexo lactose-sintase com β -1,4-galactosiltransferase e regula a produção de alguns oligossacarídeos (McVEAGH, 1999). Assim como a β -lactoglobulina, a α -lactalbumina é um exemplo de proteína fonte de peptídios antimicrobianos após proteólise (PELLEGRINI, 2003).

Um estudo clínico utilizando fórmula infantil enriquecida com α -lactalbumina mostrou que o produto apresentou atividade contra *E. coli* O127 enteropatogênica e reduziu a incidência de diarreia comparada ao leite humano. Esta ação pode ser devida a peptídios liberados da α -lactalbumina durante o processo digestivo (BRODKORB et al, 2006).

A α -lactalbumina é uma proteína que exibe alta afinidade por íons metálicos, principalmente cálcio, contribuindo para a alta biodisponibilidade desse mineral (BRODKORB et al, 2006; SGARBIERI, 2004). Utilizando calorimetria diferencial de varredura e na presença de concentrações saturadas de cálcio, a α -lactalbumina, é caracterizada por ser termoestável, apresentando temperatura de fusão (Tf) de 68°C. Entretanto, na ausência de cálcio, esta proteína é muito instável (Tf de 43°C). Portanto, a ligação do cálcio é de extrema importância para manutenção da estrutura da proteína (BRODKORB et al, 2006). Esta característica torna-se importante no desenvolvimento de produtos UHT com elevado conteúdo de proteínas do soro (JELEN et al, 1998; SGARBIERI, 2004; WHITNEY, 1988).

A α -lactalbumina contém grande quantidade de aminoácidos essenciais, principalmente triptofano e cisteína, precursores, respectivamente, de

serotonina e glutatona. É a maior fonte de aminoácidos sulfurados, que estão sendo implicados na manutenção do sistema imune (RUAN et al, 1997).

De acordo com Sternhagen et al (2001), a α -lactalbumina derivada do leite humano tem mostrado propriedades que podem inibir a proliferação de células epiteliais mamárias e renais em ratos. Foi verificado também efeito antiproliferativo em células intestinais humanas. Este estudo sugere que a α -lactalbumina pode ser eficiente na inibição do crescimento de células potencialmente cancerígenas.

A β -lactoglobulina possui características funcionais que fazem desta proteína, e de produtos de soro contendo β -lactoglobulina, ingredientes alternativos para a formulação de alimentos e bebidas. Possui excelentes características de gelificação induzida pelo calor. Ingredientes enriquecidos com esta proteína encontram aplicações em áreas onde são necessárias a ligação com água e a texturização. Exemplos incluem carnes processadas e petiscos, derivados de pescado e uma variedade de outros alimentos formulados. A natureza dos géis formados de β -lactoglobulina pode também ser simplesmente manipulada através do controle de condições químicas durante a gelatinização. Assim, os géis de β -lactoglobulina induzidos pelo calor podem ser translúcidos ou opacos, elásticos ou inelásticos. Esta flexibilidade na formação do gel pela β -lactoglobulina aumenta a faixa de aplicações na qual um ingrediente enriquecido nesta proteína pode ser usado (BRODKORB et al, 2006).

A β -lactoglobulina possui alto valor nutricional devido à presença de aminoácidos essenciais, quando comparada com os aminoácidos presentes na clara do ovo. Essas propriedades têm facilitado o seu uso como ingrediente ativo em várias bebidas fortificadas com proteínas, como sucos de frutas e bebidas para atletas, e uma variedade de bebidas longa-vida (BRODKORB et al, 2006; SGARBIERI, 2004).

Segundo Pellegrini et al (2001), a β -lactoglobulina pode exercer função antimicrobiana *in vivo* após sua parcial digestão por endopeptidases do pâncreas, e pequenas modificações na seqüência desses peptídeos pode ser útil na expansão de sua função antimicrobiana.

As proteínas do soro têm sido utilizadas para fornecer proteção contra o desenvolvimento de câncer em ensaios com animais, quando ingeridas

oralmente. A alimentação animal experimental tem comparado a eficácia das proteínas do soro em retardar quimicamente a indução de câncer de cólon em ratos. As proteínas do leite, em particular as proteínas do soro, apresentaram eficácia em retardar tumores intestinais em ratos jovens comparados com outros tipos de proteínas. Os resultados também sugerem que dietas suplementadas com β -lactoglobulina aumentam a proteção contra o desenvolvimento de precursores de células tumorogênicas, (vilosidades deformadas) no intestino grosso, reto e canal anal (McINTOSH et al, 1998).

As proteínas do soro presentes em menor quantidade, lactoferrina, lactoperoxidase, lisosima, imunoglobulina, apresentam grande potencial funcional como ingredientes alimentares. A lactoferrina apresenta capacidade de ligar o ferro, além de ser considerada um agente antimicrobiano (WHITNEY, 1988). As imunoglobulinas apresentam menor interesse do ponto de vista nutricional, já que seu principal papel não é atuar como nutriente, mas sim, atuar nos mecanismos de defesa contra infecções gastrintestinais (SGARBIERI, 2004; JELEN et al, 1998).

2.8 RICOTA

Ricota é o nome dado ao produto obtido pela precipitação de proteínas por aquecimento e acidificação, sendo a matéria-prima o soro de queijo, leite fresco ou acidificado, ou a mistura destes (FUNDAÇÃO CENTRO TECNOLÓGICO DE MINAS GERAIS, 1985).

A ricota é um queijo de origem italiana fabricado em diversos países sob várias denominações. É conhecida também por queijo de albumina, por se constituir basicamente desta e de lactoglobulina, que são os principais componentes protéicos do soro, não coaguláveis pelo coalho. São proteínas facilmente desnaturadas e precipitadas pelo calor, sob a influência de acidificação, o que constitui o princípio básico da fabricação da ricota (RIBEIRO et al, 2005).

A massa da ricota é obtida por meio da acidificação do soro de queijo, adicionado ou não de 10% de leite integral, após seu aquecimento a aproximadamente 92°C. O rendimento médio da fabricação é de cerca de 4 a 6% em relação ao volume trabalhado, sendo um produto de curta durabilidade e, portanto, considerado queijo fresco (RIBEIRO et al, 2005; DUTRA et al, 2002).

De acordo com a Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (2006), a ricota apresenta cerca de 73,6% de umidade, 12,6% de proteína, 8,1% de lipídios, 3,8% de carboidratos e 1,9% de cinzas.

A ricota pode ser comercializada fresca, condimentada ou até mesmo defumada. É considerada um produto de alto valor protéico e baixo valor calórico, o que auxilia pessoas em regime alimentar. Apresenta textura delicada, sabor típico (suave, levemente ácido e adocicado) e uma elevada porcentagem de lactose em comparação com outros tipos de queijo (WHITNEY, 1988; FOX et al, 2000).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver um produto lácteo contendo fitoquímicos bioativos de extratos de especiarias.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Produzir extratos das ervas *Origanum vulgare* e *Rosemarinus officinalis* L.;
- Otimizar as condições de extração de compostos fenólicos das ervas *Origanum vulgare* e *Rosemarinus officinalis* L. por metodologia de superfície de resposta;
- Determinar o teor de fenólicos totais nos extratos de *Origanum vulgare* e *Rosemarinus officinalis* L.;
- Determinar a atividade antioxidante nos extratos brutos de *Origanum vulgare* e *Rosemarinus officinalis* L.;
- Definir a concentração de extrato mais apropriada sob ponto de vista de alimento funcional e testá-la sensorialmente;
- Caracterizar química e fisicamente o produto final.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATÉRIAS-PRIMAS

As ervas *Origanum vulgare* e *Rosemarinus officinalis* L. foram adquiridas no mercado local, após 15 dias da colheita, e utilizadas parcialmente desidratadas (umidade de 12,1% e 10,3% para *Origanum vulgare* e *Rosemarinus officinalis* L., respectivamente) e cominuídas.

A ricota comercial, base para o produto desenvolvido, foi utilizada após 8 dias de fabricação. Os demais ingredientes e condimentos, assim como a ritoca, foram adquiridos no mercado local.

4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

4.2.1 Produção dos extratos de *Origanum vulgare* e *Rosemarinus officinalis* L.

Para otimizar as condições de extração dos compostos fenólicos das especiarias em questão foi aplicada a metodologia de superfície de resposta. Um planejamento fatorial 3^2 foi utilizado para identificar os efeitos das variáveis na extração de compostos fenólicos. Foram analisadas duas variáveis independentes em três níveis: concentração de etanol (50, 60 e 70%) e tempo de extração (2, 4 e 6 horas) (Tabela 6). A concentração de compostos fenólicos foi escolhida como variável dependente, devido à sua relação com as condições de extração.

Os extratos de *Origanum vulgare* e *Rosemarinus officinalis* L. foram obtidos via extração com a combinação dos solventes etanol e água. Amostras de 10g do material seco (*Origanum vulgare* e *Rosemarinus officinalis* L.) foram extraídas com 200 e 150 mL de solvente, respectivamente, em diferentes tempos, à temperatura ambiente, sob agitação constante. Após a extração, as amostras foram filtradas a vácuo e armazenadas sob refrigeração e ao abrigo de luz (Figura 9).

Tabela 6: Valores experimentais e níveis codificados para as variáveis independentes, para o planejamento fatorial 3^2

Variáveis independentes		Codificação		
		-1	0	+1
Concentração de etanol (%)	X1	50	60	70
Tempo de extração (h)	X2	2	4	6

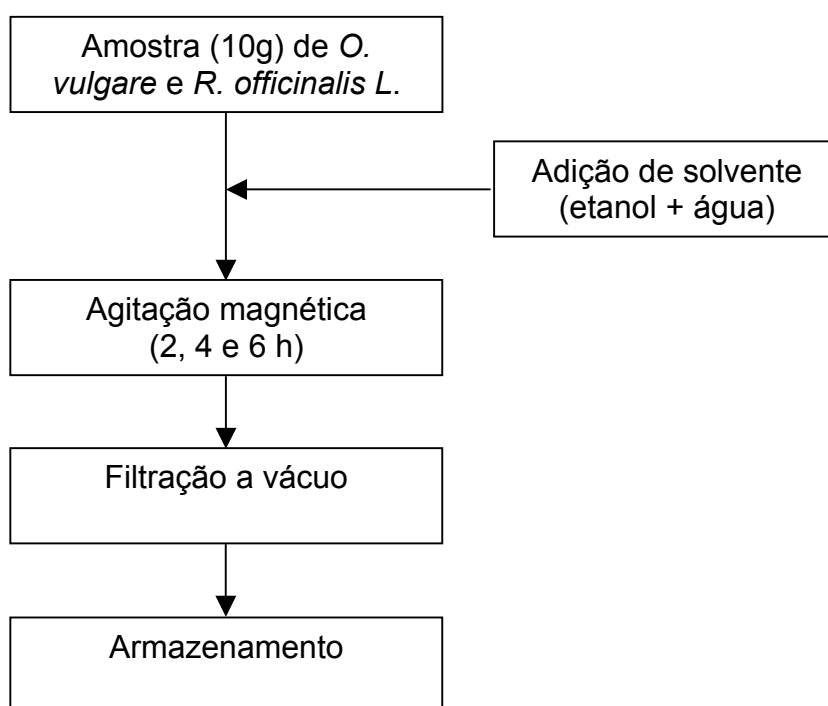


Figura 9: Fluxograma do processo de extração de compostos fenólicos de *Origanum vulgare* e *Rosemarinus officinalis* L.

Após obtenção da resposta para cada ponto do planejamento, foi realizado o *steepest ascent* (caminho da máxima inclinação ascendente), seguido de um planejamento fatorial de segunda ordem (2^2) com dois pontos centrais localizados e pontos estrela (Tabela 7). A análise estatística dos dados foi realizada utilizando-se o software *Statistic 5.0*. O comportamento do sistema foi descrito pelo polinômio de segunda ordem (equação 25). Todas as extrações foram realizadas em duplicata.

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{11} X_1 X_1 + \beta_{22} X_2 X_2 + \beta_{12} X_1 X_2 \quad (25)$$

Tabela 7: Planejamento fatorial de segunda ordem para o processo de extração de compostos fenólicos de *Origanum vulgare* e *Rosemarinus officinalis* L.

