UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FCF / FEA / FSP
Programa de Pós-Graduação Interunidades
em Nutrição Humana Aplicada – PRONUT

Utilização da metodologia de superfície de resposta no
desenvolvimento de um molho tipo Pesto visando a
atividade antioxidante

GUILHERME AFONSO

Dissertação para obtenção do grau de Mestre
Orientadora:
Profa. Assoc. Elizabeth A. Ferraz da Silva Torres

São Paulo
2006

Guilherme Afonso

Utilização da metodologia de superfície de resposta no desenvolvimento de um
molho tipo Pesto visando a atividade antioxidante

Comissão Julgadora
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Assoc. Elizabeth Aparecida Ferraz da Silva Torres
(Orientadora/Presidente)

Orientador

1º Examinador
Profa. Tit. Carmen C. Tadini

2º Examinador
Profa. Dra. Deborah H. M. Bastos

São Paulo, ____ de _____ de 2006.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Assoc. Elizabeth A. F. S. Torres, pela dedicação e pela importante participação na realização deste trabalho.

Às profas. Carmen C. Tadini e Deborah H. M. Bastos, pelos comentários e sugestões pertinentes dados durante a defesa, que contribuíram para tornar o trabalho mais completo.

À Capes pela concessão da bolsa de estudos e à FAPESP pelo auxílio financeiro.

À Cargill Agrícola S. A., especialmente a Adriano Ciavdar, pelo fornecimento do azeite “*La española*”[®].

À Marcela Monteiro, pela ajuda essencial na parte experimental.

À Emília Ishimoto, pela ajuda nas discussões e auxílio em deixar o texto mais claro e completo.

Às queridas colegas Yara, Geni, Rosana, Karina, Simone, Liania, Marcia, Renata, Luciane, Carol, Julia, Karoline pela amizade, companhia, e por toda a ajuda durante o trabalho.

À minha mãe e ao meu pai por terem sempre me dado tudo e pelo incentivo e apoio em todos os momentos.

À Carol, pelo incentivo constante, apoio fundamental e companhia eterna.

Aos meus amigos Ligia, PJ, Fil, Carlão, Maren, Edu, Pedro, Bia, Fê Morena e Fê Loira pelos momentos que fazem tudo valer à pena.

A todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram na realização deste trabalho.

Resumo

Evidências recentes têm demonstrado que dietas com elevado conteúdo de vegetais, frutas e grãos podem reduzir o risco de diversas doenças não transmissíveis. As propriedades benéficas desses alimentos têm sido atribuídas, em grande parte, à presença de substâncias antioxidantes, que são capazes de diminuir os efeitos prejudiciais dos radicais livres. O objetivo deste trabalho foi desenvolver uma formulação de molho tipo Pesto, com base nas propriedades antioxidantes dos seus ingredientes principais: manjerição, castanha do Brasil e azeite de oliva extra virgem. A metodologia foi dividida em duas fases: a primeira consistiu na avaliação da interação entre os componentes com atividade antioxidante (AA) presentes nos ingredientes principais do molho, realizada através da metodologia de superfície de resposta por modelagem de misturas. Foi utilizado um planejamento centróide simplex, no qual a resposta medida foi a atividade antioxidante dos extratos de diferentes polaridades obtidos das diferentes formulações. Utilizando-se o método DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) e o sistema β -caroteno/ácido linoléico, não foi encontrada interação entre os componentes com AA presentes nos ingredientes. Apesar dos modelos obtidos não descreverem adequadamente a variação dos resultados, o manjerição foi identificado como o ingrediente de maior contribuição para a AA total do molho. Foi realizada análise sensorial para determinar a formulação melhor aceita dentre as possibilidades obtidas. A segunda fase consistiu em submeter a formulação determinada na fase 1 às análises de composição centesimal, quantificação dos compostos fenólicos totais e quatro métodos *in vitro* de avaliação da AA: método do poder redutor, sistema β -caroteno/ácido linoléico, DPPH e ensaio em meio lipídico pelo aparelho Rancimat[®]. A formulação final pode ser considerada como uma boa fonte de antioxidantes naturais e portanto fazer parte de uma dieta saudável.

Palavras-chave: Atividade antioxidante; alimento funcional; molho Pesto; metodologia de superfície de resposta; modelagem de misturas.

Abstract

Recent evidences have shown that high consumption of vegetables, fruits and grains can reduce the risk of non-communicable diseases. The healthy properties of these foods have been related mostly to the presence of antioxidants, substances which are known as capable of decreasing the harmful effects of free radicals. The objective of this work was to develop a Pesto sauce formulation, based on the antioxidant properties of its main ingredients: sweet basil, Brazil nut and extra-virgin olive oil. The methodology was divided in two phases: The first one consisted in the evaluation of the interaction between the components with antioxidant activity (AA) present in the sauce's main ingredients, applying the response surface methodology with a mixture model. A centroid simplex plan was used, in which the response measured was the AA of the extracts of different polarities from the different formulations. By using the DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) method and the β -carotene/linoleic acid system, no interaction between the components with AA was detected. Although the models could not describe properly the response variation, sweet basil was identified as the main responsible for the total AA of the sauce. Sensory analysis was conducted to determine the most accepted formulation among the possibilities. The second phase consisted in submitting the formulation obtained in phase 1 to centesimal composition analysis, quantification of total phenolics and four *in vitro* AA methods: reducing power, DPPH method, β -carotene/linoleic acid system and the Rancimat[®] method. The final formulation may be considered a good source of natural antioxidants and therefore be part of a healthy diet.

Key words: Antioxidant activity; functional foods; Pesto sauce; response surface methodology; mixture model.

SUMÁRIO

Lista de figuras	vi
Lista de tabelas	viii
Lista de abreviaturas e siglas	ix
1 Introdução	1
2 Revisão Bibliográfica	4
2.1 Radicais Livres	4
2.1.1 Espécies reativas de oxigênio (EROS)	5
2.1.2 Oxidação lipídica	6
2.2 Antioxidantes	8
2.2.1 Antioxidantes nos alimentos	9
2.3 Avaliação <i>in vitro</i> da atividade antioxidante	12
2.4 Alimentos funcionais	14
2.5 A Dieta do Mediterrâneo	14
2.5.1 Molho Tipo Pesto	16
2.6 Alho, manjerição, azeite de oliva e castanha do Brasil (ou do Pará)	16
2.6.1 Alho	17
2.6.2 Manjerição	17
2.6.3 Azeite de oliva	18
2.6.4 Castanha do Brasil	21
2.7 Interação na capacidade antioxidante	23
2.8 Metodologia Estatística de Superfície de Resposta	24
3 Justificativa	27
4 Objetivos	28

4.1	Objetivo geral.....	28
4.2	Objetivos específicos	28
5	Materiais e Métodos.....	29
5.1	Materiais.....	29
5.1.1	Ingredientes utilizados:	29
5.1.2	Reagentes utilizados:.....	29
5.1.3	Equipamentos utilizados:	29
5.2	Metodologia	30
5.2.1	Determinações analíticas.....	30
5.2.1.1	Obtenção dos extratos	32
5.2.1.2	Determinação do teor de matéria seca dos extratos	33
5.2.2	Fase 1	33
5.2.2.1	Avaliação da interação entre os ingredientes pela modelagem de misturas ..	33
5.2.2.2	Captação de radicais livres - Método DPPH.....	36
5.2.2.3	Inibição da oxidação lipídica - Sistema β -caroteno / ácido linoléico	37
5.2.2.4	Análise Sensorial.....	38
5.2.2.5	Análise estatística.....	39
5.2.3	Fase 2: Caracterização do molho	40
5.2.3.1	Análise da composição centesimal	40
5.2.3.2	Quantificação dos compostos fenólicos totais	40
5.2.3.3	Avaliação da atividade antioxidante	41
5.2.3.3.1	Método do poder redutor.....	41
5.2.3.3.2	Ensaio em meio lipídico (Rancimat [®]).....	41
5.2.3.4	Análise estatística.....	42
5.3	Aspectos éticos.....	42

6	Resultados e Discussão.....	43
6.1	Fase 1.....	43
6.1.1	Preparo das formulações e extrações.....	43
6.1.2	Captação do radical livre - Método DPPH.....	43
6.1.3	Inibição da oxidação lipídica - Sistema β -caroteno/ácido linoléico.....	45
6.1.4	Análise estatística dos resultados	47
6.1.5	Análise Sensorial	54
6.2	Fase 2.....	57
6.2.1	Preparo das formulações e extração	57
6.2.2	Composição centesimal	57
6.2.3	Quantificação dos compostos fenólicos totais.....	59
6.2.4	Avaliação da atividade antioxidante.....	61
6.2.4.1	Captação de radicais livres - Método DPPH	61
6.2.4.2	Inibição da oxidação lipídica - Sistema β -caroteno / ácido linoléico.....	65
6.2.4.3	Método do poder redutor	68
6.2.4.4	Ensaio em meio lipídico (Rancimat [®])	70
7	Conclusões.....	73
8	Considerações Finais	75
	Referências Bibliográficas.....	77
	Apêndice.....	89
	Anexos.....	97

Lista de figuras

Figura 1. Estrutura química do ácido rosmarínico.....	11
Figura 2. Estrutura química do hidroxitirosol.....	11
Figura 3. Estrutura química do radical DPPH.....	13
Figura 4. Estrutura química do DPPH reduzido	13
Figura 6. Fluxograma do protocolo experimental. AA = atividade antioxidante.	30
Figura 7. Fluxograma de obtenção dos extratos	32
Figura 9. Contornos da superfície de resposta do modelo ajustado para o extrato polar no método do DPPH.	50
Figura 10. Superfície de resposta para o extrato polar no método do DPPH.	50
Figura 11. Contornos da superfície de resposta do modelo ajustado para o extrato apolar no sistema β -caroteno/ácido linoléico.....	53
Figura 12. Superfície de resposta para o extrato apolar no sistema β -caroteno/ácido linoléico	53
Figura 13. Curva padrão do Ácido Gálico	60
Figura 14. Curva cinética do potencial antioxidante dos extratos polares em relação à captação do DPPH, para as repetições (A, B e C), a média e o padrão, na fase 2.....	64
Figura 15. Curva cinética do potencial antioxidante dos extratos apolares em relação à captação do DPPH, para as repetições (A, B e C), a média e o padrão, na fase 2.....	64
Figura 16. Curva cinética do potencial antioxidante dos extratos polares em relação à inibição da oxidação lipídica pelo sistema β -caroteno/ácido linoléico, para as repetições (A, B e C), a média e o padrão, na fase 2.	67

Figura 17. Curva cinética do potencial antioxidante dos extratos apolares em relação à inibição da oxidação lipídica pelo sistema β -caroteno/ácido linoléico, para as repetições (A, B e C), a média e o padrão, na fase 2.....	67
Figura 18. Poder redutor dos extratos polar e apolar.....	69
Figura 19. Índice de Atividade Antioxidante (IAA) dos extratos polar e apolar, na fase 2.....	71

Lista de tabelas

Tabela 1 – Quantidade dos ingredientes na base fixa	35
Tabela 2 – Mistura de 3 ingredientes*. Planejamento centróide simplex	35
Tabela 3 – Quantidade (em g) dos ingredientes nas formulações do planejamento	36
Tabela 4 – Atividade antioxidante dos extratos polar e apolar na fase 1, pelo método do DPPH*	44
Tabela 5 – Atividade antioxidante dos extratos polar e apolar na fase 1, pelo sistema β -caroteno/ácido linoléico*	46
Tabela 6 – Resultados da ANOVA para os modelos ajustados aos dados.	48
Tabela 7 – Quantidade (g) dos ingredientes nas formulações testadas sensorialmente.....	55
Tabela 8 – Resultados (média $\pm$ DP) da análise sensorial	56
Tabela 9 – Quantidade dos ingredientes na formulação final.....	57
Tabela 10 – Composição centesimal (média $\pm$ DP) da formulação final do molho Pesto.....	58
Tabela 11 – Teor de fenólicos totais dos extratos, expresso em (a) mg de equivalente de ácido gálico (mgEAG) por mL de extrato e (b) em mgEAG por 100g de amostra.....	60
Tabela 12 – Porcentagens de captação do DPPH dos extratos polar e apolar, na Fase 2.	62
Tabela 13 – Porcentagem de inibição da oxidação lipídica dos extratos polar e apolar, na fase 2.....	65
Tabela 14 – Poder redutor dos extratos polar e apolar, na fase 2	69
Tabela 15 – Índice de atividade antioxidante (IAA) dos extratos polar e apolar, na fase 2	71

Lista de abreviaturas e siglas

AA	Atividade Antioxidante
AE	ácido elágico
AR	ácido rosmarínico
BHA	Butil hidroxianisol
BHT	Butil hidroxitolueno
CAT	Capacidade Antioxidante Total
DCNT	Doenças Crônicas Não Transmissíveis
DCV	Doenças Cardiovasculares
DPPH	1,1-difenil-2-picrihidrazil
EROS	Espécies Reativas de Oxigênio
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
IAA	Índice de Atividade Antioxidante
IFT	Institute of Food Technologists
L [•]	radical lipídico
LDL	Lipoproteínas de baixa densidade
LH	ácido graxo polinsaturado
LO [•]	radical alcóxila
LOO [•]	radical peróxila
MSR	Metodologia de Superfície de Resposta
N ₂ O	óxido nitroso
NO [•]	radical óxido de nitrogênio
NO ₂ [•]	radical dióxido de nitrogênio
O ₂	Oxigênio molecular

$^1\text{O}_2$	Oxigênio Singlete
$\text{O}_2^{\cdot-}$	radical superóxido
$\cdot\text{OH}$	radical hidroxila
OMS	Organização Mundial da Saúde
$\text{ONOO}^{\cdot}$	radical peroxinitrito
PG	Galato de propila
POF	Pesquisa de Orçamento Familiar
TBHQ	Terbutilhidroquinona

1 Introdução

Nas últimas décadas, as doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) têm se tornado a maior preocupação e desafio para a Saúde Pública. As neoplasias e as doenças cardiovasculares (DCV) são encontradas no topo da lista de causas de mortalidade dos países desenvolvidos e “em desenvolvimento”, incluindo-se nesta última classificação o Brasil, que tem seus indicadores de saúde cada vez mais parecidos com os dos países desenvolvidos (WHO, 2005). Em 2002, no Brasil, as doenças do aparelho circulatório (dentre as quais as DCV) foram responsáveis por 31,52% dos óbitos (total de 257.496 óbitos), enquanto que as neoplasias foram responsáveis por 15,31% (total de 129.923 óbitos), porém estes números podem ser ainda maiores visto que as bases de dados nacionais sobre mortalidade apresentam cobertura insatisfatória em muitos municípios do país, havendo expressiva subestimação de óbitos nas regiões Norte e Nordeste (BRASIL, 2002).

Atualmente, o estilo de vida é um dos fatores de maior influência na saúde e bem-estar, e um dos pilares do estilo de vida é a alimentação. Uma alimentação saudável e equilibrada pode contribuir para a melhora da qualidade de vida. Hipócrates já afirmava há 2500 anos: *“Permita que o alimento seja teu medicamento e que o medicamento seja teu alimento”*. Mais recentemente, têm-se comprovado a presença de substâncias biologicamente ativas em diversos alimentos, que podem vir a ter efeitos benéficos à saúde. Por isso, muitos alimentos passam a ter uma função além da nutritiva: a função terapêutica. Daí surge o termo “alimento funcional”, conceito introduzido no Japão na década de 80 (MACHADO; SANTIAGO, 2001).

Este crescente interesse na relação entre saúde e alimentação tem se refletido no número de estudos publicados relacionando dieta à prevenção de DCNT (BECK, 2000; BIANCHI; ANTUNES, 1999; HALLIWELL, 2002; INSTITUTE OF FOOD TECHNOLOGISTS, 2005; RIQUE; SOARES; MEIRELLES, 2002; SOUTHON, 2000).

Dentre as substâncias biologicamente ativas presentes nos alimentos, estão aquelas que apresentam atividade antioxidante, e que podem atuar na inibição dos efeitos deletérios dos radicais livres. Os radicais livres são átomos ou moléculas altamente reativas que podem iniciar reações em cadeia que podem culminar com a formação de substâncias nocivas à saúde humana (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

A utilização de antioxidantes por meio da promoção de uma dieta adequada, ou seja, aquela que segue padrões estabelecidos de ingestão diária recomendada de nutrientes, é preconizada por diversos especialistas. Isto porque a prevenção primária, ao reduzir riscos de doenças, pode diminuir os custos hospitalares e farmacêuticos, além de diminuir o sofrimento provocado pela doença/disfunção, melhorando sensivelmente a qualidade de vida da população (CHANDRA, 2002).

A dieta do mediterrâneo constitui uma tradição centenária que contribui para uma excelente saúde, promove uma sensação de prazer e bem estar, e forma uma parte vital da herança cultural mundial (WILLETT et al., 1995).

Molhos podem ser definidos como sendo preparações líquidas ou cremosas, utilizadas como acompanhamento de diversas preparações, com a função de complementá-las, tornando-as mais úmidas e acentuando seu sabor (PHILIPPI, 2003). O molho tipo Pesto proposto neste trabalho é uma combinação de azeite de oliva, alho, castanha do Brasil e manjerição (além de queijo parmesão ralado e sal), ingredientes que possuem grande potencial antioxidante, e que são fontes de antioxidantes naturais (BOREK, 2001; JAYASINGHE et al., 2003; MELO, 1989; VISIOLI et al., 1995). O molho tipo Pesto é tradicionalmente utilizado como acompanhamento de massas em geral (macarrão, pães, biscoitos, etc.).

Estudos sobre os antioxidantes têm ressaltado o uso de nutrientes isolados no tratamento e prevenção de doenças. Porém, é encontrada nos alimentos uma grande variedade de

substâncias que podem atuar em sinergismo na proteção das células e tecidos (NIKI et al., 1995).

O processo de otimização pode ser definido como a escolha da melhor combinação entre fatores partindo de uma condição inicial de possibilidades, portanto o desenvolvimento de um produto ou fórmula é um problema de otimização. Na busca da melhor formulação, o objetivo é determinar os níveis ótimos de cada componente ou ingrediente (CASTRO et al., 2003). Otimização pode então ser considerada como um processo para o desenvolvimento do melhor produto possível dentro de sua classe (SIDEL; STONE, 1983).

Um estudo de otimização deve seguir alguns passos básicos, desde o planejamento (escolha de métodos e produtos), realização de testes, validação dos resultados e uma pesquisa de mercado para verificação da aceitação do produto (SIDEL; STONE, 1983).

Nesse trabalho procurou-se analisar a interação entre os ingredientes para o desenvolvimento de uma formulação de um molho tipo Pesto que pudesse ser uma fonte de antioxidantes naturais na alimentação, podendo então ser benéfico à saúde.

2 Revisão Bibliográfica

2.1 Radicais Livres

O termo radical livre refere-se a qualquer espécie química capaz de existência independente que contenha um ou mais elétrons desemparelhados (GUTTERIDGE, 1995). É este não-emparelhamento de elétrons da última camada que confere alta reatividade a esses átomos ou moléculas, reagindo com diversos compostos lipídicos, proteínas e DNA, provocando reações em cadeia e desestabilizando o meio molecular (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; THOMAS, 2000).

Os radicais livres podem ser gerados durante as funções metabólicas normais, ou por fontes externas, como exposição a raios-X, ozônio, fumo, poluentes atmosféricos e resíduos químicos (BAGCHI; PURI, 1998). Porém, as células são protegidas por sistemas naturais de defesa constituídos principalmente pelas enzimas superóxido dismutase, glutathione peroxidase, catalase e glutathione reduzida. Entretanto, sob condições em que há excesso de radicais livres e deficiência no sistema protetor, haverá um desequilíbrio entre a formação e a remoção destas espécies reativas no organismo, caracterizando o que é chamado de estresse oxidativo (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; SIES, 2000). Este quadro de desequilíbrio pode provocar uma série de efeitos danosos ao organismo, dentre eles a deterioração de lipídios, DNA, carboidratos e proteínas, aterosclerose e DCV, catarata, diabetes, hemólise, aceleração do envelhecimento, perda de nutrientes, morte celular e mutagênese e carcinogênese (FERRARI; TORRES, 2003).

Os radicais livres, entretanto, não são sempre danosos, tendo também utilidade dentro do corpo humano. Os glóbulos brancos liberam radicais livres para destruir microrganismos patogênicos, como parte do sistema de defesa do organismo contra doenças (BAGCHI; PURI, 1998).

2.1.1 Espécies reativas de oxigênio (EROS)

O oxigênio existe no ar como uma molécula (O_2), e todos os seres aeróbicos utilizam-no para oxidar substratos ricos em carbono e hidrogênio para obter a energia essencial para a vida (GUTTERIDGE, 1995). Aproximadamente, de 1% a 5% do oxigênio respirado é reduzido e convertido nas chamadas espécies reativas de oxigênio (AMES et al., 1993 apud LEE; KOO; MIN, 2004).

As principais formas de EROS que aparecem durante as reações em que o O_2 oxida moléculas são os radicais superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila ($\cdot OH$), oxigênio singlete (1O_2), além dos óxidos de nitrogênio ($NO^{\cdot}$ e $NO_2^{\cdot}$) (GUTTERIDGE, 1995).

O radical superóxido (ou ânion superóxido) é um agente oxidativo fraco em meio aquoso, porém desempenha papel fundamental na formação de outras EROS, tais como o peróxido de hidrogênio e o radical hidroxila (GUTTERIDGE, 1995; LEE; KOO; MIN, 2004).

O peróxido de hidrogênio é a molécula menos reativa dentre as EROS, na ausência de íons metálicos (LEE; KOO; MIN, 2004). As propriedades de oxido-redução do H_2O_2 e sua habilidade em formar radicais livres altamente reativos na presença de metais de transição fez com que o corpo humano desenvolvesse uma defesa contra ele. O H_2O_2 não desejado é removido das células pela ação da catalase, da glutathione peroxidase (a qual contém selênio) e de algumas outras peroxidases (GUTTERIDGE, 1995).

O radical hidroxila é considerado o radical livre mais reativo, sendo um agente oxidante extremamente agressivo em sistemas biológicos (GUTTERIDGE, 1995). O $\cdot OH$ combina-se rapidamente com metais ou outros radicais no próprio sítio onde foi produzido, podendo inativar ou provocar uma mutação no DNA, inativar proteínas ou iniciar o processo de oxidação lipídica (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

O oxigênio singlete é uma forma excitada de oxigênio molecular e não possui elétrons desemparelhados em sua última camada, portanto não se caracteriza como radical livre. Mesmo assim, é uma ERO altamente reativa, estando relacionado ao dano em células visuais (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; GUTTERIDGE, 1995; LEE et al., 2004). Foi detectado que o $^1\text{O}_2$ está envolvido em reações de oxidação de colesterol (GIROTTI; KORYTOWSKY, 2000, apud LEE; KOO; MIN, 2004).

