Universidade de São Paulo
Faculdade de Saúde Pública

**Atuação de extratos naturais com efeito antimicrobiano
sobre a conservação de pães do tipo integral**

Êmily Bezerra Fernandes da Mota

**Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação Nutrição em Saúde Pública
da Faculdade de Saúde Pública da
Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Mestre em Ciências.**

**Área de Concentração: Nutrição em Saúde
Pública**

**Orientadora: Profa. Dra. Maria Elisabeth
Machado Pinto e Silva**

São Paulo
2018

Atuação de extratos naturais com efeito antimicrobiano sobre a conservação de pães do tipo integral

Êmily Bezerra Fernandes da Mota

**Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação Nutrição em Saúde Pública
da Faculdade de Saúde Pública da
Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Mestre em Ciências.**

**Área de Concentração: Nutrição em Saúde
Pública**

**Orientadora: Profa. Dra. Maria Elisabeth
Machado Pinto e Silva**

Versão Revisada

São Paulo

2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

DEDICATÓRIA

Com muito carinho, dedico esta dissertação de mestrado a Deus e a toda minha família, base para a vida.

AGRADECIMENTOS

Ao meu Deus pela presença e força que me disponibilizou durante todos os momentos da minha vida;

À Prof^a Maria Elisabeth Machado Pinto e Silva, minha orientadora, que me acolheu com confiança e paciência durante todo o Mestrado;

À Prof^a Claudia Maria Furlan que com muita dedicação contribuiu com as análises dos extratos;

À Geni Rodrigues Sampaio e Rosana Aparecida Manólio Soares Freitas pelas sugestões que colaboraram de uma maneira positiva para a existência deste trabalho e pelo auxílio com a caracterização e análises físico-químicas das amostras;

Às integrantes da banca Elizabeth Aparecida Ferraz da Silva Torres, Vanessa Dias Capriles e Tatiana Guinoza Matuda Masaoka pelo tempo disponibilizado e pelas orientações no enriquecimento deste trabalho;

À Faculdade de Saúde Pública, ao Instituto de Biociências e à Universidade de São Paulo por esta formação;

Às empresas Kaza Verde produtos naturais e *Sun Foods* Indústria de Produtos Alimentícios LTDA pela doação dos extratos naturais;

À Natalie Dantas por sempre me disponibilizar sua mão amiga e me auxiliar com a etapa estatística do trabalho;

À minha família, meus pais e irmãos pelo amor e incentivo contínuo;

Ao meu marido Jonas e sua família pelo amor e apoio, me encorajando a cumprir esta jornada de mestrado com esforço;

Enfim, a todos aqueles que de alguma forma contribuíram ou torceram pela concretização desta conquista.

MOTA, E. B. F. **Atuação de extratos naturais com efeito antimicrobiano sobre a conservação de pães do tipo integral**. 2018. Dissertação (Mestrado em Nutrição e Saúde Pública) - Faculdade de Saúde Pública da USP, São Paulo, 2018.

RESUMO

Introdução - Os óleos essenciais (OE) e a própolis apresentam propriedades antimicrobianas, o que gera interesse na área de produção de alimentos para substituir conservantes químicos, os quais podem causar danos ao organismo com a sua exposição frequente. O pão, alimento de elevado consumo no Brasil, geralmente possui conservantes químicos dentre seus ingredientes quando é industrializado, inclusive se for do tipo integral. A substituição destes aditivos por conservantes naturais torna-se uma estratégia para promoção da saúde. **Objetivo** - Avaliar a ação conservante de extratos naturais em pães integrais. **Métodos** - Foi utilizado um *mix* de OE (tomilho, orégano e manjerição) e um extrato alcoólico de própolis, que foram analisados quanto às atividades antioxidante e antibacteriana. Estes extratos foram adicionados à formulação de pães integrais, sendo verificados macroscopicamente quanto ao surgimento de sinais de deterioração em dois períodos do ano e analisados físico-quimicamente quanto às medidas de pH, atividade de água (a_w), cor e textura instrumental durante o primeiro, o quarto e o sétimo dia de armazenamento. Realizou-se teste sensorial de aceitabilidade por escala hedônica e por teste de intenção de compra. Os dados foram analisados por meio de análise de variância (ANOVA) e teste Tukey. **Resultados** - Os testes antioxidantes e antibacterianos revelaram menores valores de EC_{50} (quantidade de antioxidante necessária para decrescer a concentração do radical em 50%) e CIM_{50} (menor concentração de um agente antimicrobiano que impede o crescimento visível de um microrganismo em 50%) para a própolis. No período do ano com temperatura média mais baixa, os pães controle e com *mix* de OE apresentaram deteriorações visuais no sétimo dia de armazenamento, enquanto que neste dia não foram observadas deteriorações no pão com própolis. As medidas de pH e a a_w dos pães se encontraram dentro do padrão para esses produtos. A cor dos pães apresentou intervalos de cor L^* de 57,11 a 63,50, a^* de 0,20 a 1,79 e b^* de 22,83 a 25,50 e a força máxima de cisalhamento variação de 9,1 N a 50,2 N. Para a análise sensorial participaram 103 indivíduos com consumo frequente de pães. O teste por escala hedônica revelou médias de notas variando entre “gostei ligeiramente” e “gostei moderadamente”. O IA indicou que o pão controle foi o mais aceito (86,0%), seguido do pão com *mix* de OE (81,6%) e do pão com própolis (75,3%). O teste por intenção de compra indicou a nota média “provavelmente compraria” para todas as amostras.

Nos comentários do painel sensorial observou-se que os extratos foram detectados sensorialmente. **Conclusões** – Nas concentrações aplicadas nos pães integrais, os extratos não alcançaram todas as características de conservantes naturais para serem considerados substitutos de conservantes químicos. O pão com própolis apresentou maior tempo de armazenamento aceitável do que o pão com *mix* de OE, corroborando com os resultados dos testes realizados nos extratos e indicando maior potencial antioxidante e antimicrobiano para o extrato de própolis. As três amostras de pães obtiveram boa aceitação sensorial e com potencial para aquisição.

Descritores: Óleos essenciais; Própolis; Antimicrobianos; Aditivos alimentares; Pão.

MOTA, E. B. F. **Performance of natural extracts with antimicrobial effect on the conservation of whole-grain breads**. 2018. Dissertation (Master in Nutrition and Public Health) - Faculty of Public Health, USP, São Paulo, 2018.

ABSTRACT

Introduction – Essential oils (OE) and propolis have antimicrobial properties, which generate interest in the production of food to replace chemical preservatives, which can cause damage to the body with its frequent exposure. Bread, a food of high consumption in Brazil, generally has chemical preservatives among its ingredients when it is industrialized, even if it is of the integral type. Replacing these additives with natural preservatives becomes a strategy for health promotion. **Purpose** – Evaluate the preservative action of natural extracts in whole grains. **Methods** – A mix of OE (thyme, oregano and basil) and an alcoholic extract of propolis were used, which were analyzed for antioxidant and antibacterial activities. These extracts were added to the whole loaves formulation, being macroscopically verified for the appearance of signs of deterioration in two periods of the year and physico-chemically analyzed for pH, water activity (aw), color and instrumental texture during the first, the fourth and the seventh day of storage. A sensorial acceptance test was performed by hedonic scale and by intention of purchase test. Data were analyzed through analysis of variance (ANOVA) and Tukey test. **Results** – Antioxidant and antibacterial tests revealed lower values of EC50 (amount of antioxidant needed to decrease the concentration of the radical by 50%) and MIC50 (lower concentration of an antimicrobial agent that prevents visible growth of a microorganism by 50%) for propolis. In the period of the year with lower average temperature, the control loaves and with OE mix presented visual deteriorations in the seventh day of storage, whereas in this day no deteriorations in the bread with propolis were observed. The pH and aw measurements of the breads met the standard for these products. The color of the breads presented L * color intervals from 57.11 to 63.50, a * from 0.20 to 1.79 and b * from 22.83 to 25.50 and the maximum shear force variation of 9.1 N to 50.2 N. For the sensorial analysis 103 individuals participated with frequent consumption of breads. The hedonic scale test revealed mean scores ranging from "slightly liked" to "moderately liked". The IA indicated that the control bread was the most accepted (86.0%), followed by bread with mix of OE (81.6%) and bread with propolis (75.3%). The intent-to-buy test indicated the average grade "I would probably buy" for all samples. In the comments of the sensory panel it was observed that the extracts were detected sensorially. **Conclusions** – At the concentrations applied to whole grain breads, the extracts did not achieve all the characteristics of natural preservatives to be considered substitutes for chemical preservatives. The propolis bread had a longer acceptable storage time than bread with OE mix, corroborating with the results of the tests carried out on the extracts and indicating a higher antioxidant and antimicrobial potential for the propolis extract. The three loaf samples had good sensory acceptance and potential for acquisition.

Key words: Essential oils; Propolis; Antimicrobials; Food additives; Bread.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVOS	17
2.1	OBJETIVO GERAL	17
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3	REVISÃO DA LITERATURA	18
3.1	EXTRATOS DE PLANTAS	18
3.1.1	Extratos com Atividade Antimicrobiana	18
3.1.1.1	<i>Ocimum basilicum</i> (manjerição)	18
3.1.1.2	<i>Oreganum vulgare</i> (orégano)	19
3.1.1.3	<i>Thymus vulgaris</i> (tomilho)	19
3.1.1.4	Extrato de Própolis	20
3.1.2	Extratos Naturais como Substitutos de Conservantes Químicos	22
3.2	ADITIVOS ALIMENTARES	23
3.2.1	Antioxidantes Químicos	24
3.2.2	Conservantes Químicos	25
3.2.3	Aditivos Químicos e Implicações para a Saúde	26
3.3	PANIFICAÇÃO	28
3.3.1	Pão do Tipo Integral	29
3.3.1.1	Conservação de Pães Integrais	30
4	MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1	ANÁLISES DOS EXTRATOS	33
4.1.1	Extrato de Própolis	33
4.1.1.1	Cálculo do Limite Máximo Utilizado na Produção do Pão	33
4.1.2	Óleos Essenciais (OE)	34
4.1.2.1	Elaboração do <i>Mix</i> de Óleos Essenciais	34
4.1.3	Atividade Antioxidante	35
4.1.3.1	Análise da Atividade de Sequestro do Radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil)	35
4.1.3.2	Análise da Atividade de Sequestro do Radical Peroxil - ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity)	37
4.1.4	Atividade Antibacteriana	38
4.2	ANÁLISES DOS PÃES	40
4.2.1	Elaboração dos Pães	40
4.2.2	Caracterização das Amostras e Análises Físico-químicas	43
4.2.2.1	Medida de pH	43
4.2.2.2	Medida de Atividade de Água (a_w)	44
4.2.2.3	Medida da Cor Instrumental	44
4.2.2.4	Medida da Textura Instrumental	45
4.2.3	Análise Macroscópica Observacional	45
4.2.4	Análise Sensorial	46
4.2.4.1	Teste de Aceitação por Escala Hedônica	47