<i>Origanum vulgare</i>				<i>Rosemarinus officinalis</i> L.			
Variáveis codificadas		Variáveis não codificadas		Variáveis codificadas		Variáveis não codificadas	
X1	X2	X1 (%)	X2 (h)	X1	X2	X1 (%)	X2 (h)
-1	-1	35,0	6,5	-1	-1	72,5	7,0
-1	+1	35,0	8,5	-1	+1	72,5	9,0
+1	-1	45,0	6,5	+1	-1	77,5	7,0
+1	+1	45,0	8,5	+1	+1	77,5	9,0
-1,414	0	32,9	7,5	-1,414	0	71,5	8,0
+1,414	0	47,1	7,5	+1,414	0	78,5	8,0
0	-1,414	40,0	6,1	0	-1,414	75,0	6,6
0	+1,414	40,0	8,9	0	+1,414	75,0	9,4
0	0	40,0	7,5	0	0	75,0	8,0
0	0	40,0	7,5	0	0	75,0	8,0

4.3 FENÓLICOS TOTAIS

A determinação de compostos fenólicos totais foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Shetty et al (1995). Um mililitro de extrato alcoólico de *Origanum vulgare* e *Rosemarinus officinalis* L. foi adicionado a 1 mL de etanol 95%, 5 mL de água destilada e 0,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu 1N. Após 5 minutos, foi adicionado 1 mL de Na₂CO₃ 5%, e a mistura reagente permaneceu em repouso durante 60 minutos, à temperatura ambiente. A quantificação dos compostos fenólicos foi realizada através de leitura de absorbância a 725 nm, utilizando curva padrão de ácido gálico (10 – 100 µg/mL) em etanol 95%.

4.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

4.4.1 Sistema de inibição do radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH)

Para avaliar a capacidade dos extratos das ervas inibirem a atividade sequestrante do DPPH, foi utilizada a metodologia modificada de Cervato et al (2000), de acordo com Shetty et al (2005).

DPPH é um radical livre que quando dissolvido em etanol produz coloração azul-violeta. A perda de cor indica atividade sequestrante do radical, e o objetivo é inibir a perda de cor com os compostos antioxidantes presentes nos extratos. Três mililitros de DPPH 60µM em etanol foram adicionados a 1 mL de extrato alcoólico de *Origanum vulgare* e *Rosemarinus officinalis* L., e incubados à temperatura ambiente por 15 minutos. Foi realizada leitura de absorbância a 517 nm e a atividade antioxidante foi calculada como a porcentagem de inibição de formação do radical DPPH, de acordo com a equação 26. Como controle, foi utilizado 1 mL de etanol 95% em substituição aos extratos.

$$\% \text{ inibição} = \left(\frac{A_{517}^{\text{controle}} - A_{517}^{\text{extrato}}}{A_{517}^{\text{controle}}} \right) \cdot 100 \quad (26)$$

4.4.2 Dosagem de MDA (malondialdeído)

Aldeídos são frequentemente produzidos quando lipoperóxidos são metabolizados por organismos aeróbios. O MDA é um dos aldeídos mais abundantes resultantes da peroxidação lipídica tecidual.

A quantificação do MDA foi realizada na presença de microsoma hepático de ratos e extratos alcoólicos de *Origanum vulgare* e *Rosemarinus officinalis* L. Para tanto, foi utilizada a metodologia do ácido tiobarbitúrico, modificada por Cechini et al, 1990.

4.4.2.1 Obtenção de microssoma hepático de ratos (homogenato)

Os animais, antes de serem decapitados e exsanguinados, permaneceram em jejum por 18 horas. O fígado dos animais foi retirado, lavado com KCl 1,15% e seco com papel filtro. Essas etapas foram realizadas em banho de gelo. Após a secagem, o fígado foi picado, homogeneizado com KCl 1,15%, utilizando a proporção de 1g de fígado para 4 mL de KCl 1,15%, e centrifugado a 3200 rpm, a 4°C durante 10 minutos. O sobrenadante foi retirado, centrifugado a 11000 rpm, a 4°C durante 15 minutos e precipitado isoeletricamente com tampão acetato de sódio 0,1M, pH 4,0, para atingir pH 5,4 no meio. Após nova centrifugação a 11000 rpm, a 4°C durante 10 minutos, o precipitado foi ressuspenso em tampão fosfato Na/K 0,01M, pH 7,4, com dois movimentos de pistilo em igual volume medido antes da precipitação isoeletrica.

4.4.2.2 Quantificação de MDA

A quantificação de MDA seguiu o esquema mostrado na Tabela 8.

Tabela 8: Quantificação de MDA

	Sistema	Branco	Controle
Homogenato	1,0 mL	-	1,0 mL
Água deionizada	-	1,0 mL	2,0 mL
FeCl ₃ (1 mM)	100 µL	100 µL	100 µL
Ácido ascórbico (1 mM)	100 µL	100 µL	100 µL
TCA 2,8%*	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL
TBA 1,0%**	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL
Extrato alcoólico	2,0 mL	-	-

* Ácido tricloroacético

** Ácido tiobarbitúrico

O sistema, o branco e o controle foram agitados em vortex 40" para homogeneização dos reagentes. Em seguida, os tubos foram colocados em banho-

maria a 95°C por 20 minutos, com posterior banho de gelo para resfriamento. A fase orgânica foi extraída com 2,0 mL de butanol e o restante foi agitado novamente em vortex 40". Após agitação, a mistura foi centrifugada a 300 rpm por 15 minutos. Foi realizada leitura de absorbância a 535 nm e 572 nm contra butanol.

Os resultados da lipoperoxidação foram expressos em nanomoles de malondialdeído/mL de extrato, utilizando o valor de 156 para o coeficiente de extinção molar do malondialdeído.

4.5 DESENVOLVIMENTO DO PRODUTO LÁCTEO (PATÊ DE RICOTA)

4.5.1 Obtenção da formulação-base

A formulação-base utilizada na produção do patê de ricota foi constituída de ricota comercial + 15% de creme de leite (25,0% de gordura). A esta base, foram adicionados os extratos concentrados das ervas e demais condimentos necessários.

4.5.2 Concentração dos extratos

Os extratos obtidos por extração com etanol e água passaram por um processo de concentração em estufa com circulação e renovação de ar, a 35°C. Este procedimento foi necessário para eliminar um dos solventes (etanol), que confere sabor indesejável aos extratos. Outra razão da eliminação do solvente é obter extratos mais concentrados, a fim de se conseguir uma concentração de compostos fenólicos significativa no produto final.

4.5.3 Formulações

Foram propostas duas formulações, uma contendo extrato de *Origanum vulgare* e outra contendo extrato de *Rosemarinus officinalis* L. (Tabela 9). O volume de extrato adicionado à base foi determinado após quantificação dos

compostos fenólicos nos extratos concentrados, levando em consideração a Ingestão Diária Recomendada para compostos fenólicos (1g/dia) (SCALBERT et al, 2000) e as características sensoriais do produto.

Tabela 9: Formulações propostas para o patê de ricota

	Formulações	
	<i>Origanum vulgare</i>	<i>Rosemarinus officinalis L.</i>
	(1)	(2)
Base (g)	100	100
Cloreto de sódio (g)	1,4	1,4
Glutamato monossódico (g)	1,4	1,4
Orégano desidratado (g)	0,4	0,0
Ervas finas (g)	0,0	0,4
Extrato concentrado (mL)	22,0	10,0

4.5.4 Avaliação sensorial

As formulações de patê de ricota, contendo extratos de *Origanum vulgare* e *Rosemarinus officinalis L.*, foram avaliadas sensorialmente através de teste de aceitação, escala do ideal e intenção de compra (LAWLESS et al, 1998; STONE & SIDEL, 1985).

4.5.4.1 Teste de aceitação

Para avaliar a aceitabilidade das duas formulações, foi utilizada escala hedônica de 9 pontos, ancorada entre os pontos desgostei muitíssimo (1) e gostei muitíssimo (9) (Apêndice 1). Foram utilizados 50 provadores, entre professores, alunos e funcionários da Universidade Estadual de Londrina. As amostras foram servidas de forma monádica, em cabines individuais, e codificadas aleatoriamente com números de três dígitos. Foi solicitado a cada provador avaliar as amostras quanto à qualidade sensorial global.

4.5.4.2 Escala do ideal (*Just Right Scales*) e intenção de compra

A escala do ideal foi utilizada para avaliar os parâmetros: cor, sabor amargo, acidez, sabor salgado e firmeza (textura) (Apêndice 2). Foram utilizados 50 provadores entre professores, alunos e funcionários da Universidade Estadual de Londrina. As amostras foram servidas de forma monádica, em cabines individuais, e codificadas aleatoriamente com números de três dígitos.

Foi solicitado também aos provadores responderem, na mesma ficha, quanto à intenção de compra dos produtos apresentados. Para isto, foi utilizada escala de intenção de compra de cinco pontos, ancorada entre os pontos certamente compraria (5) e certamente não compraria (1) (Apêndice 2).

4.5.5 Caracterização físico-química da ricota comercial e do produto final

A ricota comercial e o produto final foram caracterizados quanto a: extrato seco total, proteína bruta (nitrogênio total), lipídios, resíduo mineral (cinzas), carboidratos totais, pH, atividade de água, acidez titulável e valor calórico.

Extrato seco total

O extrato seco total foi determinado após determinação da umidade, realizada por secagem em estufa a 105°C (AOAC, 1995).

Proteína bruta (nitrogênio total)

O nitrogênio total foi determinado pelo Método de Kjeldahl, utilizando-se o fator de conversão N x 6,38, para obter o teor de proteína bruta (ANVISA, Resolução RDC nº 360, de 23 de dezembro de 2003; AOAC, 1995).

Lipídios

A porcentagem de gordura foi determinada segundo o Método de Gerber, utilizando-se butirômetro especial para queijos (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985). A leitura da porcentagem de gordura foi realizada diretamente na escala do butirômetro.

Resíduo mineral (cinzas)

O resíduo mineral foi determinado pela técnica de incineração em mufla a 550-570°C, conforme a metodologia da AOAC (1995).

Carboidratos totais

A porcentagem de carboidratos totais foi calculada como a diferença entre 100 e a soma do conteúdo de proteínas, gorduras, umidade e cinzas, de acordo com a relação (ANVISA, Resolução RDC nº 360, de 23 de dezembro de 2003):

$$\% \text{ CHO totais} = 100 - (\% \text{ umidade} + \% \text{ proteína} + \% \text{ gordura} + \% \text{ cinzas}) \quad (27)$$

pH

A medida do pH foi realizada utilizando pHmetro digital (PG 2000, GEHAKA), após calibração com soluções tampão de pH 4,0 e 7,0.

Atividade de água

A atividade de água foi medida com o equipamento AquaLab, Decagon Devices, Inc., modelo CX-2.

Acidez titulável

A acidez da amostra expressa em % de ácido láctico foi determinada de acordo com a metodologia descrita pela Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais – CETEC (1985). Dez gramas do produto foram transferidos para um balão volumétrico de 100 mL e agitados vigorosamente com 85 mL de água destilada a 40°C. O volume foi completado para 100 mL com água destilada à temperatura ambiente. Uma alíquota de 50 mL foi titulada com solução de hidróxido de sódio 0,1N, utilizando fenolftaleína como indicador.

A porcentagem de ácido láctico foi determinada pela equação:

$$\% \text{ ácido láctico} = \frac{V \cdot f \cdot 0,90}{P} \quad (28)$$

Onde:

V = volume da solução de NaOH 0,1N gasto na titulação (mL)

f = fator de correção da solução de NaOH 0,1N

P = massa da amostra (g)

Valor calórico

O valor calórico (kcal e kJ) foi calculado com base em 100g de produto, utilizando os fatores de conversão (ANVISA, Resolução RDC nº 360, de 23 de dezembro de 2003):

Carboidrato = 4 kcal/g – 17 kJ/g

Proteína = 4 kcal/g – 17 kJ/g

Gorduras = 9 kcal/g – 37 kJ/g

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS DE *Origanum vulgare* E *Rosemarinus officinalis* L.

A eficiência na extração de compostos fenólicos é influenciada por múltiplos parâmetros, como temperatura, tempo de extração, polaridade do solvente, entre outros. Segundo Shahidi et al (2005), a seleção de condições apropriadas é crucial para a extração de compostos fenólicos, já que essas condições variam de acordo com a natureza dos compostos fenólicos presentes nas diversas plantas. Frente a essas circunstâncias, a metodologia de superfície de resposta tem se mostrado como uma ferramenta importante na otimização de condições experimentais a fim de maximizar a resposta desejada.