Os óxidos de nitrogênio ($\text{NO}^\cdot$ e $\text{NO}_2^\cdot$) possuem números ímpares de elétrons, por isso são considerados radicais livres, enquanto o óxido nitroso (N_2O) não. O $\text{NO}_2^\cdot$ é um poderoso agente oxidante, enquanto que $\text{NO}^\cdot$ é um fraco agente redutor, podendo reagir com o ânion superóxido, formando peroxinitrito (ONOO^-), outro poderoso oxidante capaz de danificar muitos sistemas biológicos (GUTTERIDGE, 1995). O óxido nítrico em si não é um radical livre muito reativo, mas seu excesso está envolvido com o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas e inflamatórias crônicas, como artrite reumatóide (LEE; KOO. MIN, 2004).

2.1.2 Oxidação lipídica

A oxidação por radicais livres em ácidos graxos (principalmente os insaturados) em sistemas biológicos é conhecida como oxidação lipídica, lipoperoxidação ou peroxidação lipídica. Em óleos e gorduras, esse fenômeno é responsável por alterações de cor, sabor, odor e textura, também conhecido como rancidez (GUTTERIDGE, 1995). O problema da oxidação lipídica é muito relevante no que se refere à questão da alimentação e nutrição do homem, pois além da deterioração da qualidade sensorial e nutricional dos alimentos, a formação de substâncias tóxicas contribui para a ocorrência de processos como a aterosclerose e o câncer (FERRARI, 1998).

A oxidação lipídica é iniciada freqüentemente pelo radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$). É uma reação em cadeia, representada pelas etapas de iniciação, propagação e terminação. Estas etapas estão apresentadas nas reações seguintes, onde L representa o lipídio:

O conjunto de reações acima se inicia com o seqüestro do hidrogênio do ácido graxo polinsaturado (LH) da membrana celular. Tal seqüestro pode ser realizado pelo $\cdot\text{OH}$ ou pelo $\text{LO}\cdot$ (radical alcóxila), com conseqüente formação do $\text{L}\cdot$ (radical lipídico).

Na primeira equação de propagação, o $\text{L}\cdot$ reage rapidamente com o O_2 , resultando em $\text{LOO}\cdot$ (radical peróxila), que, por sua vez, seqüestra novo hidrogênio do ácido graxo poliinsaturado, formando novamente o $\text{L}\cdot$ na segunda equação de propagação.

O término da lipoperoxidação ocorre quando os radicais ($\text{L}\cdot$ e $\text{LOO}\cdot$) produzidos nas etapas anteriores propagam-se até destruírem-se (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

Os principais produtos finais da oxidação lipídica compreendem os derivados da decomposição de hidroperóxidos, como álcoois, aldeídos, cetonas, ésteres e outros hidrocarbonetos. O malonaldeído é o maior produto secundário da oxidação lipídica, apresentando efeito citotóxico, carcinogênico e mutagênico (FERRARI, 1998).

Uma vez iniciada, a reação de oxidação lipídica segue em cadeia, e somente termina quando estiverem esgotadas as reservas de ácidos graxos insaturados e o oxigênio do meio (KIRK, 1984, apud FERRARI, 1998).

2.2 Antioxidantes

O termo antioxidante se refere a qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações em relação ao substrato oxidável, atrasa consideravelmente ou inibe sua oxidação (GUTTERIDGE, 1995). Do ponto de vista biológico, podemos conceituar antioxidantes como substâncias que protegem sistemas biológicos contra os efeitos potencialmente danosos de processos ou reações que promovem a oxidação de macromoléculas ou estruturas celulares (ABDALLA, 2000). Em alimentos, os antioxidantes agem por aumentar sua vida de prateleira e, por conseguinte, mantendo a qualidade dos alimentos (FERRARI, 1999).

Os antioxidantes podem agir em diferentes estágios numa sequência oxidativa (GUTTERIDGE, 1995):

- (a) removendo oxigênio ou diminuindo a concentração local de oxigênio;
- (b) removendo íons metálicos catalíticos;
- (c) removendo EROS chave como peróxido de hidrogênio e superóxido;
- (d) seqüestrando radicais livres iniciadores, tais como o hidroxila, o alcóxila e o peróxila;
- (e) quebrando a cadeia de uma seqüência iniciada;
- (f) seqüestrando o oxigênio singlete.

O corpo humano possui mecanismos de defesa para proteger o organismo dos efeitos deletérios dos radicais livres. Estes podem atuar em diferentes oxidantes assim como em diferentes compartimentos celulares (BAGCHI; PURI, 1998). O principal mecanismo de defesa do organismo é composto por um grupo de enzimas, que inclui a glutathione peroxidase, a superóxido dismutase e a catalase, que atua dentro das células, acelerando o metabolismo do oxigênio (BAGCHI; PURI, 1998; GUTTERIDGE, 1995). Já no exterior das células, a transferrina é o principal composto antioxidante, ligando-se a íons férricos, fazendo com que este ferro não participe em reações de oxidação que poderiam levar à formação de radicais

(GUTTERIDGE, 1995). Alguns oligoelementos (selênio, cobre, zinco) são essenciais para a formação e atividade destas enzimas. Cobre, zinco e manganês contribuem para a atividade da superóxido dismutase, enquanto que o selênio trabalha no núcleo da glutathione peroxidase (PINCEMAIL, 2006).

Quanto à solubilidade, os antioxidantes podem ser classificados como hidrofílicos, tais como o ácido ascórbico e a maioria dos compostos fenólicos, e como lipofílicos, tais como a vitamina E e os carotenóides (HUANG et al., 2002). Moure et al. (2001) identificaram um fenômeno que chamaram de “paradoxo polar”, no qual antioxidantes hidrofílicos são mais efetivos que os lipofílicos em óleos, enquanto antioxidantes lipofílicos apresentam maior atividade em emulsões.

2.2.1 Antioxidantes nos alimentos

Há muitos anos, a indústria de alimentos vem utilizando antioxidantes para preservar e/ou melhorar a qualidade de produtos alimentícios. Os principais antioxidantes sintéticos utilizados habitualmente nos alimentos são os fenóis butil hidroxianisol (BHA), butil hidroxitolueno (BHT), terbutilhidroquinona (TBHQ) e o galato de propila (PG) (NAWAR, 1996). Porém, estes antioxidantes sintéticos podem vir a ter efeitos adversos na saúde humana (FERRARI, 1999). O BHT já foi relacionado ao desenvolvimento de doenças pulmonares e o BHA pode promover a ação de substâncias carcinogênicas (HOCMAN, 1988). Atualmente, o limite máximo de concentração permitido para estes antioxidantes sintéticos em alimentos, segundo a legislação brasileira, é de 200ppm (BRASIL, 1988).

O interesse na pesquisa por novos antioxidantes naturais tem aumentado nos últimos anos, levando as indústrias alimentícia, farmacêutica e de cosméticos a terem maior atenção em novas fontes de antioxidantes naturais. Os compostos antioxidantes naturais têm sido isolados de diferentes partes de plantas tais como sementes, frutas, folhas e raízes (MANCINI-FILHO

et al., 1998). Os principais antioxidantes naturais utilizados na indústria são o ácido ascórbico, o ácido cítrico e alguns derivados do tocoferol (SHAHIDI; JANITHA; WANASUNDARA, 1992). Os compostos fenólicos também fazem parte desse grupo de antioxidantes naturais, porém seu uso na indústria ainda é bastante limitado. O ácido ascórbico apresenta efeito antioxidante desprezível quando comparado ao efeito dos compostos fenólicos (KALT et al., 1999), substâncias que constantemente vêm sendo correlacionadas positivamente com a atividade antioxidante (AA) de alimentos (CHANWITHEESUK; TEERAWUTGULRAG; RAKARIYATHAM, 2005; JAVANMARDI et al., 2003; ZHENG & WANG, 2001).

Em sucos derivados de frutas cítricas, entre 65 e 100% do potencial antioxidante presente é devido ao ácido ascórbico, mas este último é responsável por menos de 5% em sucos de maçã e abacaxi. Nos sucos que não são derivados de frutas cítricas (como os de maçã e abacaxi), o potencial antioxidante presente é principalmente devido aos compostos fenólicos. Nos sucos, a contribuição dos carotenóides para o potencial antioxidante é desprezível (GARDNER et al., 2000).

Os compostos fenólicos ocorrem naturalmente em frutas, hortaliças e produtos fermentados, como vinhos e azeite, e podem ser definidos como um grupo com uma ou mais hidroxilas ligada ao anel aromático. Quando possuem três ou mais hidroxilas ligadas ao anel aromático, são chamados de polifenóis. A eles já foram atribuídas muitas características positivas em alimentos, tais como: contribuição para o aroma e sabor; contribuição para a adstringência; pigmentação natural; contribuição à resistência ao estresse mecânico sofrido por plantas; propriedades antimicrobiais, antivirais, antiinflamatórias; antitumorais, anticancerígenas e antimutagênicas; atividade antioxidante e redução da incidência de doenças coronarianas (LULE & XIA, 2005). Dois exemplos de compostos fenólicos, o ácido rosmarínico, principal composto fenólico do manjeriço (KINTZIOS et al., 2003), e o

hidroxitirosol, principal composto fenólico do azeite de oliva (TUCK; HAYBALL, 2002), estão representados na Figura 1 e na Figura 2.

Figura 1. Estrutura química do ácido rosmarínico

Figura 2. Estrutura química do hidroxitirosol

Além de contribuir na preservação dos alimentos, os fitoquímicos naturalmente presentes, com suas propriedades funcionais, poderiam ajudar no combate de diversos tipos de DCNT. Os limonóides e o ácido ascórbico das frutas cítricas, os isoflavonóides da soja, os tocotrienóis de grãos de cereais e vegetais, o licopeno do tomate, melancia e goiaba, as antocianinas do feijão, a quercetina da uva vermelha (vinho), entre outros, estão entre os fitoquímicos estudados (CRAIG; BECK, 1999).

Uma maneira de se combater o estresse oxidativo e a oxidação lipídica consiste na utilização de antioxidantes presentes em alimentos com a propriedade de impedir ou diminuir o desencadeamento das reações oxidativas.

2.3 Avaliação *in vitro* da atividade antioxidante

Atividade antioxidante não pode ser medida diretamente, mas sim pelos efeitos do antioxidante em controlar a extensão da oxidação (ANTOLOVICH et al., 2002). Existem diversos métodos para este fim, classificáveis como métodos baseados na varredura de radicais livres ou métodos que empregam lipídios como substrato (GIADA; MANCINI-FILHO, 2004).

O método da atividade antioxidante pelo captação do radical DPPH foi inicialmente proposto por Blois (1958), e tem sido amplamente utilizado para se determinar a atividade antioxidante de alimentos (GIL et al., 2002; JUNG et al., 2005; TEPE et al., 2005; YU; ZHOU; PARRY, 2005).

O radical DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) é caracterizado como um radical livre estável, de cor violeta e com banda de absorção em solução metanólica centrada em 517 nm. Quando uma solução de DPPH é misturada a outra que possa doar um próton, a forma reduzida do DPPH é gerada, com a perda da cor violeta e aparecimento de uma cor amarela clara (MOLYNEUX, 2004). Portanto, este método mede a capacidade em doação de prótons da amostra. Sua popularidade pode ser atribuída a sua simplicidade e velocidade de análise, mas isto é atingido a certo preço: a relevância dos dados obtidos deve ser cuidadosamente considerada (ANTOLOVICH et al., 2002).

Nas Figuras 3 e 4 estão representados as estruturas químicas da molécula do DPPH ainda radical e quando reduzido.

Figura 3. Estrutura química do radical DPPH

Figura 4. Estrutura química do DPPH reduzido

Método desenvolvido por Marco (1968) e modificado por Miller (1971), o sistema β -caroteno/ácido linoléico emprega lipídios como substrato, baseando-se na descoloração do β -caroteno induzida pelos produtos da degradação oxidativa do ácido linoléico. É um método executado em meio emulsionado, simples, sensível, mas não específico (diferentes indutores, como oxigênio, luz e calor podem interferir no ensaio). A queda na absorbância é efetuada a 470 nm, na presença e na ausência de um antioxidante (controle), e a porcentagem de inibição da oxidação lipídica é determinada em relação ao controle (ANTOLOVICH et al., 2002; GIADA; MANCINI-FILHO, 2004; MELO; MANCINI-FILHO, 1989; SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999;).

Este método já foi utilizado para se determinar atividade antioxidante em diversos alimentos, como na Castanha do Brasil (MELO, 1989), em extratos de coentro (MELO et al.,

2003), e em diversas hortaliças asiáticas, dentre elas brócolis, couve de Bruxelas e tomate (KAUR; KAPOOR, 2002).

2.4 Alimentos funcionais

Os alimentos funcionais são alimentos naturais ou produtos alimentícios elaborados que possuem em sua composição substâncias bioativas que podem influenciar positivamente uma função fisiológica atuando na prevenção de doenças ou desordens. A portaria nº398 de 30/04/99, da Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde do Brasil fornece a definição legal de alimento funcional: "todo aquele alimento ou ingrediente que, além das funções nutricionais básicas, quando consumido como parte da dieta usual, produz efeitos metabólicos e/ou fisiológicos e/ou efeitos benéficos à saúde, devendo ser seguro para consumo sem supervisão médica" (BRASIL, 1999a; BRASIL, 1999b).

Existem também outras definições para o termo alimento funcional. Ele pode ser um alimento, ou parte dele, que promova benefício a saúde além da nutrição básica (para a população pretendida). Exemplos podem incluir desde alimentos convencionais, fortificados, enriquecidos ou melhorados, até suplementos dietéticos. Eles fornecem nutrientes essenciais em quantidades superiores às necessárias para manutenção, crescimento e desenvolvimento do ser humano, além de outros componentes biologicamente ativos que promovem benefícios à saúde ou efeitos fisiológicos desejáveis (INSTITUTE OF FOOD TECHNOLOGISTS, 2005).

2.5 A Dieta do Mediterrâneo

A dieta do mediterrâneo constitui uma tradição centenária que contribui para uma excelente saúde, promove uma sensação de prazer e bem estar, e forma uma parte vital da

herança cultural mundial (WILLETT et al., 1995). Ela é um tipo de alimentação característica de países da região do mar Mediterrâneo (Espanha, Portugal, Itália, Grécia, Iugoslávia, França, Albânia, Turquia, Malta, Israel, Síria, Líbano, Egito, Líbia, Tunísia, Argélia e Marrocos). Este padrão alimentar é composto principalmente de ingestão de frutas e hortaliças, cereais, azeite de oliva como principal fonte de gorduras (ácidos graxos monoinsaturados), vinhos e um consumo relativamente maior de pescados e menor de carnes vermelhas, em relação ao norte europeu (NACIF et al., 1998).

Estudos epidemiológicos recentes têm dado o respaldo ao fato de que a aderência a este tipo de dieta realmente pode ter um efeito positivo na expectativa e na qualidade de vida (ROBERTSON; SMAHA, 2001; TRICHOPOULOU; VASILOPOULOU, 2000; WILLET et al., 1995). Knoops et al. (2004) mostraram pelo projeto HALE (The Healthy Ageing: a Longitudinal Study in Europe) que entre indivíduos de 70 a 90 anos de idade, a aderência a esta dieta (e a um estilo de vida saudável) foi associada a mais de 50% de queda nas taxas de mortalidade geral e específica.

Esposito et al. (2004) concluíram num estudo randômico que a prevalência de síndrome metabólica e o risco de DCV associadas a ela podem ser bastante reduzidos com a dieta do mediterrâneo. Um dos mecanismos responsáveis pelo efeito cardio-protetor da dieta pode ter sido causado pela redução do estado inflamatório associado com a síndrome metabólica. Os autores indicam ainda que, do ponto de vista da saúde pública, a adoção deste tipo de dieta pode promover benefícios adicionais aos riscos das doenças cardiovasculares.

Apesar da robusta associação positiva existente entre a aderência à dieta mediterrânea e a queda na mortalidade, não há evidências dessa associação com os alimentos individualmente, o que pode sugerir que os benefícios sejam atribuídos aos efeitos cumulativos (sinérgicos ou interativos) entre os componentes da alimentação quando ingeridos conjuntamente (ESPOSITO et al., 2004).

O molho do tipo Pesto pode ser considerado parte integrante da dieta mediterrânea, já que todos seus ingredientes fazem parte da pirâmide alimentar característica desta dieta (WILLET et al., 1995) e possuem a mesma região de origem.

2.5.1 Molho Tipo Pesto

Molhos podem ser definidos como preparações líquidas ou cremosas, utilizadas como acompanhamento de diversas preparações, com a função de complementá-las, tornando-as mais úmidas e acentuando seu sabor (PHILIPPI, 2003). Os tipos mais utilizados de molhos podem ser classificados em: molhos salgados engrossados, molhos salgados líquidos, molhos de manteiga, molhos de tomate, molhos para massas, molhos regionais e molhos doces.

Atualmente, existe uma infinidade de molhos que podem ser utilizados como acompanhamento de massas, dentre eles o molho tipo Pesto, de origem Genovesa (PHILIPPI, 2003).

Sua receita original é composta pelos ingredientes: manjericão, pinoli, azeite de oliva, queijo pecurino, sal e alho, porém existem várias receitas do molho tipo Pesto adaptadas à culinária brasileira, tendo cada uma variações na proporção dos ingredientes, como:

- Manjericão, castanha de caju, azeite de oliva, queijo parmesão ralado e alho;
- Manjericão, nozes, azeite de oliva e ricota;
- Manjericão, amêndoas, azeite de oliva, queijo parmesão ralado e alho.

Alguns exemplos de receitas se encontram no anexo A.

2.6 Alho, manjericão, azeite de oliva e castanha do Brasil (ou do Pará)

As especiarias e ervas têm participado significativamente na manutenção da saúde humana, melhorando a qualidade de vida e servindo aos homens com suas diferentes

propriedades, como temperos, bebidas, cosméticos, tinturas ou medicamentos. A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que aproximadamente 80% da população mundial confia na medicina tradicional para seus cuidados de saúde primários, ou seja, muitas das terapias utilizadas envolvem o uso de extratos de plantas ou seus componentes ativos com destaque às especiarias e ervas. Pela sua diversidade e pelas inúmeras possibilidades de aplicação culinária as especiarias adquiriram lugar de destaque em todas as cozinhas aristocráticas da Europa, embora estas se tenham revelado muito diferentes umas das outras (FLANDRIN; MONTANARI, 1996).

2.6.1 Alho

O alho (*Allium sativum*) é um vegetal da família *Liliacea*. Possui compostos organossulfurados que apresentam atividade antioxidante. Os principais compostos organossulfurados solúveis em água são a s-alilcisteína e a s-alilmercaptocisteína, com potente atividade antioxidante, sendo produzidas durante o processo de amadurecimento. Os compostos solúveis em lipídios também possuem atividade antioxidante, como o dialil sulfito, trialilsulfito, dialil polisulfito. Outras substâncias presentes no alho que possuem atividade antioxidante são os compostos fenólicos e o selênio (BOREK, 2001).

Nuutila et al. (2003) mostraram que o extrato metanólico do alho apresentou atividade antioxidante, que por sua vez foi positivamente correlacionada com o teor de fenólicos totais das amostras.

2.6.2 Manjeriço

O manjeriço (*Ocimum basilicum* L.) é originário da Índia, onde é uma planta sagrada e usada não só na culinária, mas também plantado nas portas das casas para espantar “mau olhar”. Foi introduzido na Europa na Antiguidade, e também é considerada sagrada no

Egito. Era o emblema do amor em Roma e o símbolo do luto na Grécia e dizia-se reservado aos soberanos que, somente eles, poderiam colher o manjerição com uma foice de ouro, de onde vem o significado de seu nome: "planta do rei". Aqui no Brasil, suas folhas são usadas em banhos contra o “mau olhado” e sabe-se que o manjerição afasta as moscas. No século passado, os sapateiros utilizavam esta erva para atenuar o odor do couro.

Juliani e Simon (2002) testaram a atividade antioxidante de extratos (etanólico/aquoso – 8:2) de cinco diferentes cultivares de manjerição, e obtiveram uma forte correlação entre o teor de fenólicos totais e a atividade antioxidante. Sua fração de fenólicos (tais como flavonóides), e não o seu óleo essencial, foi o principal responsável pela atividade apresentada. Os autores também afirmaram que a inserção de manjerição na dieta poderia prover até 125mg de antioxidantes fenólicos (equivalente ácido gálico) e até 140mg de equivalentes de ácido ascórbico por grama de peso seco da erva ingerido.

A atividade antioxidante em sistemas lipofílicos dos compostos voláteis do manjerição foi testada por Lee e Shibamoto (2002). Eles mostraram que a formação de dienos conjugados na oxidação de metil linoleato foi inibida fortemente pela presença do manjerição, sendo esta apenas inferior à do tomilho. Os resultados obtidos foram também similares aos obtidos com antioxidantes sintéticos, tais como BHT e α -tocoferol.

Foi identificado como principal ácido fenólico do manjerição o ácido rosmarínico e principalmente a ele atribuída a atividade antioxidante (KINTZIOS et al., 2003), sendo que este composto ainda pode apresentar efeito sinérgico com o α -tocoferol (JAYASINGHE et al., 2003).

2.6.3 Azeite de oliva

O azeite de oliva virgem é produto da prensagem mecânica do fruto da oliveira (*Olea europaea* L.), sendo tratado apenas por processos físicos, tais como lavagem, moagem, prensa

fria e centrifugação, não passando por processo térmico, resultando num produto não fermentado. O azeite de oliva é classificado por seu grau de acidez, representado pela acidez livre (g de ácido oléico livre por 100g de óleo) (IOOL, 2006). Segundo a União Européia, o azeite de oliva pode ser classificado como (CASA DO AZEITE ESPANHOL, 2005):

- » Extra Virgem: produto da primeira prensagem, é aquele cuja acidez é menor do que 0,8% e que apresenta atributos positivos suficientes em testes sensoriais. É produto de alta qualidade gastronômica e no dia-a-dia é utilizado para finalização de pratos ou saladas. Industrialmente pode ser misturado com outros tipos de azeite.
- » Virgem: com acidez entre 0,8% e 2% e que na sua comercialização pode ser denominado fino. Seu principal uso é o culinário e quando usado industrialmente é mesclado com outros tipos de azeite.
- » Lampante: acidez maior do que 2%. Destina-se exclusivamente para uso industrial na mistura com outros azeites de oliva.
- » Refinado: antes do refino, supera o grau de acidez de 2%, ou que por problemas climáticos ou de processo é inadequado sensorialmente. O refino não modifica a estrutura química do azeite de oliva, mas resulta em um produto com acidez não superior a 0,3%. O azeite refinado não é vendido aos consumidores e destina-se exclusivamente a utilização industrial, onde são misturados com outros azeites de oliva.

A mistura de azeite refinado com azeites de oliva virgens (extra, fino ou lampante) recebe a denominação genérica azeite de oliva, cujo grau de acidez não pode superar 1%. Essa limitação modula a utilização dos azeites virgens na produção do azeite de oliva, isto é, os fabricantes utilizam mais azeite de oliva extra virgem do que o lampante na elaboração do azeite de oliva. A principal utilização do azeite de oliva é culinária (CASA DO AZEITE ESPANHOL, 2005).