4.2.4.2	Teste de Aceitação por Escala de Intenção de Compra	48
4.2.4.3	Comentários do Painel Sensorial	48
4.3	ASPECTOS ÉTICOS	48
4.4	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	49
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
5.1	ANÁLISES DOS EXTRATOS	50
5.1.1	Atividade Antioxidante	50
5.1.1.1	Análise da Atividade de Sequestro do Radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil)	50
5.1.1.2	Análise da Atividade de Sequestro do Radical Peroxil - ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity)	51
5.1.2	Atividade antibacteriana	53
5.2	ANÁLISES DOS PÃES	55
5.2.1	Caracterização das Amostras e Análises Físico-químicas	55
5.2.1.1	Medida de pH	55
5.2.1.2	Medida de Atividade de Água (a_w)	57
5.2.1.3	Medida da Cor Instrumental	58
5.2.1.4	Medida da Textura Instrumental	60
5.2.2	Análise Macroscópica Observacional	62
5.2.3	Análise Sensorial	66
5.2.3.1	Teste de Aceitação por Escala Hedônica	67
5.2.3.2	Teste de Aceitação por Escala de Intenção de Compra	73
6	CONCLUSÕES	75
6.1	CONSIDERAÇÕES GERAIS	75
7	CONFLITO DE INTERESSE	76
	REFERÊNCIAS	77
	ANEXOS	
	Anexo 1 - Frasco do Extrato de Própolis	88
	Anexo 2 - Laudo do Extrato de Própolis	89
	Anexo 3 - Frascos dos Óleos Essenciais	90
	Anexo 4, A - Laudo Técnico do Óleo Essencial de Manjerição	91
	Anexo 4, B - Laudo Técnico do Óleo Essencial de Orégano	92
	Anexo 4, C - Laudo Técnico do Óleo Essencial de Tomilho	93
	Anexo 5 - Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa	94
	Anexo 6 - Questionário para Caracterização do Painel Sensorial	97
	Anexo 7 - Escala Hedônica de 7 Pontos	98
	Anexo 8 - Escala Intenção de Compra	99
	CURRÍCULO LATTES	100

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Valores médios e desvios padrão de pH das amostras de pães em três dias durante o período de armazenamento.	56
Tabela 2 -	Valores médios e desvios padrão de atividade de água (a_w) das amostras de pães em três dias durante o período de armazenamento.	57
Tabela 3 -	Valores médios e desvios padrão dos intervalos de cor instrumental ($L^*a^*b^*$) das amostras de pães em três dias durante o período de armazenamento.	59
Tabela 4 -	Valores médios expressos em força máxima de cisalhamento (N) e desvios padrão da textura instrumental das amostras de pães em três dias durante o período de armazenamento.	61
Tabela 5 -	Perfil de degustadores participantes da análise sensorial.	67
Tabela 6 -	Valores médios e desvios padrão das notas obtidas por atributo e por amostra no teste de aceitação por escala hedônica de 7 pontos.	68
Tabela 7 -	Valores médios e desvios padrão das notas obtidas no teste de aceitação por escala de intenção de compra de 5 pontos.	73

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1** - Componentes químicos responsáveis pelas atividades biológicas da própolis brasileira. 21
- Quadro 2** - Classificação de alguns alimentos, em especial o pão, quanto ao pH e a_w que possuem. 31
- Quadro 3** - Exemplos de bactérias e fungos e os valores de pH e a_w mínimos que necessitam para desenvolvimento. 32
- Quadro 4** - Ingredientes utilizados, ordem de incorporação e proporção em base de farinha para a elaboração dos pães controle, com própolis e com *mix* de óleos essenciais. 41

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Redução do radical DPPH.	35
Figura 2 -	Estrutura química da fluoresceína (7) e diclorofluoresceína (8).	37
Figura 3 -	Fluxograma de produção, fatiamento e embalagem dos pães controle e elaborados com os extratos naturais.	42
Figura 4 -	Bandeja recebida pelos provadores para a realização da análise sensorial.	47
Figura 5 -	Curvas obtidas no ensaio antioxidante (DPPH) demonstrando a porcentagem de atividade em função de concentrações variáveis do padrão Trolox (A), do extrato de própolis (B) e do <i>mix</i> de óleos essenciais (OE) (C).	50
Figura 6 -	Curvas obtidas no ensaio antioxidante (ORAC) demonstrando a Net AUC em função de concentrações variáveis do padrão Trolox (A), do extrato de própolis (B) e do <i>mix</i> de óleos essenciais (OE) (C).	52
Figura 7 -	Curvas obtidas no ensaio antibacteriano demonstrando a porcentagem de inibição de crescimento da bactéria <i>Escherichia coli</i> em função de concentrações variáveis do padrão canamicina (A), do extrato de própolis (B) e do <i>mix</i> de óleos essenciais (OE) (C).	53
Figura 8 -	Curvas obtidas no ensaio antibacteriano demonstrando a porcentagem de inibição de crescimento da bactéria <i>Bacillus subtilis</i> em função de concentrações variáveis do padrão canamicina (A), do extrato de própolis (B) e do <i>mix</i> de óleos essenciais (OE) (C).	54
Figura 9 -	Possíveis colônias de fungos observadas nos pães controle e com <i>mix</i> de óleos essenciais no sétimo dia de armazenamento, elaborados no início do mês de julho de 2017.	62
Figura 10 -	Possíveis colônias de fungos observadas nos pães no sétimo dia de armazenamento, elaborados no final do mês de abril de 2018.	63
Figura 11 -	Colônias dos fungos: <i>Aspergillus ochraceus</i> (A), <i>Penicillium roqueforti</i> (B) e <i>Rhizopus stolonifer</i> (C). Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, 2005.	64
Figura 12 -	Distribuição das notas obtidas no teste de aceitação por escala hedônica de 7 pontos para os pães controle (A), com própolis (B) e com <i>mix</i> de óleos essenciais (OE) (C) por atributos analisados.	69
Figura 13 -	Distribuição das notas obtidas no teste de aceitação por escala de intenção de compra de 5 pontos por amostras de pães analisados.	74

SIGLAS UTILIZADAS

- ABIP - Associação Brasileira da Indústria de Panificação e Confeitaria.
- a_w - Atividade de água.
- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária.
- ATP - Adenosina trifosfato.
- a* - Coordenada vermelho/verde.
- BHT - Butil hidroxitolueno.
- b* - Coordenada amarelo/azul.
- CIM₅₀ - Concentração Inibitória Mínima capaz de inibir 50% dos isolados;
- CIE - *Commission Internationale de l'Eclairage*.
- DPPH - Radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil.
- EC₅₀ - Concentração Eficiente para decrescer a concentração inicial do radical em 50%.
- FAO - Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura.
- IA - Índice de Aceitabilidade.
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.
- IDA - Ingestão Diária Aceitável.
- JECFA - Comitê Misto de Peritos FAO/OMS sobre aditivos alimentares.
- L* - Luminosidade.
- MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e abastecimento.
- NCCLS - *National Committee for Clinical Laboratory Standards*.
- Net AUC - Diferença entre a área da amostra subtraída pela área do branco/controle.
- OE - Óleos essenciais.
- OMS - Organização Mundial da Saúde.
- ORAC - *Oxygen Radical Absorbance Capacity*.
- PEBD - Polietileno de baixa densidade.
- pH - Potencial hidrogeniônico.
- POF - Pesquisa de Orçamentos Familiares.
- ROS - Espécies reativas de oxigênio.
- TCLE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

1 INTRODUÇÃO

As plantas e especiarias são mencionadas como recursos naturais para fins medicamentosos e até mesmo como conservadores de alimentos desde a antiguidade (MESQUITA et al., 2008; RODRIGUES e SILVA, 2010; COAN e MATIAS, 2014). Diversos estudos científicos mostram o efeito antimicrobiano de ervas como o *Origanum vulgare* (orégano), o *Ocimum basilicum* (manjerição) e o *Thymus vulgaris* (tomilho) (COIMBRA e SILVA, 1958; PINTO et al., 2000; FRANCO e LANDFRAF, 2008).

A própolis, substância produzida por abelhas, é composta por metabólitos secundários de plantas da localidade da colmeia, pois possuem, além de outros componentes, resina e pólen (PEREIRA et al., 2002; SALATINO et al., 2011; FIANCO, 2014). Da mesma forma, a própolis possui propriedade antimicrobiana, devido à presença de compostos fenólicos (PEREIRA et al., 2002; BANKOVA, 2005).

A utilização de extratos naturais como estratégia para a conservação de alimentos e para substituir aditivos químicos alimentares, torna-se conveniente, tendo em vista que os efeitos de longo prazo sobre a saúde e o efeito cumulativo da exposição a vários aditivos nem sempre são bem conhecidos (MITCHELL, 2008; ALVES, 2010; KHANUM et al., 2011; BRASIL, 2014).

Estudos mostram que há possibilidade de ocorrer reações adversas pelo consumo de aditivos alimentares contínuo e veiculado por diversos alimentos, como, por exemplo, alergias, aumento da hiperatividade e câncer (POLÔNIO e PERES, 2009; SOKOVIĆ et al., 2010; AUN et al., 2011; ALBUQUERQUE et al., 2012; HONORATO et al., 2013; FERREIRA, 2015).

Várias funções desempenhadas por esses aditivos podem ser citadas, como agente de massa, antiumectante, antioxidante, corante, espessante, aromatizante, estabilizante e conservante, todas atuando em benefícios para as indústrias de alimentos, retardando alterações oxidativas ou microbiológicas nos produtos, por exemplo. A partir disto, possibilita-se a produção de uma diversidade de alimentos industrializados que vêm suprir as demandas do modelo atual de vida urbano, com participação crescente na dieta brasileira desde 1980 (BRASIL, 1997; GARCIA, 2003; MARTINS et al., 2013).

O pão é um alimento costumeiramente presente na mesa dos brasileiros e o pão do tipo integral é um dos produtos enriquecidos com fibras alimentares mais consumidos. Contudo, no caso dos pães industrializados, observa-se a presença frequente de aditivos conservantes nas listas de ingredientes dos rótulos, o que os caracteriza como alimento ultraprocessado. Este achado contradiz a tendência crescente pela busca de uma alimentação mais adequada para a

saúde, na qual os consumidores associam a alegação “integral” como sendo um símbolo de alimento saudável pelo fato de conter fibras, havendo também uma tendência de se evitar a ingestão de aditivos químicos (BRASIL, 2010; BRASIL, 2014).