O delineamento experimental foi planejado para avaliar o impacto de dois fatores (variáveis independentes), tempo de extração e proporção entre os solventes etanol e água, na extração de compostos fenólicos (variável dependente) de *Origanum vulgare* e *Rosemarinus officinalis* L. O primeiro passo foi estabelecer os níveis das variáveis dependentes a serem testados, com base em valores teóricos obtidos da literatura (Tabela 6) (SHETTY et al, 2005; CAPECKA et al, 2005; TSIMIDOU et al, 2002).

Na Tabela 10 encontram-se as respostas obtidas para o primeiro planejamento fatorial (3^2) de extração de compostos fenólicos totais de *Origanum vulgare* e *Rosemarinus officinalis* L.

Tabela 10: Resposta da variável dependente (compostos fenólicos totais) para o primeiro planejamento

Fenólicos totais (µg/mL)				
	Concentração de etanol (%)	Tempo de extração (h)	<i>Rosemarinus officinalis L.</i>	<i>Origanum vulgare</i>
1	50,0	2,0	152,77	2072,12
2	50,0	4,0	142,33	2365,81
3	50,0	6,0	258,87	2554,81
4	60,0	2,0	161,96	2261,12
5	60,0	4,0	243,64	2129,50
6	60,0	6,0	344,90	2177,36
7	70,0	2,0	143,11	1642,90
8	70,0	4,0	321,41	2056,90
9	70,0	6,0	396,57	2168,28

Tabela 11: Efeitos para *Rosemarinus officinalis L.* e *Origanum vulgare* para o primeiro planejamento

<i>Rosemarinus officinalis L.</i>			<i>Origanum vulgare</i>	
Fator	Efeito	P	Efeito	p
X1 (L)	102,373	0,046	-374,887	0,066
X1 (Q)	14,323	0,634	45,857	0,742
X2 (L)	180,833	0,010	308,103	0,109
X2 (Q)	-7,237	0,807	37,972	0,784
X1X2	73,680	0,150	-	-

A análise dos efeitos (Tabela 11) para *Rosemarinus officinalis L.* mostrou que a concentração de compostos fenólicos foi favorecida pelo aumento da concentração de etanol e pelo aumento no tempo de extração (efeitos lineares positivos). Esses resultados indicaram que para se maximizar a extração de compostos fenólicos de *Rosemarinus officinalis L.*, dever-se-ia aumentar a concentração de etanol e o tempo de extração. Já para *Origanum vulgare*, o aumento na concentração de etanol teve efeito negativo, ou seja, o rendimento em compostos fenólicos foi favorecido pela redução na concentração de etanol, embora

o aumento no tempo de extração tenha influenciado de forma positiva a extração dos compostos fenólicos. Portanto, para que se obtivesse maior concentração de compostos fenólicos de *Origanum vulgare*, dever-se-ia reduzir a concentração de etanol e aumentar o tempo de extração.

Com base nesses resultados, foi realizado o *steepest ascent* (caminho da máxima inclinação ascendente) com o objetivo de localizar a região de máximo na extração de compostos fenólicos. Os resultados obtidos nesta etapa (Tabelas 12 e 13) foram utilizados para determinação do ponto central do planejamento de segunda ordem, com dois pontos centrais localizados e pontos estrela (Tabelas 14 e 15).

Tabela 12: Caminho da máxima inclinação ascendente para extração de compostos fenólicos de *Rosemarinus officinalis* L.

Variáveis codificadas		Variáveis não-codificadas		Fenólicos totais (µg/mL)
X1	X2	Concentração de etanol (%)	Tempo de extração (h)	
+1,57	+2	75,7	8,0	535,69
+2,14	+3	81,4	10,0	438,56
+2,71	+4	87,1	12,0	510,56
+3,28	+5	92,8	14,0	466,51

Tabela 13: Caminho da máxima inclinação ascendente para extração de compostos fenólicos de *Origanum vulgare*

Variáveis codificadas		Variáveis não-codificadas		Fenólicos totais (µg/mL)
X1	X2	Concentração de etanol (%)	Tempo de extração (h)	
-2	+1,82	40,0	7,6	2275,25
-3	+2,64	30,0	9,3	1808,61
-4	+3,46	20,0	10,9	1814,81

Tabela 14: Resposta da variável dependente (compostos fenólicos totais) para o segundo planejamento com *Rosemarinus officinalis L.*

Variáveis codificadas		Variáveis não-codificadas		Fenólicos totais (µg/mL)
X1	X2	Concentração de etanol (%)	Tempo de extração (h)	
-1	-1	72,5	7,0	365,02
-1	+1	72,5	9,0	356,21
+1	-1	77,5	7,0	351,97
+1	+1	77,5	9,0	374,81
-1,414	0	71,5	8,0	348,27
+1,414	0	78,5	8,0	412,01
0	-1,414	75,0	6,6	448,89
0	+1,414	75,0	9,4	383,07
0	0	75,0	8,0	449,43
0	0	75,0	8,0	465,09

Tabela 15: Resposta da variável dependente (compostos fenólicos totais) para o segundo planejamento com *Origanum vulgare*

Variáveis codificadas		Variáveis não-codificadas		Fenólicos totais (µg/mL)
X1	X2	Concentração de etanol (%)	Tempo de extração (h)	
-1	-1	35,0	6,5	1954,80
-1	+1	35,0	8,5	2127,26
+1	-1	45,0	6,5	2279,76
+1	+1	45,0	8,5	2214,88
-1,414	0	32,9	7,5	2236,42
+1,414	0	47,1	7,5	2472,84
0	-1,414	40,0	6,1	2551,16
0	+1,414	40,0	8,9	2235,11
0	0	40,0	7,5	2588,85
0	0	40,0	7,5	2560,45

Tabela 16: Efeitos para *Rosemarinus officinalis L.* e *Origanum vulgare* no segundo planejamento

Fator	<i>Rosemarinus officinalis L.</i>		<i>Origanum vulgare</i>	
	Efeito	p	Efeito	p
X1 (L)	23,923	0,346	186,732	0,198
X1 (Q)	-95,149	0,026	-334,874	0,101
X2 (L)	-19,763	0,429	-84,846	0,531
X2 (Q)	-59,309	0,109	-296,369	0,136

A análise dos efeitos para *Rosemarinus officinalis L.* e *Origanum vulgare* (Tabela 16) revelou que os resultados obtidos estão praticamente no máximo, já que os termos lineares foram desprezíveis e os termos quadráticos significativos (Figuras 10 e 11).

As condições ótimas de extração de compostos fenólicos de *Rosemarinus officinalis L.* foram obtidas utilizando-se a concentração de 75% de etanol em oito horas de operação (Figura 10, Tabela 14). Para *Origanum vulgare*, as condições ótimas de extração de compostos fenólicos foram obtidas quando empregou-se 40% de etanol em sete horas e meia de operação (Figura 11, Tabela 15).

A diferença na concentração ótima de etanol para extração de compostos fenólicos de *Rosemarinus officinalis L.* e *Origanum vulgare* revela diferença na polaridade dos fenólicos extraídos de cada especiaria. Pode-se afirmar que os compostos fenólicos extraídos de *Origanum vulgare* foram mais hidrofílicos que os extraídos de *Rosemarinus officinalis L.*

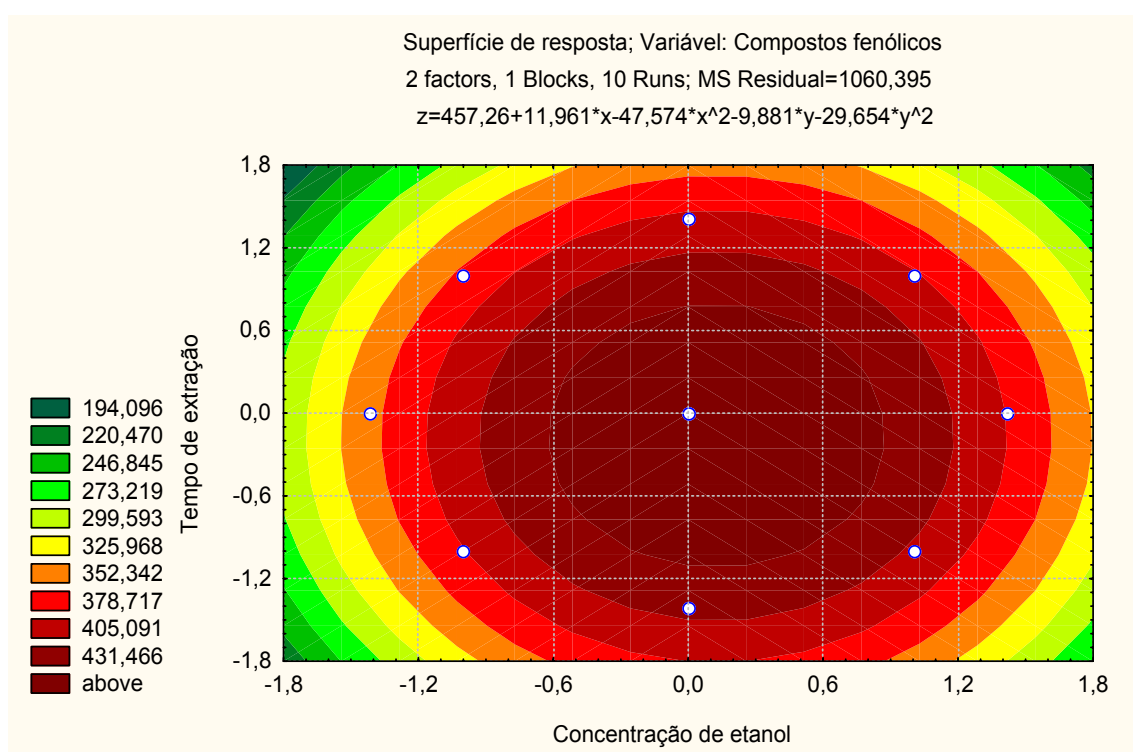
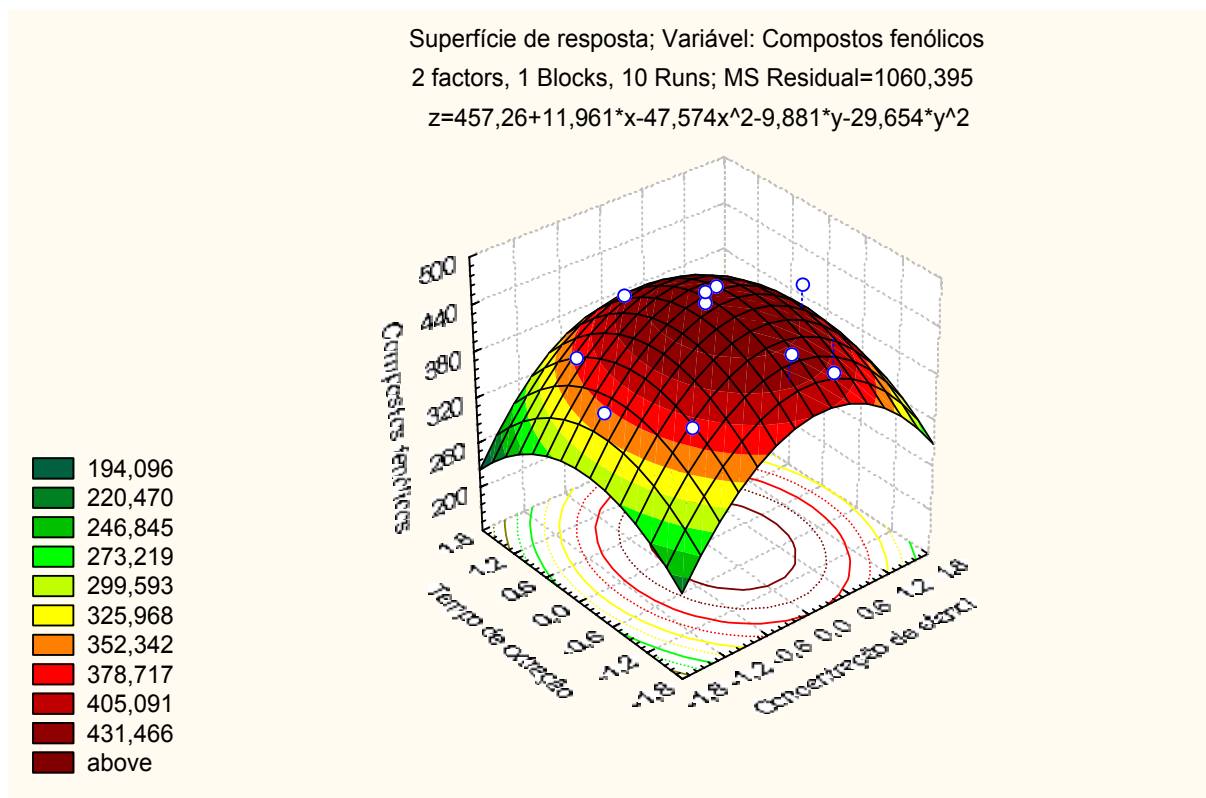


Figura 10: Superfície de resposta para os efeitos de concentração de etanol e tempo de extração sobre a concentração de compostos fenólicos de *Rosemarinus officinalis* L.