Dentre os óleos vegetais comestíveis comercializados mundialmente, o azeite de oliva é um dos mais importantes e antigos do mundo, sendo largamente usado nos países que margeiam o Mediterrâneo (citados no item 2.5). É raro existir, dentre os óleos vegetais não refinados, um sabor e aroma mais apreciado do que o do azeite de oliva virgem (OWEN et al., 2000). Ele apresenta, ainda, algumas propriedades nutricionais (elevado teor de ácido graxo monoinsaturado, o ácido oléico - ω -9), que podem contribuir para uma menor incidência de doenças coronarianas em habitantes do Mediterrâneo em relação a povos de outras regiões que consomem altos teores de gorduras saturadas (KIRITSAKIS; MARKAKIS, 1987; PEREIRA; BARCELOS, 2003).

O azeite de oliva extra virgem é uma grande fonte de compostos fenólicos (antioxidantes naturais), possuindo mais de 30 já identificados (TUCK; HAYBALL, 2002). O teor de fenólicos presente nos diferentes tipos de azeite é inversamente proporcional ao processo que ele sofre, isto é, quanto mais processado o óleo, menor a quantidade de compostos fenólicos presentes (VISIOLI; GALLI, 2002).

Os fenólicos presentes em maior quantidade são a oleuropeína, o hidroxitirosol e o tirosol, e a estes têm sido atribuídos grande parte dos efeitos benéficos do azeite de oliva. O composto hidroxitirosol é o que possui maior capacidade em combater os radicais livres e como consequência maior atividade antioxidante do que os outros dois compostos fenólicos. Os tocoferóis, que são efetivos contra processos oxidativos, também são encontrados no azeite de oliva (OWEN et al., 2000; TUCK; HAYBALL, 2002).

Coni et al. (2000) estudaram os efeitos protetores da oleuropeína na oxidação das lipoproteínas de baixa densidade (LDL-colesterol) em coelhos. Mostraram a eficácia deste composto fenólico em aumentar a resistência das LDL-colesterol à oxidação, reduzir os níveis plasmáticos de colesterol total, livre e esterificado, e causar uma redistribuição dos componentes lipídicos das LDL-colesterol com um efeito indireto em sua dimensão.

Fitó et al. (2000) demonstraram o efeito protetor do azeite de oliva e seus fenólicos na oxidação das LDL-colesterol *in vitro*, comparando a atividade antioxidante do óleo com e sem seu conteúdo de fenólicos. Porém, a quantidade necessária para que se atingisse o resultado obtido foi relativamente grande, fato corroborado por Vissers, Zock e Katan (2004).

Embora os fenólicos do azeite de oliva sejam bem absorvidos pelo corpo, o conteúdo de fenólicos no azeite com potencial antioxidante na dieta mediterrânea é provavelmente muito baixo para produzir algum efeito mensurável na oxidação do LDL-colesterol ou outros marcadores em humanos. As evidências disponíveis sugerem que o consumo de fenólicos na quantidade fornecida pela dieta não protege o LDL-colesterol de qualquer modificação oxidativa (VISSERS; ZOCK; KATAN, 2004).

Um fato a ser considerado é que o azeite dificilmente é consumido sozinho. Normalmente ele é acompanhado de vegetais frescos e/ou crus, o que pode vir a promover um benefício adicional indireto (VISIOLLI; GALLI, 2002).

Os gastos com azeite de oliva estão presentes em quase todas as classes de renda da população brasileira. A pesquisa de orçamento familiar (POF) de 1998/99 revelou que as famílias com renda de até 2,5 salários mínimos não possuem gastos com este tipo de óleo, porém de acordo com o aumento de renda há um aumento proporcional dos gastos com azeite. A faixa salarial de maior gasto com azeites é a de 20 a 22 salários mínimos. O principal problema relativo ao consumo do azeite de oliva é a sua variação de preços, que por ser principalmente importado, depende da flutuação cambial (SOUZA, 2002).

2.6.4 Castanha do Brasil

Castanhas em geral, como as nozes, a amêndoa, a avelã, o amendoim, a castanha de caju e a castanha do Brasil apresentam em sua composição tocoferóis e também fenólicos

(KORNSTEINER; WAGNER; ELMADFA, 2006), portanto são fontes de antioxidantes naturais e já tiveram sua atividade antioxidante reportada (YANG; HALIM; LIU, 2005).

A castanha do Brasil é uma amêndoa oleaginosa proveniente da castanheira-do-Brasil (*Bertholetia excelsa*, H.B.R., família *Lecythidaceae*), árvore nativa da região amazônica. Essa amêndoa é muito rica em gorduras e proteínas de alto valor biológico, muitas vezes chamada de "carne vegetal". A proteína contida em apenas duas de suas amêndoas equivale à de um ovo de galinha. A castanha do Brasil apresenta também um alto teor de selênio em sua composição (SOUZA; MENEZES, 2004).

O selênio é um oligoelemento essencial à saúde, sendo que há fortes indícios que de atua como elemento protetor de doenças crônicas, como aterosclerose, artrite, cirrose, câncer, entre outras. O selênio retarda o envelhecimento, combate a tensão pré-menstrual, preserva a elasticidade da pele e pode neutralizar os radicais livres (ALVARENGA, 2002, apud SOUSA; MENEZES, 2004)

A castanha do Brasil apresenta elevado teor de lipídios na sua composição (em torno de 66%), além de uma alta concentração de ácidos graxos insaturados (21% ácido linoléico e 25% ácido oléico, aproximadamente) (ESTADOS UNIDOS, 2005). Devido ao seu elevado teor lipídico e pela significativa presença de ácidos graxos insaturados, presume-se que a castanha possua em sua composição substâncias que possam retardar seu processo oxidativo (MELO, 1989)

Melo (1989), utilizando-se do sistema modelo de ácido linoléico e β -caroteno, mostrou que o extrato metanólico da castanha do Brasil apresenta um valor de inibição da oxidação lipídica do substrato semelhante ao obtido com antioxidante sintético (BHT).

Ferrari (2002) realizou um estudo da capacidade antioxidante total (CAT) de diversos alimentos comercializados na cidade de São Paulo, no qual a castanha do Brasil apresentou o maior valor de CAT, seguido do guaraná, café e chocolate.

2.7 Interação na capacidade antioxidante

Na literatura encontram-se diversos estudos que tentam demonstrar o comportamento antioxidante de componentes individualmente, porém pouco se sabe sobre o resultado da interação entre diferentes compostos antioxidantes, e sua consequência na estabilidade de alimentos (PINELO et al., 2004). Alguns estudos relatam que a capacidade antioxidante de várias substâncias não apresenta um comportamento linear “dose dependente” e pode ser alterada pela presença de outras substâncias com o mesmo efeito na dieta (SUBAGIO; MORITA, 2001; HWANG et al., 2000; SOUTHON, 2000). Em termos práticos, tais substâncias podem apresentar sinergismo, isto é, quando uma mistura de duas ou mais resulta num efeito antioxidante maior ou menor que de cada uma isoladamente. Em função dessa propriedade, combinações de antioxidantes são usualmente mais aplicadas em alimentos ou suplementos, do que os mesmos isoladamente (FRANKEL, 1996; CHENG et al., 2001).

Segundo Craig e Beck (1999), vitaminas, minerais, fitoquímicos e fibra dietética não devem ser isolados de alimentos e substituídos por suplementos, sendo reconhecido que grande parte dos fitoquímicos presentes nos alimentos atuam sinergicamente para exercer efeitos benéficos ao organismo.

Vattem et al. (2006) investigaram as propriedades antimutagênicas dos compostos fenólicos do oxicoco (*cranberry*), do ácido elágico (AE) e do ácido rosmarínico (AR), e suas possíveis interações sinérgicas. Os autores mostraram que a funcionalidade antimutagênica do extrato de oxicoco foi significativamente melhorada quando 30% dele foi substituído por AE e AR, sugerindo uma ação sinérgica entre eles.

Pinelo et al. (2004) mostraram em seu estudo que a adição de compostos fenólicos em sistemas complexos nem sempre promove um efeito positivo na capacidade antioxidante do sistema, pois foi observado um efeito de sinergismo negativo entre os três compostos fenólicos (catequina, resveratrol e quercetina). Porém, eles concluem que o único modo de se

saber o efeito que a adição de um novo composto fenólico terá na capacidade antioxidante, e por consequência na estabilidade da matriz alimentícia, seria por meio de estudos experimentais específicos com o sistema considerado em cada caso.

Vang, Rasmussen e Andersen (1997), trabalhando com brócolis, concluíram em seu trabalho que o melhor modo de se entender os efeitos anti-carcinogênicos de substâncias alimentares é assumir que elas agem aditivamente ou sinergicamente. Este efeito foi considerado plausível, já que dietas contêm muitas substâncias que podem agir na mesma ou em diferentes etapas na carcinogênese.

2.8 Metodologia Estatística de Superfície de Resposta

A metodologia de superfície de resposta (MSR) é uma popular técnica de otimização atualmente utilizada em ciências e tecnologia dos alimentos, por ser bastante simples e eficaz (BOX; DRAPER, 1987).

A MSR é uma técnica estatística baseada no emprego de planejamentos fatoriais, introduzida na década de 50, e desde então tem sido usada com grande sucesso na modelagem de diversos processos industriais (BARROS-NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2003). Ela consiste em um grupo de técnicas usadas no estudo empírico das relações entre uma ou mais respostas e suas variáveis de entrada (BOX; HUNTER; HUNTER, 1978).

Uma das vantagens do uso da MSR consiste na economia de recursos financeiros e tempo, proporcionada pelo delineamento gerando curvas “iso-resposta”, o que possibilita a obtenção do mesmo resultado com diferentes proporções entre as variáveis, sem necessidade de se repetir exaustivamente os ensaios experimentais (BARROS-NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2003).

Um modo particular do planejamento de experimentos é a aplicação de MSR para modelar misturas de componentes, no qual as proporções entre os componentes sempre somam 100%, assim podemos escrever:

$$\sum x_i = 100\% = 1 \quad (1)$$

em que x_i representa a proporção do i -ésimo componente da mistura (BARROS-NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2003). Estas proporções podem ser representadas num triângulo, onde cada vértice representaria o componente puro na mistura (Figura 5).

Figura 5. Representação gráfica de um modelo de misturas

Barreto et al. (2003) fizeram uso da MSR para avaliar o efeito da adição de dois antioxidantes (interação entre ácido fítico e α -tocoferol) na oxidação lipídica de carnes de frango estocadas sob refrigeração por um período de 96h a 4°C sob luz fluorescente. Os resultados obtidos pelo grupo indicaram um possível efeito sinérgico positivo entre os componentes.

Castro et al. (2003) fizeram uso da modelagem de misturas para otimizar uma combinação de proteínas usadas na formulação de preparações à base de bebidas lácteas consumidas por

programas institucionais, com o objetivo de explorar as possíveis interações entre análise sensorial, análise nutricional, e atributos econômicos.

Castro et al. (2005) utilizaram a modelagem de misturas para avaliar a interação entre α -tocoferol, β -caroteno e licopeno na formulação de um suplemento nutricional. Os resultados obtidos mostraram que não ocorreu sinergismo entre os três componentes, quando o homogenato de cérebro de rato foi utilizado como o substrato oxidável. Também foi sugerido que a MSR pode ser aplicada para se estimar o comportamento de uma mistura de ingredientes em suplementos nutricionais.

3 Justificativa

A transição nutricional diz respeito às mudanças que os padrões nutricionais vêm sofrendo no decorrer dos tempos, e resultam da modificação da estrutura da dieta de indivíduos. Cada país possui aspectos singulares em sua transição, mas todas convergem para uma dieta rica em gorduras de origem animal, açúcar e alimentos refinados e redução no consumo de carboidratos complexos e fibras, usualmente chamada de “dieta ocidental” (MONTEIRO et al., 2000). O Brasil não escapa desse quadro, e a queda do consumo de produtos tradicionais presentes na cesta básica vem ilustrar esse fato.

A Pesquisa de Orçamento Familiar (POF) de 2002-2003 traz as modificações no consumo de alimentos nos últimos anos. Comparada à POF de 1987-1988, carnes frescas, cereais, açúcares, feijão e leite, entre outros, apresentaram queda na participação do orçamento familiar, enquanto que panificados em geral e carne de frango tiveram um aumento (BRASIL, 2004). O macarrão teve seu perfil de consumo estável no Brasil, que é o terceiro maior produtor mundial, com um volume total de 1 milhão de toneladas anuais e um faturamento de mais de R\$ 2 bilhões. A média do consumo deste produto é de 5,6kg /pessoa/ano (2003), sendo destes 84% relativos à massa seca (ABIMA, 2006).

O estilo de vida é um dos fatores de maior influência na saúde e bem-estar, tendo como um de seus pilares a alimentação, cuja importância na prevenção das DCNT tem sido cada vez mais reconhecida. O combate aos radicais livres através do consumo de antioxidantes presentes nos alimentos é um meio preventivo de grande importância para a Saúde Pública.

Diante do exposto, pretendeu-se desenvolver um molho para ser utilizado que apresentasse um bom potencial antioxidante e que fosse de fácil preparo. Este molho é composto por seis ingredientes (alho, manjerição, azeite de oliva extra virgem, castanha do Brasil, queijo parmesão e sal de cozinha).

4 Objetivos

4.1 Objetivo geral

Desenvolver uma formulação de molho tipo Pesto, à base de manjerição, castanha do Brasil, azeite de oliva extra virgem, alho, queijo parmesão ralado e sal, para ser utilizada como acompanhamento de massas, pães e biscoitos, e que pudesse representar uma boa fonte de antioxidantes naturais na dieta.

4.2 Objetivos específicos

- » Avaliar a interação entre os compostos com atividade antioxidante presentes nos extratos de diferentes polaridades dos ingredientes principais do molho Pesto;
- » Determinar uma proporção entre os ingredientes que pudesse maximizar a atividade antioxidante da formulação e que fosse aceita sensorialmente;
- » Determinar a composição centesimal da formulação final;
- » Avaliar a atividade antioxidante da formulação final por quatro métodos: método do DPPH (capacidade de captação de radicais livres); sistema β -caroteno/ácido linoléico (inibição da oxidação lipídica); método do poder redutor; ensaio em meio lipídico pelo aparelho Rancimat[®];
- » Quantificar o teor de compostos fenólicos totais nos extratos.

5 Materiais e Métodos

5.1 Materiais

5.1.1 Ingredientes utilizados:

Manjerição (*Ocimum basilicum* L.) fresco foi adquirido no CEAGESP, no próprio dia ou no anterior ao que as formulações foram preparadas. A castanha do Brasil (amêndoa proveniente da *Bertholetia excelsa*, H.B.R) e o azeite utilizado, extra virgem, foram provenientes de um mesmo lote. O alho (*Allium Sativum*), o queijo parmesão ralado e sal iodado foram adquiridos em mercado local. O trabalho foi dividido em 2 fases, sendo que os ingredientes (exceto o manjerição – adquirido no dia de elaboração da formulação) foram armazenados em refrigeração entre ambas as fases.

5.1.2 Reagentes utilizados:

DPPH 1,1,2 (D9132), β -caroteno (C9750), Ácido linoléico (FEMA 3380) e Ácido Gálico (G7384) Sigma; Reagente de Folin-Cicalteau (UN3264) Merck; Ferricianeto de potássio (CAS 13746-66-2), Ecibra; Cloreto férrico 1% Dinâmica; Metanol (grau HPLC); Éter etílico (grau HPLC).

5.1.3 Equipamentos utilizados:

Espectrofotômetro UV-1650 PC (Shimadzu Corp.); Aparelho Rancimat 743 (Metrohm); Aparelho Ultra Turrax T-18 basic (IKA); Ultrassonificador C/T (Thornton); processador de alimentos Multipractic Super (FAET); Destilador de nitrogênio TE036-1 (Tecnal); Mufla Q318.24 (Quimis); Estufa Q317.B222 (Quimis); Extrator Soxhlet MA486/6 (Marconi).

5.2 Metodologia

A metodologia foi dividida em duas fases. A Figura 6 apresenta um esquema simplificado do protocolo experimental.

Na fase 1, as formulações do planejamento foram preparadas com pelo menos uma repetição por ponto. Já na fase 2 foram preparadas 3 repetições da formulação obtida. Todas as análises foram realizadas em duplicata.

Figura 6. Esquema do protocolo experimental. AA = atividade antioxidante.

5.2.1 Determinações analíticas

Cada ingrediente do molho pode ser considerado como uma matriz complexa de compostos. A mistura dessas matrizes aumenta consideravelmente essa complexidade, portanto há uma grande variedade de substâncias (com atividade antioxidante) a serem

extraídas para análises no molho Pesto. A bibliografia nesse aspecto, de extrações em misturas de matrizes complexas, é inexistente, portanto o método de extração foi determinado a partir de pré-testes.

Durante a realização destes pré-testes, foram testadas diversas metodologias de extração para que se atingisse uma forma eficiente de se obter extratos com os compostos com atividade antioxidante. As metodologias testadas foram as seguintes:

- » Método inicialmente proposto por Pratt e Miller (1984). Esta metodologia baseia-se na extração dos compostos com atividade antioxidante por homogeneização a quente com metanol e hexano como solventes;
- » Método baseado na homogeneização em agitador magnético seguida de separação em centrífuga e coleta do sobrenadante (LEONG; SHUI, 2002; RIVERO et al., 2003; TEPE et al., 2005; com modificações);
- » Os métodos da coluna seca (MARMER; MAXWELL, 1981) e o método de determinação de gordura de Bligh-Dyer (BLIGH; DYER, 1959). O primeiro usa como solventes diclorometano e metanol, enquanto o método de Bligh-Dyer faz o uso de água, metanol e clorofórmio para a separação da fração lipídica da amostra;
- » Método de extração seqüencial com solventes de diferentes polaridades, utilizando o aparelho Ultra Turrax para homogeneização da solução. Testou-se tanto a ordem crescente de polaridade dos solventes, como a decrescente. (GOUPY et al., 1999; KÄHKÖNEN et al., 1999; MELO et al., 2003; com modificações).

O método que apresentou melhor performance na extração dos componentes com atividade antioxidante foi o utilizado na seqüência do trabalho, e está apresentado detalhadamente a seguir.

5.2.1.1 Obtenção dos extratos

A Figura 7 apresenta um fluxograma do processo de obtenção dos extratos.

Figura 7. Fluxograma de obtenção dos extratos

Os extratos metanólico/aquoso (8:2 – polar) e etéreo (apolar) do molho tipo Pesto foram obtidos por extração sequencial com os solventes de diferentes polaridades, de acordo a

seguinte metodologia: inicialmente foram separadas amostras de 5g e homogeneizadas por 5 minutos com 50mL de uma mistura metanol/água (8:2) no Ultra Turrax a 10.000 rpm. As amostras foram então filtradas à vácuo (filtro Nalgon[®], porosidade 3 micra) em balão de 50mL e volume completado até 50mL. Após a evaporação do solvente, o resíduo foi submetido ao mesmo processo, porém utilizando éter como solvente. Os sobrenadantes foram armazenados em frascos âmbar sob nitrogênio em freezer (-18°C) para ensaios posteriores.

Na realização dos ensaios, em processo similar ao de Popov e Lewin (1996), o extrato apolar foi evaporado com fluxo de N₂ e dissolvido em metanol para que o excesso de gordura presente no molho pudesse ser isolado dos compostos com atividade antioxidante, e assim não interferir nos resultados.

5.2.1.2 Determinação do teor de matéria seca dos extratos

Essa determinação teve por objetivo avaliar o teor de sólidos nos extratos, para o cálculo da concentração e determinação do total de extrato a ser utilizado na determinação da atividade antioxidante. Para tal, foi utilizado o método gravimétrico em que as amostras foram colocadas em estufa à 105°C por 5 horas, resfriadas no dessecador e então pesadas em balança analítica até que se obtivesse o peso constante (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985).

5.2.2 Fase 1

5.2.2.1 Avaliação da interação entre os ingredientes pela modelagem de misturas

Para este estudo foi utilizado um planejamento experimental de modelagem de misturas com 3 componentes, visando a análise pela metodologia de superfície de resposta (MSR). Dado o fato de o molho ser uma mistura de ingredientes, trabalhou-se com as proporções dos ingredientes na formulação de modo que a soma entre estas proporções fosse 1. Foi aplicado

um planejamento experimental centróide simplex, no qual são necessários no mínimo sete pontos para que as interações entre todos os ingredientes possam ser avaliadas (individualmente e entre si) (BARROS-NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2003). Neste tipo de planejamento, procurou-se ajustar um modelo do tipo:

$$y = \sum_{i=1}^3 \beta_i x_i + \sum_{i=1}^3 \sum_{j=1}^3 \beta_{ij} x_i x_j + \beta_{123} x_1 x_2 x_3 \quad (2)$$

no qual o primeiro termo da equação é referente aos efeitos individuais de cada ingrediente, o segundo termo é referente aos efeitos de interação entre os ingredientes dois a dois, e finalmente o terceiro termo é referente ao efeito de interação entre os três ingredientes.

Foram consideradas como variáveis independentes (fatores) as proporções dos três principais ingredientes (manjeriço, azeite de oliva e castanha), em sete níveis de variação. O alho, o queijo e o sal tiveram suas proporções fixadas, visto que o queijo e o sal não têm atividade antioxidante reportada e a quantidade de alho presente na formulação é muito pequena para que se pudesse obter uma variação significativa. A variável dependente (resposta) foi a atividade antioxidante e o experimento indicaria a região na qual a variável dependente melhor responderia às variáveis independentes.

A formulação partiu de uma base fixa contendo uma pequena quantidade de cada ingrediente. Em 100g de molho, 60g constituíram a base fixa, que foi distribuída conforme indicado na Tabela 1.

Tabela 1 – Quantidade dos ingredientes na base fixa

Ingrediente	Massa (g)
Alho	3
Manjerição	15
Azeite	20
Castanha	10
Queijo	10
Sal	2
Total	60

Nos 40g restantes (para completar os 100g) os trs ingredientes em diferentes propores foram variados na tentativa de se ajustar ao modelo (2).

O experimento foi ento constitudo de 7 ensaios, referentes a um planejamento centride simplex completo (obtidos pelo software MINITAB verso 14), cujas propores (nveis codificados) esto apresentadas na Tabela 2. As formulaes utilizadas esto apresentadas na Tabela 3. Foram preparadas no mesmo dia de forma aleatria (por sorteio) duas repeties das formulaes 1 a 5, e 3 repeties das formulaes 6 e 7 (Tabela 3).

Tabela 2 – Mistura de 3 ingredientes*. Planejamento centride simplex

Ensaio	x_1 (A)	x_2 (M)	x_3 (C)	Resultado
1	1	0	0	y_1
2	0	1	0	y_2
3	0	0	1	y_3
4	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{2}$	0	y_{12}
5	$\frac{1}{2}$	0	$\frac{1}{2}$	y_{13}
6	0	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{2}$	y_{23}
7	$\frac{1}{3}$	$\frac{1}{3}$	$\frac{1}{3}$	y_{123}

* x_1 , x_2 e x_3 representam a proporo de cada ingrediente ao total da formulao pelo azeite (A), manjerio (M) e pela castanha (C), respectivamente.