Diante das propriedades conservantes que alguns extratos naturais possuem e tendo em vista o aumento do consumo de alimentos com aditivos alimentares pela população brasileira e o impacto negativo sobre a saúde pública que este consumo pode causar, justifica-se pesquisar sobre a possibilidade da utilização desses extratos como substitutos de aditivos alimentares, mais especificamente conservantes químicos em pães, alimento frequentemente consumido pela população, visando contribuir com a promoção da saúde.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo do presente estudo foi avaliar a ação conservante de extratos naturais em pães integrais.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Elaborar um *mix* de óleos essenciais de manjerição, orégano e tomilho;
- b) Avaliar a atividade antioxidante e antibacteriana do extrato de própolis e do *mix* de óleos essenciais;
- c) Elaborar pães integrais com o extrato de própolis, com o *mix* de óleos essenciais e sem extratos (controle);
- d) Observar o surgimento de sinais de deterioração nas amostras;
- e) Verificar a ação dos extratos nas características físico-químicas das amostras;
- f) Analisar a aceitação sensorial dos pães.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 EXTRATOS DE PLANTAS

Desde a antiguidade as plantas são utilizadas como recursos naturais para fins terapêuticos e até mesmo como conservadores de alimentos (MESQUITA et al., 2008; RODRIGUES e SILVA, 2010; COAN e MATIAS, 2014). Esse conhecimento empírico adquirido por diversos povos e gerações é também estudado no meio científico (PEREIRA et al., 2017).

As pesquisas identificam fitoquímicos presentes em ervas que comprovam o efeito conservante de plantas: o gengibre, o orégano e o alecrim apresentam ação antifúngica; a sálvia, o coentro, o manjerição, o orégano, o gengibre, o alho, o barbatimão, o tomilho e a salsa possuem ação antibacteriana (MITCHELL, 2008; AGUIAR et al., 2009; FIB, 2010; PINHO et al., 2012; GRANDIS et al., 2015; SAKKAS e PAPADOPOULOU, 2017; ELANSARY et al., 2018).

3.1.1 Extratos com Atividade Antimicrobiana

3.1.1.1 *Ocimum basilicum* (manjerição)

A ação antibacteriana do *Ocimum basilicum* (manjerição, folhas), da família *Lamiaceae*, pode ser evidenciada nos estudos de Sartoratto et al. (2004) e Silva (2015), que avaliaram *in vitro* a atividade antibacteriana do óleo essencial deste vegetal comprovando-a sobre a bactéria *Staphylococcus aureus*.

O potencial antimicrobiano do manjerição é explicado pela presença de componentes químicos na erva. Análises fitoquímicas do seu extrato bruto indicam a presença de componentes como flavonoides, antraquinonas, taninos, linalol e geraniol. Além da ação antimicrobiana, o manjerição também apresenta atividade antioxidante devido a presença de metil-ésteres de ácidos graxos (OZCAN e CHALCHAT, 2002; SOKOVIĆ et al., 2010; ROSADO et al., 2011; SILVA, 2015; NAIDU et al., 2016).

3.1.1.2 *Oreganum vulgare* (orégano)

Mitchell (2008) expõe em seu trabalho que o óleo essencial do *Oreganum vulgare* (orégano, folhas), da família *Lamiaceae*, é capaz de inibir, em baixas dosagens, cepas de fungos, como *A. flavus*, *A. fumigatus* e *A. ochraceus*. Ainda, comenta que este óleo apresenta potencial para ser usado como agente antimicrobiano natural.

No estudo de Cattelan e colaboradores (2015) verificou-se a aceitação de um condimento preparado com óleo essencial de orégano, que foi colocado como alternativa para conservação natural de alimentos e para substituição à aditivos químicos. Foi identificado um ponto de partida promissor para a elaboração de mais pesquisas sobre a aceitabilidade sensorial deste óleo em alimentos.

Em outro estudo, o efeito antimicrobiano do orégano foi avaliado em forma de um *mix* com pimenta e alecrim (*Rosmarinus officinalis*), os quais, da mesma forma, apresentam atividade antibacteriana. Foi concluído que o *mix* exibe efeito antimicrobiano frente aos microrganismos *Staphylococcus spp.*, *Aeromonas spp.* e *Escherichia coli*. Os autores ressaltam que a utilização deste produto natural, se utilizado em alimentos, não deixaria resíduos prejudiciais nos mesmos, sendo uma boa estratégia de utilização pela indústria alimentícia (NASCIMENTO et al., 2014).

Identificou-se que os componentes químicos carvacrol e timol encontrados nesta erva, são responsáveis pela atividade biológica antimicrobiana do orégano (COIMBRA e SILVA, 1958; FORSYTHE, 2002; FRANCO e LANDFRAF, 2008; SOKOVIĆ et al., 2010; BHARTI e VASUDEVA, 2013).

3.1.1.3 *Thymus vulgaris* (tomilho)

O *Thymus vulgaris* (tomilho, folhas), da família *Lamiaceae*, também mostra atividade antibacteriana. Alves (2010) avaliou a atuação do tomilho contra bactérias *E. coli*, *Salmonella enteritidis* e *S. aureus* e verificou um grande potencial antimicrobiano.

Boruga e colaboradores (2014) testaram a atividade antimicrobiana do tomilho contra bactérias e fungos e obtiveram resultados confirmando o elevado poder antimicrobiano, podendo ser usado como fonte de antissépticos naturais para uso da indústria alimentícia. Os componentes químicos presentes nesta erva, como o carvacrol e o timol são responsáveis pela referida atividade (PINTO et al., 2000; SOKOVIĆ et al., 2010).

Suhr e Nielsen (2003) estudaram a atividade antifúngica de óleos essenciais das

seguintes plantas: louro, folhas de canela, cravo, erva-cidreira, mostarda, laranja, sálvia, tomilho e alecrim. Os autores provaram que o óleo essencial de tomilho foi o melhor inibidor de crescimento de fungos dentre as plantas estudadas.

Jay (2005) relata que o mecanismo pelo qual algumas plantas inibem o crescimento microbiano não está claro, porém a atividade antimicrobiana não pode ser questionada, pois um considerável número de estudos comprova a eficácia de plantas contra microrganismos contaminantes de alimentos, inclusive contra fungos produtores de micotoxinas. O desafio está na utilização destas plantas nos alimentos como substituto aos conservantes químicos, tendo em vista que são menos eficazes nos alimentos do que no meio de cultura.

3.1.1.4 Extrato de Própolis

A própolis é uma substância produzida por abelhas a partir de plantas da região, sendo composta por secreções salivares deste animal, além de pólen, resina e cera. Como parte de sua composição tem origem vegetal, a própolis contém metabólitos secundários, que variam de acordo com a vegetação local e com a época do ano (PEREIRA et al., 2002; SALATINO et al., 2011; FIANCO, 2014).

Há uma variedade de componentes químicos que podem ser encontrados na própolis. Dentre eles destacam-se os compostos fenólicos, especialmente os flavonoides, que formam mais de 50% do peso da própolis e são responsáveis por características antimicrobianas e antioxidantes do produto (PEREIRA et al., 2002; KUNRATH et al., 2017). Estes compostos danificam o crescimento e o metabolismo das bactérias, causando a ruptura da integridade da parede celular, bloqueando os canais iônicos e inibindo a síntese de adenosina trifosfato (ATP) (KOWALSKI e MAKAREWICZ, 2017).

Com relação a atividade antibacteriana da própolis, as cepas gram positivas parecem ser mais sensíveis do que as negativas. Vargas e colaboradores (2004) testaram a atividade antibacteriana da própolis *in vitro* sobre 161 isolados bacterianos, os quais foram considerados sensíveis ao extrato da própolis utilizada quando não se observava crescimento bacteriano na placa em 3 dias de incubação a 37°C. O extrato da própolis inibiu 92,6% dos isolados gram positivos e 42,5% dos gram negativos, concluindo que a própolis avaliada foi capaz de exercer ação antibacteriana efetiva contra a maioria dos isolados testados.

Bankova (2005) cita os componentes responsáveis pelas atividades biológicas da própolis brasileira:

Quadro 1 – Componentes químicos responsáveis pelas atividades biológicas da própolis brasileira.

Atividade antibacteriana	Atividade antitumoral	Atividade hepatoprotetora	Atividade antioxidante
Ácidos p-cumáricos prenilados, diterpenos labdânicos	Ácidos p-cumáricos prenilados, diterpenos clerodanos, benzofuranos	Ácidos p-cumáricos prenilados, flavonóides, lignanos, ácidos cafeoilquínicos	Ácidos p-cumáricos prenilados, flavonóides

Fonte: Bankova (2005).

O tipo de própolis brasileira pode ser classificado por sua origem botânica em própolis verde, vermelha e marrom. A própolis verde é a mais popularmente estudada, sendo encontrada na região sudeste do país e composta por metabólitos da planta *Baccharis dracunculifolia* (alecrim-do-campo), o ácido cinâmico, flavonoides, terpenoides e outros. A própolis vermelha, encontrada no nordeste do Brasil, foi descoberta a pouco tempo, por isso sua composição química não é conhecida completamente, no entanto há registros da presença da planta *Dalbergia ecastophyllum*. Na própolis vermelha podem estar presentes fenóis, isoflavonas, triterpenoides e benzofenonas preniladas, este último com propriedade antifúngica (SILVA et al., 2008; FIANCO, 2014).

Já a própolis marrom pode ser coletada em regiões próximas ao Mato Grosso do Sul, sendo proveniente de plantas como *Piptadenia falcata* (angico-do-cerrado), *Tabebuia spp.* (ipês), *Vernonia spp.* (assa-peixes) e *Cecropia pachystachya* (embaúba). Dentre os constituintes químicos deste tipo de própolis pode-se citar flavonoides, benzofenononas, ácidos fenólicos e seus ésteres, que apresentam propriedades antioxidantes e antimicrobianas (BASTOS et al., 2011; FIANCO, 2014; GOMES et al., 2016).

Há estudos que testam as propriedades antibacterianas da própolis de forma sinérgica com óleos essenciais de plantas. O trabalho de Probst et al. (2011) combina extrato etanólico de própolis com óleos essenciais de gengibre, hortelã-pimenta e canela. Os autores mostram que esta combinação pode ser valiosa no desenvolvimento de fitoterápicos com ações antimicrobianas contra microrganismos gram-positivos e gram-negativos.

Além da atividade antibacteriana que a própolis possui, menciona-se ainda a atividade

da própolis contra fungos (LONGHINI et al., 2007). Assim, devido a capacidade antimicrobiana da própolis, torna-se relevante a sua utilização em alimentos como substituto de conservantes químicos, tendo em vista que há uma tendência na alimentação de se evitar a ingestão de aditivos químicos ou substituí-los por naturais, sendo este um símbolo da saudabilidade para os consumidores (BRASIL, 2010).

3.1.2 Extratos Naturais como Substitutos de Conservantes Químicos

Diante do relato sobre a atividade antimicrobiana de alguns extratos naturais já bem estabelecida na literatura, torna-se interessante a utilização desses extratos como estratégia para a conservação de alimentos e para substituir aditivos químicos alimentares, como sugerem Ernandes e Garcia-Cruz (2007), Mitchell (2008), Erkmen e Ozcan (2008) e Alves (2010) em suas pesquisas.