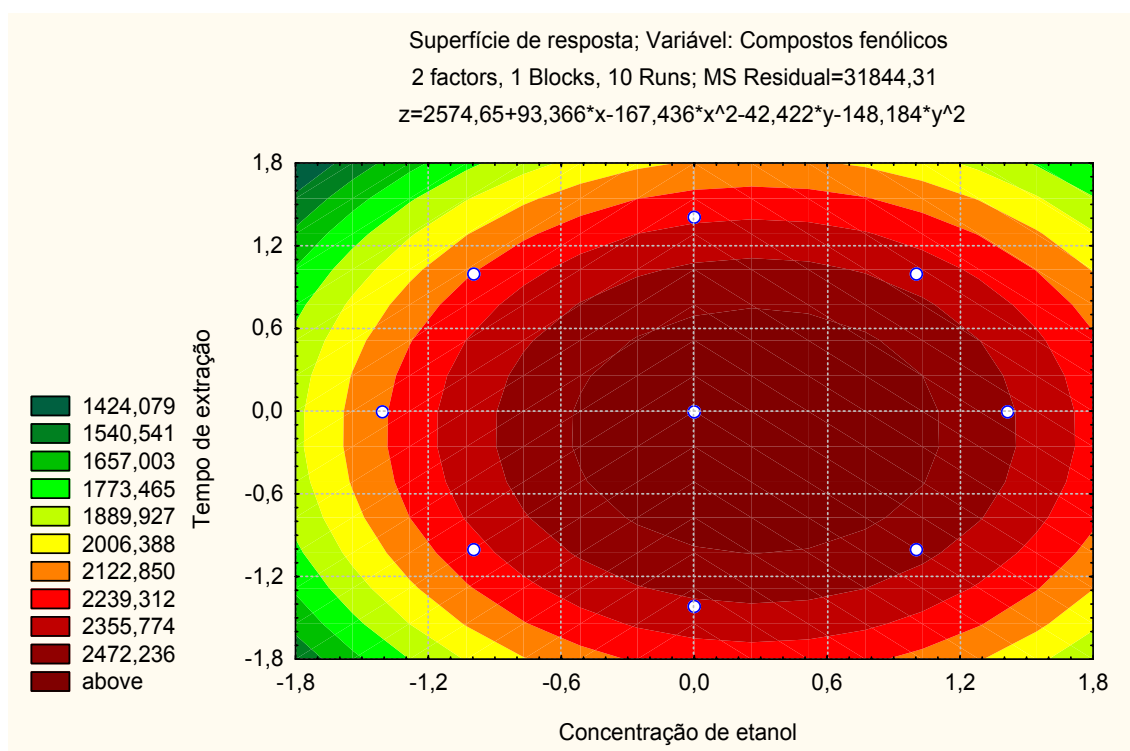
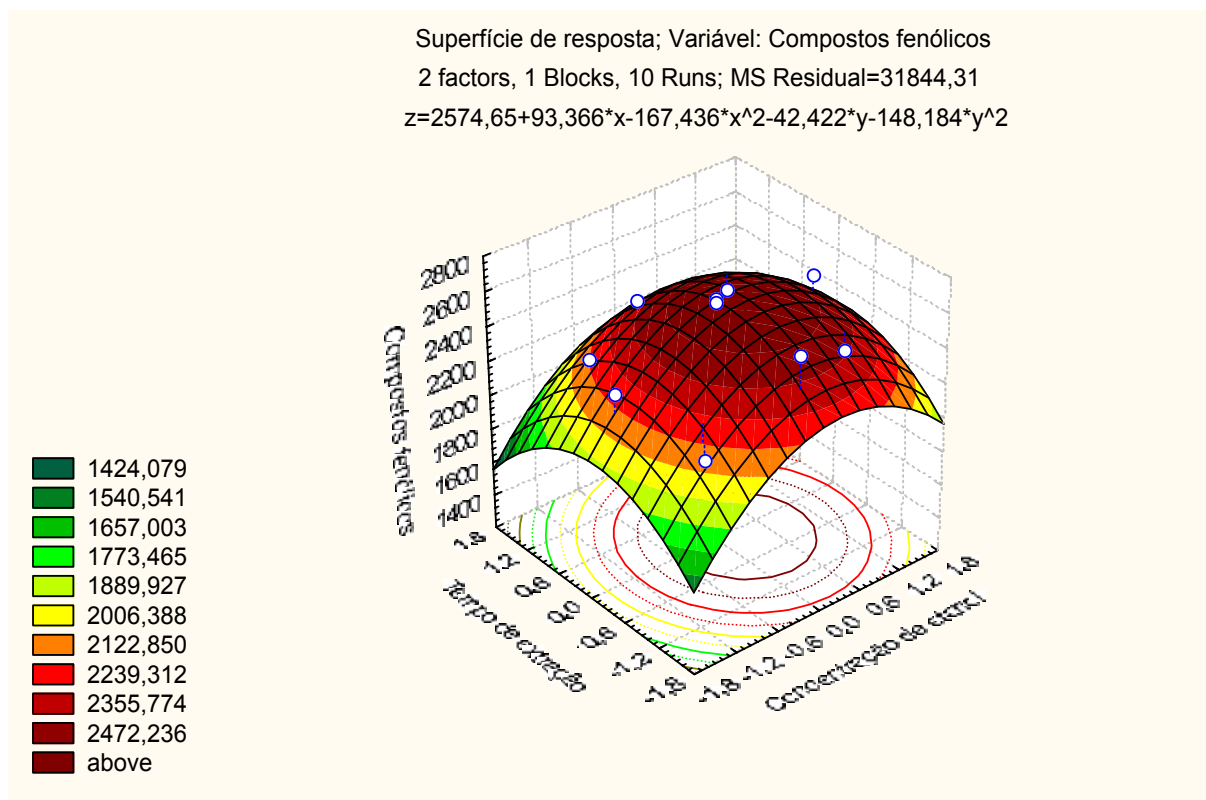


Figura 11: Superfície de resposta para os efeitos de concentração de etanol e tempo de extração sobre a concentração de compostos fenólicos de *Origanum vulgare*

Segundo Shetty et al (2005), melhores resultados na extração de fenólicos a partir de orégano comercial ou geneticamente modificado, foram obtidos

através do emprego de 60% de etanol em 24 horas de extração. Nessas condições, os autores encontraram compostos fenólicos em concentrações de 35,43 mg/g (p/p) para orégano comercial e 55,35 mg/g (p/p) para orégano geneticamente modificado. Ressalta-se que os extratos foram concentrados. Segundo os autores, existe uma variabilidade muito ampla na concentração de fenólicos nas ervas comerciais, justificando o estudo de modificação genética para uniformidade de concentração, requisito essencial para o emprego desse produto como ingrediente em alimentos funcionais.

Neste experimento, obtivemos concentrações p/v, em extratos não concentrados de *Origanum vulgare*, de 2,57 mg/mL $\pm$ 0,02. A concentração obtida no extrato líquido, após evaporação do solvente (etanol), passou a 18,0 mg/mL (p/v), justificando a aplicação do extrato como ingrediente em alimentos funcionais. Sabe-se que em vinho tinto, por exemplo, produto com alegação antioxidante comprovada, a concentração de compostos fenólicos situa-se na faixa de 1,6 mg/mL (CASTELLARI et al, 2000).

A concentração de compostos fenólicos obtida para os extratos de *Rosemarinus officinalis* L. foi significativamente inferior ($p < 0,01$) à obtida para os extratos de *Origanum vulgare*, atingindo o valor de 0,46 mg/mL $\pm$ 0,01 no extrato diluído e 9,60 mg/mL (p/v) no extrato concentrado. Os extratos das folhas de *Rosemarinus officinalis* L. apresentam elevada concentração de ácido rosmarínico, um éster do ácido cafeico, com propriedades biológicas bem reconhecidas (SHAHIDI et al, 1995), o que justifica o estudo e a investigação dessa especiaria. Vários estudos têm demonstrado que o ácido rosmarínico possui atividade antiinflamatória, baseada na inibição de lipoxigenases e ciclooxigenases, podendo ser usado no tratamento de desordens inflamatórias (PEREIRA et al, 2005; PETERSEN et al, 2003). Também apresenta propriedades antioxidantes, fornecendo proteção contra o desenvolvimento de muitas doenças relacionadas ao estresse oxidativo, como doenças cardiovasculares e câncer (HUANG et al, apud SHETTY et al, 2005).

5.2 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

5.2.1 Sistema de inibição do radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH)

O método de seqüestro de radicais livres para avaliar a atividade antioxidante está baseado no descolorimento de uma solução composta por radicais estáveis DPPH de cor azul-violeta quando da adição de substâncias que podem ceder um átomo de hidrogênio, ou seja, baseia-se na transferência de elétrons de um composto antioxidante para um oxidante (LAJOLO et al, 2006). A redução do radical DPPH é acompanhada de perda de sua coloração azul-violeta.

O decaimento da absorbância das amostras (extratos alcoólicos de *Origanum vulgare* e *Rosemarinus officinalis* L.) relacionado ao decaimento da absorbância do controle resultou na porcentagem de seqüestro de radicais livres (Tabela 17, Figura 12).

Tabela 17: Inibição do radical DPPH em extratos alcoólicos de *Origanum vulgare* e *Rosemarinus officinalis* L.

Extrato alcoólico	% de inibição
<i>Origanum vulgare</i>	41,16 ± 2,28
<i>Rosemarinus officinalis</i> L.	90,14 ± 0,62

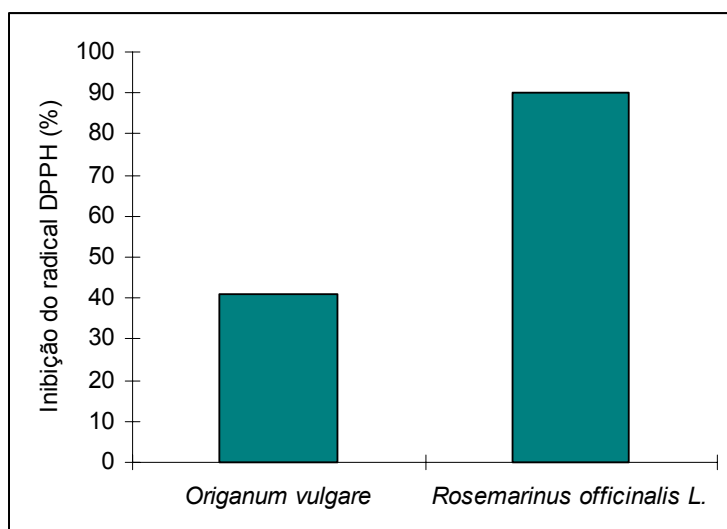


Figura 12: Inibição do radical DPPH em extratos alcoólicos de *Origanum vulgare* e *Rosemarinus officinalis* L.

O extrato alcoólico de *Rosemarinus officinalis* L. apresentou maior atividade antioxidante comparado ao extrato alcoólico de *Origanum vulgare*, embora o conteúdo total de compostos fenólicos em ambos os extratos tenha sido diferente (Tabelas 14 e 15). O percentual de inibição do radical DPPH foi de 90,14% para o extrato alcoólico de *Rosemarinus officinalis* L. e 41,16% para o extrato alcoólico de *Origanum vulgare*. Isto sugere que a natureza físico-química dos compostos fenólicos individuais presentes nos extratos pode ser mais importante na contribuição da atividade antioxidante que o conteúdo total de fenólicos determinado pelo ensaio utilizando o reagente Folin-Ciocalteu. Segundo Shetty et al (2005) este fato pode indicar que uma concentração crítica de compostos fenólicos é suficiente para obter uma atividade antioxidante desejada e depois disso ocorre um efeito de saturação e a presença de fenólicos adicionais não aumenta a atividade antioxidante.