A influência de diferentes fatores na efetividade dos antioxidantes em alimentos complexos e heterogêneos não pode ser avaliada com apenas um método (SAURACALIXTO; GOÑI, 2006), por isso, nesta fase, foram utilizados dois experimentos que avaliam a atividade antioxidante, cujos métodos apresentam nível satisfatório de confiabilidade (SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999). Foram utilizados o método da atividade antioxidante pela captação do radical DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) e o sistema β -caroteno/ácido linolêico, tanto para os extratos polares quanto apolares, conforme detalhado nos itens 5.2.2.2 e 5.2.2.3.

Tabela 3 – Quantidade (em g) dos ingredientes nas formulações do planejamento

Formulação	Variação			Total na formulação		
	Azeite	Manjericão	Castanha	Azeite	Manjericão	Castanha
1	40	0	0	60	15	10
2	0	40	0	20	55	10
3	0	0	40	20	15	50
4	20	20	0	40	35	10
5	20	0	20	40	15	30
6	0	20	20	20	35	30
7	13,33	13,33	13,33	33,33	28,33	23,33

5.2.2.2 Captação de radicais livres - Método DPPH

Foi utilizado método desenvolvido por Yamaguchi et al. (1998) e adaptado por Nandita e Rajini (2004), com pequenas modificações: 1,5mL de solução de DPPH (20mg/L em metanol) foi misturado aos diferentes extratos (0,75mL dos extratos padronizados em 0,5mg/mL). Os brancos foram preparados para as amostras e para o DPPH (0,75mL da

amostra com 1,5mL de metanol e 1,5mL de DPPH com 0,75mL de metanol, respectivamente). Foram realizadas leituras de absorbância a 517 nm durante 30 minutos, nos tempos 0, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20 e 30. A porcentagem de captação foi calculada pela seguinte fórmula:

$$\%Captação = [1 - (A_{a30} - A_{aB}) / (A_{DPPH-B})] \times 100$$

Em que: A_{a30} = absorbância da amostra depois dos 30 minutos;

A_{aB} = absorbância do branco da amostra;

A_{DPPH-B} = absorbância do branco do DPPH.

5.2.2.3 Inibição da oxidação lipídica - Sistema β -caroteno / ácido linoléico

Utilizou-se a avaliação da atividade antioxidante através do sistema β -caroteno/ácido linoléico baseado no procedimento desenvolvido por Marco (1968), descrito por Melo e Mancini-Filho (1989).

Inicialmente, 28 μ L de solução de β -caroteno (2mg/mL em clorofórmio) foram adicionados de 28 μ L de ácido linoléico e 200mg de *Tween* 40 (emulsificante). O clorofórmio foi evaporado em atmosfera de nitrogênio e foram adicionados 140mL de água oxigenada (água destilada oxigenada durante 30 minutos). 5mL desta emulsão foram misturados a 1mL das amostras (padronizadas em 0,5mg/mL; 1mL de metanol para o branco) num tubo de ensaio e agitados em vortex. A absorbância foi lida em espectrofotômetro a 470 nm, durante 2 horas, a cada 15 minutos. Durante o ensaio, os tubos foram mantidos em banho-maria a 50°C.

A porcentagem de inibição da oxidação lipídica foi calculada pela fórmula:

$$\%IOL = [(A_{iB} - A_{fB}) - (A_{iA} - A_{fA})] \div (A_{iB} - A_{fB}) \times 100$$

Em que: A_{iB} = absorbância inicial do branco

A_{fB} = absorbância final do branco

A_{iA} = absorbância inicial da amostra

A_{fA} = absorbância final da amostra

5.2.2.4 Análise Sensorial

Para a análise sensorial em escala laboratorial do molho Pesto foi utilizado o teste afetivo de aceitabilidade do consumidor, utilizando escala hedônica de nove pontos (DUTCOSKY, 1996; MEILGAARD; CIVILLE; CARR, 1991). As análises foram realizadas no Laboratório de Técnica Dietética da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, no período de 2 horas após a preparação dos molhos, em cabines individuais apropriadas, com luz branca. Os provadores (não treinados) receberam uma bandeja com as três amostras a serem analisadas, um copo de água e uma ficha, cujo exemplo está apresentado na Figura 8. Nas fichas os provadores deveriam informar o sexo, a faixa etária, se já haviam consumido e se gostavam do molho Pesto. As três amostras eram entregues de uma só vez ao provador, mas deveriam ser provadas na ordem apresentada, para minimizar erros provocados por possível ocorrência de sabor residual ou fadiga sensorial. Após o término das análises os provadores receberam um brinde pela participação.

As amostras foram codificadas com números de 3 dígitos e apresentadas aos provadores em ordem aleatória para minimizar possíveis erros. A escolha dos códigos foi realizada de acordo com a metodologia sugerida por Meilgaard; Civille; Carr (1991), através da Tabela de ordem aleatória de dígitos de 1 a 9 divididos em grupos de três colunas.

Dentre as três opções determinadas na avaliação da interação entre os ingredientes, a formulação melhor aceita foi utilizada para análises subseqüentes (fase 2) a fim de se determinar sua composição centesimal, quantificar seu teor de fenólicos totais e avaliar por quatro métodos a sua atividade antioxidante.

Nome: _____

Sexo: () Masculino () Feminino

Faixa etária: () até 17 () 18 – 34 () 35 – 49 () 50 ou mais

Já consumiu molho Pesto? () Sim () Não

Gosta de molho Pesto? () Sim () Não () Não sei

Prove as amostras **da esquerda para a direita**, e indique no quadro abaixo o quanto gostou, **de maneira geral**, do produto:

Amostra:	Amostra:	Amostra
9 - () Gostei MUITÍSSIMO	9 - () Gostei MUITÍSSIMO	9 - () Gostei MUITÍSSIMO
8 - () Gostei Muito	8 - () Gostei Muito	8 - () Gostei Muito
7 - () Gostei Regularmente	7 - () Gostei Regularmente	7 - () Gostei Regularmente
6 - () Gostei Ligeiramente	6 - () Gostei Ligeiramente	6 - () Gostei Ligeiramente
5 - () Indiferente	5 - () Indiferente	5 - () Indiferente
4 - () Desgostei Ligeiramente	4 - () Desgostei Ligeiramente	4 - () Desgostei Ligeiramente
3 - () Desgostei Regularmente	3 - () Desgostei Regularmente	3 - () Desgostei Regularmente
2 - () Desgostei Muito	2 - () Desgostei Muito	2 - () Desgostei Muito
1 - () Desgostei MUITÍSSIMO	1 - () Desgostei MUITÍSSIMO	1 - () Desgostei MUITÍSSIMO
O que mais gostou?	O que mais gostou?	O que mais gostou?
O que menos gostou?	O que menos gostou?	O que menos gostou?

Muito obrigado por participar de nossa pesquisa!

Figura 8. Ficha utilizada na análise sensorial

5.2.2.5 Análise estatística

Foi realizada análise de regressão múltipla e consideraram-se as variáveis independentes com nível de significância menor que 0,05. Na análise de variância foi esperado um valor de R^2 (coeficiente de determinação do modelo) maior do que 80%, indicando, dessa forma, um melhor ajuste do modelo. Também procurou-se um modelo que não apresentasse falta de ajuste estatisticamente significativa. Os melhores resultados da atividade antioxidante obtidos pela modelagem foram submetidos a teste de aceitação sensorial. No teste de aceitação sensorial foi aplicada uma análise de variância (ANOVA), a um nível de significância de 5%.

5.2.3 Fase 2: Caracterização do molho

5.2.3.1 Análise da composição centesimal

A umidade foi determinada pelo método gravimétrico, em estufa à 105°C. O teor de proteínas foi determinado pelo método micro Kjeldahl, empregando o fator de conversão 5,75. O teor de cinzas foi determinado em mufla a 550 °C. Lipídios foram determinados por extração em aparelho Soxhlet. Estas análises foram determinadas segundo as Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (1985). O teor de fibra alimentar total foi determinado pelo método não-enzimático-gravimétrico, segundo Li e Cardozo (1992). Carboidratos foram calculados por diferença. O valor calórico foi calculado multiplicando-se o teor de proteínas, carboidratos e lipídios pelos fatores 4, 4 e 9, respectivamente (BRASIL, 2003).

5.2.3.2 Quantificação dos compostos fenólicos totais

O total de compostos fenólicos da amostra foi determinado de acordo com o método utilizado por Genovese et al. (2003), com reagente Folin-Ciocalteu. Este método é utilizado para a determinação de compostos fenólicos totais em alimentos e bebidas e baseia-se na redução dos ácidos fosfomolibdico e fosfotúngstico em solução alcalina. A cor azul produzida pela redução do reagente de Folin pelos fenólicos é medida espectrofotometricamente, na faixa de absorção de 750 nm.

Foram adicionados a cada tubo de ensaio 0,25mL do extrato, 2mL de água destilada, 0,25mL de solução de Folin-Ciocalteu 1:10. Os tubos foram agitados e deixados em repouso por 3 minutos. Foi então adicionado 0,25mL de solução saturada de carbonato de sódio e o tubo agitado. Os tubos de ensaio foram deixados em repouso em banho a 37°C durante 30min para o desenvolvimento da cor. Foi lida a absorbância a 750 nm. O teor de fenólicos totais foi calculado através da curva padrão (com ácido gálico, construída com 5 concentrações diferentes do padrão).

5.2.3.3 Avaliação da atividade antioxidante

Além dos dois métodos já descritos anteriormente nos itens 5.2.2.2 e 5.2.2.3, a formulação obtida pela MSR foi também submetida a análises do seu potencial antioxidante, segundo métodos descritos a seguir.

5.2.3.3.1 Método do poder redutor

O poder redutor das amostras foi determinado de acordo com o método de Oyazu (1986), citado por Mathew e Abraham (2006). Três diferentes concentrações (300, 500 e 800mg/mL) dos extratos, diluídas para 1mL de metanol, foram misturadas com solução tampão-fosfato (2,5mL, 0,2M, pH 6,6) e ferricianeto de potássio $[K_3Fe(CN)_6]$ (2,5mL, 1% m/v). Os tubos de ensaio com a mistura foram levados à estufa a 50°C, por 20 minutos. Uma alíquota de ácido tricloroacético (2,5mL, 10% m/v) foi adicionada à mistura, e esta posteriormente foi centrifugada a 1.000g durante 10 minutos, à temperatura ambiente. Uma alíquota de 2,5mL do sobrenadante foi misturada com água destilada (2,5mL) e cloreto férrico $[FeCl_3]$ (0,5mL, 0,1% m/v) e a absorbância foi lida no espectrofotômetro a 700 nm. Um aumento na absorbância indica maior potencial redutor do extrato.

5.2.3.3.2 Ensaio em meio lipídico (Rancimat[®])

O ensaio em meio lipídico foi realizado utilizando-se o aparelho Rancimat[®], segundo a metodologia descrita por Laubli e Bruttel (1986). Foi trabalhada uma concentração de 500ppm, baseada no resíduo seco dos extratos. O volume dos extratos foi evaporado nos tubos do Rancimat[®] sob atmosfera de nitrogênio. Foram adicionados 3g de banha de suíno sem antioxidantes a cada tubo. As amostras foram colocadas no aparelho (temperatura de

110°C; fluxo de ar 20 L/h) até que a curva de condutividade completasse seu ciclo. O Índice de Atividade Antioxidante (IAA) foi calculado pela razão entre o tempo de condutividade das amostras com antioxidantes e o tempo de condutividade do controle (sem antioxidante).

5.2.3.4 Análise estatística

Na 2ª fase, todos os resultados obtidos foram submetidos à análise descritiva e estão expressos como média e desvio padrão (DP) de três repetições. Na comparação entre os resultados esperados pela fase 1 e os obtidos na fase 2 foram utilizados o teste ‘*t*’ de *student* e intervalos de confiança (95%). Novamente foi utilizado o software MINITAB, v.14.

5.3 Aspectos éticos

O projeto de pesquisa foi encaminhado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Saúde Pública/Universidade de São Paulo, conforme as normas de resolução 196 de 10/10/1996, do Conselho Nacional de Saúde, que regulamenta as pesquisas envolvendo seres humanos (ANEXO B). Todos os participantes da análise sensorial foram esclarecidos sobre os objetivos da pesquisa e assinaram o termo de consentimento (APÊNDICE A).

6 Resultados e Discussão

6.1 Fase 1

6.1.1 Preparo das formulações e extrações

As extrações foram realizadas em 3 dias consecutivos, mantendo as formulações prontas sob refrigeração. Na análise estatística, foram considerados três blocos, para o caso de algum fator externo que pudesse afetar o resultado ao longo dos três dias fosse levado em consideração.

A concentração dos extratos utilizada nos ensaios foi padronizada em 0,5mg/mL a partir dos pré-testes, já que nessa concentração foi possível observar variação nos resultados nos testes de atividade antioxidante.

6.1.2 Captação do radical livre - Método DPPH

O método de avaliação da atividade antioxidante pela captação do radical DPPH determina a capacidade em doação de prótons da amostra (ANTOLOVICH et al., 2002). Na Tabela 4 estão apresentados os resultados obtidos no planejamento para o teste DPPH com os extratos polar e apolar, e que foram utilizados para a modelagem estatística. Extratos que apresentam alta capacidade de captação do DPPH (acima de 90%) correspondem a praticamente à totalidade de captação do radical, já que o método apresenta uma absorção residual de aproximadamente 7% da absorção final total (MILIAUSKAS; VENSKUTONIS; VAN BEEK, 2004).

Tabela 4 – Atividade antioxidante dos extratos polar e apolar na fase 1, pelo método do DPPH*

Formulação	Proporções* ¹			% captação DPPH	
	x ₁	x ₂	x ₃	Extrato Polar	Extrato Apolar
1	1	0	0	80,8 ± 4,9	24,2 ± 8,8
2	0	1	0	88,6 ± 3,0	23,6 ± 1,8
3	0	0	1	48,1 ± 5,1	32,2 ± 0,6
4	½	½	0	88,9 ± 5,3	18,6 ± 2,6
5	½	0	½	68,5 ± 13,0	26,0 ± 4,8
6	0	½	½	72,1 ± 21,2	30,2 ± 4,4
7	⅓	⅓	⅓	79,3 ± 16,6	22,6 ± 1,6

*Resultados expressos como média ± DP das repetições

*¹ as colunas x₁, x₂ e x₃ indicam a proporção de azeite de oliva, manjerição e castanha do Brasil nas formulações, respectivamente.

Verifica-se que os compostos antioxidantes presentes no extrato polar (antioxidantes hidrofílicos, dentre eles os compostos fenólicos) são bem mais eficazes que os antioxidantes apolares, também referidos como lipofílicos (como os tocoferóis e carotenóides) na captação do radical. A captação média dos extratos apolares variou entre 18,6 e 32,2%, enquanto a captação média dos extratos polares variou entre 48,1 e 88,9%. Estes últimos também apresentaram desvios padrão superiores aos extratos apolares, sendo que as formulações 5,6 e 7, apresentaram os mais altos desvios. Nos apolares, a formulação 1 foi a que apresentou maior desvio.

A formulação 3, com maior proporção de castanha do Brasil, foi a que apresentou menor porcentagem média de captação do DPPH dentre os extratos polares, enquanto teve maior captação média entre os extratos apolares. Exatamente o inverso foi observado para a formulação 4, ponto de proporção equivalente entre manjerição e azeite de oliva.

Ainda pela Tabela 4, é possível observar para os extratos polares, em geral, que as porcentagens médias de captação das formulações com maior proporção de castanha

(formulações 3, 5 e 6) são inferiores às porcentagens médias de captação das formulações com maior proporção de azeite e manjerição (formulações 1,2 e 4). Isto pode ser uma indicação de que os antioxidantes hidrofílicos (como os compostos fenólicos) presentes no azeite e no manjerição sejam mais eficazes na captação de radicais livres do que os presentes na castanha. Observando-se os dados dos extratos apolares, nota-se o inverso. Portanto, os compostos lipossolúveis provenientes da castanha aparentemente são mais eficazes na captação de radicais livres do que os oriundos do azeite e do manjerição.

Pinilla et al. (2005) testaram a atividade antioxidante de variedades comerciais de uma espécie de sopa do mediterrâneo, chamada de “Gazpacho” (mistura de tomate, pepino, pimentão verde, cebola e alho). Foram testadas as frações lipofílica e hidrofílica e suas capacidades de captação do radical DPPH. Seus resultados foram condizentes com os deste trabalho, ou seja, a fração lipofílica da mistura (compostos apolares) apresentou atividade bastante inferior à hidrofílica (compostos polares) neste teste.

6.1.3 Inibição da oxidação lipídica - Sistema β -caroteno/ácido linoléico

O sistema β -caroteno/ácido linoléico é constituído por uma emulsão, sendo então considerado como um sistema aquoso-lipídico. Neste método a atividade antioxidante é avaliada pela capacidade do extrato ou antioxidante em inibir o processo de oxidação do sistema, fato indicado pela descoloração do β -caroteno.

Na Tabela 5 estão apresentados os resultados da porcentagem de inibição da oxidação lipídica do planejamento para os extratos polar e apolar, os quais foram utilizados para a modelagem estatística.

Tabela 5 – Atividade antioxidante dos extratos polar e apolar na fase 1, pelo sistema β -caroteno/ácido linoléico*

Formulação	Proporções ^{*1}			% Inibição da oxidação lipídica	
	x ₁	x ₂	x ₃	Extrato Polar	Extrato Apolar
1	1	0	0	66,5 ± 1,8	88,2 ± 1,8
2	0	1	0	68,1 ± 1,8	89,9 ± 1,3
3	0	0	1	65,5 ± 3,2	90,2 ± 0,8
4	½	½	0	66,3 ± 3,7	89,8 ± 0,3
5	½	0	½	63,4 ± 13,0	85,3 ± 3,7
6	0	½	½	64,3 ± 4,8	88,6 ± 3,4
7	⅓	⅓	⅓	64,5 ± 5,5	88,0 ± 1,0

*Resultados expressos como média ± DP

*¹as colunas x₁, x₂ e x₃ indicam a proporção de azeite de oliva, manjerição e castanha do Brasil nas formulações, respectivamente.

É notável que os valores de inibição da oxidação lipídica dos extratos apolares são superiores aos valores para o extrato polar, o contrário do que foi observado no método do DPPH. Já foi reportado na literatura que antioxidantes lipofílicos apresentam maior atividade antioxidante em emulsões (MOURE et al., 2001).

Para ambos os extratos, não foi possível observar nenhuma tendência clara na dispersão dos dados entre as diferentes formulações, indicando aparentemente que nenhum dos componentes teve influência superior aos outros no resultado. O extrato polar da formulação 5 foi o que apresentou maior desvio padrão, enquanto que para os extratos apolares todos os desvios foram baixos, sendo que as formulações 5 e 6 apresentaram os maiores valores de desvio.

Goupy et al. (1999) isolaram compostos com atividade antioxidante de malte e cevada, e mostraram que os tocoferóis (α , β e δ -tocoferol) presentes no extrato de baixa polaridade são mais eficazes na inibição da oxidação lipídica que os compostos fenólicos. Enquanto os

compostos fenólicos apresentaram entre 12 e 65% de inibição, os tocoferóis ficaram acima de 90%.

6.1.4 Análise estatística dos resultados

Os dados foram então tratados conforme descrito no item 5.2.2.1 (APÊNDICE B). Procurou-se determinar um modelo estatístico que explicasse a variação dos dados para cada teste de atividade antioxidante e polaridade de extrato, para que se procedesse a otimização da formulação, caso fossem obtidos modelos representativos. As restrições determinadas no item 5.2.2.5 foram levadas em consideração para a adequação dos modelos.

O valor de p indica a significância do modelo ajustado, isto é, a chance de se errar caso seja aceito que os valores obtidos no modelo são verdadeiros. Um valor de p acima de 0,05 indica que não há evidências estatísticas (a um nível de 95% de confiança) para se afirmar que no modelo linear o β_i , no modelo quadrático o β_{ij} e no modelo cúbico especial o β_{123} da equação (2) (item 5.2.2.1) sejam diferentes de zero (CORNELL, 1990).

A falta de ajuste sugere um tipo diferente de aproximação para se determinar um modelo apropriado, indicando se o modelo obtido é adequado ou não para as respostas obtidas. Esta aproximação admite inicialmente que as suposições de normalidade, independência e variância constante dos erros são válidas. Caso o valor da falta de ajuste seja inferior a 0,05 (indicando 95% de confiança), pode-se considerar que há evidências estatísticas suficientes para afirmar que o modelo não está bem ajustado aos dados (CORNELL, 1990).

O R^2 é chamado de coeficiente de determinação do modelo, e tem seu valor máximo igual a 1. Ele indica a porcentagem da variação do resultado explicada pelo modelo, e quanto mais próximo de 1 estiver o valor de R^2 , melhor terá sido o ajuste às respostas observadas (BARROS-NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2003).

Tendo esses três parâmetros em vista, na procura por um modelo que se ajustasse adequadamente aos dados, realizou-se a análise de variância, e foram obtidos os resultados apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 – Resultados da ANOVA para os modelos ajustados aos dados.

Teste	Extrato	Modelo	<i>p</i>	Falta de ajuste	R ² ajustado
DPPH	Polar	<i>linear</i>	<i>0,011</i>	<i>0,917</i>	<i>0,518</i>
		quadrático	0,686	0,871	0,444
		cúbico especial	0,694	0,794	0,380
	Apolar	linear	0,064	0,617	0,300
		quadrático	0,247	0,744	0,410
		cúbico especial	0,419	0,720	0,389
Sistema β-caroteno/ác. linoléico	Polar	linear	0,876	0,596	-
		quadrático	0,845	0,409	-
		cúbico especial	0,606	0,326	-
	Apolar	<i>linear</i>	<i>0,004</i>	<i>0,277</i>	<i>0,723</i>
		quadrático	0,258	0,310	0,763
		cúbico especial	0,339	0,288	0,765

A análise estatística no planejamento identificou a total ausência de interação entre os ingredientes, em todos os modelos gerados. Isso ficou evidenciado pelos valores de *p* maiores que 0,05 para todos os ajustes quadráticos e cúbicos especiais. Também não foi identificada nenhuma falta de ajuste significativa, fato indicado pelos valores acima de 0,05 na tabela, o que mostra que as suposições de normalidade e variância constante dos erros foi adequada. Foram gerados dois modelos lineares estatisticamente significativos (realçados na tabela), para o teste DPPH com o extrato polar (*p*=0,011) e para o teste do sistema β-caroteno/ác. linoléico com o extrato apolar (*p*=0,004). Os coeficientes de determinação dos modelos (R² –

porcentagem da variação do resultado explicada pelo modelo) ficaram, em todos os casos, abaixo de 0,8, isto é, abaixo do considerado satisfatório (segundo as premissas estabelecidas no trabalho).

As condições de trabalho foram controladas, desde o manuseio das matérias primas, preparo das formulações e reagentes, até a execução dos testes, além do que os métodos utilizados apresentam resultados confiáveis. Isso indica que grande parte dos resultados obtidos foi produto de fatores aleatórios intrínsecos aos alimentos utilizados, e que os modelos não explicam adequadamente a variação dos resultados. Ainda assim, procedemos às análises dos resultados obtidos.