A referida substituição supre a demanda exigida por consumidores de produtos naturais e a busca por conservantes alternativos que garantam a segurança alimentar (HINTZ et al., 2015).

Carocho et al. (2014) relatam que é esperado maior notoriedade para o uso de aditivos naturais se comparado aos químicos, isso pelo fato dos primeiros contribuírem com efeitos benéficos para a saúde, porém, faz-se necessário realizar estudos sobre a utilização dos mesmos. Ainda comentam que certamente ocorrerá uma transição para o uso de aditivos naturais e que há quatro forças para decidir a respeito dos aditivos alimentares: legisladores, cientistas, empresas e consumidores.

Além da necessidade de realização de testes científicos para comprovação da eficácia dos aditivos naturais como conservantes de alimentos, vale ressaltar a importância de se verificar a viabilidade de emprego e aceitação de alimentos com extratos naturais, por parte dos consumidores (TRAJANO et al., 2009). Para isso, pode-se utilizar a análise sensorial de alimentos por meio de métodos afetivos, os quais refletem uma manifestação subjetiva do consumidor sobre a preferência ou aceitação do produto (TEIXEIRA, 2009).

Hintz e colaboradores (2015) reportam em seu trabalho sobre a importância de realizar estudos sensoriais, além das outras avaliações científicas, para analisar se os alimentos sofrem alterações organolépticas pela adição de antimicrobianos naturais.

Estudos como o de Ferreira et al. (2011) mostram a possibilidade da utilização de extratos de plantas como substitutos de aditivos alimentares sintéticos. Neste trabalho, avaliou-se a possibilidade do extrato alcoólico de erva mate (*Ilex paraguariensis*) para substituir total

ou parcialmente antioxidantes sintéticos e pôde-se concluir que o extrato a 0,1% de concentração foi eficiente em sua atividade antioxidante, já que preveniu a oxidação lipídica em hambúrgueres de carne. Além disso, a adição do extrato no alimento mostrou-se aceitável sensorialmente.

Ribeiro-Santos et al. (2016) realizaram análises *in vitro* para verificar a atividade antioxidante e antimicrobiana de óleos essenciais. Os autores concluíram que os óleos estudados, utilizados individualmente ou em combinação, são uma ótima alternativa aos aditivos sintéticos devido a capacidade antioxidante e/ou antimicrobiana que possuem. Sugere-se que sejam adicionados diretamente aos alimentos ou incorporados nas embalagens dos produtos com o intuito de conservação dos mesmos.

Outro exemplo da possibilidade do uso de extratos naturais como conservantes alimentares encontra-se no estudo de Araújo (2005), que testou extratos alcoólicos a 10% de ervas, como o tomilho e o orégano, para conservação de pães de sal e de pães doce e obteve resultados eficientes, pois os pães alcançaram 17 dias de armazenamento sem a formação de colônias de fungos. Da mesma forma, como no estudo de Ferreira et al. (2011), a análise sensorial realizada demonstrou boa aceitação desses produtos por parte dos provadores.

3.2 ADITIVOS ALIMENTARES

O conceito de aditivo alimentar pode ser variável de país para país e, da mesma forma, uma substância pode ser permitida em uma nação e proibida em uma outra vizinha, o que gera problemas na comercialização de alimentos industrializados entre países. Então, diante da necessidade de desenvolver um padrão mundial no uso de aditivos em alimentos e avaliar a segurança do seu consumo, foi criado em 1956 o Comitê Conjunto de Especialistas da FAO/OMS sobre Aditivos Alimentares (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives - JECFA) (GAVA, 1983; FAO, 2018).

No Brasil, de acordo com a portaria nº 540, de 27 de outubro de 1997, aditivo alimentar é:

“qualquer ingrediente adicionado intencionalmente aos alimentos, sem propósito de nutrir, com o objetivo de modificar as características físicas, químicas, biológicas ou sensoriais, durante a fabricação, processamento, preparação, tratamento, embalagem, acondicionamento, armazenagem, transporte ou manipulação de um alimento. Ao agregar-se poderá resultar em que o próprio aditivo ou seus derivados se convertam em um componente de tal alimento. Esta definição não inclui os contaminantes ou substâncias nutritivas que sejam incorporadas ao alimento para manter ou modificar suas propriedades nutricionais”.

A indicação do emprego de aditivos intencionais nos rótulos dos alimentos é obrigatória desde 1969 pelo decreto lei nº 986. Quando presentes em alimentos embalados devem ser indicados, de forma legível, nos rótulos pelo nome ou código correspondente com a especificação da classe a que pertence. Para cada categoria de alimento existe uma resolução que aprova o uso de aditivos alimentares e seus limites máximos permitidos. Por exemplo, a resolução nº 383, de 05 de agosto de 1999, aprova o uso de aditivos alimentares, estabelecendo suas funções e seus limites máximos para a categoria de alimentos 7 – produtos de panificação e biscoitos (BRASIL, 1969; BRASIL, 1999).

As funções dos aditivos alimentares podem ser diversas: agente de massa, antiespumante, antiumectante, antioxidante, corante, conservador, edulcorante, espessantes, geleificante, estabilizante, aromatizante, umectante, regulador de acidez, acidulante, emulsificante, melhorador de farinha, realçador de sabor, fermento químico, glaceante, agente de firmeza, sequestrante, estabilizante de cor, espumante (BRASIL, 1997).

3.2.1 Antioxidantes Químicos

A portaria nº 540 de 27 de outubro de 1997 define antioxidante como sendo a “substância que retarda o aparecimento de alteração oxidativa no alimento”. Sua função é semelhante ao conservante, pois impede ou retardar a deterioração de alimentos, no entanto, o antioxidante atua especialmente na proteção de óleos e gorduras, evitando a formação de “ranço” oxidativo, pela reação com o radical livre (CARVALHO, 2005).

Dessa forma, os antioxidantes contribuem para a estabilidade dos componentes dos alimentos, mantendo seu valor nutricional e sua cor, evitando a degradação e a descoloração (RIBOTTA e TADINI, 2009). Os antioxidantes podem ter funções além das atividades que evitam a auto oxidação de lipídeos, aumentando a validade, inclusive, de produtos de panificação (JAY, 2005; NANDITHA e PRABHASANKAR, 2009).

São exemplos de antioxidantes permitidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para uso em alimentos: ascorbato de sódio, ácido eritórbito, ácido isoascórbico, sulfito de sódio, butil hidroxitolueno (BHT), citrato de isopropila e eritorbato de sódio (BRASIL, 1999; BRASIL, 2013).

O uso destes antioxidantes sintetizados tem sido questionável devido às implicações que podem causar para a saúde humana. Por outro lado, os antioxidantes naturais, como os flavonoides e os compostos fenólicos encontrados na própolis e outros extratos vegetais podem ser uma opção mais saudável de aditivos para a indústria de alimentos, pois além da propriedade

antioxidante estes produtos apresentam efeitos benéficos sobre a saúde humana e, utilizados em níveis adequados, não influenciam no paladar (BORGES et al., 2009; ALVES e KUBOTA, 2013).

Os efeitos benéficos pelo consumo destes antioxidantes estão relacionados com a proteção contra doenças inflamatórias e com a função de impedir o dano oxidativo causado por espécies reativas de oxigênio (ROS), que ocorrem naturalmente no organismo, pela respiração celular por exemplo, ou por fontes externas, como a radiação ionizante. Para que ROS não sejam deletérias ao organismo, faz-se necessário o equilíbrio pelo consumo de antioxidantes, os quais transformam as espécies reativas de oxigênio em subprodutos inofensivos (MOREIRA e MANCINI-FILHO, 2004; RUFINO et al., 2007; BRESCIA, 2012).

3.2.2 Conservantes Químicos

Segundo a portaria nº 540 de 27 de outubro de 1997, conservador é a “substância que impede ou retarda a alteração dos alimentos provocada por microrganismos ou enzimas”. Os conservantes são utilizados, desde os povos antigos, com o objetivo de aumentar a durabilidade dos alimentos. Há evidências de várias técnicas de conservação como a secagem e o congelamento, ainda usadas e aperfeiçoadas na atualidade (ORDÓÑEZ, 2005).

O uso de conservantes também foi motivado pela globalização, pois o comércio necessitava prover mantimentos para regiões distantes. Desde então, a indústria de alimentos é motivada para utilizar aditivos químicos para conservar alimentos, visando prolongar a vida de prateleira e garantir a sua comercialização para conquistar mais consumidores (ORNELAS, 2006).

Há vários tipos de conservantes químicos para uso em alimentos liberados pela ANVISA, como o propionato de cálcio, ácido sórbico, sorbato de sódio, benzoato de potássio, sulfito de sódio, metabissulfito de sódio e sorbato de cálcio (BRASIL, 2013).

O propionato de cálcio e o ácido sórbico são comumente usados em produtos de panificação. O primeiro possui boa solubilidade, características inodoras e atividade eficaz contra fungos, porém baixa atividade contra a maioria das bactérias e não afeta leveduras. Já o segundo apresenta eficácia contra leveduras, fungos e algumas bactérias, inativando as desidrogenases, enzimas necessárias ao metabolismo de carboidratos e ácidos graxos, contudo exerce efeitos adversos na massa, pois reduzem o volume do pão e propiciam massas pegajosas (GAVA, 1983; RIBOTTA e TADINI, 2009).

Vale ressaltar que na definição de conservantes químicos não estão inclusos sais

comuns, vinagres, açúcares, condimentos ou óleos extraídos de condimentos e substâncias provenientes da defumação (FRANCO e LANDGRAF, 2008).

Apesar das funções dos conservantes para a indústria de alimentos, estes e outros aditivos químicos podem causar reações adversas para a saúde dos consumidores, como exacerbações de asma em indivíduos asmáticos sensíveis, dermatites e até mesmo câncer (POLÔNIO e PERES, 2009; FAVERO et al., 2011).

3.2.3 Aditivos Químicos e Implicações para a Saúde

O uso de aditivos não é justificável e não será permitido quando houver evidência ou suspeita de que o mesmo é tóxico; quando interferir no valor nutricional do alimento; quando for utilizado para encobrir deteriorações de alimentos; quando induzir o consumidor a erro ou engano; e quando não cumprir a legislação de aditivos em alimentos (GAVA, 1983).

Antes de um aditivo ser autorizado para uso em alimentos, deve ser realizado um estudo toxicológico do mesmo. Quando liberados para consumo, ainda serão reavaliados cientificamente e mantidos sob observação, pois se faz necessário levar em consideração não apenas as funções tecnológicas dos aditivos alimentares, mas especialmente seus efeitos colaterais, contraindicações e ações pelo uso prolongado (ANTUNES e ARAÚJO, 2000; ALBUQUERQUE et al., 2012).