As diferenças na atividade antioxidante obtidas neste ensaio foram, em grande parte, função da taxa de fenólicos hidrofílicos e hidrofóbicos, já que o método utilizado determina essencialmente compostos fenólicos solúveis em água (SHETTY et al, 2005; LAJOLO et al, 2006), embora Kulisic et al (2004) afirmem que a polaridade do substrato não influencia na sensibilidade do método.

5.2.2 Dosagem de MDA (malondialdeído)

O teste de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico baseia-se na reação do ácido tiobarbitúrico com os produtos de decomposição de hidroperóxidos, e um dos principais produtos formados no processo oxidativo é o malondialdeído, um aldeído de cadeia curta (BORGES et al, 1999). Sua identificação e quantificação tem sido utilizada para estimar a intensidade da peroxidação lipídica em sistemas biológicos, em células e em tecidos (MAFRA et al, 1999).

Tabela 18: Concentração de MDA (malondialdeído)

Extrato alcoólico	nM MDA/mL	Redução na produção de MDA (%)
<i>Origanum vulgare</i>	2,318 ± 0,01 ^a	49,8
<i>Rosemarinus officinalis</i> L.	1,362 ± 0,03 ^b	70,5
Controle	4,621 ± 0,02	-

* Médias seguidas de letras diferentes, na mesma coluna, diferem entre si ao nível de 5% (Tukey)

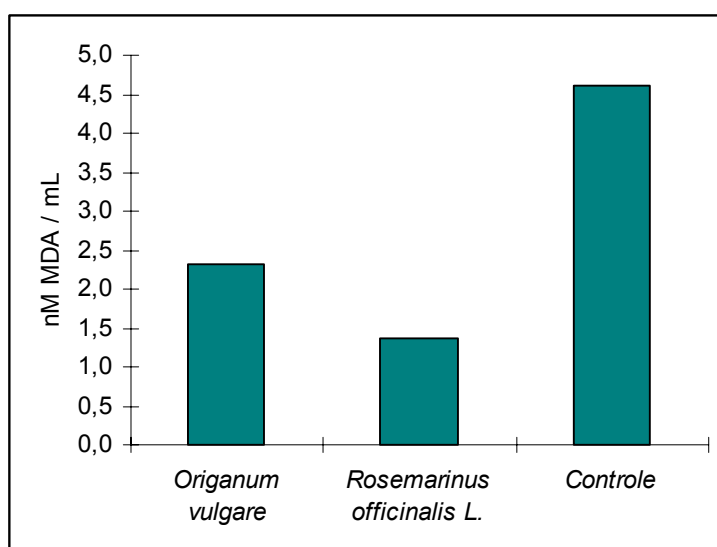


Figura 13: Concentração de MDA (malondialdeído)

A produção de malondialdeído foi significativamente diferente ($p < 0,05$) na presença dos extratos alcoólicos de *Origanum vulgare* e *Rosemarinus officinalis* L. (Tabela 18, Figura 13). O controle, no qual a produção de malondialdeído é máxima, foi utilizado para avaliar a redução percentual na produção deste composto, na presença dos extratos alcoólicos de *Origanum vulgare* e *Rosemarinus officinalis* L. O extrato alcoólico de *Rosemarinus officinalis* L. reduziu em 70,5% a produção de malondialdeído, apresentando maior atividade antioxidante que o extrato alcoólico de *Origanum vulgare*, onde a redução na produção de malondialdeído foi de 49,8%. Este resultado confirma a hipótese de que a natureza físico-química dos compostos fenólicos presentes nos extratos pode ser mais importante na atividade antioxidante que a concentração total dos mesmos, e, segundo Shetty et al (2005), pode ocorrer um efeito de saturação pela presença de

fenólicos adicionais, fato já comentado no ensaio de inibição da atividade sequestrante do radical DPPH.

5.3 DESENVOLVIMENTO DO PRODUTO LÁCTEO (PATÊ DE RICOTA)

5.3.1 Concentração dos extratos

Antes de serem adicionados à base láctea, os extratos alcoólicos de *Origanum vulgare* e *Rosemarinus officinalis* L. passaram por um processo de concentração em estufa com circulação e renovação de ar a 35°C, a fim de remover o solvente (etanol) e aumentar a concentração expressa em mg de compostos fenólicos totais/ mL de extrato.

A concentração final dos extratos foi de 18,00 mg de fenólicos/mL de extrato para *Origanum vulgare* e 9,60 mg de fenólicos/mL de extrato para *Rosemarinus officinalis* L.

O produto contendo extrato de *Origanum vulgare* apresentou 396 mg de fenólicos/ 100g de produto, o que corresponde a 39,6% da Ingestão Diária Recomendada (SCALBERT et al, 2000). Já o produto adicionado de extrato de *Rosemarinus officinalis* L. apresentou 96 mg de fenólicos/ 100g de produto, correspondendo a 9,6% da Ingestão Diária Recomendada.

5.3.2 Caracterização físico-química da ricota comercial e do produto final

Foram determinados os valores de extrato seco total, proteína bruta (nitrogênio total), gordura, resíduo mineral (cinzas), carboidratos totais, pH, atividade de água, acidez titulável e valor calórico para a ricota comercial e para o produto final (patê de ricota) (Tabela 19).

Tabela 19: Caracterização físico-química da ricota comercial (1) e do patê de ricota adicionado de extrato de *Origanum vulgare* (2) e *Rosemarinus officinalis* L. (3)

	1	2	3
Extrato seco total (%)	34,86 ± 0,15 ^{*a}	61,81 ± 0,21 ^{*b}	58,81 ± 0,59 ^{*c}
Cinzas (%)	1,53 ± 0,03 ^{*a}	2,22 ± 0,07 ^{*b}	2,48 ± 0,25 ^{*b}
Proteína bruta (%)	12,40 ± 0,02 ^{*a}	8,82 ± 0,70 ^{*b}	10,07 ± 0,45 ^{*c}
Gordura (%)	14,11 ± 0,10 ^{*a}	19,53 ± 0,25 ^{*b}	19,23 ± 0,15 ^{*b}
Carboidratos totais (%)	6,82 ^a	31,24 ^b	27,03 ^c
Acidez titulável (% de ácido láctico)	0,192 ± 0,006 ^{*a}	0,278 ± 0,005 ^{*b}	0,235 ± 0,005 ^{*c}
Atividade de água (25,5°C)	0,987 ± 0,001 ^{*a}	0,985 ± 0,001 ^{*a}	0,980 ± 0,001 ^{*b}
pH (25,0°C)	6,10 ± 0,01 ^{*a}	5,50 ± 0,005 ^{*b}	5,43 ± 0,01 ^{*c}
Valor calórico (100g) (kcal)	203,87 ^a	336,01 ^b	321,47 ^c

* Média de três determinações ± desvio padrão

Médias seguidas de letras diferentes, numa mesma linha, diferem estatisticamente entre si (Tukey, 5%)

O teor proteico das duas formulações desenvolvidas foi inferior ao teor proteico da ricota comercial (12,4%). O produto pode ser enquadrado como um queijo de média umidade, no qual o teor de umidade é de 36,0 a 45,9% (DUTRA et al, 2002).

O valor calórico do produto foi calculado de acordo com os fatores de conversão estabelecidos pela Resolução RDC nº 360, de 23 de dezembro de 2003, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. O produto contendo extrato de *Origanum vulgare* apresentou 336,01 kcal/100g ou 1403,63 kJ/100g, sendo significativamente maior que o valor calórico apresentado pela formulação contendo extrato de *Rosemarinus officinalis* L. (321,47 kcal/100g ou 1342,21 kJ/100g).

5.3.3 Avaliação sensorial

5.3.3.1 Teste de aceitação

Para a avaliação da qualidade sensorial global do patê de ricota adicionado de extratos de *Origanum vulgare* e *Rosemarinus officinalis* L. foram

utilizados 50 provadores, sendo 32,0% do sexo masculino e 68,0% do sexo feminino. Destes, 58,0% tinham o hábito de consumir ricota regularmente (até dez vezes ao mês).

As duas amostras testadas diferiram significativamente, ao nível de 1% (Tukey), quanto à qualidade sensorial global, sendo a amostra adicionada de extrato de *Origanum vulgare* a mais aceita, alcançando índice de aceitação de 91,1% (Tabela 20). A amostra contendo extrato de *Rosemarinus officinalis* L. apresentou índice de aceitação de 76,0%.

Tabela 20: Resultado do teste de aceitação sensorial global do patê de ricota adicionado de extratos de *Origanum vulgare* e *Rosemarinus officinalis* L.

Formulações	Média dos julgamentos*	Índice de aceitação (%)*
<i>Origanum vulgare</i>	8,20 ± 1,14 ^a	91,1
<i>Rosemarinus officinalis</i> L.	6,84 ± 1,58 ^b	76,0

* Média de 50 julgamentos

Médias seguidas de letras diferentes diferem entre si ao nível de 1% (Tukey) – Escala hedônica de 9 pontos (9 = gostei muitíssimo, 5 = não gostei nem desgostei, 1 = desgostei muitíssimo)

Na Figura 14 pode ser observada a distribuição de freqüência de notas para o teste de aceitação das amostras de patê de ricota. Em relação à amostra contendo extrato de *Origanum vulgare*, 50,0% dos provadores atribuíram nota 9 (gostei muitíssimo). Já para a amostra adicionada de extrato de *Rosemarinus officinalis* L, 32,0% dos provadores atribuíram a nota 7, o que corresponde a “gostei moderadamente”.

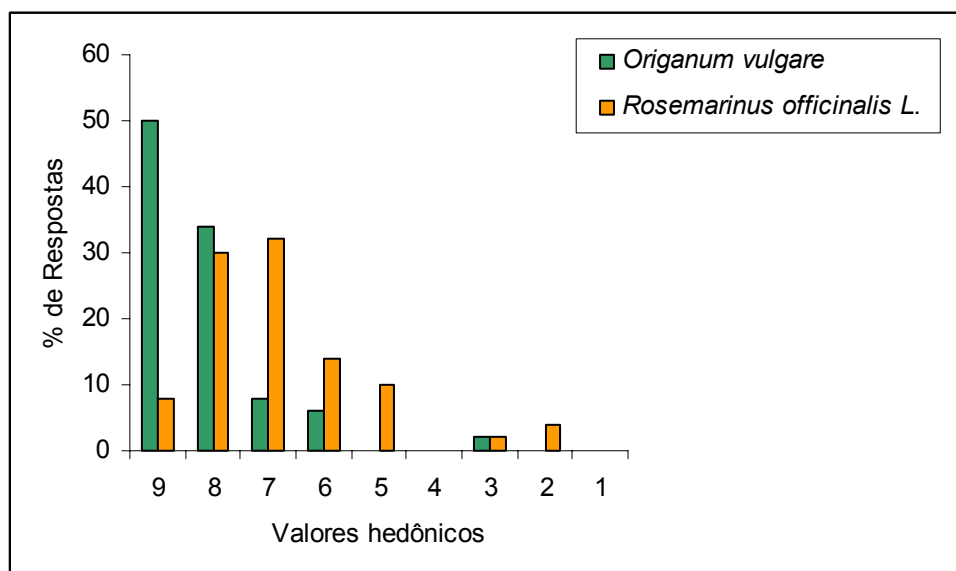


Figura 14: Frequência das notas obtidas no teste de aceitação sensorial global para as amostras de patê de ricota (9 = gostei muitíssimo; 5 = não gostei nem desgostei; 1 = desgostei muitíssimo)

5.3.3.2 Escala do ideal

As duas amostras foram submetidas à avaliação dos atributos cor, sabor amargo, acidez, sabor salgado e textura/firmeza, através do uso da escala do ideal. Os resultados obtidos estão representados nas Figuras 15 e 16 e na Tabela 21.