O modelo linear significativo gerado para o extrato polar no método do DPPH pode ser representado pela equação do plano (3):

$$\hat{y}(\%captção) = \underset{(\pm 8,0)}{81,8} \cdot x_1 + \underset{(\pm 6,7)}{93,2} \cdot x_2 + \underset{(\pm 6,9)}{55,0} \cdot x_3 \quad (3)$$

Novamente, x_1 , x_2 e x_3 indicam a proporção de azeite de oliva, manjerição e castanha do Brasil nas formulações, respectivamente. A representação gráfica da equação (3) pode ser visualizada nas Figuras 9 e 10. Esta equação indica que caso fosse preparada uma formulação no ponto de máxima proporção de azeite, o resultado esperado da porcentagem de captação do radical DPPH seria de 81,7%. Se fosse preparada no ponto de máxima proporção de manjerição, 93,2% e no ponto de máxima proporção de castanha, 55,0%.

Figura 9. Contornos da superfície de resposta do modelo ajustado para o extrato polar no método do DPPH.

Figura 10. Superfície de resposta para o extrato polar no método do DPPH.

Apesar de representar apenas 51,8% da variação dos dados, verificou-se pelo modelo que neste método a maior contribuição para a atividade antioxidante do molho foi devida aos compostos hidrofílicos (como os compostos fenólicos) presentes no manjericão. Os compostos hidrofílicos presentes no azeite de oliva também tiveram forte contribuição na captação de radicais livres, enquanto os da castanha do Brasil apresentaram uma participação inferior aos outros dois.

Analisando-se a estrutura dos principais compostos fenólicos presentes no manjericão e no azeite de oliva (Figura 1 e Figura 2), percebe-se que o ácido rosmarínico possui 2 hidroxilas ligadas a um anel aromático a mais que o hidroxitirosol. Isto pode ser um indicador da razão do maior poder de doação de prótons do manjericão, em relação ao azeite de oliva, já que o número de moléculas de DPPH que são reduzidas está relacionado com o número de hidroxilas disponíveis (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995). Não foram encontrados na literatura dados que identifiquem os principais compostos fenólicos da castanha do Brasil, mas pode-se observar pelo modelo (3) que eles são menos eficazes que os compostos presentes no manjericão e no azeite.

Para o extrato apolar, ainda no método do DPPH, o modelo linear aproximou-se de ser estatisticamente significativo ($p=0,064$), porém seu R^2 foi ainda inferior ao do modelo obtido para o extrato polar, representando apenas 30% da variação dos dados. Isto é, 70% da variação dos dados seriam explicáveis por fatores aleatórios. Isso significa que o resultado poderia ser expresso por uma constante independente da composição da mistura. Esta constante tem o valor de $25,5\% \pm 5,0\%$ (média $\pm$ DP; IC(95%)=[19,8%; 31,1%]).

Para o sistema β -caroteno/ác. Linoléico, o extrato polar não gerou um modelo que pudesse explicar a variação dos dados. Esta foi gerada em sua totalidade por fatores aleatórios, visto que o R^2 foi nulo. Portanto, o resultado pode ser expresso por uma constante independente da composição da mistura, cujo valor é $65,3\% \pm 5,0\%$ (média $\pm$ DP; IC(95%)=[56,9%; 71,0%]).

Isto é uma indicação de que os compostos polares (como os polifenóis) presentes no manjerição, no azeite e na castanha apresentam atividade similar numa emulsão, quando protegendo um substrato lipídico da oxidação.

Já para o extrato apolar, observou-se um fenômeno similar ao que ocorreu para o extrato polar no método do DPPH: obteve-se um modelo linear estatisticamente significativo, porém o valor do R^2 ficou novamente abaixo do considerado satisfatório, segundo as premissas estabelecidas no trabalho (Tabela 6). O modelo linear obtido encontra-se representado na equação (4). A representação gráfica da equação (4) pode ser visualizada nas Figuras 11 e 12.

$$\hat{y}(\%IOL) = 85,0 \underset{(\pm 0,8)}{.x_1} + 90,3 \underset{(\pm 0,7)}{.x_2} + 88,0 \underset{(\pm 0,7)}{.x_3} \quad (4)$$

Esta equação indica que caso fosse preparada uma formulação no ponto de máxima proporção de azeite, o resultado esperado da porcentagem inibição da oxidação lipídica seria de 85,0%. Se fosse preparada no ponto de máxima proporção de manjerição, 90,3% e de castanha, 88,0%.

Figura 11. Contornos da superfície de resposta do modelo ajustado para o extrato apolar no sistema β -caroteno/ácido linoléico

Figura 12. Superfície de resposta para o extrato apolar no sistema β -caroteno/ácido linoléico

O modelo representou 72,3% da variação dos dados, e indicou que neste método os compostos que mais contribuíram para a atividade antioxidante do molho foram os presentes no extrato apolar do manjeriço. Entretanto, a contribuição para o resultado dos três componentes foi bastante similar, todas acima de 80%. Diferentes indutores, como oxigênio, luz e calor podem ter interferido neste ensaio, portanto o resultado deve ser interpretado com cautela (SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999).

Os compostos voláteis apresentam atividade antioxidante, e eles estão presentes na fração lipofílica do manjeriço (LEE; SHIBAMOTO, 2002), enquanto no azeite e na castanha, que são matrizes essencialmente lipídicas, seus compostos lipofílicos são principalmente os tocoferóis e alguns carotenóides.

6.1.5 Análise Sensorial

Muito se tem discutido a respeito das propriedades sensoriais dos alimentos e como avaliá-las adequadamente. Segundo o Institute of Food Technologists (1981), existem duas linhas básicas na condução de ensaios sensoriais: (1) testes afetivos para avaliação da aceitabilidade ou preferência; (2) testes discriminativos para identificar diferenças entre atributos de vários produtos (INSTITUTE OF FOOD TECHNOLOGISTS, 1981).

Os testes afetivos são utilizados quando se necessita conhecer o “*status* afetivo” dos consumidores com relação ao produto, e para isso existem algumas ferramentas disponíveis, tais como as escalas hedônicas. Dos valores relativos de aceitabilidade é possível determinar a preferência, ou seja, as amostras melhores aceitas podem ser consideradas as mais preferidas. Pode-se avaliar tanto a aceitação global, ou seja, o produto como um todo, como a aceitação de atributos específicos do produto (cor, aroma, sabor) (MEILGAARD; CIVILLE; CARR, 1991).

Nenhum dos dois modelos (equações (3) e (4) do item anterior) obtidos foi considerado satisfatório, conforme os padrões estatísticos pré-estabelecidos, por isso não foi possível que se realizasse a otimização da formulação. Contudo, os modelos puderam indicar o manjericão como sendo o ingrediente de maior contribuição para a atividade antioxidante, tanto na captação de radicais livres, como na proteção de um substrato lipídico numa emulsão. Dessa forma, a formulação do molho Pesto a ser considerada para a continuidade do trabalho seria aquela com a maior quantidade de manjericão na preparação e que fosse sensorialmente aceita.

No limite da região de variação do manjericão (ponto (0,1,0) do modelo; formulação 2 na Tabela 3) teríamos uma formulação final com 55% (em massa) de manjericão. Entretanto, esta quantidade de manjericão iria descaracterizar o molho do ponto de vista sensorial, de modo que não foi considerado para a avaliação sensorial.

Foram então elaboradas 3 opções de molho na região de crescimento da proporção de manjericão, correspondentes aos pontos (0,20, 0,60, 0,20), (0,15, 0,70, 0,15) e (0,10, 0,80, 0,10), indicadas na Tabela 7, para se testar o limite de manjericão aceito sensorialmente. Participaram da análise 50 provadores que experimentaram em ordem aleatória as três opções de molho.

Tabela 7 – Quantidade (g) dos ingredientes nas formulações testadas sensorialmente

Formulação	Total na formulação (g)		
	Azeite	Manjericão	Castanha
(0,20, 0,60, 0,20)	8	24	8
(0,15, 0,70, 0,15)	6	28	6
(0,10, 0,80, 0,10)	4	32	4

Devido a dificuldades operacionais em servir o molho com macarrão, principalmente no controle da temperatura do alimento, a formulação foi servida com biscoitos de “água e sal”, adquiridos em mercado local. Juntamente às amostras, foi servido um copo de água. Os provadores foram instruídos quanto à forma de procedimento na avaliação, e prontamente atendidos caso tivessem qualquer dúvida.

A população que participou da análise sensorial foi predominantemente feminina (82%), com idade entre 18 e 34 anos (58%) e conhecia o molho Pesto (52%) anteriormente à análise. 50% dos provadores não sabiam se gostavam do produto (enquanto 48% gostavam). Os resultados da análise estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 – Resultados (média $\pm$ DP) da análise sensorial

Formulação	Resultado
(0,20, 0,60, 0,20)	7,65 $\pm$ 1,15 ^a
(0,15, 0,70, 0,15)	7,41 $\pm$ 1,22 ^a
(0,10, 0,80, 0,10)	7,42 $\pm$ 1,26 ^a

*Letras iguais na coluna indicam ausência de diferença estatisticamente significativa.

Verifica-se que as três preparações apresentaram valores de aceitação considerados altos (valores entre 7 e 8, correspondentes a “gostei regularmente” e “gostei muito”, respectivamente). Pela ANOVA, não foi encontrada diferença estatística significativa entre os resultados de aceitação dos molhos, portanto foi considerada final a formulação equivalente ao ponto (0,10, 0,80, 0,10) (Tabela 9), preparação que possuía maior quantidade de manjericão entre as testadas.

Tabela 9 – Quantidade dos ingredientes na formulação final

Ingrediente	Massa (g)
Alho	3
Manjericão	47
Azeite	24
Castanha	14
Queijo	10
Sal	2
Total	100

6.2 Fase 2

6.2.1 Preparo das formulações e extração

O manjericão utilizado nas formulações desta fase do projeto foi adquirido no dia anterior ao preparo, no mesmo local onde foi adquirido para a execução da fase 1. Os outros ingredientes estavam armazenados sob refrigeração (exceto o azeite de oliva).

No mesmo dia, três repetições da formulação final (Tabela 9) foram preparadas, e em seguida amostras foram submetidas ao processo de extração dos compostos com AA, segundo metodologia descrita no item 5.2.1.1.

6.2.2 Composição centesimal

As amostras foram inicialmente colocadas em estufa para a determinação da umidade do alimento. O teor de proteínas e lipídios foi determinado a partir da amostra seca. O teor de fibra alimentar total foi determinado a partir da amostra seca desengordurada. O teor de cinzas foi determinado a partir da amostra integral.

A Tabela 10 foi construída de acordo com o formato da Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, 1998), e apresenta a composição centesimal da preparação final do molho Pesto, determinada na Fase 1 do projeto.

Dos resultados obtidos (Tabela 10) observa-se que o molho apresentou um teor de umidade de 47%, um teor de proteínas de 7%, e 33% de lipídios. O molho tipo Pesto é um alimento de alta densidade energética, devido ao seu alto conteúdo de lipídios, e pode ser considerado como fonte de fibras, pois possui acima de 3g de fibras totais a cada 100g de alimento (BRASIL, 1998).

Tabela 10 – Composição centesimal (média $\pm$ DP) da formulação final do molho Pesto

Composição centesimal	Valor por 100g
Umidade (g)	47,35 $\pm$ 0,33
Energia (kcal)	342
Energia (kJ)	1429
Proteínas (g)	7,13 $\pm$ 0,69
Lipídios totais (g)	33,26 $\pm$ 0,53
Carboidratos totais (g)	7,90
Carboidratos “disponíveis” (g)	3,51
Cinzas (g)	4,36 $\pm$ 0,23
Fibra alimentar total (g)	4,39 $\pm$ 0,38

Carboidratos disponíveis foram calculados por diferença. Exclui também a fração fibra alimentar (100g - gramas totais de umidade, proteína, lipídios, cinzas e fibra alimentar); Resultados em base úmida.

Disponíveis no mercado, existem molhos Pesto prontos para o consumo. Um desses molhos prontos apresentou a seguinte composição centesimal: 28% de umidade, 52% de lipídios, 5% de proteínas e apenas 1,61% de fibra alimentar total. Possui uma densidade energética maior que a do molho estudado, de 531kcal a cada 100g do alimento

(UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, 1998). Comparativamente, o molho comercial possui uma formulação diferente da desenvolvida nesse projeto, com uma maior proporção de azeite em sua composição.

Em pesquisa na Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, 1998), encontra-se que um molho de tomate tradicional possui um teor de umidade bastante superior ao do molho Pesto, correspondente a aproximadamente 85% de sua composição centesimal. Possui menos proteínas, lipídios e cinzas (1,6, 1,2 e 1%, respectivamente), porém contém mais fibra alimentar total e carboidratos (5 e 10%, respectivamente). Já um molho à bolonhesa (molho de tomate com carne moída) tem características próximas às do molho de tomate, contendo um menor teor de fibra alimentar total (3%) e maior de proteínas (4%). Portanto, ao substituir-se o molho de tomate, tradicional acompanhamento de massas, pelo molho Pesto, a composição de nutrientes fornecida na alimentação será diferente qualitativa e quantitativamente.

6.2.3 Quantificação dos compostos fenólicos totais

A atividade antioxidante de compostos fenólicos é principalmente devida às suas propriedades de óxido-redução, que podem desempenhar papel fundamental na absorção e neutralização de radicais livres, como quelantes de oxigênio singlete e metais ou decompondo peróxidos (NAWAR, 1996; ZHENG; WANG, 2001).

A correlação do teor de fenólicos totais com a atividade antioxidante já foi apresentada em diversos trabalhos, sendo que muitas vezes uma correlação positiva foi estabelecida (CHANWITHEESUK; TEERAWUTGULRAG; RAKARIYATHAM, 2005; JAVANMARDI et al., 2003; SAURA-CALIXTO; GOÑI, 2006; ZHENG; WANG, 2001) enquanto em outros casos esta correlação não foi encontrada (PAREJO et al., 2003; SALDANHA, 2005).

O teor de fenólicos totais nos extratos foi determinado de acordo com a curva padrão construída com concentrações conhecidas de ácido gálico (Figura 13). Os extratos polares tiveram de ser diluídos em quatro vezes para que a realização das leituras fosse possível. Os resultados estão apresentados na Tabela 11.

Figura 13. Curva padrão do Ácido Gálico

Tabela 11 – Teor de fenólicos totais dos extratos, expresso em (a) mg de equivalente de ácido gálico (mgEAG) por mL de extrato e (b) em mgEAG por 100g de amostra.

Repetição	Extrato ^a		Molho ^b
	Polar	Apolar*	
A	0,135	ND	134,4
B	0,148	ND	147,9
C	0,140	ND	139,2
Média ± DP	0,141 ± 0,006	-	140,5 ± 6,8

*ND – Não detectado

O extrato polar do molho apresentou 0,141mg de equivalente de ácido gálico a cada mL de extrato (mgEAG/mL), e 140,5mgEAG a cada 100g do alimento pronto. Para o extrato apolar não foi possível determinar o teor de fenólicos totais, pois a solução ficou turva durante

o tempo de repouso no banho a 37°C. Isto pode ter ocorrido pelo fato de o método ser executado em meio aquoso, enquanto que os compostos dissolvidos no extrato apolar são lipossolúveis, ou seja, insolúveis em água.

Borguini (2006), no estudo da diferença entre tomates de cultivo convencional e orgânico e seus produtos, determinou o teor de fenólicos totais do molho de tomate. Mostrou que o molho de tomate convencional possui aproximadamente 220mgEAG a cada 100g de produto, enquanto o molho feito a partir do tomate orgânico apresenta aproximadamente 330mgEAG por 100g de produto.

6.2.4 Avaliação da atividade antioxidante

Wu et al. (2004) desenvolveram um estudo preliminar para a criação de um banco de dados constando da atividade antioxidante total e das frações lipofílica e hidrofílica em uma série de mais de 100 tipos de alimentos. Em seu trabalho constam diversas frutas, legumes, verduras, nozes, frutas secas, temperos e cereais, além de alguns alimentos prontos para o consumo. Nota-se que a disponibilidade de produtos que possuem atividade antioxidante é grande, e a combinação deles pode prover na dieta uma quantidade significativa de antioxidantes naturais.

6.2.4.1 Captação de radicais livres - Método DPPH

Na Tabela 12 estão apresentados os resultados da porcentagem de captação do DPPH para as três repetições dos extratos de diferentes polaridades.

Pela proporção da formulação final e pela equação do modelo (3), o resultado esperado para o extrato polar neste teste seria de 88,2%. O resultado obtido foi de $85,9 \pm 2,3\%$ ($IC(95\%)=[83,5\%; 88,4\%]$). Como o valor esperado está contido dentro do intervalo de

confiança, pode-se afirmar que não há diferença estatisticamente significativa entre os resultados ($p=0,062$), ou seja, o modelo obtido na fase 1 pôde prever o resultado obtido, apesar de ter sido considerado inadequado (por representar apenas 51,8% da variação dos dados).

Tabela 12 – Porcentagens de captação do DPPH dos extratos polar e apolar, na Fase 2.

Repetição	Extrato	
	Polar	Apolar
A	87,6	15,1
B	87,1	19,0
C	83,1	18,9
Média $\pm$ DP	85,9 $\pm$ 2,3	17,7 $\pm$ 5,3

O padrão (BHT) apresentou captação de 94,4% do radical, na mesma concentração dos extratos.

Já no extrato apolar, os compostos lipossolúveis foram capazes de captar $17,7 \pm 5,3\%$ do radical livre ($IC(95\%)=[12,1\%; 23,3\%]$). Na fase 1 não foi possível que um modelo para esse extrato fosse determinado, e chegou-se à conclusão que qualquer proporção utilizada para se preparar o molho Pesto teria uma captação de $25,5\% \pm 5,0\%$ ($IC(95\%)=[19,8\%; 31,1\%]$). Verifica-se que existe uma intersecção entre os dois intervalos obtidos, portanto não se pode dizer que há uma diferença estatisticamente significativa. Ou seja, o resultado obtido está dentro daquilo se esperava pelo resultado da fase 1.

A avaliação da capacidade de captação de radicais livres pelo método do DPPH em extratos de diferentes polaridades de molho de tomate foi testada por Borguini (2006) pela mesma metodologia utilizada neste projeto. A concentração trabalhada foi de 0,2mg/mL, e os resultados mostraram que os extratos apolares (etéreo) apresentaram uma porcentagem de captação do DPPH maior do que os extratos polares (etanólico e aquoso). Esse resultado foi

justificado pela grande presença de licopeno (composto lipossolúvel) no tomate. Ainda assim, os extratos apolares apresentaram entre 16 e 24% de captação do DPPH. Os extratos polares apresentaram entre 11 e 18% (etanólico) e 7 e 17% (aquoso). Como o método do DPPH é dose-dependente fica difícil fazer uma comparação com os resultados obtidos neste trabalho (Tabela 12), embora eles aparentemente sejam superiores para o extrato polar e inferiores para o extrato apolar.

Arnao, Cano e Acosta (2001) utilizaram o método enzimático de descoloração do ABTS/H₂O₂/HRP para avaliar a atividade antioxidante das frações hidrofílica e lipofílica de três tipos de sopas de legumes diferentes (contendo apenas ingredientes naturais): “Gazpacho” (mistura de tomate, pepino, cebola, pimentão, alho, água, azeite de oliva, vinagre, sal e suco de limão), sopa de tomate (tomate misturado com azeite de oliva, sal e suco de limão) e uma sopa denominada “sopa dos sete legumes” (mistura de tomate, cenoura, aipo, cebola, pimentão, pepino e alho, água, azeite de oliva, vinagre, sal, suco de limão e condimentos). Este método baseia-se na capacidade de diferentes componentes em seqüestrar o radical catiônico ABTS (ABTS^{•+}). Da capacidade antioxidante da fração hidrofílica de cada amostra, 53% para o “Gazpacho”, 67% para a sopa de tomate e 93% para a “sopa dos sete legumes” foi devida a outros compostos que não o ácido ascórbico (dentre eles os compostos fenólicos). Para as três amostras a fração hidrofílica apresentou atividade superior à fração lipofílica na capacidade total de seqüestrar o radical (67, 80 e 64%, respectivamente).

As figuras 14 e 15 apresentam o comportamento cinético da captação do DPPH para os extratos, durante os 30 minutos de ensaio, em comparação com o padrão (BHT). Verifica-se que para o extrato polar a queda inicial de absorbância é mais acentuada do que para o padrão, mas este último estabiliza-se num patamar inferior, ou seja, consegue captar mais radicais livres que os compostos hidrossolúveis presentes no extrato polar (94% para o padrão contra

86% do extrato). O mesmo não é observado para o extrato apolar, já que a queda de absorbância do extrato é menor que a do padrão.

Figura 14. Curva cinética do potencial antioxidante dos extratos polares em relação à captação do DPPH, para as repetições (A, B e C), a média e o padrão, na fase 2.

Figura 15. Curva cinética do potencial antioxidante dos extratos apolares em relação à captação do DPPH, para as repetições (A, B e C), a média e o padrão, na fase 2.

Mensor et al. (2001) testaram extratos de diferentes polaridades de diversas plantas brasileiras pelo método do DPPH, e observaram que extratos de maior polaridade tendem a possuir uma maior capacidade de captação do radical livre. Os autores concluíram que a polaridade dos solventes utilizados influenciou diretamente na atividade antioxidante dos extratos.

6.2.4.2 Inibição da oxidação lipídica - Sistema β -caroteno / ácido linoléico

Na Tabela 13 estão apresentados os resultados da porcentagem de inibição da oxidação lipídica pelo sistema β -caroteno/ácido linoléico para as três repetições dos extratos de diferentes polaridades. Neste sistema, o extrato polar apresentou atividade inferior ao extrato apolar ($p=0,007$).

Tabela 13 – Porcentagem de inibição da oxidação lipídica dos extratos polar e apolar, na fase 2.

Repetição	Extrato	
	Polar	Apolar
A	56,3	84,2
B	68,6	83,4
C	67,4	84,5
Média $\pm$ DP	64,1 $\pm$ 9,0	84,0 $\pm$ 1,1

O padrão (BHT) apresentou %IOL de 93,4%, na mesma concentração dos extratos.

Na fase 1 do projeto, para o extrato polar neste sistema foi encontrada dificuldade similar ao extrato apolar para o método do DPPH: não foi obtido um modelo adequado que pudesse descrever adequadamente a variação dos dados. Desse modo, chegou-se à conclusão que qualquer proporção utilizada para se preparar o molho Pesto produziria um resultado dentro

do intervalo calculado ($65,3\% \pm 5,0\%$; $IC(95\%)=[56,9\%; 71,0\%]$). A formulação final apresentou capacidade de inibição de $64,1\% \pm 9,0\%$ ($IC(95\%)=[54,6\%; 73,6\%]$). Nota-se que os dois intervalos são bastante similares, portanto não se pode dizer que há uma diferença estatisticamente significativa entre os resultados obtidos nas duas fases. Ou seja, o resultado da inibição da oxidação lipídica da formulação final esteve dentro daquilo se esperava pelo resultado da fase 1.