A avaliação toxicológica envolve ensaios em animais que determinam a toxicidade aguda, testes com duração de semanas; a toxicidade subaguda, testes que ocorrem durante um período de tempo equivalente a 10% da vida provável da espécie animal estudada; e a toxicidade crônica, testes por um longo período de tempo, equivalente a 50% da vida provável do animal (GAVA, 1983).

De acordo com o artigo 24 do decreto lei nº 986 de 1969, só será permitido o emprego de aditivo intencional, dentre outros aspectos, quando comprovada a sua inocuidade e quando utilizado no limite estabelecido para a Ingestão Diária Aceitável (IDA). Por outro lado, poucos estudos avaliam o consumo de aditivos alimentares pelos consumidores, tornando-se possível o surgimento de efeitos colaterais pela ingestão excessiva de tais aditivos (BRASIL, 1997; POLÔNIO e PERES, 2009).

No Kuwait (Península Arábica) foi constatado consumo de corantes acima do limite máximo permitido para crianças (HUSAIN et al., 2006) e nos países da Europa foi demonstrado consumo elevado de sulfitos, polissorbatos, estearoil-lactilatos e ésteres de sorbitano, este último encontrado em produtos de panificação (VIN et al., 2013). Outro estudo foi realizado

para verificar a ingestão de aditivos alimentares pelos franceses e foi detectado consumo de nitritos, sulfitos e urucum com IDA ultrapassada por crianças e adultos (BEMRAH et al., 2008).

Da mesma forma, em uma pesquisa realizada em um ambulatório pediátrico do Rio de Janeiro – BR foi verificado consumo de corantes acima da IDA quando aplicado um questionário para 150 responsáveis de crianças de até 10 anos de idade (SCHUMANN et al., 2008).

Polônio e Peres (2009) realizaram uma revisão sistemática da literatura e identificaram os riscos gerados pelo consumo de aditivos alimentares como um problema de saúde pública no Brasil, inclusive para grupos considerados vulneráveis, como as crianças. Os autores citam como causa o aumento do consumo de alimentos industrializados.

A última Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF) realizada pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) identificou elevado consumo alimentar médio *per capita* (g/dia) de sucos/refrescos/sucos em pó reconstituídos, refrigerantes, sopas, caldos e alto percentual de consumo fora do domicílio de chocolates, sorvete/picolé, refrigerantes, refrigerantes *diet/light*, salgados fritos e assados e salgadinhos industrializados (IBGE, 2011).

Tal consumo está fortemente ligado às mudanças no estilo de vida da população brasileira, que exige mais praticidade no preparo dos alimentos. Este fato acompanha o advento da industrialização e o melhoramento científico e tecnológico na área alimentícia (GARCIA, 2003; SILVA et al., 2015).

Fai e colaboradores (2008) tratam como “paradoxo” o fato da exigência, pela população, de alimentos seguros, com larga vida de prateleira e com o mínimo de aditivos químicos. Como já apresentado, é de grande importância a utilização dos aditivos para a indústria de alimentos e para o consumidor moderno, porém os órgãos de saúde pública responsáveis devem ficar atentos aos riscos toxicológicos gerados pela ingestão diária dessas substâncias, tendo em vista que a exposição é dada pela totalidade de produtos consumidos (SILVA et al., 2015).

As pesquisas mostram os seguintes perigos para a saúde causados pelo consumo de aditivos alimentares: câncer, desenvolvimento de alergias ou anafilaxia, hiperatividade, dermatites e urticária, dor abdominal, diarreia, náusea, edema de língua ou laringe, vômito, exacerbação da asma, tosse, rinite, fadiga, desordem de comportamento, cefaleia, neuropatia, arritmia, taquicardia e palpitações, lacrimejamento, tremores e outros (BORGES et al., 2009; AUN et al., 2011; ALBUQUERQUE et. al., 2012; BISSACOTTI et al., 2015).

Diante disso, diversos autores, estudiosos nessa área, sugerem a redução do consumo de alimentos industrializados; aumento de estudos científicos sobre os malefícios que os aditivos podem gerar; esforços da indústria de alimentos para elaborar meios de substituição de aditivos

químicos alimentares; e criação de estratégias para a vigilância alimentar e nutricional da população, visando a educação alimentar e promoção e proteção da saúde (SILVA et al., 2015; BISSACOTTI et al., 2015).

3.3 PANIFICAÇÃO

A panificação é apontada desde os primórdios da humanidade, havendo registros da elaboração de pães desde o período neolítico, cerca de 6 mil anos antes de Cristo. No Egito e em Roma desenvolveram-se as variedades de trigo, a moagem, a fermentação e os fornos e na era industrial, no início do século XIX, o consumo deste alimento foi largamente difundido. A história do pão demonstra a sua grande importância social, religiosa e econômica, possuindo ampla aceitação até os dias atuais (CALVEL, 1987; CANELLA-RAWLS, 2006; ORNELAS, 2006; BRASIL, 2010).

No Brasil, a indústria de pães compõe uma parcela considerável do setor alimentício. O Instituto Tecnológico de Panificação e Confeitaria (ITPC), juntamente com a Associação Brasileira da Indústria de Panificação e Confeitaria (ABIP), registra um crescimento de 3,2% para o segmento de panificação e confeitaria das empresas brasileiras no ano de 2017, com um faturamento de R\$ 90,3 bilhões, maiores que os registrados no ano de 2016, que apresentou crescimento de 3,1% e faturamento de R\$ 87,24 bilhões (ABIP, 2018).

A pesquisa de orçamentos familiares 2008-2009, realizada pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística para analisar o consumo alimentar pessoal no Brasil, revela o hábito frequente desta população em consumir o pão. O valor per capita encontrado foi de 53 g por dia, quantidade maior que a de outros alimentos, como milho, batata-inglesa, banana, macarrão, peixe e aves, o que caracteriza a importância deste alimento para o brasileiro (IBGE, 2011).

A farinha de trigo é o ingrediente fundamental para a obtenção do pão. Sua composição química média apresenta proteínas (7-13%), lipídeos (1-2%), amido (50-70%), açúcar (1-2%), água (10-14%) e micronutrientes. As frações proteicas do trigo, gliadina e glutenina, e suas proporções adequadas, são responsáveis pela grande utilização desse cereal, pois quando são hidratadas e sob energia mecânica, formam uma rede tridimensional importante para o crescimento e textura do produto, chamada glúten (CALVEL, 1987; ARAÚJO W. M. C. et al., 2009; FIB, 2009).

Além da farinha de trigo, utilizam-se outros ingredientes na receita do pão, como o fermento, a água, o óleo, o sal e o açúcar. O fermento tem o papel de produzir gás carbônico, que faz a massa crescer, e formar ácidos orgânicos, os quais participarão na formação do sabor

do pão; a água tem importância para a hidratação da farinha, proporcionando o inchaço dos grãos de amido, assegurando a união das proteínas formadoras do glúten, favorecendo a atividade enzimática e contribuindo para a fermentação do pão; o óleo auxilia na retirada do produto da forma e melhora a extensibilidade e o volume da massa; o sal possui a função de aumentar a força da mesma, diminuir ligeiramente a atividade de fermentação, melhorar o aspecto da crosta e do sabor do pão e contribuir com a conservação do produto; e o açúcar apresenta função principal de acelerar a fermentação, pois é consumido pelas células do fermento (CALVEL, 1987; CANELLA-RAWLS, 2006).

Para enriquecer um pão pode-se adicionar especiarias e/ou outros ingredientes naturais na formulação, tais como cardamomo, baunilha, cravo, açafrão, canela, funcho, anis, noz-moscada, gengibre e própolis. Esse uso possui intenção de sabor, aroma e ainda de conservação (FIB, 2009).

Inserido neste setor, o pão do tipo integral é um dos alimentos mais conhecido e consumido dentre os produtos enriquecidos com fibras alimentares, nutriente essencial para o bom funcionamento do organismo, redução do colesterol e controle de doenças como a diabetes (PIMENTEL e SIMÕES, 2012).

3.3.1 Pão do Tipo Integral

Segundo a Resolução CNNPA nº 12 de 1978, o pão integral deverá ser preparado com, no mínimo, 50% de farinha de trigo integral, sendo-lhe proibido o emprego de caramelo. Esta farinha é definida pela instrução normativa nº 8 de 2005 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) como sendo o “produto elaborado com grãos de trigo (*Triticum aestivum* L.) ou outras espécies de trigo do gênero *Triticum*, ou combinações por meio de trituração ou moagem e outras tecnologias ou processos a partir da moagem completa do grão limpo, contendo ou não o gérmen” (BRASIL, 1978; BRASIL, 2005).

Esse tipo de pão apresenta características próprias como textura mais densa e firme, forte sabor e coloração variando de marrom-claro a marrom-escuro (CANELLA-RAWLS, 2006). Devido possuir a farinha de trigo integral como ingrediente majoritário, o pão integral apresenta mais nutrientes em sua constituição, como fibras e vitaminas e minerais (BRASIL, 2011). Logo, o consumo deste alimento tende a aumentar, é o que expõe o documento *Brasil Food Trends 2020* a respeito da existência de uma tendência de saudabilidade e bem-estar pelo consumo de cereais integrais, visando uma alimentação mais nutritiva.

Além do fato dos consumidores associarem a característica “integral” como sendo um

símbolo de alimento saudável devido ao conteúdo de fibras, existe também uma propensão pelo consumo de pães industrializados devido a conveniência, praticidade e tempo de validade elevado. Contudo, no caso dos pães integrais industrializados, observa-se a presença de aditivos químicos conservantes, frequentemente, nas listas de ingredientes dos rótulos, tornando-se contraditório à tendência relacionadas a saudabilidade e bem-estar, que sugere a eliminação destes aditivos da dieta (BRASIL, 2010; DEL RÉ e JORGE, 2012).

3.3.1.1 Conservação de Pães Integrais

Os alimentos se mantêm conservados até a data em que os mesmos se tornam inaceitáveis para o consumo, ou seja, necessitam possuir qualidade para a ingestão, não apresentando deteriorações que causam modificações sensoriais rejeitadas pelos consumidores ou patógenos. O tempo de conservação de um alimento é influenciado pelos fatores intrínsecos do mesmo, como a atividade de água, o pH e a composição química, e pelos fatores extrínsecos, como a temperatura e a umidade relativa do ambiente. Os deteriorantes de pães são divididos em físicos, químicos e microbiológicos (FORSYTHE, 2002; RIBOTTA e TADINI, 2009).

Segundo Canella-Rawls (2006) o principal problema encontrado nas padarias é o envelhecimento do pão, que é uma série de mudanças físicas que ocorrem logo após o produto ser retirado do forno, sendo observado gradativamente perda da umidade, retrogradação do amido, aumento da dureza e perda de sabor e aromas.

A rancidez oxidativa e a rancidez hidrolítica são deteriorações químicas que podem ocorrer em pães com elevada concentração de gorduras insaturadas. E, com relação às deteriorações microbianas, o desenvolvimento de fungos é o fator limitante mais encontrado da conservação de pães (RIBOTTA e TADINI, 2009).