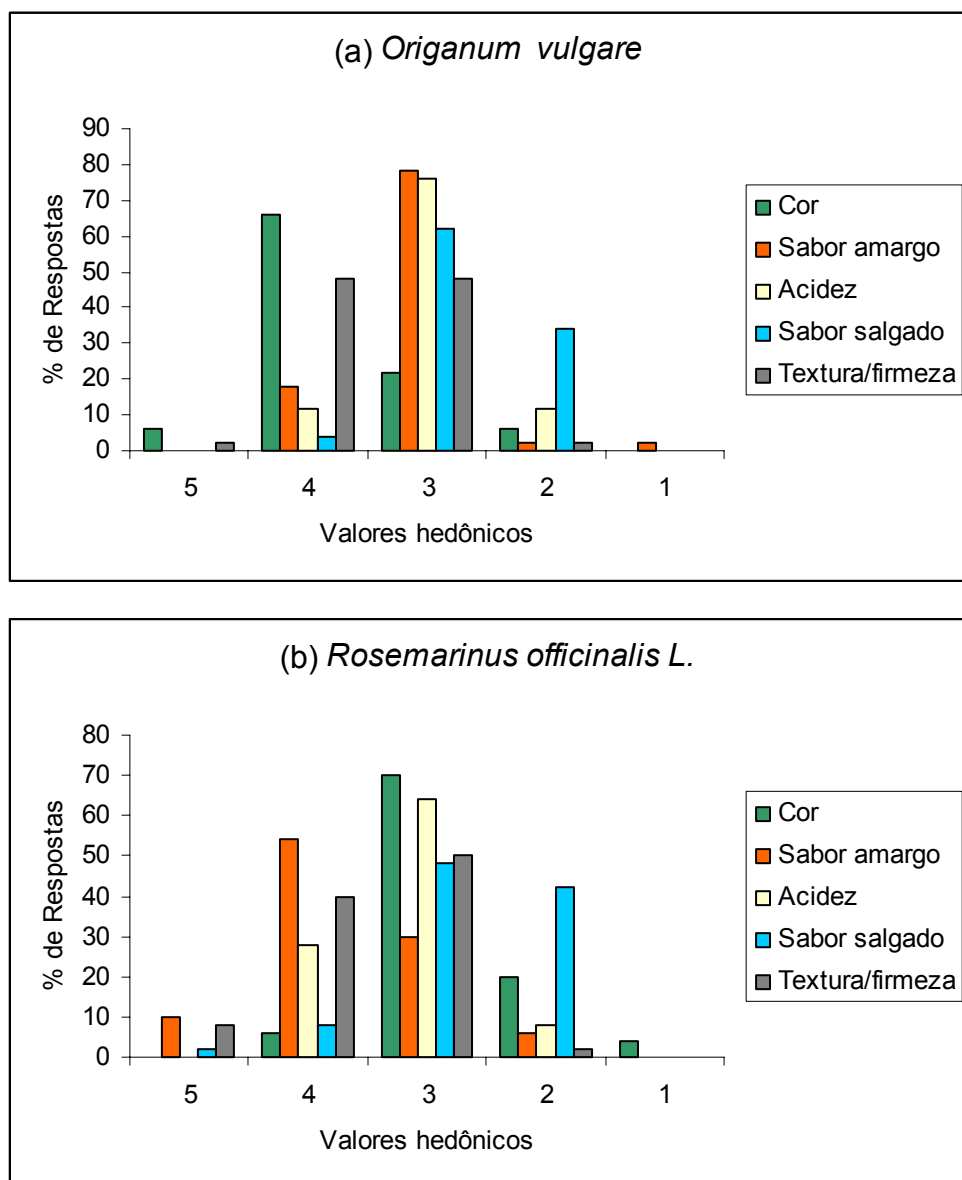


Figura 15: Avaliação dos atributos cor, sabor amargo, acidez, sabor salgado e textura/firmeza para as amostras de patê de ricota, (a) adicionado de extrato de *Origanum vulgare* e (b) adicionado de extrato de *Rosemarinus officinalis L.*, utilizando a escala do ideal (5 = muito mais que o ideal; 3 = ideal; 1 = muito menos que o ideal)

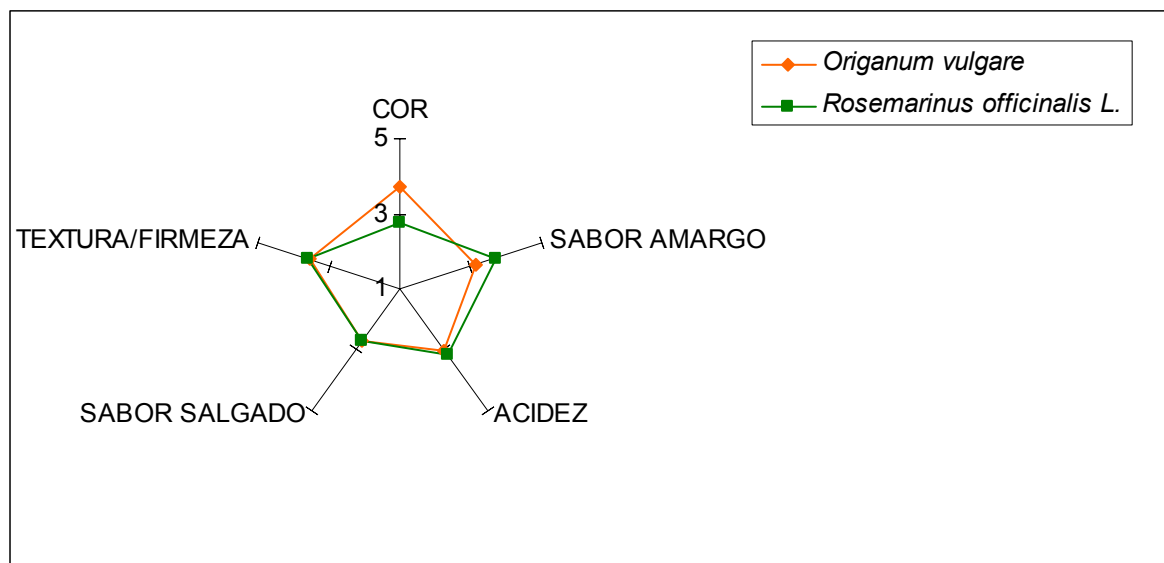


Figura 16: Comparação dos atributos cor, sabor amargo, acidez, sabor salgado e textura/firmeza, de duas amostras de patê de ricota avaliadas pela escala do ideal (5 = muito mais que o ideal; 3 = ideal; 1 = muito menos que o ideal)

Tabela 21: Resultado da avaliação sensorial dos atributos cor, sabor amargo, acidez, sabor salgado e textura/firmeza, de amostras de patê de ricota, utilizando a escala do ideal

Média de julgamentos dos atributos*	Formulações	
	<i>Origanum vulgare</i>	<i>Rosemarinus officinalis L.</i>
Cor	3,72 ± 0,67 ^a	2,78 ± 0,61 ^b
Sabor amargo	3,12 ± 0,52 ^a	3,68 ± 0,74 ^b
Acidez	3,00 ± 0,49 ^a	3,20 ± 0,57 ^a
Sabor salgado	2,70 ± 0,54 ^a	2,70 ± 0,71 ^a
Textura / firmeza	3,50 ± 0,58 ^a	3,54 ± 0,68 ^a

* Média de 50 julgamentos (escala do ideal: 5 = muito mais que o ideal, 4 = ligeiramente mais que o ideal, 3 = ideal, 2 = ligeiramente menos que o ideal, 1 = muito menos que o ideal)

Médias seguidas de mesmas letras, numa mesma linha, não diferem entre si (Tukey, 1%)

Quanto à avaliação do atributo cor, as duas amostras diferiram ($p < 0,01$), sendo a amostra adicionada de extrato de *Origanum vulgare* a mais

escura; 66,0% dos provadores a julgaram como “ligeiramente mais escura que o ideal”. O extrato de *Origanum vulgare* apresenta coloração marrom intensa, que resulta num escurecimento da base de ricota. Na avaliação da amostra contendo extrato de *Rosemarinus officinalis* L., 70% dos provadores consideraram a cor “ideal”. Como o extrato de *Rosemarinus officinalis* L. é de coloração clara, sua adição à base de ricota pouco altera a cor natural do produto. Por se tratar de um produto que tem como base a ricota, este é um resultado esperado, uma vez que a ricota apresenta-se, normalmente, na cor branca ou amarelo palha.

Outro atributo que deve ser considerado é o sabor amargo. O extrato de *Rosemarinus officinalis* L. apresenta sabor amargo intenso, o que refletiu na qualidade sensorial do produto. Com aplicação da escala do ideal, verificou-se que 54,0% dos provadores consideraram a amostra contendo extrato de *Rosemarinus officinalis* L. “ligeiramente mais amarga que o ideal”, o que não foi verificado para a amostra adicionada de extrato de *Origanum vulgare*, em que 78,0% dos provadores consideraram o sabor amargo “ideal”. Portanto, a amostra contendo extrato de *Rosemarinus officinalis* L. foi considerada mais amarga que a amostra adicionada de extrato de *Origanum vulgare* ($p < 0,01$).

Os atributos acidez e sabor salgado foram considerados “ideais” para ambas as amostras, não diferindo significativamente entre si ($p > 0,01$).

Quanto à textura/firmeza da amostra, 50% dos provadores consideraram ideal a amostra contendo extrato de *Rosemarinus officinalis* L. No entanto, a amostra contendo extrato de *Origanum vulgare*, foi considerada “ideal” por 48,0% dos provadores e “ligeiramente mais firme que o ideal” por 48,0% dos provadores.

5.3.3.3 Intenção de compra

Os provadores foram consultados sobre a intenção de compra do patê adicionado de extrato de *Origanum vulgare* e *Rosemarinus officinalis* L. (Tabela 22). Os resultados indicaram que 46% dos provadores “provavelmente comprariam” o patê contendo extrato de *Origanum vulgare*, dado que confirma a boa aceitação do produto pelos consumidores. Em relação ao patê adicionado de extrato de *Rosemarinus officinalis* L., 56% dos provadores “talvez comprassem / talvez não comprassem” o produto. Este resultado reflete a menor aceitação do produto (76%),

e também o impacto do sabor amargo, uma vez que o produto foi julgado como “ligeiramente mais amargo que o ideal” (escala do ideal).

Tabela 22: Intenção de compra do patê de ricota

	Intenção de compra (%)	
	<i>O. vulgare</i>	<i>R. officinalis L.</i>
Certamente compraria	18,0	0,0
Provavelmente compraria	46,0	24,0
Talvez comprasse/ talvez não comprasse	26,0	56,0
Provavelmente não compraria	8,0	20,0
Certamente não compraria	2,0	0,0

6 CONCLUSÃO

As condições ótimas de extração de compostos fenólicos foram: 75% de etanol durante 8 horas de operação para *Rosemarinus officinalis L.* e 40% de etanol durante 7,5 horas de operação para *Origanum vulgare*.

Foram obtidos extratos solúveis de *Rosemarinus officinalis L.* e *Origanum vulgare* com concentração de compostos fenólicos de 0,46 mg/mL e 2,57 mg/mL respectivamente. Os extratos concentrados alcançaram concentração de compostos fenólicos de 18,0 mg/mL para *Origanum vulgare* e 9,60 mg/mL para *Rosemarinus officinalis L.*

O extrato de *Rosemarinus officinalis L.* apresentou maior atividade antioxidante tanto na dosagem de MDA quanto na inibição do radical DPPH.

O produto lácteo formulado com extrato de *Origanum vulgare* apresentou concentração de compostos fenólicos de 396 mg/100g de produto, o que corresponde a 39,6% da ingestão diária recomendada. O índice de aceitação deste produto foi de 91,1%.

O produto contendo extrato de *Rosemarinus officinalis L.* atingiu 76,0% de aceitação, com compostos fenólicos na concentração de 96 mg/100g de produto, correspondendo a 9,6% da ingestão diária recomendada.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDALLA, A. E.; ROOZEN, J. P. The effects of stabilized extracts of sage and oregano on the oxidation of salad dressings. **Europe Food Research Technology**, v. 212, p. 551-560, 2001.

AKYON, Y. Effect of antioxidants on the immune response of *Helicobacter pylori*. **Clinical Microbiology & Infection**, v. 8, n. 7, p. 438-441, jul. 2002.

ANDRADE Jr., D. R.; SOUZA, R. B.; SANTOS, S. A.; ANDRADE, D. R. Os radicais livres de oxigênio e as doenças pulmonares. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 31, n. 1, p. 60-68, jan/fev, 2005.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 18, de 30 de abril de 1999. Aprova o Regulamento Técnico que estabelece as diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e/ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos, constante do anexo desta portaria. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 03 de maio de 1999.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 360 de 23 de dezembro de 2003. Aprova o Regulamento Técnico sobre Rotulagem Nutricional em Alimentos Embalados, tornando obrigatória a rotulagem nutricional. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 26 de dezembro de 2003.