Já para o extrato apolar, na fase 1 foi obtido o modelo (4) estatisticamente significativo, porém também foi considerado inadequado, pois representava apenas aproximadamente 72% da variação dos dados. Segundo o modelo, a inibição da oxidação lipídica esperada para a formulação final seria de 89,5%. A obtida, no entanto, foi de $84,0 \pm 1,1\%$ ($IC(95\%)=[82,8\%; 85,2\%]$), valor menor que o esperado ($p<0,001$). Portanto, o modelo (4), que dentre os obtidos na fase 1 possuía menor valor de p e maior valor de R^2 , não previu adequadamente o resultado na fase 2, resultado atribuído a fatores aleatórios dos alimentos utilizados.

A inibição da oxidação lipídica pelo sistema β -caroteno/ácido linoléico em extratos de diferentes polaridades obtidos de molho de tomate foi testada por Borguini (2006). A concentração de $25\mu\text{g/mL}$ foi utilizada para o extrato apolar, já que concentrações acima desta apresentaram efeito pró-oxidante no sistema. Este extrato apresentou entre 8 e 20% de inibição da oxidação lipídica, valores bastante inferiores aos obtidos para a formulação final do molho Pesto. O licopeno concentra-se no extrato apolar, mas é conhecido principalmente por sua capacidade de sequestrar radicais livres, justificativa utilizada para seu fraco desempenho neste sistema. Já com os extratos polares (etanólico e aquoso), a mesma autora trabalhou numa concentração de $0,5\text{mg/mL}$, a mesma utilizada no presente trabalho. Foram obtidas inibições entre 30 e 40%, valores inferiores aos obtidos com a formulação final (média de 64%).

As figuras 16 e 17 representam o comportamento cinético dos extratos de diferentes polaridades, durante os 120 minutos de ensaio, em comparação com o padrão (BHT).

Figura 16. Curva cinética do potencial antioxidante dos extratos polares em relação à inibição da oxidação lipídica pelo sistema β -caroteno/ácido linoléico, para as repetições (A, B e C), a média e o padrão, na fase 2.

Figura 17. Curva cinética do potencial antioxidante dos extratos apolares em relação à inibição da oxidação lipídica pelo sistema β -caroteno/ácido linoléico, para as repetições (A, B e C), a média e o padrão, na fase 2.

Verifica-se para o extrato polar (figura 16) que a queda de absorbância é mais acentuada do que para o padrão, ou seja, o extrato não consegue ser tão eficaz quanto o padrão na inibição da oxidação do ácido linoléico. Já para o extrato apolar (figura 17) essa diferença é menor, isto é, o comportamento do padrão é superior ao do extrato ($p < 0,001$), conseguindo inibir 93% contra 84% do extrato.

6.2.4.3 Método do poder redutor

O método do poder redutor determina a capacidade de compostos em doar elétrons, convertendo assim radicais livres em produtos estáveis. Durante a reação, o ferricianeto ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$) é reduzido a ferricianato ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$), que por sua vez reage com os íons férricos presentes na solução produzindo uma cor esverdeada. Conforme o aumento da capacidade dos compostos em doar elétrons para que a reação de redução ocorra, a solução fica mais escura. Portanto, o aumento na absorbância indica maior potencial redutor do extrato (YEN; CHEN, 1995). O poder redutor dos extratos de diferentes polaridades foi testado e avaliado através do gráfico apresentado na Figura 18.

O gráfico indica que o extrato polar apresentou poder redutor, evidenciado pelo aumento na absorbância com o aumento na concentração do extrato. Já o extrato apolar apresentou um menor poder redutor, pois o aumento na absorbância foi muito pequeno com a variação na concentração do extrato. Dessa forma, pode-se inferir que os compostos hidrossolúveis presentes nos componentes do molho Pesto são melhores doadores de elétrons que os compostos lipossolúveis ($p < 0,001$).

Figura 18. Poder redutor dos extratos polar e apolar.

A Tabela 14 apresenta os resultados de cada repetição e suas respectivas médias, que foram utilizados na construção do gráfico (Figura 18).

Tabela 14 – Poder redutor dos extratos polar e apolar, na fase 2

Extrato	Repetição	Concentração (µg/mL)		
		300	500	800
Polar	A	0,137	0,184	0,254
	B	0,152	0,204	0,308
	C	0,147	0,192	0,276
	Média ± DP	0,145 ^{aA} ± 0,008	0,193 ^{aB} ± 0,010	0,279 ^{aC} ± 0,027
Apolar	A	0,104	0,116	0,119
	B	0,099	0,114	0,117
	C	0,099	0,106	0,129
	Média ± DP	0,101 ^{bA} ± 0,003	0,112 ^{bA} ± 0,005	0,122 ^{bA} ± 0,006

Letras diferentes minúsculas na coluna e maiúsculas na linha indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Como descrito anteriormente, o método do DPPH demonstrou que os componentes hidrossolúveis são melhores doadores de prótons que os lipossolúveis. Portanto, a capacidade de captação de radicais livres, tanto por doação de prótons como de elétrons dos compostos hidrossolúveis presentes nos componentes do molho Pesto é superior a dos lipossolúveis.

6.2.4.4 Ensaio em meio lipídico (Rancimat[®])

A estabilidade oxidativa é um parâmetro importante para a determinação da qualidade de óleos e gorduras. O aparelho Rancimat[®] expõe a gordura a um fluxo contínuo de ar e altas temperaturas, e o progresso da curva de oxidação lipídica pode ser acompanhado pela determinação periódica dos peróxidos formados. A curva consiste numa fase de indução, em que praticamente não há formação de produtos secundários, e na fase de oxidação, na qual ocorre um grande aumento na detecção do valor de peroxidação e formação de compostos voláteis (principalmente ácido fórmico). Estes compostos ficam retidos na água deionizada, que tem sua condutividade determinada. A curva da condutividade elétrica da água pelo tempo determina, no ponto de intersecção entre as duas paralelas traçadas respectivas às duas fases do processo, o tempo de indução ou índice de estabilidade oxidativa (LAUBLI; BRUTTEL, 1986).

Um antioxidante adicionado à gordura pode aumentar o tempo de indução da oxidação da amostra, desse modo o índice de atividade antioxidante (IAA – razão entre o tempo de indução da amostra sem antioxidante pelo tempo de indução da amostra com antioxidantes) é um indicador da capacidade de proteção do meio lipídico à oxidação.

Os extratos de diferentes polaridades foram testados neste método e os resultados do índice de atividade antioxidante dos extratos estão apresentados na Tabela 15. O resultado também pode ser visualizado na Figura 19, na qual fica facilmente notável que não houve diferença estatisticamente significativa entre o índice obtido para os dois extratos.

Tabela 15 – Índice de atividade antioxidante (IAA) dos extratos polar e apolar, na fase 2

Repetição	Extrato	
	Polar	Apolar
A	1,10	1,20
B	1,25	1,24
C	1,02	1,23
Média ± DP	1,12 ^a ± 0,14	1,22 ^a ± 0,04

Letras diferentes na última linha indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$);
O padrão (BHT) apresentou IAA=3,5.

Figura 19. Índice de Atividade Antioxidante (IAA) dos extratos polar e apolar, na fase 2

Os resultados mostram que os dois extratos tiveram um tempo de indução superior ao controle, isto é, ambos protegeram a gordura da oxidação ($p=0,043$ para o extrato polar e $p<0,001$ para o apolar). Na média, o índice de atividade antioxidante do extrato apolar foi superior ao do polar, porém não houve diferença estatisticamente significativa entre os dois extratos ($p=0,218$), ou seja, tanto os compostos hidrossolúveis quanto os compostos

lipossolúveis puderam proteger igualmente o substrato da oxidação. Essa ausência de diferença se deu pela grande variação nos resultados do extrato polar. Ambos os extratos apresentaram IAA inferior ao padrão.

Neste sistema, esperava-se um resultado superior dos compostos hidrofílicos sobre os lipofílicos, sendo relatado na literatura o bom comportamento de compostos fenólicos na proteção de óleos e gorduras, superior aos tocoferóis e carotenóides (BALDIOLI et al., 1996; APARICIO et al., 1999; MOURE et al., 2001; PIZZALE et al., 2002).

7 Conclusões

- » Em relação à atividade antioxidante, não foi identificada nenhuma interação entre os compostos hidrossolúveis presentes nos ingredientes que compõe o molho Pesto. O mesmo ocorreu com os compostos lipossolúveis;
- » O efeito aditivo dos componentes também não foi claramente observado, pois as análises das amostras apresentaram altos desvios padrão. Conclui-se que os resultados foram produtos de fatores aleatórios intrínsecos aos alimentos utilizados, e que os modelos determinados não explicam adequadamente a variação dos resultados. Somente tendências puderam ser determinadas;
- » O manjerição foi identificado como o ingrediente com maior contribuição para a atividade antioxidante total do molho Pesto, tanto na fase polar, quanto na fase apolar. Na fase polar, a atividade antioxidante foi atribuída principalmente aos compostos fenólicos, enquanto que na fase apolar, aos seus compostos voláteis;
- » A formulação final do trabalho, aceita sensorialmente, possui (em 100g): 47g de manjerição, 14g de castanha do Brasil, 24g de azeite de oliva, 10g de queijo parmesão, 3g de alho e 2g de sal;
- » O extrato polar apresentou atividade antioxidante superior ao extrato apolar nos testes de captação do radical livre (método do DPPH e teste do poder redutor). Já o extrato apolar foi superior na inibição da oxidação lipídica (sistema β -caroteno/ácido linoléico). No ensaio em meio lipídico (pelo aparelho Rancimat[®]) não houve diferença entre os dois

extratos. Em todos os casos, o antioxidante sintético apresentou atividade antioxidante superior aos extratos;

- » No extrato polar determinou-se o teor de fenólicos totais, sendo atribuída a estes, principalmente, a atividade antioxidante desta fase. Já no extrato apolar não foi possível determinar o teor de fenólicos, e sua atividade antioxidante foi atribuída aos compostos voláteis do manjericão e tocoferóis e carotenóides da castanha e do azeite.
- » A formulação final pode ser considerada como uma boa fonte de lipídios. Além de possuir compostos antioxidantes naturais, pode ser considerada como fonte de fibras. Assim, a formulação de molho Pesto proposto neste trabalho pode representar uma boa opção dentro de uma dieta saudável.

8 Considerações Finais

Neste trabalho, verificou-se a ausência de interação entre os ingredientes na atividade antioxidante do molho Pesto, ficando também difícil de visualizar o efeito aditivo entre os compostos. Uma matriz complexa, como um alimento em sua totalidade, está sujeito a fatores aleatórios, e normalmente possui grande variabilidade. Ao se misturar uma série de matrizes complexas, pelo fato de não haver interação entre elas, como é o caso do molho Pesto, a variância só tende a aumentar.

Neste trabalho, caso alguma interação entre os ingredientes fosse identificada, um bom precedente se abriria para uma série de novos estudos, nos quais se poderia verificar a possibilidade da combinação de certos alimentos fornecer uma quantidade significativa de antioxidantes na dieta, sendo que estes poderiam estar trabalhando sinergicamente no organismo, combatendo radicais livres e inibindo a oxidação das células do corpo.

A extrapolação de resultados laboratoriais para o ser humano é complicada e muito perigosa, pois se passa de um ambiente de total controle para outro no qual exatamente o oposto ocorre.

O molho Pesto não é um prato corriqueiro na alimentação do brasileiro, mas este trabalho mostrou que pode ser inserido na alimentação e considerado parte de uma dieta saudável. É um alimento de alta densidade energética, portanto deve ser indicado com cautela e consumido com moderação, mas por ser um acompanhamento de massas, torna o prato mais completo do ponto de vista nutricional. Pode ser considerada como uma boa fonte de lipídios insaturados, sobretudo monoinsaturados, já que seus ácidos graxos são provenientes, sobretudo, do azeite de oliva e da castanha. Pode também ser uma boa opção para ser oferecido em restaurantes “por quilo”, já que o número de refeições fora de casa que o brasileiro vem fazendo só tem aumentado nos últimos anos.

Por fim, o molho Pesto aqui proposto é uma combinação de certos ingredientes a certa proporção, mas a ausência de interações aqui determinada dificulta a definição de uma receita ‘ideal’. Desse modo, diversas receitas estão disponíveis ao consumidor, cada qual com uma característica pessoal. A substituição dos ingredientes, como a castanha do Brasil por nozes ou amendoim e o azeite por outro óleo (como soja ou canola, por exemplo) pode trazer efeitos benéficos da mesma forma que a formulação final aqui determinada. Todas podem ser fontes de antioxidantes naturais, trazendo benefícios ao consumidor.

Referências Bibliográficas¹

ABIMA. Associação Brasileira das Indústrias de Massas Alimentícias. Disponível em <<http://www.abima.com.br>>. Acesso em 30 jan. 2006.

ABDALLA, D.S.P. Estresse oxidativo e alimentação. In: TIRAPEGUI, J. (Ed.) **Nutrição: Fundamentos e aspectos atuais**. São Paulo: Atheneu, 2000. p.179-200.

ANTOLOVICH, M. et al. Methods for testing antioxidant activity. **Analyst**, v.127, p.183-198, 2002.

APARICIO, R.; RODA, L.; ALBI, M.A.; GUTIÉRREZ, F. Effect of Various Compounds on Virgin Olive Oil Stability Measured by Rancimat. **J Agric Food Chem**, v. 47, p.4150-4155, 1999.

ARNAO, M.B.; CANO, A.; ACOSTA, M. The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. **Food Chem**, v. 73, p. 239-244, 2001.

BAGCHI, K.; PURI, S. Free radicals and antioxidants in health and disease. **Eastern Mediterranean Health Journal**, v. 4, n. 2, p.350-360, 1998. Disponível em: <<http://www.emro.who.int/Publications/EMHJ/0402/21.htm>>. Acesso em: 11 ago. 2005.

BALDIOLI, M.; SERVILI, M.; PERRETTI, G.; MONTEDORO, G.F. Antioxidant activity of tocopherols and phenolic compounds of virgin olive oil. **J Am Oil Chem Soc**, v. 73, n. 11, p.1589-1593, 1996.

BARRETO, A.C.S. et al. Empirical models for describing poultry meat lipid oxidation inhibition by natural antioxidants. **J Food Comp Analysis**, v. 16, p.587-594, 2003.

BARROS-NETO, B.B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. Campinas: Editora da UNICAMP, 2003.

BECK, M.A. Nutritionally induced oxidative stress: effect on viral disease. **Am J Clin Nutr**, v. 71(suppl), p.1676S-1679S, 2000.

¹ De acordo com as normas da ABNT NBR-6023, com adaptações USP – Diretrizes para Apresentação de Dissertações e Teses da USP: Documento Eletrônico e Impresso, 110p., 2004. Disponível em <<http://www.teses.usp.br/info/diretrizesfinal.pdf>>. Acesso em 12 ago. 2005.

BIANCHI, M.L.P.; ANTUNES, L.M.G. Radicais Livres e os principais antioxidantes da dieta. **Rev Nutr Campinas**, v. 12, n. 2, p.123-130, 1999.

BLIGH, E.G.; DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Can J Biochem Physiol**, v. 37, p.911-917, 1959.

BLOIS, M.S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. **Nature**, n. 181, p.1199-1200, 1958.

BOREK, C. Antioxidant health effects of aged garlic extract: Recent advances on the nutritional effects associated with the use of garlic as supplement. **J Nutr**, v. 131(suppl), p.1010S-1015S, 2001.

BORGUINI, R.G. **Avaliação do potencial antioxidante e de algumas características físico-químicas do tomate (*Lycopersicon esculentum*) orgânico em comparação ao convencional**. Tese (Doutorado) - Programa de pós graduação em Saúde Pública, Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006

BOX, G.E.P.; HUNTER, W.G.; HUNTER, J.S. **Statistics for experiments: as introduction to design, data analysis and model building**. New York: John Wiley and Sons, 1978. p.510-539.

BOX, G.E.P.; DRAPER, N.R. **Empirical model-building and response surfaces**. New York: John Wiley & Sons, 1987.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft and Technologies/Food Sc Tech**, v. 28, p.25-30, 1995.

BRASIL. ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução nº4**. Brasília. 1988. Disponível em <<http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=18839>>. Acesso em 13 ago. 2005.

BRASIL. ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Portaria nº27, de 13 de janeiro de 1998**. Brasília. 1998. Disponível em <<http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=97>>. Acesso em 22 jun. 2006.

BRASIL. ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução nº18**. Brasília. 1999a. Disponível em <<http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=109>>. Acesso em 13 ago. 2005.

BRASIL. ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução nº19**. Brasília. 1999b. Disponível em <<http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=110>>. Acesso em 13 ago. 2005.

BRASIL. ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução - RDC nº 360, de 23 de dezembro de 2003**. Brasília. 2003. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/rdc/360_03rdc.htm>. Acesso em 11 mai. 2006.

BRASIL. DATASUS – Informações de saúde. Brasília. 2002. **Óbitos por ocorrência segundo Capítulo CID-10, 2002**. Disponível em <<http://www.datasus.gov.br>>. Acesso em 10 ago. 2005.

BRASIL. IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Brasília. Pesquisa de Orçamento Familiar - POF 2002-2003. Brasília. 2004. Disponível em <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em 01 fev. 2006.

CASA DO AZEITE ESPANHOL. Disponível em <<http://www.azeite.com.br>>. Acesso em: 10 ago. 2005.

CASTRO, I.A. et al. Simultaneous optimization of response variables in protein mixture formulation: constrained simplex method approach. **Int J Food Sci Technol**, v. 38, n. 2, p.103-110, 2003.

CASTRO, I.A. et al. Optimization of the antioxidant capacity of a mixture of carotenoids and α -tocopherol in the development of a nutritional supplement. **Food Res Int**, v. 38, p.861–866, 2005.

CHANDRA, R.K. Preventive nutrition: consideration of cost-benefit ad cost-effective ratios. **Nutr Res**, v. 1-3 (editorial), 2002.

CHANWITHEESUK, A.; TEERAWUTGULRAG, A.; RAKARIYATHAM, N. Screening of antioxidant activity and antioxidant compounds of some edible plants of Thailand. **Food Chem**, v.92, p.491–497, 2005.

CHENG, T.Y.; ZHU, Z.; MASUDA, S.; MARCOS, N.C. Effects of multinutrient supplementation on antioxidant defense systems in healthy human beings. **J Nutr Biochem**, v. 12, p.388-395, 2001.

CONI, E. et al. Protective effect of oleuropein, an olive oil biophenol, on low density lipoprotein oxidizability in rabbits. **Lipids**, v. 35, n. 1, p.45-54, 2000.

CORNELL, J. A. **Experiments with Mixtures: Designs, Models and the Analysis of Mixtures Data**, 2^a ed., Wiley: New York, 1990.

CRAIG, W.; BECK, L. Phytochemicals: health protective effects. **Can J Diet Pract Res**, v. 60, p. 78-84, 1999.

DUTCOSKY, S.D. Métodos Sensoriais. In: **Análise Sensorial de Alimentos**. 20th ed. Curitiba: Editora Universitária Champagnat, 1996.

ESPOSITO, K. et al. Effect of a mediterranean-style diet on endothelial dysfunction and markers of vascular inflammation in the metabolic syndrome: a randomized trial. **JAMA**, v. 292, n. 12, p.1440-1446, 2004.

ESTADOS UNIDOS. U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service. 2005. **USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 18**. Nutrient Data Laboratory Home Page. Disponível em <<http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp>>. Acesso em 20 fev. 2006.

FERRARI, C.K.B. Oxidação lipídica em alimentos e sistemas biológicos: mecanismos gerais e implicações nutricionais e patológicos. **Rev Nutr Campinas**, v. 11, n. 1, p.3-14, 1998.

FERRARI, C.K.B. Oxidação de gorduras em alimentos: produção de substâncias tóxicas na dieta do homem. **Rev Instit Hig Med Soc**, v. 3, p.22-26, 1999.

FERRARI, C.K.B. **Avaliação da capacidade antioxidante total (CAT) e colorimetria de vinte e um diferentes tipos de alimentos comercializados no município de São Paulo (SP), Brasil**. 2002. Tese (Doutorado) - Programa de pós graduação em Saúde Pública, Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

FERRARI, C.K.B.; TORRES, E.A.F.S. Biochemical pharmacology of functional foods and prevention of chronic diseases of aging. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 57, p.251-260, 2003.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev Ass Med Brasil**, v. 43, n. 1, p.61-68, 1997.

FITO M. et al. Protective effect of olive oil and its phenolic compounds against low density lipoprotein oxidation. **Lipids**, v. 35, n. 6, p.633-638, 2000.

FLANDRIN, J.L.; MONTANARI, M. Tempero cozinha e dietética nos séculos XIV, XV e XVI. In: **História da Alimentação**. São Paulo, Estação Liberdade, 1996.

FRANKEL, E.N. Antioxidants in lipid foods and their impact on food quality. **Food Chem**, v. 57, n. 1, p.51-55, 1996.

GARDNER, P.T. et al. The relative contribution of vitamin C, carotenoids and phenolics to the antioxidant potential of fruit juices. **Food Chem**, v. 68, p. 471-474, 2000.

GENOVESE, M.I. et al. Determinação do conteúdo de fenólicos totais em frutas. **Braz J Phar Sci**, v. 39, p.167-169, 2003.

GIADA, M.L.R.; MANCINI-FILHO, J. Avaliação da atividade antioxidante *in vitro* de compostos fenólicos de alimentos. **Nutrire: Rev Soc Bras Alim Nutr**, v. 26, p.91-107, 2004.

GIL, M.A. et al. Antioxidant capacities, phenolic compounds, carotenoids, and vitamin C contents of nectarine, peach, and plum cultivars from California. **J Agric Food Chem**, v. 50, p. 4976–4982, 2002

GOUPY, P.; HUGUES, M.; BOIVIN, P.; AMIOT, M.J. Antioxidant composition and activity of barley (*Hordeum vulgare*) and malt extracts and of isolated phenolic compounds. **J Sci Food Agric**, v. 79, p.1625-1634, 1999.

GUTTERIDGE, J.M.C. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. **Clin Chem**, v. 41, n.12, p.1819-1828, 1995.

HALLIWELL, B. Effect of diet on cancer development: is oxidative DNA damage a biomarker? **Free Rad Biol & Med**, v. 32, n. 10, p.968-974, 2002.

HOCMAN, G. Chemoprevention of cancer: phenolic antioxidants (BHT, BHA). **Int J Biochem**, v. 20, n.7, p. 639-651, 1988.

HWANG, J.; SEVANIAN, A.; HODIS, H.N.; URSINE, F. Synergistic inhibition of LDL oxidation by phytoestrogens and ascorbic acid. **Free Rad Biol & Med**, v. 29, p.79-89, 2000.

HUANG D. et al. Development and validation of oxygen radical absorbance capacity assay for lipophilic antioxidants using randomly methylated β -cyclodextrin as the solubility enhancer. **J Agric Food Chem**, v. 50, p.1815-1821, 2002.

INSTITUTE OF FOOD TECHNOLOGISTS. Sensory evaluation guide for testing food and beverage products. **Food Technol**, v. 11, p.50-57, 1981.

INSTITUTE OF FOOD TECHNOLOGISTS. **Functional foods: opportunities and challenges**. IFT expert reports, 2005. Disponível em <http://members.ift.org/IFT/Research/IFTExpertReports/functionalfoods_report.htm>. Acesso em 10 ago. 2005.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz**, 3^a ed. São Paulo: IMESP, 1985.