Para prevenir a contaminação dos pães por esses microrganismos pode-se aderir a alguns cuidados, como produzir e embalar os pães em condições controladas, conhecer a atividade de água (a_w), ou seja, a disponibilidade de água de um alimento, e a concentração de íons hidrogênio (pH - potencial hidrogeniônico) do produto, usar atmosfera modificada, películas comestíveis e/ou aditivos (RIBOTTA e TADINI, 2009).

O tempo de armazenamento dos alimentos pode ser determinado pela combinação de testes microbiológicos, químicos e sensoriais (FORSYTHE, 2002). Compreender a classificação dos pães de acordo com o seu pH e a_w permite identificar potenciais riscos de deterioração. Isto porque os microrganismos necessitam de um valor de pH mínimo, ótimo e máximo e da presença de água para o seu metabolismo e proliferação, tais fatores interferem

diretamente na curva de crescimento microbiano (FRANCO e LANDGRAF, 2008).

O quadro abaixo mostra a classificação dos pães e outros alimentos quanto a acidez e atividade de água que geralmente apresentam. Pode-se observar que os pães são classificados com baixa acidez e alta a_w , isto é, são alimentos nos quais a maioria das bactérias, mofos e leveduras podem se desenvolver (RIBOTTA e TADINI, 2009).

Quadro 2 – Classificação de alguns alimentos, em especial o pão, quanto ao pH e a_w que possuem.

Parâmetro que influenciam na deterioração dos pães	Classificação	Exemplos de alimentos
pH	$\text{pH} < 4,6$ (alta acidez)	Torta de limão
	pH entre 4,6 - 7,0 (baixa acidez)	Pães integrais e bolos
	$\text{pH} > 7,0$ (produto não ácido)	<i>Muffin</i> de cenoura
a_w	$a_w < 0,6$ (baixa atividade de água)	Cookies
	a_w entre 0,6 - 0,85 (atividade de água intermediária)	Rosquinhas
	$a_w > 0,85$ (alta atividade de água)	Pães e pizzas

Fonte: Ribotta e Tadini, 2009.

Mudanças nos valores desses parâmetros, tidos como adequados, podem indicar alterações na qualidade dos pães e demais produtos (FORSYTHE, 2002).

As bactérias que mais causam problemas de deterioração em pães é o *Bacillus subtilis* e o *Bacillus mesentericus*, que possuem capacidade de formar esporos e endurecer o miolo do pão devido a degradação de proteínas e amido. As leveduras deteriorantes, normalmente *Pichia burtonii*, *Candida guilliermondii*, *Hansenula anomala* e *Debaromyces hansenii*, afetam a superfície do produto, provocando manchas brancas ou rosadas ou interferem a fermentação, gerando produtos secundários que modificam as características sensoriais do pão. Já dentre os

fungos, as contaminações mais frequentes ocorrem por *Penicillium spp.*, *P. roqueforti*, *P. commune*, *P. expansum*, *P. notatum*, *P. viridicatum*, *Cladosporium spp.*, *Rhizopus stolonifer*, *Neurospora sitophila*, *Endomyces fibuliger*, *Aspergillus flavus* e *A. glaucus* (CALVEL, 1987; NIELSEN e RIOS, 2000; JAY, 2005; FRANCO e LANDGRAF, 2008; RIBOTTA e TADINI, 2009).

Segue no quadro abaixo alguns exemplos de microrganismos e seus valores mínimos de pH e a_w para multiplicação.

Quadro 3 – Exemplos de bactérias e fungos e os valores de pH e a_w mínimos que necessitam para desenvolvimento.

Microrganismos	pH	a_w
Bactérias:		
<i>Escherichia coli</i>	4,3 a 4,4	0,96
<i>Bacillus subtilis</i>	4,2 a 4,5	0,95
Fungos:		
<i>Aspergillus flavus</i>	2,1	0,70
<i>Aspergillus niger</i>	1,2	0,77

Fonte: Adaptado de Franco e Landgraf (2008) e Santos (2015).

Segundo Forsythe (2002), o tempo esperado em que os pães sem conservantes se mantêm preservados é de até uma semana à temperatura ambiente. No caso dos pães integrais, espera-se um tempo menor de conservação, tendo em vista que possuem mais nutrientes em sua composição química. Dessa forma, os microrganismos encontram um meio com fatores intrínsecos mais favoráveis à multiplicação (FRANCO e LANDGRAF, 2008). No entanto, para pães integrais industrializados, que possuem antimofos químicos em seus ingredientes, o tempo de conservação é de 10 a 12 dias (SEHN e STEEL, 2016).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANÁLISES DOS EXTRATOS

O extrato de própolis e o *mix* de óleos essenciais de orégano, manjerição e tomilho, utilizados no presente estudo, foram analisados quanto à atividade antioxidante e à atividade antibacteriana que possuem.

4.1.1 Extrato de Própolis

O extrato alcoólico de própolis (anexo 1) foi disponibilizado pela empresa Kaza Verde produtos naturais, CNPJ 06.276.749/0001-42, endereço rua Dr. Pompílio Mercadante, nº 105, centro, Jacareí/SP, CEP nº 12308-510, assim como o laudo do mesmo (anexo 2). O extrato de própolis foi fabricado em novembro de 2016 (lote: 205; validade: novembro de 2018) pela empresa brasileira Prodapys produtos naturais - Apis Nativa Produtos Naturais LTDA., CNPJ 95765285/0001-68, endereço rua Irineu Bornhausen, nº 315, centro, Araranguá/SC, CEP nº 88900-071.

De acordo com o laudo, a própolis tem classificação marrom e concentração a 15% (150mg de própolis em 1mL do extrato), apresentando sabor, aroma, cor e aspecto característicos e ausência de impurezas. As análises físico-químicas quantitativas e qualitativas também apresentaram resultados satisfatórios.

4.1.1.1 Cálculo do Limite Máximo Utilizado na Produção do Pão

A Resolução nº 383, de 05 de agosto de 1999 expõe os limites máximos permitidos do uso de aditivos alimentares em produtos de panificação e biscoitos. Tal resolução limita o uso de conservante a 0,1g/100g de pão com fermento biológico, sendo assim, buscou-se utilizar a mesma quantidade do extrato de própolis por 100g de pão integral, o que equivale a 0,67mL do extrato, conforme demonstrado no cálculo abaixo:

$$\begin{array}{lcl}
 \text{Extrato de própolis a 15\%:} & & \\
 100\text{mL do extrato} - 15\text{g de própolis} & & \\
 X & - 0,1\text{g de própolis} & X = 0,67\text{mL do extrato}
 \end{array}$$

Então, a quantidade máxima a ser utilizada do extrato de própolis para uma formulação de pão de 600g é de 4,02mL (1 colher de chá rasa). Além dessa quantidade estabelecida, verificou-se, em testes piloto, que o extrato poderia interferir de modo excessivo na análise sensorial, o que não seria o intuito da presente pesquisa.

4.1.2 Óleos Essenciais (OE)

Foram disponibilizados óleos essenciais puros de manjeriço, orégano e tomilho (anexo 3) pela empresa *Sun Foods* Indústria de Produtos Alimentícios LTDA, CNPJ 54.420.351/0001-80, endereço Estrada Municipal de Itu, 040 s/n, CEP 13.000-300, bairro Apotribu, Itú/SP. Os laudos técnicos podem ser visualizados no anexo 4 A, B e C.

4.1.2.1 Elaboração do *Mix* de Óleos Essenciais

Para a elaboração do *mix* de OE e para o *mix* de OE diluído utilizou-se:

- Óleos essenciais;
- Óleo de soja;
- Balão volumétrico;
- Microtubo de 1,5mL;
- Micropipeta monocal;
- Papel alumínio;
- Agitador.

O *mix* de OE foi elaborado no Laboratório de Componentes Alimentares e Saúde (LACAS) da Faculdade de Saúde Pública da USP. Em um microtubo de 1,5mL, protegido da luz com papel alumínio, colocou-se 200µL de cada óleo essencial (manjeriço, orégano e tomilho) e agitou-se.

Os óleos essenciais das ervas foram utilizados em combinação (*mix*) com o intuito de aumentar o espectro da atividade conservante das amostras de pães pela possibilidade de efeitos sinérgicos (SOKOVIĆ et al., 2010).

Para ser utilizado na formulação dos pães integrais foi necessário diluir o *mix* em óleo de soja, pois foi verificado, em teste iniciais, que a utilização do *mix* puro e em quantidades maiores que a empregada, acrescentou aromas e sabores muito intensos nos pães, o que

descaracteriza sensorialmente o produto final.

A diluição do *mix* de OE foi feita em um balão volumétrico no qual colocou-se 32,8μL do *mix*, acrescentou-se óleo de soja até atingir a indicação de 100mL do balão e agitou-se. Além disso, foi realizado testes piloto com óleos essenciais de alho e cebola, porém estes conferiram aromas muito acentuados e, por isso, não foram acrescentados na elaboração do *mix*.

4.1.3 Atividade Antioxidante

Existem diversos métodos *in vitro* para analisar o potencial de extratos, substâncias e produtos. Tais métodos, segundo Alves e colaboradores (2010), são ferramentas muito importantes na seleção e estudo de substâncias, espécies de plantas ou até alimentos que podem ser utilizados como fármacos ou para estudos químicos. Dentre eles, destacam-se os métodos DPPH e ORAC, bastante utilizados em avaliações da capacidade sequestradora de radicais livres de antioxidantes naturais.

4.1.3.1 Análise da Atividade de Sequestro do Radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil)

A avaliação da atividade sequestradora do radical DPPH é um dos métodos mais usados para determinar a atividade antioxidante de extratos. Este radical possui coloração púrpura, mas quando na presença de uma substância antioxidante é reduzido, formando como produto difenil-picril-hidrazina, de coloração mais clara ou amarela (figura 1). Essa redução é acompanhada pela diminuição da absorbância, que pode ser monitorada por equipamentos (SOUSA et al., 2007).

Figura 1 – Redução do radical DPPH.

Fonte: Rufino e colaboradores, 2007.

A partir dos resultados obtidos das absorvâncias, determina-se a porcentagem de atividade antioxidante, a qual corresponde à quantidade de DDPH consumida pelo antioxidante. A quantidade de antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50% é denominada concentração eficiente (EC_{50}). Sendo assim, quanto maior o consumo de DPPH por uma amostra, maior será a sua atividade antioxidante e menor a sua EC_{50} (SOUSA et al., 2007).

Para a execução da análise foram utilizados os seguintes materiais:

- Extratos diluídos em DMSO 10%;
- Solução de DPPH 0,20mM;
- DMSO 10%;
- Padrão Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-ácido carboxílico MM = 250,29). Solução 0,5mg/mL;
- Microplaca de 96 poços;
- Frasco âmbar;
- Micropipeta monocanal;
- Micropipeta multicanal;
- Leitor de microplacas.