AOAC – ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of AOAC international**. 17 ed. USA: AOAC International, 1995.

ARCILA-LOZANO, C. C.; LOARCA-PIÑA, G.; LECONA-URIBE, S.; MEJÍA, E. G. El orégano: propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, Caracas, v. 54, n. 1, p. 100-111, 2004.

BAST, A.; HAENEN, G. R. M. M.Ç DOELMAN, C. J. A. Oxidants and antioxidants: state of the art. **The American Journal of Medicine**, v. 91, n. 3, p. S2-S13, 1991.

BERGHOFER, E.; JUNTACHOTE, T.; BAUER, F.; SIEBENHANDL, S. The application of response surface methodology to the production of phenolic extracts of lemon grass, galangal, holy basil and rosemary. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 41, p. 121-133, 2006.

BIANCHI, M. L.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 12, n. 2, p. 123-130, maio/ago, 1999.

BIDLACK, W. R.; WANG, W. Planejamento de alimentos funcionais. In: SHILS, M. E. et al. **Tratado de nutrição moderna na saúde e na doença**. 9 ed. Rio de Janeiro: Manole, 1999. p. 1959-1970.

BOLAND, J. L.; ten-HAVE, P. Kinetics in the chemistry of rubber and related materials; the inhibitory effect of hydroquinone on the thermal oxidation of ethyl linoleate. **Trans. Faraday Soc.**, v. 43, p. 201-204, 1947.

BORGES V. C. Alimentos funcionais: prebióticos, probióticos, fitoquímicos e simbióticos. In: WAITZBERG, D. L. **Nutrição enteral e parenteral na prática clínica**. São Paulo: Atheneu, 2001.

BORGES, M. F. M.; SILVA, F. A. M.; FERREIRA, M. A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. **Química Nova**, v. 22, n. 1, p. 94-103, 1999.

BOTSOGLOU, N. A.; CHRISTAKI, E.; FLETOURIS, D. J.; FLOROU-PANERI, P.; SPAIS, A. B. The effect of dietary oregano essential oil on lipid oxidation in raw and cooked chicken during refrigerated storage. **Meat Science**, v. 62, p. 259-265, 2002.

BRODKORB, A.; CHATTERTON, D. E. W.; SMITHERS, G.; ROUPAS, P. Bioactivity of β -lactoglobulin and α -lactalbumin – technological implications for processing. **International Dairy Journal**, v. 16, p. 1229-1240, 2006.

BYRNE, M. Formulating foods for new & diverse lifestyles. **Food Engineering International**, v. 20, p. 49-58, 1995.

CAPECKA, E.; MARECZEK, A.; LEJA, M. Antioxidant activity of fresh and dry herbs of some *Lamiaceae* species. **Food Chemistry**, v. 93, p. 223-226, 2005.

CARAGAY, A. B. Cancer: preventive foods and ingredients. **Food Technology**, v. 46, p. 65-68, 1992.

CARDELLO, H. M. A. B.; CARDOSO, J. M. P.; BATTOCHIO, J. R. Equivalência de dulçor e poder edulcorante de edulcorantes em função da temperatura de consumo em bebidas preparadas com chá-mate em pó solúvel. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 24, n. 3, p. 448-452, jul/set 2004.

CASTELLARI, M.; MATRICARDI, L.; ARFELLI, G.; GALASSI, S.; AMATI, A. Level of single bioactive phenolics in red wine as a function of the oxygen supplied during storage. **Food Chemistry**, v. 69, n. 1, p. 61-67, 2000.

CAVERO, S.; JAIME, L.; MARTÍN-ÁLVAREZ, P. J.; SEÑORÁNS, F. J.; REGLERO, G.; IBAÑEZ, E. In vitro antioxidant analysis of supercritical fluid extracts from rosemary (*Rosemarinus officinalis* L.). **Europe Food Research Technology**, v. 221, p. 478-486, 2005.

CECHINI, R; ARUOMA, O. I.; HALLIWELL, B. The action of hydrogen peroxide on the formation of thiobarbituric acid reative material from microssomes or from DNA damage by bleomycin or phenanthroline artefacts in the thiobarbituric acid test. **Free Radical Research Commun**, v. 10, p. 245-258, 1990.

CERVATO, C.; CARABELLI, M.; GERVASIO, S.; CITTERA, A.; CAZZOLA, R.; CESTARO, B. Antioxidant properties of oregano (*Origanum vulgare*) leaf extracts. **Journal of Food Biochemistry**, v. 24, p. 453-465, 2000.

CHIPAULT, J. R.; MIZUN, G. K.; HAWKINS, J. M.; LUNDBERG, W. O. The antioxidant properties of natural spices. **Food Research**, v. 17, p. 46-55, 1952.

DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v. 5, n. 1, p. 33-40, jan./jul. 2004.

DESHPANDE, S. S.; DESHPANDE, U. S.; SALUNKHE, D. K. Nutritional and health aspects of food antioxidants. In: MADHAVI, D. L.; DESHPANDE, S. S.; SALUNKE, D. K. **Food antioxidants – technological, toxicological and health perspectives**. USA: Marcel Dekker Inc, 1996. cap. 6, p. 361-469.

DREWNOWSKI A.; POPKIN, B. M. The nutrition transition: new trends in the global diet. **Nutrition Reviews**, v. 55, p. 3143-3298, 1997.

DUTRA, E. R. P.; MUNCK, A. V. **Apostila de fabricação de queijos**. Juiz de Fora: Centro Tecnológico Instituto de Laticínios Cândido Tostes, 2002. 50p.

FERREIRA, A. L. A., MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação de Medicina do Brasil**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

FOX, P. F.; GUINEE, T. P.; COGAN, T. M., McSWEENEY, P. L. H. Fresh acid-curd cheese varieties. In: _____. **Fundamentals of cheese science**. Gaithersburg, Maryland: Aspen Publishers, Inc, 2000. cap. 16, p. 363-387.

FUNDAÇÃO CENTRO TECNOLÓGICO DE MINAS GERAIS (CETEC). **Manual para fabricação de laticínios**. Série de Publicações Técnicas – 014, Belo Horizonte, 1985.

GORDON, M. H. The development of oxidative rancidity in foods. In: POKORNY, J; YANISHLIEVA, N.; GORDON, M. **Antioxidants in food: practical application**. USA: CRC Press, 2001. cap. 2, p. 7-21.

HALL III, C. Sources of natural antioxidants: oilseeds, nuts, cereals, legumes, animal products and microbial sources. In: POKORNY, J; YANISHLIEVA, N.; GORDON, M. **Antioxidants in food: practical application**. USA: CRC Press, 2001. cap. 9, p.159-209.

HALLIWELL, B. Reactive species and antioxidants: redox biology is a fundamental theme of aerobic life. **Plant Physiology**, v. 141, p. 312-322, jun., 2006.

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

HÖEHR, N. F.; ROVER Jr, L. O.; VELLASCO, A. P. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 112-119, 2001.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. v.1. 3 ed. São Paulo: 1985.

JADHAV, 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.; SALUNKE, D. K. **Food antioxidants – technological, toxicological and health perspectives**. USA: Marcel Dekker Inc, 1996. cap. 2, p. 5-63.

JELEN, P.; LUTZ, S. Functional milk and dairy products. In: MAZZA, G. **Functional foods: biochemical and processing aspects**. Lancaster, Pennsylvania: Technomic Publishing Company, Inc, 1998. cap. 11, p. 357-380.

JOHNSON, I. T. Antioxidants and antitumoral properties. In: POKORNY, J; YANISHLIEVA, N.; GORDON, M. **Antioxidants in food: practical application**. USA: CRC Press, 2001. cap. 6, p.100-123.

KIKUSAKI, H.; NAKATANI, N. Structure of a new antioxidative phenolic acid from oregano (*Origanum vulgare* L.). **Agricultural Biological Chemistry**, v. 53, p. 519-524, 1988.

KLEEF, E.; TRIJP, H. C. M.; LUNING, P. Functional foods: health claim-food product compatibility and the impact of health claim framing on consumer evaluation. **Appetite**, v. 44, p. 299-308, 2005.

KULISIC, T.; RADONIC, A.; KATALINIC, V.; MILOS, M. Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. **Food Chemistry**, v. 85, p. 633-640, 2004.

KWAK N. S.; JUKES, D. J. Functional foods. Part 1: the development of a regulatory concept. **Food Control**, v. 12, p. 99-107, 2001.

LAJOLO, F. M.; DUARTE-ALMEIDA, J. M.; SANTOS, R. J.; ENOVESE, M. I. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoleico e método de seqüestro de radicais DPPH•. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 22, p. 446-452, abr./jun., 2006.

LANZILOTTI, R. S.; LANZILOTTI, H. S. Análise sensorial sob o enfoque da decisão *fuzzy*. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 12, n. 2, p. 145-157, maio/ago 1999.

LAWLESS, H. T., HEYMANN, H. **Sensory evaluation of food: principles and practices**. New York: Chapman & Hall, 1998. 819p.

MADHAVI, D. L.; SALUNKE, D. K. Toxicological aspects of food antioxidants. In: MADHAVI, D. L.; DESHPANDE, S. S.; SALUNKE, D. K. **Food antioxidants – technological, toxicological and health perspectives**. USA: Marcel Dekker Inc, 1996a. cap. 5, p. 267-359.

MADHAVI, D. L.; SINGHAL, R. S.; KULKARNI, P. R. Technological aspects of food antioxidants. In: MADHAVI, D. L.; DESHPANDE, S. S.; SALUNKE, D. K. **Food antioxidants – technological, toxicological and health perspectives**. USA: Marcel Dekker Inc, 1996b. cap.4, p. 159-265.

MAFRA, D.; ABDALLA, D. S. P.; COZZOLINO, S. M. F. Peroxidação lipídica em pacientes com insuficiência renal crônica. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 12, n. 3, p. 205-212, set./dez., 1999.

MARX, G., CHEVION, M. Site-specific modification of albumin by free radicals – reaction with copper (II) and ascorbate. **Journal of Biochemistry**, v. 236, p. 397-400, 1986.

McINTOSH, G. H.; ROYLE, P. J.; LE LEU, R. K.; REGESTER, G. O.; JOHNSON, M. A.; GRINSTED, R. I. Whey proteins as functional food ingredients. **International Dairy Journal**, v. 8, p. 425-434, 1998.

McVEAGH, P. Human milk – there's no other quite like it. **Pacific Health Dialog**, v. 1, n. 2, p. 43-51, 1999.

MEIRELES, A. A.; CARVALHO, R. N.; MOURA, L. S.; ROSA, P. T. V. Supercritical fluid extraction from rosemary (*Rosemarinus officinalis*): kinetic data, extract's global yield, composition, and antioxidant activity. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 35, p. 197-204, 2005.

MELO, E. A.; MANCINI FILHO, J.; GUERRA, N. B.; MACIEL, G. R. Atividade antioxidante de extratos de coentro (*Coriandrum sativum* L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, p. 195-199, dez. 2003.

MIELGAARD, M.; CIVILLE, G. V.; CARR, B. T. **Sensory evaluation techniques**. v. 1, Flórida – USA: CRC Press, 1987, 125p.

MIRANDA, L. E. C.; VIARO, F.; CENEVIVA, R. As bases experimentais da lesão por isquemia e reperfusão do fígado: revisão. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 19, n. 1, p. 3-12, jan/fev, 2004.

MOREIRA, A. V. B.; MANCINI FILHO, J. Influência dos compostos fenólicos de especiarias sobre a lipoperoxidação e o papel lipídico de tecidos de ratos. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 17, n. 4, p. 411-424, out./dez. 2004.

MÜLLER, M. S.; CORNELSEN, J. M. **Normas e padrões para teses, dissertações e monografias**. 4 ed. Londrina: Editora UEL, 2002. 134p.

NAGATO, L. A. F.; RODAS, M. A. B.; DELLA TORRE, J. C. M.; CANO, C. B.; BARSOTTI, R. C. F.; YOTSUYANAGI, K. Parâmetros físicos e químicos e aceitabilidade sensorial de sucos de frutas integrais, maracujá e uva, de diferentes marcas comerciais brasileiras. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 6, n. 1, p. 127-136, jan/jul 2003.