JAYASINGHE, C. et al. Phenolics composition and antioxidant activity of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.). **J Agric Food Chem**, v. 51, p.4442-9, 2003.

JAVANMARDI, J.; STUSHNOFF, C.; LOCKEB, E.; VIVANCO, J.M. Antioxidant activity and total phenolic content of Iranian *Ocimum* accessions. **Food Chem**, v. 83, p.547-550, 2003.

JULIANI, H.R.; SIMON, J.E. Antioxidant activity of basil. In: JANICK, J.; WHIPKEY, A. (eds.) **Trends in new crops and new uses**. Alexandria, VA: ASHS Press, 2002. p. 575-579.

JUNG, C-H. et al. Antioxidant activities of cultivated and wild Korean ginseng leaves. **Food Chem**, v. 92, p.535-540, 2005.

KÄHKÖNEN, M.P. et al. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. **J Agric Food Chem**, v. 47, p.3954-3962, 1999.

KALT, W.; FORNEY, C.F.; MARTIN, A.; PRIOR, R.L. Antioxidant capacity, vitamin C, phenolics, and anthocyanins after fresh storage of small fruits. **J Agric Food Chem**, v. 47, p.4638-4644, 1999.

KAUR, C.; KAPOOR, H.C. Anti-oxidant activity and total phenolic content pf some Asian vegetables. **Int J Food Sci Tech**, v. 37, p.153-161, 2002.

KINTZIOS, S. et al. *In vitro* rosmarinic acid accumulation in sweet basil (*Occimum basilicum* L.). **Biotechnology Letters**, v. 25, p.405-408, 2003.

KIRITSAKIS, A.; MARKAKIS, P. Olive oil: a review. **Advances in food research**, v. 31, p.453-83, 1987.

KNOOPS, K.T.B. et al. Mediterranean Diet, Lifestyle Factors, and 10-Year Mortality in Elderly European Men and Women: The HALE Project. **JAMA**, v. 292, p.1433-39, 2004.

KORNSTEINER, M.; WAGNER, K-H.; ELMADFA, I. Tocopherols and total phenolics in 10 different nut types. **Food Chem**, v. 98, p.381-387, 2006.

LAUBLI, M.W.; BRUTTEL, P.A. Determination of the oxidative stability of fats and oils: comparison between the active oxygen method (AOCS Cd 12-57) and the Rancimat method. **J Am Oil Chem Soc**, v.63, n. 6, p. 792-795, 1986.

LEE, K.G.; SHIBAMOTO, T. Determination of antioxidant potential of volatile extracts isolated from various herbs and spices. **J Agric Food Chem**, v. 50, p. 4947-4952, 2002

LEE, J.; KOO, N.; MIN, D.B. Reactive oxygen species, aging, and antioxidant nutraceuticals. **Compr Rev Food Sc Food Saf**, v. 3, p.21-33, 2004.

LEONG, L.P.; SHUI, G. An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets. **Food Chem**, v. 76, p.69-75, 2002.

LI, B.W.; CARDOZO, M.S. Nonenzymatic-gravimetric determination of total dietary fiber in fruits and vegetables. **J AOAC Int**, v. 75, n.2, p. 372-374, 1992.

LULE, S. U.; XIA, W. Food phenolics, pros and cons: a review. **Food Rev Int**, v. 21, p. 367-388, 2005.

MACHADO, F.M.S.; SANTIAGO, V.R. Os benefícios do consumo dos alimentos funcionais. In: TORRES, E.A.F.S.; MACHADO, F.M.S. **Alimentos em Questão: uma abordagem técnica para as dúvidas mais comuns**. São Paulo: Ponto Crítico, 2001. p. 35-44.

MANCINI-FILHO, J. et al. Antioxidant activity of cinnamon (*Cinnamomum Zeylanicum*, *Breyne*) extracts. **Boll Chim Farmac**, v. 137, n. 11, p.443-447, 1998.

MARCO, G.J. A rapid method for evaluation of antioxidants. **J Am Oil Chem Soc**, v. 45, p. 594-598, 1968.

MARMER, N.W.; MAXWELL, R.J. Dry column method for the quantitative extraction and simultaneous class separation of lipids from muscle tissue. **Lipids**, v. 16, p.365-371, 1981.

MATHEW, S.; ABRAHAM, T. E. Studies on the antioxidant activities of cinnamon (*Cinnamomum verum*) bark extracts, through various in vitro models. **Food Chem**, v. 94, p.520-528, 2006.

MEILGAARD, M.; CIVILLE, G.V.; CARR, B.T. **Sensory evaluation techniques**. 2ª ed. Florida – USA: CRC Press, 1991.

MELO, E.A.; MANCINI-FILHO, J.; GUERRA, N.B.; MACIEL, G.R. Atividade antioxidante de extratos de coentro (*Coriandrum sativum* L.). **Ciênc Tecnol Aliment**, v. 23, p.195-199S, 2003

MELO, M.S.O.M. **Antioxidantes Naturais da Castanha do Brasil (*Bertholletia excelsa*, H.B.R.), da castanha do caju (*Anacardium occidentale*, L.) e do fruto do dendezeiro (*Elaeis guineensis*, Jacq)**. 1989. Dissertação (Mestrado) – Programa de pós-graduação em Ciências dos Alimentos, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1989.

MELO, M.S.O.M.; MANCINI-FILHO J. Antioxidantes naturais do fruto do dendezeiro (*Elaeis guineensis*, jacq). **Revista de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo**, v. 25, n. 2, p.147-57, 1989.

MENSOR, L.L. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytother Res**, v. 15, n. 2, p.127-130, 2001.

MILLER, H.E. A simplified method for the evaluation of antioxidants. **J Am Oil Chem Soc**, v. 48, p.91, 1971.

MILIAUSKAS, G.; VENSKUTONIS, P.R.; VAN BEEK, T.A. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. **Food Chem**, v. 85, p.231-237, 2004.

MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. **J Sci Technol**, v. 26, n. 2, p.211-219, 2004.

MONTEIRO, C.A.; MONDINI, L.; SOUZA, A.L.M.; POPKIN, B.M.. Da desnutrição para a obesidade: a transição nutricional no Brasil. In: MONTEIRO, C.A. (org) **Velhos e novos males da saúde no Brasil – a evolução do país e de suas doenças**. 2nd ed. São Paulo: Hucitec Nupens/USP, p. 247-255, 2000.

MOURE, A. et al. Natural antioxidants from residual sources. **Food Chem**, v. 72, p. 145-171, 2001.

NACIF, M.A.L et al. Dieta Mediterrânea e Saúde. **Cadernos de Nutrição**, v. 15, p.11-24, 1998.

NANDITA, S.; RAJINI, P.S. Free radical scavenging activity of an aqueous extract of potato peel. **Food Chem**, v. 85, p.611-616, 2004.

NAWAR, W.W. Lipids. *In*: FENNEMA, O.R. (Ed). **Food Chemistry**. New York: Marcel Dekker, Inc. p.653-667, 1996

NIKI, E.; NOGUCHI, N.; TSUCHIHASHI, H.; GOTOH, N. Interaction among vitamin C, vitamin E, and β -carotene. **Am J Clin Nutr**, v. 62, n. 6, p.1322-1326, 1995.

NUUTILA, A.M. et al. Comparison of antioxidant activities of onion and garlic extracts by inhibition of lipid peroxidation and radical scavenging activity. **Food Chem**, v. 81, n. 4, p. 485-493, 2003.

OWEN, R.W. et al. Olive-oil consumption and health: the possible role of antioxidants. **The Lancet Oncology**, v. 1, p.107-11, 2000.

PAREJO, I. et al. Investigation of Bolivian plant extracts for their radical scavenging activity and antioxidant activity. **Life Sciences**, v. 73, p.1667-1681, 2003.

PEREIRA, M.C.D.A.; BARCELOS M.F.P. Aspectos tecnológicos e nutricionais do azeite de oliva. **Hig Aliment**, v. 17, n. 106, p.22-9, 2003.

PHILIPPI, S.T. **Nutrição e Técnica Dietética**. São Paulo: Manole, 2003. p.181-90.

PINCEMAIL, J. How to evaluate your oxidative stress. Probiox SA. Disponível em <http://www.probiox.com/uk/html/body_stressoxydant.htm> Acesso em 30 jan 2006.

PINELO, M.; MANZOCCO, L.; NUÑEZ, M.J.; NICOLI, M.C. Interaction among phenolics in food fortification: negative synergism on antioxidant capacity. **J Agric Food Chem**, v. 52, n. 5, p.1177-1180, 2004.

PINILLA, M.J. et al. Hydrophilic and lipophilic antioxidant capacities of commercial Mediterranean vegetable soup (Gazpachos). **J Food Sci**, v. 70, n. 1, p. S60-S65, 2005.

PIZZALE, L. et al. Antioxidant activity of sage (*Salvia officinalis* and *S fruticosa*) and oregano (*Origanum onites* and *O indercedens*) extracts related to their phenolic compound content. **J Sci Food Agric**, v. 82, p.1645–1651, 2002.

POPOV, I.N.; LEWIN, G. Photchemiluminescent detection of antiradical activity; IV: testing of lipid-soluble antioxidants. **J Biochem Biophys Methods**, n. 31, p.1-8, 1996.

PRATT, D.E, MILLER, E.E. A flavonoid antioxidant in Spanish peanuts. **J Am Oil Chem Soc**, v. 61, p.1064-1067, 1984.

RIQUE, A.B.R.; SOARES, E.A.; MEIRELLES, C.M. Nutrição e exercício na prevenção e controle das doenças cardiovasculares. **Rev Bras Med Esporte**, v. 8, n. 6, p.244-54, 2002.

RIVERO, F. et al. Antioxidant activity in vivo and in vitro of *Halimeda incrassata* aqueous extracts. **Ciênc Tecnol Alim**, v. 23, n. 2, p.256-263, 2003.

ROBERTSON, M.R.; SMAHA, L. Can a Mediterranean-style diet reduce heart disease? **Circulation**, v. 103 (editorial), p.1821-1822, 2001.

SALDANHA, L.A. **Avaliação da atividade antioxidante in vitro de extratos de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) verde e tostada e chá verde (*Camellia sinensis*)**. Dissertação (Mestrado) - Programa de pós graduação em Saúde Pública, Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005

SAURA-CALIXTO, F.; GOÑI, I.; Antioxidant capacity of the Spanish Mediterranean diet. **Food Chem**, v. 94, p.442-447, 2006.

SHAHIDI, F.; JANITHA, P.K.; WANASUNDARA, P.D. Phenolic antioxidants. **Crit Rev Food Sci Nut**, v.32, n.1, p.67-103, 1992.

SIDEL, J.L.; STONE, H. An introduction to optimization research. **Food Technol**, p36-38, 1983.

SIES, H. What is oxidative stress? In: KEANEY, J.F. **Oxidative stress and vascular disease**. Kluwer Academic Publishers, 2000.

SILVA, F.A.M.; BORGES, M.F.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.

SOUTHON, S. Increased fruit and vegetable consumption within the EU: potential health benefits. **Food Res Int**, v. 33, p.211-217, 2000.

SOUZA, L.R.A. **Consumo alimentar de azeite e vinho: realidade paulistana e as recomendações da dieta mediterrânea**. 2002. Dissertação (Mestrado) – Programa de pós-graduação Interunidades em Nutrição Humana Aplicada (PRONUT), Faculdade de Economia e Administração, Faculdade de Ciências Farmacêuticas e Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

SOUZA, M.L.; MENEZES, H.C. Processamento de amêndoa e torta de castanha do Brasil e farinha de mandioca: parâmetros de qualidade. **Ciênc Tecnol Aliment**, v. 24, n. 1, p.120-128, 2004.

SUBAGIO, A.; MORITA, N. Instability of carotenoids is a reason for their promotion on lipid oxidation. **Food Res Int**, v. 34, p.183-188, 2001.

TEPE, B. et al. Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller (Lamiaceae). **Food Chem**, n. 90, p. 333–340, 2005.

THOMAS, M.J. The role of free radicals and antioxidants. **Nutrition**, v. 16, n. 7/8, p.16-18, 2000.

TRICHOLOPOULOU, A.; VASILOPOULOU, E. Mediterranean diet and longevity. **Brit J Nutr**, v. 84 (suppl. 2), p.S205-S209, 2000.

TUCK, K.L.; HAYBALL, P.J. Major phenolic compounds in olive oil: metabolism and health effects. **J Nut Biochem**, v. 13, n. 11, p.636-44, 2002.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental/BRASILFOODS. **Tabela Brasileira de Composição de Alimentos-USP. Versão 4.1**. 1998. Disponível em <<http://www.fcf.usp.br/tabela>>. Acesso em 27 jun 2006.

VANG, O.; RASMUSSEN, B.F.; ANDERSEN, O. Combined effects of complex mixtures of potentially anti-carcinogenic compounds on antioxidant enzymes and carcinogen metabolizing enzymes in the rat. **Cancer Letters**, v. 114, p.283-286, 1997.

VATTEM, D.A.; JANG, H.-D.; LEVIN, R.; SHETTY, K. Synergism of cranberry phenolics with ellagic acid and rosmarinic acid for antimutagenic and DNA protection functions. **J Food Biochem**, v. 30, n. 1, p.98-116, 2006.

VISIOLI, F. et al. Low density lipoprotein oxidation is inhibited in vitro by olive oil constituents. **Atherosclerosis**, v. 117, p.25-32, 1995.

VISIOLI, F.; GALLI, C. Biological properties of olive oil phytochemicals. **Crit Rev Food Sci Nutr**, v. 42, n. 3, p.209-221, 2002.

VISSERS, M.N.; ZOCK, P.L.; KATAN, M.B. Bioavailability and antioxidant effects of olive oil phenols in humans: a review. **Eur J Clin Nutr**, v. 58, p.955–965, 2004.

WHO – World Health Organization. 2005. Disponível em <<http://www.who.int/en>>. Acesso em 10 ago. 2005.

WILLETT, W.C. et al. Mediterranean diet pyramid: a cultural model for healthy eating. **Am J Clin Nutr**, v. 61(suppl), p.1402S-1406S, 1995.

WU, X. et al. Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. **J Agric Food Chem**, v. 52, p.4026-4037, 2004.

YANG, J.; HALIM, L.; LIU, R.H. Antioxidant and antiproliferative activities of common nuts. In: 2005 IFT Annual Meeting, Session 35, Nutraceutical & Functional Foods: General I, 2005, New Orleans, Louisiana. **Resumo**. Disponível em <http://ift.confex.com/ift/2005/techprogram/paper_30586.htm>. Acesso em 22 jun. 2006.

YEN, G-C.; CHEN, H-Y. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. **J Agric Food Chem**, n.1, v. 43. p.27-32, 1995.

YU, L. L., ZHOU, K. K., PARRY, J. Antioxidant properties of cold-pressed black caraway, carrot, cranberry, and hemp seed oils. **Food Chem**, v. 91, p.723–729, 2005.

ZHENG, W.; WANG, S. Y. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. **J Agric Food Chem**, v. 49, p.5165-5170, 2001.

Apêndice

APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO e PROTOCOLO DE PESQUISA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE SAÚDE PÚBLICA
DEPARTAMENTO DE NUTRIÇÃO
Av. Dr. Arnaldo, 715 - CEP: 01246-904 - São Paulo.
Fone: 3066-7736 ou 7705/7762/7701
Fone/Fax: (011) 852-6748

Termo de Consentimento Esclarecido

Resolução n. 196, de 10 de outubro de 1996, segundo o Conselho Nacional de Saúde.

Título do Protocolo de Pesquisa: Otimização de mistura de ingredientes, com atividade antioxidante, no desenvolvimento de molho tipo Pesto para macarrão.

Objetivo: O presente projeto de pesquisa visa otimizar “*in vitro*” uma mistura contendo três ingredientes (azeite de oliva, castanha do Pará e manjerição), com atividade antioxidante, no desenvolvimento de molho tipo Pesto (“*in natura*”) para macarrão, onde pretende-se responder as seguintes questões:

1. Como identificar a proporção entre os quatro ingredientes selecionados para se obter ao máximo o sinergismo, promovendo a melhor resposta antioxidante possível no desenvolvimento do molho tipo Pesto (“*in natura*”) para macarrão?
2. A melhor resposta do molho tipo Pesto otimizado, será aceito sensorialmente pelas pessoas?
3. Qual seria a composição nutricional do molho tipo Pesto com boa atividade antioxidante, depois de ser otimizado?

População de Estudo: amostra da comunidade universitária da FSP/USP (estudantes, funcionários e docentes).

Orientadora: Elizabeth A.F.S. Torres

Autor da Pesquisa: discente de Pós-graduação - PRONUT - FEA/FCF/FSP - USP – **Guilherme Afonso**

Caro Colaborador: Este estudo será realizado por meio de análise instrumental e sensorial. Serão utilizados os laboratórios de bromatologia e técnica dietética da Faculdade de Saúde Pública.

Risco: O estudo não trará risco à sua integridade física e moral.

Benefícios: As informações obtidas neste estudo serão úteis cientificamente (a) pela contribuição para a área de pesquisa de sabor e aroma de misturas de ingredientes com atividade antioxidante em alimentos e (b) para obter-se subsídios visando a otimização de quatro ingredientes, de modo que resulte em produtos com melhor atividade antioxidante e maior aceitação por uma população que não é tradicionalmente consumidora de molhos “*in natura*”.

Privacidade: As informações obtidas neste estudo poderão ser divulgadas em publicações, congressos, porém sem identificação do participante.

O pesquisador garante fornecer resposta a qualquer pergunta ou esclarecer qualquer dúvida que houver sobre os procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados com a pesquisa.

A participação de vossa senhoria é voluntária, podendo retirar seu consentimento e deixar de participar da pesquisa a qualquer momento sem maiores consequências.

Ciente do compromisso assumido na minha colaboração com esta pesquisa, e pela importância da mesma subscrevo-me a seguir:

Nome (completo): _____

Assinatura: _____

Assinatura do pesquisador: _____

Caso necessite informações complementares sobre a pesquisa, entrar em contato com:

Mestrando **Guilherme Afonso** e Prof^a Associada **Elizabeth A. F. S. Torres**, Departamento de Nutrição da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo. Av. Dr. Arnaldo, 715, ou pelo telefone 3066 7748 ou 3066 7701.

Protocolo de Pesquisa

Título do Protocolo: Otimização de mistura de ingredientes, com atividade antioxidante, no desenvolvimento de molho tipo Pesto para macarrão.

Pesquisador: Guilherme Afonso

Carteira de Identidade: 26.106.324-8 SSP/SP

CPF: 264.121.308-70

Endereço para correspondência: Av. Dr. Arnaldo, 715.

CEP: 01246 - 904 - São Paulo.

Telefone: 3066 7748 **e-mail:** gafonso@usp.br

Cargo/função: Mestrando

Orientadora: Elizabeth A. F. S. Torres

Carteira de Identidade: 03637272-0

CPF: 609886907-30

Endereço para correspondência: Av. Dr. Arnaldo, 715.

CEP: 01246 - 904 - São Paulo.

Telefone: 3066 7701 **e-mail:** eatorres@usp.br

Unidade: Faculdade de Saúde Pública

Universidade: Universidade de São Paulo

OBJETIVO: O presente projeto de pesquisa visa otimizar “*in vitro*” uma mistura contendo três ingredientes (azeite de oliva, castanha do Pará e manjerição), com atividade antioxidante, no desenvolvimento de molho tipo Pesto (“*in natura*”) para macarrão, onde pretende-se responder as seguintes questões:

1. Como identificar a proporção entre os quatro ingredientes selecionados para se obter ao máximo o sinergismo, promovendo a melhor resposta antioxidante possível no desenvolvimento de um molho tipo Pesto (“*in natura*”) para macarrão?
2. A melhor resposta do molho tipo Pesto otimizado, será aceito sensorialmente pelas pessoas?
3. Qual seria a composição nutricional do molho tipo Pesto com boa atividade antioxidante, depois de ser otimizado?

MATERIAL E MÉTODOS: Os dados referentes às características sensoriais da mistura de ingredientes com atividade antioxidante serão coletados na FSP/USP por meio de análise sensorial através da aplicação de um formulário.

BIBLIOGRAFIA: Periódicos e livros publicados, recentemente sobre o tema.

RISCO: Este estudo não apresenta nenhum risco à integridade física e moral do participante.

BENEFÍCIOS: As informações obtidas neste estudo serão úteis cientificamente pela contribuição para a área de pesquisa de sabor e aroma de misturas de ingredientes com atividade antioxidante em alimentos e para obter-se subsídios visando a otimização de quatro ingredientes, de modo que resulte em produtos com melhor atividade antioxidante e maior aceitação por uma população que não é tradicionalmente consumidora de molhos *in natura*.

DURAÇÃO TOTAL DA PESQUISA: 12 a 24 meses.

LOCAL DA PESQUISA: A pesquisa será realizada nos seguintes locais: Av. Dr. Arnaldo 715, São Paulo – SP (Faculdade de Saúde Pública)

As informações obtidas neste estudo serão tornadas públicas sejam eles favoráveis ou não e poderão ser divulgadas em publicações, congressos, porém sem identificação do participante.

CARACTERÍSTICAS DA POPULAÇÃO: A população estudada constará de uma amostra da comunidade universitária (estudantes, funcionários e docentes). Indivíduos, de ambos os sexos, serão recrutados para participar da pesquisa, desde que manifestem seu consentimento, não havendo, portanto, nenhum critério para exclusão.

O pesquisador se compromete em cumprir a Resolução n. 196, de 10 de outubro de 1996, segundo o Conselho Nacional de Saúde.