A técnica usada para a referida análise foi realizada no Laboratório de Fitoquímica do Departamento de Botânica da USP e seguiu a referência de Santos et al. (2016). Para o preparo da microplaca, utilizou-se como controle negativo a solução de DPPH adicionada de DMSO 10%, para o controle positivo adicionou-se a solução de DPPH e a solução padrão trolox em diferentes concentrações, variando de 12,5 μ g/mL a 200 μ g/mL, e, nos poços das amostras, adicionou-se a solução DPPH e as amostras também em concentrações diferentes, variando de 0,016mg/mL a 1mg/mL para o extrato de própolis e de 0,15mg/mL a 9,38mg/mL para o *mix* de OE. Todas as amostras e controles foram feitos em triplicata.

A microplaca preparada foi incubada durante 20 minutos em temperatura ambiente e isento de luz. Em seguida, a diminuição da absorvância foi medida a 515nm pelo leitor de microplacas Synergi.

4.1.3.2 Análise da Atividade de Sequestro do Radical Peroxil - ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*)

Este método de avaliação de atividade antioxidante se baseia na propriedade de indicadores fluorescentes (figura 2). O radical peroxil (AAPH - 2,2' Azobis (2-amininopropane) dihydrochloride), oxidante encontrado em substratos biológicos, reage com o indicador fluorescente para formar um produto não fluorescente, que é medido por espectrofotometria com máxima emissão de fluorescência (ALVES et al., 2010).

O potencial antioxidante é medido pela inibição da oxidação, por meio da diferença entre a área da amostra subtraída pela área do branco/controle (Net AUC). Esta área é quantificada pelo decaimento da fluorescência no decorrer do tempo, sendo considerada a proteção antioxidante conferida pelo composto da amostra quanto maior for o tempo de decaimento da fluoresceína. O controle positivo utilizado, comumente o Trolox, possui concentrações conhecidas, sendo possível gerar uma curva padrão para comparação da atividade antioxidante da amostra (ALVES et al., 2010; BRESCIA, 2012).

Assim como no teste DPPH, utiliza-se a concentração eficiente (EC_{50}) para medir a atividade antioxidante da amostra.

Figura 2 – Estrutura química da fluoresceína (7) e diclorofluoresceína (8).

Fonte: Alves e colaboradores, 2010.

Para este teste antioxidante foram utilizados os seguintes materiais:

- Extratos;
- Tampão fosfato (75mM pH 7);
- Fluoresceína 268,6μM;
- Fluoresceína 4μM;
- Solução AAPH (2,2' Azobis (2-amininopropane) dihydrochloride) 75mM;
- Padrão Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-ácido carboxílico MM= 250,29);

- MeOH;
- Micropipeta monocal;
- Micropipeta multicanal;
- Vidro âmbar;
- Microplaca de 96 poços;
- Leitor de microplacas.

A técnica usada para esta análise foi realizada no Laboratório de Fitoquímica do Departamento de Botânica da USP e baseou-se em Santos et al. (2016). No preparo da microplaca, utilizou-se como controle negativo a solução de fluoresceína adicionada de tampão fosfato, para o controle positivo adicionou-se a solução de fluoresceína e a solução padrão Trolox em diferentes concentrações seriadas, variando de 0,156µg/mL a 2,5µg/mL, e, nos poços das amostras, adicionou-se a solução de fluoresceína e as amostras também em concentrações diferentes, variando de 0,977µg/mL a 62,5µg/mL para o extrato de própolis e de 0,029mg/mL a 1,875mg/mL para o *mix* de OE. Todas as amostras e controles foram feitos em triplicata.

A microplaca preparada foi incubada por 30 minutos a 37° C. Em seguida, adicionou-se aos poços a solução AAPH. A resposta fluorescente foi determinada a 485nm de comprimento de onda de excitação e 528nm de emissão pelo leitor de microplacas Synergi. A fluorescência foi medida em intervalos de 1 minuto por 2 horas.

4.1.4 Atividade Antibacteriana

Os métodos de diluição em caldo ou ágar são utilizados para medir a atividade *in vitro* de uma substância ou produto frente a um isolado bacteriano. Ao final do teste, determina-se quantitativamente a concentração inibitória mínima (CIM), que é a menor concentração de um agente antimicrobiano que impede o crescimento visível de um microrganismo (NCCLS, 2003).

Para este teste foram utilizados os seguintes materiais:

- Extratos;
- Antibiótico canamicina;
- DMSO 4%;
- Glicerol;
- Cepas de bactérias;

- Placas de petri;
- Estufa com agitador;
- Tubo falcon;
- Meio LB líquido;
- Resazurina 0,01%;
- Micropipetas monocal e multicanal;
- Microplaca de 96 poços;
- Leitor de microplacas.

O ensaio de quantificação do efeito inibidor de crescimento bacteriano baseou-se no *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS) com modificações seguindo o protocolo proposto por Sedano-Partida et al. (2018), sendo realizado no Laboratório de Fitoquímica do Departamento de Botânica da USP. Inicialmente, preparou-se a solução do antibiótico (canamicina) e a curva de calibração. Para isto, pesou-se 1 mg do antibiótico e diluiu-se em 1mL de DMSO 4%. A partir desta solução foram realizadas mais 8 diluições seriadas.

Para o ensaio antimicrobiano, as bactérias, *Escherichia coli* (cepa MG1655, gram-negativa) e *Bacillus subtilis* (cepa PY79, gram-positiva), foram armazenadas em glicerol sob temperatura de -80°C. As mesmas foram espalhadas em placas de petri de 90mm de diâmetro contendo meio sólido e mantidas em estufa 35°C por 24 horas. Foi utilizada uma placa sem bactéria como controle negativo de crescimento.

Após o tempo citado, selecionou-se uma colônia para ser adicionada a um tubo falcon contendo meio LB líquido, chamado de pré inóculo, ficando em agitação por 16 horas a 35°C para *E. coli* e 18 horas para *B. subtilis*. Em seguida, o pré inóculo foi diluído em meio LB líquido para obter uma leitura de 0,08 a 0,10 de absorbância dessa solução – diluição $1,5 \times 10^8$ UFC/mL na escala de Mcfarland.

Para o preparo da microplaca, as amostras (extratos) foram diluídas em DMSO 4%. Nos poços das amostras adicionou-se 20μL do extrato e 180μL de meio LB com a diluição da bactéria. Para os poços brancos adicionou-se apenas 200μL de meio LB sem bactéria. Para o controle negativo 1, foram adicionados 180μL de meio LB com bactéria e 20μL de DMSO 4%. Para o controle negativo 2, adicionou-se apenas 200μL de meio LB com bactéria. E para o controle positivo, que é a curva padrão, adicionou-se 180μL de meio LB com a diluição da bactéria e 20μL da solução de canamicina (100μg/mL). Os testes foram feitos em triplicata, tanto para as amostras como para os controles.

A microplaca foi incubada por 18 horas a 35° C com agitação 120rpm para *E. coli* e por 20 horas para *B. subtilis*. Depois da incubação, realizou-se a leitura em espectrofotômetro no comprimento de 595nm, pelo leitor de microplacas Synergi. Após, foram colocados 20µL de resazurina 0,01% e a microplaca novamente incubada por 1 hora e, em seguida, em agitação por 16 horas a 35°C. Após este tempo, verificou-se a coloração dos poços para indicação de viabilidade celular: poços com coloração azul indicam células não viáveis, enquanto que poços com coloração rosa indicam a presença de células viáveis.

4.2 ANÁLISES DOS PÃES

4.2.1 Elaboração dos Pães

Os pães foram elaborados no laboratório de técnica dietética da Faculdade de Saúde Pública da USP com a técnica de massa direta. Este método de mistura de massa foi criado na década de 1920 e trata-se da simples incorporação de todos os ingredientes da receita do pão, seguindo uma ordem determinada (CANELLA-RAWLS, 2006).

Para os procedimentos experimentais da panificação foram utilizados os seguintes materiais:

- Água morna;
- Açúcar cristal União[®];
- Óleo de soja Liza[®];
- Mix de OE diluído;
- Extrato de própolis;
- Sal Cisne[®];
- Farinha de trigo tradicional Renata[®];
- Farinha de trigo integral Renata[®];
- Fermento biológico seco instantâneo Fleishman[®];
- Máquina de fazer pão;
- Faca de serra para corte;
- Tábua para corte;
- Grade para o descanso dos pães;
- Medidas caseiras padrão;
- Sacos plásticos e arames para embalagem.

O fluxograma da produção dos pães, fatiamento e embalagem pode ser visualizado na figura 3.

Foram feitos três tipos de formulação de pães integrais: pão integral controle, pão integral com extrato de própolis e pão integral com *mix* de óleos essenciais. Os ingredientes, a ordem de incorporação destes na forma da panificadora e as quantidades utilizadas em cada tipo de pão elaborado podem ser visualizadas no quadro abaixo:

Quadro 4 – Ingredientes utilizados, ordem de incorporação e proporção em base de farinha para a elaboração dos pães controle, com própolis e com *mix* de óleos essenciais.

Ingredientes e ordem de incorporação	%¹	Pão controle	Pão com própolis	Pão com <i>mix</i>
Água morna ($\pm 40\text{ }^{\circ}\text{C}$)	66,7	X	X	X
Açúcar cristal	6,7	X	X	X
Sal	2,2	X	X	X
Óleo de soja	8,3	X	X	-
<i>Mix</i> de óleos essenciais diluído em óleo de soja	8,3	-	-	X
Farinha de trigo integral	66,7	X	X	X
Farinha de trigo tradicional	33,3	X	X	X
Fermento biológico seco instantâneo	2,8	X	X	X
Extrato de própolis	1,12	-	X	-

Nota: X: Ingrediente utilizado na formulação do pão; -: Ingrediente não utilizado na formulação do pão; ¹: Em relação ao total da mistura de farinha de trigo tradicional mais integral.

A água morna foi utilizada com o intuito de favorecer a função do fermento seco empregado. E, para minimizar a carência de força da farinha integral e melhorar a aceitação e o volume do pão, misturou-se à farinha de trigo tradicional, pela capacidade desta última em formar glúten e fornecer estrutura e habilidade na retenção de gases (CALVEL, 1987; CANELLA-RAWLS, 2006).

Figura 3 – Fluxograma de produção, fatiamento e embalagem dos pães controle e elaborados com os extratos naturais.

Os ingredientes, utensílios e equipamentos necessários foram separados e colocados na bancada.

Os ingredientes foram colocados na máquina de fazer pão de marca Arno, *Le Pain*, 110V e programou-se o ciclo ultrarrápido, o qual possui duração total de 1h20m, sendo 25 minutos de amassamento mecânico, 07 minutos para descanso/crescimento da massa e 48 minutos para assadura. Com exceção dos ingredientes utilizados, o preparo dos pães seguiu a mesma sequência.