O'CONNOR, T. P.; O'BRIEN, N. M. Nutritional aspects of cheese. In: FOX, P. F.; GUINEE, T. P.; COGAN, T. M., McSWEENEY, P. L. H. **Fundamentals of cheese science**. Gaithersburg, Maryland: Aspen Publishers, Inc, 2000. cap.21, p. 504-513.

OHKATSU, Y.; KAJIYAMA, T. Effect of *para*-substituents of phenolic antioxidants. **Polymer Degradation and Stability**, v. 71, p. 455-452, 2001.

OKUDA, T. Phenolic antioxidants. In: HIRAMATSU, M.; YOSHIKAWA, T.; INOVE, M. **Food and free radicals**. New York: Plenum Press, 1997. cap. 4, p. 31-48.

OLSZEWER, E. **Radicais livres em medicina**. São Paulo: Fundo Editorial BYK, 1995. 204p.

PADILHA, P. C.; PINHEIRO, R. L. O papel dos alimentos funcionais na prevenção e controle do câncer de mama. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 50, n. 3, p. 251-260, 2004.

PELLEGRINI, A. Antimicrobial peptides from food proteins. **Current Pharmaceutical Design**, v. 9, n. 16, p. 1225-1238, 2003.

PELLEGRINI, A.; DETTLING, C.; THOMAS, U.; HUNZIKER, P. Isolation and characterization of four bactericidal domains in the bovine β -lactoglobulin. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1526, n. 2, p. 131-140, 2001.

PEREIRA, P.; TYSCA, D.; OLIVEIRA, P.; BRUMA, L. F. S.; PICADA, J. N.; ARDENGHI, P. Neurobehavioral and genotoxic aspects of rosmarinic acid. **Pharmacological Research**, v. 52, p. 199-203, 2005.

PETERSEN, M.; SIMMONDS, M. S. J. Rosmarinic acid. **Phytochemistry**, v. 62, p. 121-125, 2003.

RAJALAKSHMI, D.; NARASIMHAN, S. Food antioxidants: sources and methods of evaluation. In: MADHAVI, D. L.; DESHPANDE, S. S.; SALUNKE, D. K. **Food antioxidants – technological, toxicological and health perspectives**. USA: Marcel Dekker Inc, 1996. cap. 3, p. 65-157.

RIBEIRO, A. C.; MARQUES, S. C.; SODRÉ, A. F.; ABREU, L. R. PICCOLI, R. H. Controle microbiológico da vida de prateleira de ricota cremosa. **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v. 29, n. 1, p. 113-117, jan./fev., 2005.

RICE-EVANS, C.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends in Plant Science**, v. 2, n. 4, p. 152-159, abr., 1997.

RUAN, E. A.; RAO, S.; BUN-LICK, J. S.; STRYKER, S. J.; TELFORD, G. L.; OTTERSON, M. F.; OPARA, E. C.; KOCK, T. R. Glutathione levels in chronic inflammatory disorders of the human colon. **Nutrition Research**, v. 17, n. 3, p. 463-473, 1997.

SAGONE Jr, A. L.; GREEWALD, E. H.; KRAUT, J.; BIANCHINE, J.; SINGH, D. Glucose: role as free radical scavenger in biological systems. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 101, p. 97-104, 1983.

SAHIN, F.; GÜLLÜCE, M.; DAFERERA, D.; SÖKMEN, A.; SÖKMEN, M.; POLISSIOU, M.; AGAR, G.; ÖZER, H. Biological activities of the essential oils and methanol extract of *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* in the Eastern Anatolia region of Turkey. **Food Control**, v. 15, p. 549-557, 2004.

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

SCALBERT, A.; WILLIAMSON, G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. **Journal of Nutrition**, 130: 2073-2085, 2000.

SCHWARZ, K. Phenolic diterpenes from rosemary and sage. In: SHI, J.; MAZZA, G.; Le MAGUER, M. **Functional foods – biochemical and processing aspects**. v. 2. USA: CRC Press, 2002. p. 189-211.

SGARBIERI, V. C. Propriedades fisiológicas-funcionais das proteínas do soro de leite. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 17, n. 4, p. 397-409, out/dez, 2004.

SHAHIDI, F., NACZK, M. Antioxidant properties of food phenolics. In: _____. **Food phenolics: sources, chemistry, effects, applications**. USA: Technomic Publishing Company, Inc, 1995. cap. 8, p. 235-279.

SHAHIDI, F.; LIYANA-PATHIRANA, C. Optimization of extraction of phenolic compounds from wheat using response surface methodology. **Food Chemistry**, v. 93, p. 47-56, 2005.

SHAHIDI, F.; NACZK, M. Antioxidant properties of food phenolics. In: _____. **Phenolics in food and nutraceuticals**. USA: CRC Press, 2004a. cap. 8, p. 403-441.

SHAHIDI, F.; NACZK, M. Nutritional and pharmacological effects of food phenolics. In: _____. **Phenolics in food and nutraceuticals**. USA: CRC Press, 2004b. cap. 7, p. 331-402.

SHAMI, N. J., MOREIRA, E. A. Licopeno como agente antioxidante. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 17, n. 2, p. 227-236, abr/jun, 2004.

SHETTY, K.; CHUN, S.; VATTEM, D. A.; LIN, Y. Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 809-816, 2005.

SHETTY, K.; CORREIA, R. T. P.; McCUE, P.; MAGALHÃES, M. M. A.; MACÊDO, G. R. Production of phenolic antioxidants by the solid-state bioconversion of pineapple waste mixed with soy flour using *Rhizopus oligosporus*. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 2167-2172, 2004.

SHETTY, K.; CURTIR, O. F.; LEVIN, R. E.; WITKOWSKY, R.; ANG, W. Prevention of vitrification associated with in vitro shoot culture of oregano (*Origanum vulgare*) by *Pseudomonas* ssp. **Journal of Plant Physiology**, v. 147, n. 3-4, p. 447-451, 1995.

SHETTY, K.; McCUE P. Phenolic antioxidant biosynthesis in plants for functional food application: integration of systems biology and biotechnological approaches. **Food Biotechnology**, v. 17, n. 2, p. 67-97, 2003.

SILVA, A. F.; MINIM, V. P. R.; RIBEIRO, M. M. Análise sensorial de diferentes marcas comerciais de café (*Coffea arabica* L.) orgânico. **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v. 29, n. 6, p. 1224-1230, nov/dez, 2005.

SIVROPOULOU, A.; PAPANIKOLAOU, E.; NIKOLAOU, C.; KOKKINI, S.; LANARAS, T.; ARSENAKIS, M. Antimicrobial and cytotoxic activities of *Origanum* essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, p. 1202-1205, 1996.

STERNHAGEN, L. G., ALLEN, J. C. Growth rates of a human colon adenocarcinoma cell line are regulated by the milk protein alpha-lactalbumin. **Bioactive Components of Human Milk Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 501, p. 115-120, 2001.

STONE, H., SIDEL, J. L. **Sensory evaluation practices**. 2 ed. USA: Academic Press, Inc, 1985. 338p.

TABELA BRASILEIRA DE COMPOSIÇÃO DE ALIMENTOS. **NEPA - UNICAMP**, T113, versão II, 2 ed. Campinas, AP: NEPA-UNICAMP, 2006, 113p.

THORSEN, M. A.; HILDEBRANDT, K. S. Quantitative determination of phenolic diterpenes in rosemary extracts: aspects of accurate quantification. **Journal of Chromatography A**, v. 995, p. 119-125, 2003.

TSIMIDOU, M.; EXARCHOU, V.; NENADIS, N.; GEROTHANASSIS, I. P.; TROGANIS, A.; BOSKOU, D. Antioxidant activities and phenolic composition of extracts from greek oregano, greek sage, and summer savory. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 5294-5299, 2002.

URALA, N.; LÄHTEENMÄKI, L. Attitudes behind consumers' willingness to use functional foods. **Food Quality and Preference**, v. 15, p. 793-803, 2004.

VANNUCCHI H.; MOREIRA, E. A. M.; CUNHA, D. F.; JUNQUEIRA-FRANCO, M. V. M.; BERNARDES, M. M.; JORDÃO Jr, A. A. Papel dos nutrientes na peroxidação lipídica e no sistema de defesa antioxidante. **Medicina**, Ribeirão Preto, v. 31, p. 31-44, jan/mar, 1998.

WALZEM, R. L. Functional foods. **Trends in Food Science and Technology**, v. 15, p. 518, 2004.

WANG, S. Y., ZHENG, W. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 11, p. 5165-5170, 2001.

WHITNEY, R. McL. Proteins of milk. In: WONG, N. P.; JENNESS, R.; KEENEY, M.; MARTH, E. H. **Fundamentals of dairy chemistry**. 3 ed. New York: Van Nostrand Reinhold, 1988. cap. 3, p. 81-169.

WOLFF, S. P.; CRABBE, M. J. C.; THORNALLEY, P. J. The autoxidation of glyceraldehydes and other simple monosaccharides. **Exp. Basel**, v. 40, p. 244-246, 1984.

YANISHLIEVA-MASLAROVA, N. V. Inhibiting oxidation. In: POKORNY, J; YANISHLIEVA, N.; GORDON, M. **Antioxidants in food: practical application**. USA: CRC Press, 2001a. cap. 3, p. 22-69.

YANISHLIEVA-MASLAROVA, N. V. Sources of natural antioxidants: vegetables, fruits, herbs, spices and teas. In: POKORNY, J; YANISHLIEVA, N.; GORDON, M. **Antioxidants in food: practical application**. USA: CRC Press, 2001b. cap. 10, p. 210-263.

APÊNDICE

APÊNDICE 1

TESTE DE ACEITAÇÃO

Nome (opcional): _____ Data: _____

Sexo: () M () F

Idade: () Menos de 20 anos

() 20 – 35 anos

() 35 – 50 anos

() Mais de 50 anos

Você tem o hábito de consumir ricota? () Sim () Não

Se SIM, quantas vezes ao mês? () Mais de 20 vezes

() Entre 10 e 20 vezes

() Até 10 vezes

Você está recebendo amostras de patê de ricota. Por favor, prove as amostras e indique o quanto você gostou ou desgostou destas amostras de um modo geral, utilizando a escala abaixo:

9 – Gostei muitíssimo

8 –

7 –

6 –

5 – Não gostei nem desgostei

4 –

3 –

2 –

1 – Desgostei muitíssimo

Amostra

Valor

Cite o que você mais gostou na amostra:

Cite o que você menos gostou na amostra:

APÊNDICE 2

ESCALA DO IDEAL (*Just Right Scales*) E INTENÇÃO DE COMPRA

Nome (opcional): _____ Data: _____

Você está recebendo amostras de patê de ricota. Por favor, prove-as e avalie quão próximo do ideal estão as amostras quanto à cor, sabor amargo, acidez, sabor salgado e firmeza (textura).

Amostra: _____

Cor

- ☐ Muito mais escuro que o ideal
- ☐ Ligeiramente mais escuro que o ideal
- ☐ Ideal
- ☐ Ligeiramente mais claro que o ideal
- ☐ Muito mais claro que o ideal

Sabor amargo

- ☐ Muito mais amargo que o ideal
- ☐ Ligeiramente mais amargo que o ideal
- ☐ Ideal
- ☐ Ligeiramente menos amargo que o ideal
- ☐ Muito menos amargo que o ideal

Acidez

- ☐ Muito mais ácido que o ideal
- ☐ Ligeiramente mais ácido que o ideal
- ☐ Ideal
- ☐ Ligeiramente menos ácido que o ideal
- ☐ Muito menos ácido que o ideal

Sabor salgado

- ☐ Muito mais salgado que o ideal
- ☐ Ligeiramente mais salgado que o ideal
- ☐ Ideal
- ☐ Ligeiramente menos salgado que o ideal
- ☐ Muito menos salgado que o ideal

Firmeza (textura)

- ☐ Muito mais firme que o ideal
- ☐ Ligeiramente mais firme que o ideal
- ☐ Ideal
- ☐ Ligeiramente menos firme que o ideal
- ☐ Muito menos firme que o ideal

Se você encontrasse esse produto no mercado, você:

- ☐ Certamente compraria
- ☐ Provavelmente compraria
- ☐ Talvez comprasse / talvez não comprasse
- ☐ Provavelmente não compraria
- ☐ Certamente não compraria