APÊNDICE B – AJUSTE DOS MODELOS ESTATÍSTICOS

Teste DPPH - Extrato Polar

Modelo Linear

Estimativa dos coeficientes de regressão (proporção dos componentes)					
Termo	Coef	SE Coef	T	P	VIF
Bloco 1	-0,06864	0,04236	-1,62	0,133	1,352
Bloco 2	0,02336	0,04928	0,47	0,645	1,647
Azeite	0,81767	0,08006	*	*	1,610
Manjerição	0,93221	0,06682	*	*	1,206
Castanha	0,55000	0,06935	*	*	1,299

S = 0,115196 PRESS = 0,283607

R-Sq = 64,69% R-Sq(pred) = 31,40% R-Sq(adj) = 51,85%

Análise de variância (proporção dos componentes)						
Fonte	gl	SQ	SQadj	QM	F	p
Blocos	2	0,08215	0,03513	0,017565	1,32	0,305
Regressão	2	0,18532	0,18532	0,092660	6,98	0,011
Linear	2	0,18532	0,18532	0,092660	6,98	0,011
Erro Residual	11	0,14597	0,14597	0,013270		
Falta de ajuste	7	0,05103	0,05103	0,007289	0,31	0,917
Error Puro	4	0,09495	0,09495	0,023737		
Total	15	0,41345				

Modelo Quadrático

Estimativa dos coeficientes de regressão (proporção dos componentes)					
Termo	Coef	SE Coef	T	P	VIF
Bloco 1	-0,08761	0,04929	-1,78	0,113	1,586
Bloco 2	0,06663	0,08157	0,82	0,438	3,909
Azeite	0,73725	0,11834			3,048
Manjerição	0,91520	0,09680			2,192
Castanha	0,48787	0,09318			2,031
Azeite*Manjerição	0,04047	0,47962	0,08	0,935	2,434
Azeite*Castanha	0,48089	0,52773	0,91	0,389	2,946
Manjerição*Castanha	0,32211	0,37113	0,87	0,411	2,019

S = 0,123760 PRESS = 0,392360

R-Sq = 70,36% R-Sq(pred) = 5,10% R-Sq(adj) = 44,43%

Análise de variância (proporção dos componentes)						
Fonte	gl	SQ	SQadj	QM	F	p
Blocos	2	0,08215	0,04848	0,024240	1,58	0,264
Regressão	5	0,20876	0,20876	0,041752	2,73	0,100
Linear	2	0,18532	0,15737	0,078686	5,14	0,037
Quadrático	3	0,02344	0,02344	0,007814	0,51	0,686
Erro Residual	8	0,12253	0,12253	0,015316		
Falta de Ajuste	4	0,02759	0,02759	0,006896	0,29	0,871
Erro Puro	4	0,09495	0,09495	0,023737		
Total	15	0,41344				

Modelo Cúbico Especial

Estimativa dos coeficientes de regressão (proporção dos componentes)					
Termo	Coef	SE Coef	T	P	VIF
Bloco 1	-0,09068	0,05261	-1,72	0,128	1,619
Bloco 2	0,06046	0,08747	0,69	0,512	4,029
Azeite	0,74704	0,12727	*	*	3,159
Manjeriçao	0,91573	0,10227	*	*	2,193
Castanha	0,49611	0,10047	*	*	2,116
Azeite*Manjeriçao	-0,01339	0,52345	-0,03	0,980	2,597
Azeite*Castanha	0,37463	0,61484	0,61	0,562	3,583
Manjeriçao*Castanha	0,26184	0,41873	0,63	0,552	2,303
Azeite*Manjeriçao*Castanha	1,19094	2,90530	0,41	0,694	2,032

S = 0,130745 PRESS = 0,482539

R-Sq = 71,06% R-Sq(pred) = 0,00% R-Sq(adj) = 37,98%

Análise de variância (proporção dos componentes)						
Fonte	gl	SQ	SQadj	QM	F	p
Blocos	2	0,082153	0,051013	0,025506	1,49	0,289
Regressão	6	0,211632	0,211632	0,035272	2,06	0,183
Linear	2	0,185319	0,152094	0,076047	4,45	0,057
Quadrático	3	0,023441	0,009902	0,003301	0,19	0,898
Cúbico Especial	1	0,002872	0,002872	0,002872	0,17	0,694
Erro Residual	7	0,119659	0,119659	0,017094		
Falta de Ajuste	3	0,024713	0,024713	0,008238	0,35	0,794
Erro Puro	4	0,094946	0,094946	0,023737		
Total	15	0,413445				

Teste DPPH - Extrato Apolar**Modelo Linear**

Estimativa dos coeficientes de regressão (proporção dos componentes)					
Termo	Coef	SE Coef	T	P	VIF
Bloco 1	0,014114	0,01673	0,84	0,417	1,352
Bloco 2	-0,004545	0,01947	-0,23	0,820	1,647
Azeite	0,212506	0,03162	*	*	1,610
Manjeriçao	0,223036	0,02639	*	*	1,206
Castanha	0,316900	0,02739	*	*	1,299

S = 0,0455025 PRESS = 0,0475233

R-Sq = 48,66% R-Sq(pred) = 0,00% R-Sq(adj) = 29,99%

Análise de variância (proporção dos componentes)						
Fonte	gl	SQ	SQadj	QM	F	p
Blocos	2	0,006861	0,001490	0,000745	0,36	0,706
Regressão	2	0,014725	0,014725	0,007363	3,56	0,064
Linear	2	0,014725	0,014725	0,007363	3,56	0,064
Erro Residual	11	0,022775	0,022775	0,002070		
Falta de Ajuste	7	0,013428	0,013428	0,001918	0,82	0,617
Erro Puro	4	0,009347	0,009347	0,002337		
Total	15	0,044361				

Modelo Quadrático

Estimativa dos coeficientes de regressão (proporção dos componentes)

Termo	Coef	SE Coef	T	P	VIF
Bloco 1	0,0121	0,01664	0,73	0,488	1,586
Bloco 2	0,0088	0,02754	0,32	0,756	3,909
Azeite	0,2351	0,03995	*	*	3,048
Manjeriçao	0,2429	0,03268	*	*	2,192
Castanha	0,3140	0,03146	*	*	2,031
Azeite*Manjeriçao	-0,2888	0,16194	-1,78	0,112	2,434
Azeite*Castanha	-0,0800	0,17818	-0,45	0,666	2,946
Manjeriçao*Castanha	0,0636	0,12531	0,51	0,625	2,019

S = 0,0417860 PRESS = 0,0576990

R-Sq = 68,51% R-Sq(pred) = 0,00% R-Sq(adj) = 40,96%

Análise de variância (proporção dos componentes)

Fonte	gl	SQ	SQadj	QM	F	p
Blocos	2	0,006861	0,002000	0,001000	0,57	0,586
Regressão	5	0,023532	0,023532	0,004706	2,70	0,102
Linear	2	0,014725	0,007271	0,003635	2,08	0,187
Quadrático	3	0,008807	0,008807	0,002936	1,68	0,247
Erro Residual	8	0,013969	0,013969	0,001746		
Falta de Ajuste	4	0,004622	0,004622	0,001155	0,49	0,744
Erro Puro	4	0,009347	0,009347	0,002337		
Total	15	0,044361				

Modelo Cúbico Especial

Estimativa dos coeficientes de regressão (proporção dos componentes)

Termo	Coef	SE Coef	T	P	VIF
Bloco 1	0,0142	0,01710	0,83	0,434	1,619
Bloco 2	0,0130	0,02843	0,46	0,660	4,029
Azeite	0,2285	0,04136	*	*	3,159
Manjeriçao	0,2425	0,03324	*	*	2,193
Castanha	0,3084	0,03265	*	*	2,116
Azeite*Manjeriçao	-0,2521	0,17011	-1,48	0,182	2,597
Azeite*Castanha	-0,0076	0,19981	-0,04	0,971	3,583
Manjeriçao*Castanha	0,1047	0,13608	0,77	0,467	2,303
Azeite*Manjeriçao*Castanha	-0,8107	0,94417	-0,86	0,419	2,032

S = 0,0424896 PRESS = 0,0615538

R-Sq = 71,51% R-Sq(pred) = 0,00% R-Sq(adj) = 38,95%

Análise de variância (proporção dos componentes)

Fonte	gl	SQ	SQadj	QM	F	p
Blocos	2	0,006861	0,002858	0,001429	0,79	0,490
Regressão	6	0,024863	0,024863	0,004144	2,30	0,151
Linear	2	0,014725	0,006969	0,003484	1,93	0,215
Quadrático	3	0,008807	0,005940	0,001980	1,10	0,412
Cúbico Especial	1	0,001331	0,001331	0,001331	0,74	0,419
Erro Residual	7	0,012638	0,012638	0,001805		
Falta de Ajuste	3	0,003291	0,003291	0,001097	0,47	0,720
Erro Puro	4	0,009347	0,009347	0,002337		
Total	15	0,044361				

Teste β -caroteno/ácido linoléico - Extrato Polar**Modelo Linear**

Estimativa dos coeficientes de regressão (proporção dos componentes)

Termo	Coef	SE Coef	T	P	VIF
Bloco 1	-0,02489	0,01822	-1,37	0,199	1,352
Bloco 2	-0,00105	0,02120	-0,05	0,961	1,647
Azeite	0,65630	0,03445	*	*	1,610
Manjeriçao	0,67306	0,02875	*	*	1,206
Castanha	0,65043	0,02984	*	*	1,299

S = 0,0495636 PRESS = 0,0587329

R-Sq = 20,18% R-Sq(pred) = 0,00% R-Sq(adj) = 0,00%

Análise de variância (proporção dos componentes)

Fonte	gl	SQ	SQadj	QM	F	p
Blocos	2	0,006173	0,005484	0,002742	1,12	0,362
Regressão	2	0,000661	0,000661	0,000330	0,13	0,876
Linear	2	0,000661	0,000661	0,000330	0,13	0,876
Erro Residual	11	0,027022	0,027022	0,002457		
Falta de Ajuste	7	0,016245	0,016245	0,002321	0,86	0,596
Erro Puro	4	0,010777	0,010777	0,002694		
Total	15	0,033856				

Modelo Quadrático

Estimativa dos coeficientes de regressão (proporção dos componentes)

Termo	Coef	SE Coef	T	P	VIF
Bloco 1	-0,0174	0,02206	-0,79	0,453	1,586
Bloco 2	-0,0228	0,03650	-0,63	0,549	3,909
Azeite	0,6852	0,05295	*	*	3,048
Manjeriçao	0,6675	0,04332	*	*	2,192
Castanha	0,6725	0,04169	*	*	2,031
Azeite*Manjeriçao	0,0719	0,21461	0,33	0,746	2,434
Azeite*Castanha	-0,1913	0,23614	-0,81	0,441	2,946
Manjeriçao*Castanha	-0,0926	0,16607	-0,56	0,592	2,019

S = 0,0553780 PRESS = 0,107890

R-Sq = 27,53% R-Sq(pred) = 0,00% R-Sq(adj) = 0,00%

Análise de variância (proporção dos componentes)

Fonte	gl	SQ	SQadj	QM	F	p
Blocos	2	0,006173	0,006118	0,003059	1,00	0,410
Regressão	5	0,003149	0,003149	0,000630	0,21	0,951
Linear	2	0,000661	0,000185	0,000092	0,03	0,970
Quadrático	3	0,002488	0,002488	0,000829	0,27	0,845
Erro Residual	8	0,024534	0,024534	0,003067		
Falta de Ajuste	4	0,013757	0,013757	0,003439	1,28	0,409
Erro Puro	4	0,010777	0,010777	0,002694		
Total	15	0,033856				

Modelo Cúbico Especial

Estimativa dos coeficientes de regressão (proporção dos componentes)					
Termo	Coef	SE Coef	T	P	VIF
Bloco 1	-0,0192	0,02334	-0,82	0,438	1,619
Bloco 2	-0,0265	0,03881	-0,68	0,517	4,029
Azeite	0,6910	0,05646	*	*	3,159
Manjeriçao	0,6678	0,04537	*	*	2,193
Castanha	0,6773	0,04457	*	*	2,116
Azeite*Manjeriçao	0,0404	0,23222	0,17	0,867	2,597
Azeite*Castanha	-0,2535	0,27277	-0,93	0,384	3,583
Manjeriçao*Castanha	-0,1279	0,18577	-0,69	0,513	2,303
Azeite*Manjeriçao*Castanha	0,6967	1,28890	0,54	0,606	2,032

S = 0,0580033 PRESS = 0,140430

R-Sq = 30,44% R-Sq(pred) = 0,00% R-Sq(adj) = 0,00%

Análise de variância (proporção dos componentes)						
Fonte	gl	SQ	SQadj	QM	F	p
Blocos	2	0,006173	0,007060	0,003530	1,05	0,399
Regressão	6	0,004132	0,004132	0,000689	0,20	0,964
Linear	2	0,000661	0,000279	0,000139	0,04	0,960
Quadrático	3	0,002488	0,003455	0,001152	0,34	0,796
Cúbico Especial	1	0,000983	0,000983	0,000983	0,29	0,606
Erro Residual	7	0,023551	0,023551	0,003364		
Falta de Ajuste	3	0,012774	0,012774	0,004258	1,58	0,326
Erro Puro	4	0,010777	0,010777	0,002694		
Total	15	0,033856				

Teste β -caroteno/ácido linoléico - Extrato Apolar**Modelo Linear**

Estimativa dos coeficientes de regressão (proporção dos componentes)					
Termo	Coef	SE Coef	T	P	VIF
Bloco 1	0,008065	0,004439	1,82	0,097	1,352
Bloco 2	0,024310	0,005166	4,71	0,001	1,647
Azeite	0,849959	0,008392	*	*	1,610
Manjeriçao	0,903373	0,007004	*	*	1,206
Castanha	0,880085	0,007269	*	*	1,299

S = 0,0120743 PRESS = 0,00389759

R-Sq = 79,69% R-Sq(pred) = 50,64% R-Sq(adj) = 72,31%

Análise de variância (proporção dos componentes)						
Fonte	gl	SQ	SQadj	QM	F	p
Blocos	2	0,003532	0,005405	0,002702	18,54	0,000
Regressão	2	0,002762	0,002762	0,001381	9,47	0,004
Linear	2	0,002762	0,002762	0,001381	9,47	0,004
Erro Residual	11	0,001604	0,001604	0,000146		
Falta de Ajuste	7	0,001235	0,001235	0,000176	1,91	0,277
Erro Puro	4	0,000369	0,000369	0,000092		
Total	15	0,007897				

Modelo Quadrático

Estimativa dos coeficientes de regressão (proporção dos componentes)					
Termo	Coef	SE Coef	T	P	VIF
Bloco 1	0,00965	0,004444	2,17	0,062	1,586
Bloco 2	0,02299	0,007354	3,13	0,014	3,909
Azeite	0,85928	0,010669	*	*	3,048
Manjeriçã	0,91076	0,008727	*	*	2,192
Castanha	0,88645	0,008401	*	*	2,031
Azeite*Manjeriçã	-0,05237	0,043241	-1,21	0,260	2,434
Azeite*Castanha	-0,04583	0,047578	-0,96	0,364	2,946
Manjeriçã*Castanha	-0,03953	0,033460	-1,18	0,271	2,019

S = 0,0111577 PRESS = 0,00468813

R-Sq = 87,39% R-Sq(pred) = 40,63% R-Sq(adj) = 76,35%

Análise de variância (proporção dos componentes)						
Fonte	gl	SQ	SQadj	QM	F	p
Blocos	2	0,003532	0,003508	0,001754	14,09	0,002
Regressão	5	0,003370	0,003370	0,000674	5,41	0,018
Linear	2	0,002762	0,001353	0,000676	5,43	0,032
Quadrático	3	0,000608	0,000608	0,000203	1,63	0,258
Erro Residual	8	0,000996	0,000996	0,000124		
Falta de Ajuste	4	0,000627	0,000627	0,000157	1,70	0,310
Erro Puro	4	0,000369	0,000369	0,000092		
Total	15	0,007897				

Modelo Cúbico Especial

Estimativa dos coeficientes de regressão (proporção dos componentes)					
Termo	Coef	SE Coef	T	P	VIF
Bloco 1	0,0103	0,004475	2,30	0,055	1,619
Bloco 2	0,0243	0,007440	3,27	0,014	4,029
Azeite	0,8572	0,010825	*	*	3,159
Manjeriçã	0,9107	0,008699	*	*	2,193
Castanha	0,8847	0,008545	*	*	2,116
Azeite*Manjeriçã	-0,0409	0,044521	-0,92	0,389	2,597
Azeite*Castanha	-0,0232	0,052295	-0,44	0,671	3,583
Manjeriçã*Castanha	-0,0267	0,035615	-0,75	0,478	2,303
Azeite*Manjeriçã*Castanha	-0,2537	0,247109	-1,03	0,339	2,032

S = 0,0111204 PRESS = 0,00508526

R-Sq = 89,04% R-Sq(pred) = 35,61% R-Sq(adj) = 76,51%

Análise de variância (proporção dos componentes)						
Fonte	gl	SQ	SQadj	QM	F	p
Blocos	2	0,003532	0,003589	0,001794	14,51	0,003
Regressão	6	0,003500	0,003500	0,000583	4,72	0,031
Linear	2	0,002762	0,001433	0,000717	5,79	0,033
Quadrático	3	0,000608	0,000197	0,000066	0,53	0,675
Cúbico Especial	1	0,000130	0,000130	0,000130	1,05	0,339
Erro Residual	7	0,000866	0,000866	0,000124		
Falta de Ajuste	3	0,000497	0,000497	0,000166	1,79	0,288
Erro Puro	4	0,000369	0,000369	0,000092		
Total	15	0,007897				

Anexos

ANEXO A – EXEMPLOS DE RECEITAS

Em: <http://bolnamesa.bol.com.br/biblioteca/parigi/trennete.jhtm>

Ingredientes

- 1 maço pequeno de rúcula
- 1 maço pequeno de manjerição
- 150g de queijo pecorino ralado
- 30g de pinoli
- 2 dentes de alho (opcional)
- 200ml de azeite de oliva extravirgem
- sal e pimenta-do-reino
- pinoli para decorar

Modo de preparo

No liquidificador, bata todos os ingredientes até obter uma mistura bem homogênea.

Em: <http://www.guarani.com.br/guarani/diversao/cravo/receitas/semana12.htm>

Ingredientes

- 2 xícaras de folhas de manjerição fresco, limpo e seco
- ½ xícara de azeite de oliva extra virgem
- 2 colheres de sopa de pignoli
- 2 dentes de alho, amassados
- 1 colher de chá de sal
- ½ xícara de queijo parmesão ralado
- 3 colheres de manteiga, temperatura ambiente

Modo de Preparo

Coloque o manjerição, azeite, pignoli, alho e sal em um processador ou liquidificador e misture em velocidade alta. Pare para raspar o que fica nas paredes da tigela. Quando os ingredientes estiverem bem misturados e finos transfira para uma tigela e acrescente o queijo a mão mexendo delicadamente. No final adicione a manteiga em pomada. Misture bem e prove o tempero. Lembre-se que o queijo parmesão já é bastante salgado. A textura deve ficar de uma pasta. Guarde na geladeira em pote hermeticamente fechado por até um mês.

Nota 1: quando for adicionar o pesto a alguma massa adicione ao pesto uma colher de sopa de água fervendo e misture bem(pode ser da água na qual se ferveu o macarrão)e só então misture o pesto a massa.

Nota 2: O pignoli é a semente do pinheiro, e tem aspecto parecido com uma amêndoa só que bem pequeno. A cor é bege claro e o pignoli não tem pele. Pode ser encontrado em lojas especializadas em produtos italianos.

Em: <http://www.planetaorganico.com.br/danio1.htm>

Ingredientes

- 80ml azeite extra virgem Italiano
- 20g de alho picado
- 50g de pinoli (pinhões-snobber)
- 50g de queijo parmesão Italiano ralado

- 50g de queijo pecorino ralado
- sal e pimenta a gosto

Modo de Preparo

O molho pesto precisa ser feito com a ajuda de um liquidificador. Coloca-se primeiramente o azeite, o alho, o sal, os pinhões, as folhas (somente) lavadas e secas do manjericão e por último os dois tipos de queijo. Liquidificar evitando demorar muito tempo para evitar excessiva perda cromática do manjericão. Obtenha um creme homogêneo e cremoso, separe.

Em: <http://verdesmares.globo.com/culinaria/receita.asp?codigo=59997&modulo=459>

Ingredientes

- 2 dentes de alho
- 2 xícaras (chá) de folhas de manjericão
- 3 colheres (sopa) de pinoli ou nozes
- 1/2 colher (chá) de sal
- 1 colher (sopa) de salsinha picada
- 1/2 xícara (chá) de azeite
- 1/2 xícara (chá) de parmesão ou pecorino ralado

Modo de preparo

No processador, bata os seis primeiros ingredientes e transfira para uma tigela. Acrescente metade do queijo parmesão ralado e reserve até a hora de empregar.

Em: http://panelinha.ig.com.br/receita.phtml?cod_rec=1368

Ingredientes

- 4 dentes de alho
- 1 colher (chá) de sal
- 1 xícara (chá) de folhas de manjericão, fresco
- 3 colheres (chá) de pinoli ou nozes, sem casca
- 100g de queijo pecorino ou parmesão, ralado
- ½ xícara (chá) de azeite
- pimenta-do-reino, a gosto

Modo de preparo

Descasque os dentes de alho, passe pelo espremedor e coloque numa tigela. Adicione a colher de chá de sal e misture muito bem.

Triture os pinoli ou as nozes (no processador, com um pilão ou com as mãos) e junte alho e sal. Lave as folhas de manjericão. Seque e pique em pedaços bem pequenos. Coloque também na tigela. Acrescente o queijo e o azeite e misture muito bem até obter uma pasta homogênea. Tempere com um pouco de pimenta-do-reino e conserve num vidro esterilizado.

Outros links com receitas:

<http://italianfood.about.com/od/greenvegetable/r/blr0011.htm>

<http://en.wikibooks.org/wiki/Cookbook:Pesto>

http://www.e-rcps.com/pasta/rcp/p_opqr/pesto_easy.shtml

<http://www.elook.org/recipes/soup/45152.html>

ANEXO B – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA

Universidade de São Paulo**Faculdade de Saúde Pública****COMITÊ DE ÉTICA – COEP**

Av. Dr. Arnaldo, 715 – CEP 01246-904 – São Paulo – Brasil

Telefones: (55-11) 3066- 7779 fone/fax (55-11) 3064 -7314 e-mail: mdgracas@usp.br**Of.COEP/120/03**

20 de agosto de 2004

Pelo presente, informo que o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo-COEP, **analisou e aprovou**, em sua 05ª/04, realizada em 19.08.04, de acordo com os requisitos da Resolução CNS/196/96, o Protocolo de Pesquisa n.º 1154, intitulado: “OTIMIZAÇÃO DE MISTURA DE INGREDIENTES, COM ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, NO DESENVOLVIMENTO DE MOLHO PARA MACARRÃO”, apresentado pela pesquisadora Yara Severino de Queiroz.

Atenciosamente,

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Eunice", followed by a stylized flourish.

Eunice Aparecida Bianchi Galati
Professora Doutora**Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa da FSP-COEP**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FCF/FEA/FSP

Programa de Pós-Graduação Interunidades em Nutrição Humana Aplicada

Instruções para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado

1. O candidato fará uma apresentação oral do seu trabalho, com duração máxima de trinta minutos.
2. Os membros da banca farão a arguição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de trinta minutos para arguir o candidato, exclusivamente sobre o tema do trabalho apresentado, e o candidato disporá de trinta minutos para sua resposta.
 - 2.1 Com a devida anuência das partes (examinador e candidato), é facultada a arguição na forma de diálogo em até sessenta minutos por examinador.
3. A sessão de defesa será aberta ao público.
4. Terminada a arguição por todos os membros da banca, a mesma se reunirá reservadamente e expressará na ata (relatório de defesa) a aprovação ou reprovação do candidato, baseando-se no trabalho escrito e na arguição.
 - 4.1 Caso algum membro da banca reprove o candidato, a Comissão Julgadora deverá emitir um parecer a ser escrito em campo exclusivamente indicado na ata.
 - 4.2 O candidato será aprovado por unanimidade ou por maioria.
5. Uma cópia da ata de defesa será encartada na versão definitiva do trabalho, que será depositada na biblioteca.
6. Dúvidas poderão ser esclarecidas junto à Secretaria de Pós-Graduação: pgfarma@usp.br, (11) 3091 3621.

São Paulo, 21 de março de 2005.

Profa. Dra. Silvia Maria Franciscato Cozzolino
Presidente da CPG/PRONUT/USP