Quando finalizado o tempo de preparo, os pães foram deixados esfriando em grades vazadas, por aproximadamente 1h30m. Ao final de cada ciclo obtinha-se um pão de rendimento aproximado de 600g.

Em seguida, foram fatiados, embalados (duas fatias por embalagem, excluindo-se as fatias da ponta do pão) e identificados.

A embalagem utilizada foi de polietileno de baixa densidade (PEBD), geralmente usada para embalar pães. Além disso, foi escolhida pela sua resistência, baixo custo e disponibilidade; para proteger o pão contra deteriorações e oscilações de umidade; aumentar a capacidade de conservação; e favorecer a observação visual de alterações causadas por microrganismos, contudo não sendo uma barreira ao oxigênio (GAVA, 1983; RIBOTTA e TADINI, 2009).

Os pães foram, então, estocados no próprio laboratório de técnica dietética, em temperatura ambiente, simulando situações de armazenamento doméstico. A partir das amostras dos pães elaborados, realizou-se análises físico-químicas e sensoriais.

Vale ressaltar que se seguiu as normas das Boas Prática de Manipulação de Alimentos durante todo o processo de produção dos pães.

4.2.2 Caracterização das Amostras e Análises Físico-químicas

Os pães foram estudados por meio de análises físico-químicas, que refletem a qualidade dos mesmos, em três momentos durante o armazenamento: no primeiro dia (em seguida ao seu preparo e resfriamento), no quarto e no sétimo. Para cada análise foram necessárias duas fatias semelhantes das amostras, desprezando-se as fatias deformadas ou das extremidades dos pães e as medidas foram realizadas em triplicatas. Segue abaixo a descrição das avaliações de pH, atividade de água, cor e textura instrumental, realizadas nos laboratórios de Componentes Alimentares e Saúde e de Bioquímica e Propriedades Funcionais dos Alimentos da Faculdade de Saúde Pública da USP.

4.2.2.1 Medida de pH

Para a realização deste teste foram utilizados os seguintes materiais:

- Amostras (pães integrais);
- Béquer;
- pHmetro;
- Água deionizada;
- Soluções tampões com 7 e 4 unidades de pH.

O pH foi determinado em aparelho pHmetro, o qual é constituído de dois eletrodos e um galvanômetro ligado a uma escala de unidade de pH, que varia de 1 a 14. Dez gramas de

cada amostra foram misturados em 100mL de água deionizada em béqueres. Em seguida, o pHmetro foi ligado e calibrado com tampões 7 e 4 unidades de pH. O eletrodo foi lavado com água destilada e seco para então fazer a leitura e determinar o pH das amostras, ou seja, para cada tipo de pão analisado (CECCHI, 2003).

4.2.2.2 Medida de Atividade de Água (a_w)

Para a medida de a_w os seguintes materiais foram utilizados:

- Amostras (pães integrais);
- Equipamento medidor de a_w ;
- Cubeta.

Para esta análise, uma porção da região central do pão (miolo) foi colocada de modo a preencher uma cubeta, a qual foi inserida no equipamento AquaLab, modelo 3TE, por volta de 24°C. Aguardou-se a indicação do equipamento da finalização da leitura e registrou-se a medida de a_w expressa. Assim ocorreu em todas as amostras de pães.

4.2.2.3 Medida da Cor Instrumental

Para a realização deste teste foram utilizados os seguintes materiais:

- Amostras (pães integrais);
- Colorímetro.

A identificação da cor pelo olho humano é subjetiva, o que pode ocasionar falhas e confusão na comunicação. Diante disso, se faz importante a utilização de colorímetro para expressar de forma mais precisa a cor de um produto por meio de numeração. Neste trabalho a cor das amostras de pães foi avaliada pelo colorímetro portátil CR-400 (Konilca Minolta), o qual utiliza o intervalo de cor $L^*a^*b^*$, definido pela CIE - *Commission Internationale de l'Eclairage* (HUNTERLAB, 1996).

O referido intervalo de cor surgiu com a teoria de cores opostas, que afirma sobre duas cores não serem amarelas e azuis ao mesmo tempo ou verdes e vermelhas ao mesmo tempo. O L^* indica a luminosidade (L^* positivo indica claridade e L^* negativo escuridão), a^* a coordenada vermelho/verde (a^* positiva indica vermelho e a^* negativa verde) e b^* a

coordenada amarelo/azul (b^* positiva indica amarelo e b^* negativa azul). Para quantificar esse intervalo de cor, o colorímetro mede a luz refletida do produto em cada comprimento de onda (KONICA, 2018).

O colorímetro foi calibrado e as medições foram realizadas em diferentes partes do miolo dos pães de modo a obter uma média das triplicatas. Após o registro dos valores das cores, foi calculada a diferença total da cor (ΔE^*_{ab}) entre o pão controle e os demais para cada dia de análise, de acordo com a fórmula: $\Delta E^*_{ab} = [(L^*_1 - L^*_2)^2 + (a^*_1 - a^*_2)^2 + (b^*_1 - b^*_2)^2]^{1/2}$. Em seguida, foi feita a média da diferença total da cor entre o pão controle e o pão com própolis e entre o pão controle e o pão com *mix* dos três dias analisados (CAPRILES, 2009).

4.2.2.4 Medida da Textura Instrumental

Para a realização desta medida foram utilizados os seguintes materiais:

- Amostras (pães integrais);
- Régua;
- Faca de serra para corte;
- Texturômetro para cisalhamento.

Aproximadamente 2cm da parte inferior das fatias, contendo a casca, foram utilizadas para a análise da textura, que foi medida pela força máxima durante o cisalhamento da amostra por meio do equipamento texturômetro TA-XT2i da *Stable Micro Systems, Surrey, Reino Unido*, acoplado com uma celda do tipo “Warner Bratzler” e com o software “Texture Expert”. O teste cisalhamento foi aplicado para medir a força máxima necessária para cortar ou fatiar o produto. A velocidade do corte foi de 1mm/s e as análises realizadas em triplicata. Esta metodologia foi adaptada de Alcântara (2017).

4.2.3 Análise Macroscópica Observacional

Para esta análise, os pães foram elaborados em dois períodos diferentes do ano, o primeiro ocorreu no início do mês de julho de 2017, cuja temperatura média era de 15,8 °C, e o segundo no final do mês de abril de 2018, período de temperatura mais elevada, com média de 23,1°C. O intuito foi verificar o comportamento da deterioração dos pães nestas situações (INMET, 2018).

Em cada período, os pães foram observados macroscopicamente em três dias durante o período de armazenamento, no primeiro, no quarto e no sétimo dia. Observou-se se os pães apresentavam possíveis colônias visuais de microrganismos ou demais aspectos indicativos de deterioração, isto é, se esses produtos se encontravam aceitáveis ou não para consumo, considerando que estas observações são realizadas pelo consumidor em seu domicílio.

As possíveis colônias de microrganismos identificadas na deterioração dos pães foram comparadas com descritivos semelhantes da literatura para fundamentar a indicação do gênero do microrganismo deteriorante.

4.2.4 Análise Sensorial

Além das análises físico-químicas e macroscópica observacional, os pães foram avaliados sensorialmente por meio de testes de aceitação, que são métodos afetivos utilizados para verificar se um alimento ou produto é aceito pelos consumidores ou se possui probabilidade de ser adquirido pelos mesmos (TEIXEIRA, 2009).

Tais testes ocorreram no mês de novembro de 2017 no Laboratório de Técnica Dietética e de Análise Sensorial da Faculdade de Saúde Pública da USP, em mesas individuais separadas por meio físico, no primeiro dia de armazenamento dos pães, ou seja, até 24 horas após a elaboração.

Utilizou-se os seguintes materiais para a análise sensorial:

- Amostras (pães integrais);
- Margarina;
- Pratos descartáveis;
- Espátula descartável;
- Guardanapo;
- Copos descartáveis;
- Bandeja;
- Faca de serra para corte;
- Água;
- Computadores.

Foram recrutados indivíduos que frequentavam a Faculdade de Saúde Pública no dia da análise, os quais responderam questões antes de iniciarem os testes sensoriais propriamente ditos e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), que indicava os

ingredientes utilizados e que se tratava de uma análise com pães do tipo integral. Para caracterização dos recrutados, questionou-se sobre a frequência do consumo de pão, idade e gênero (anexo 6).

Na figura 4 visualiza-se a bandeja que os provadores receberam para a realização dos testes. Observa-se que as amostras eram codificadas com números aleatórios de três dígitos, dessa forma, os provadores não sabiam se estavam recebendo o tratamento experimental ou o controle (modelo de pesquisa uni-cego). Além disso, os pães estavam porcionados de maneira semelhante (corte e quantidade).

Foi disponibilizada água para que o provador pudesse enxaguar a boca entre as degustações das amostras. A margarina foi colocada como consumo opcional para que, caso o provador tenha costume de consumir pão apenas acompanhado de manteiga ou margarina, realizasse a análise de acordo com o consumo habitual do produto.

Figura 4 – Bandeja recebida pelos provadores para a realização da análise sensorial.

Fonte: Registro fotográfico da autora.

O painel sensorial respondeu a dois testes de aceitação, a escala hedônica de 7 pontos e a escala que avalia o poder de compra.

4.2.4.1 Teste de Aceitação por Escala Hedônica

Trata-se de um teste quantitativo utilizado com o objetivo de determinar o grau de aceitabilidade das amostras e dos atributos cor, textura, umidade e impressão global. A escala escolhida foi a verbal, sendo composta por sete pontos, que variavam desde “desgostei muito”

(nota 1) até “gostei muito” (nota 7) (anexo 7) (MINIM, 2012).

Os provadores assinalavam a nota que julgavam para cada atributo questionado e para cada pão. Os resultados eram tabulados automaticamente pelo sistema FIZZ. Foi calculado o Índice de Aceitabilidade (IA) para o atributo “impressão global” para cada amostra de pão.

O IA é calculado considerando como 100% a maior nota alcançada por cada amostra analisada e o critério de decisão para o índice ser de boa aceitação é de IA igual ou superior a 70% (TEIXEIRA et al., 1987). Assim, para este cálculo, adotou-se a seguinte expressão matemática:

$$IA = \frac{A \times 100}{B}$$

Onde: A = nota média obtida para o produto
B = nota máxima dada ao produto

4.2.4.2 Teste de Aceitação por Escala de Intenção de Compra

Este é um teste quantitativo utilizado para determinar a intenção ou disposição do consumidor em comprar um produto. A escala escolhida foi a verbal, sendo composta por cinco pontos, que variavam desde “certamente não compraria” (nota 1) até “certamente compraria” (nota 5) (anexo 8) (MINIM, 2012).

Da mesma forma como na escala hedônica de sete pontos, os provadores assinalavam a nota que julgavam para cada pão e os resultados eram tabulados automaticamente pelo sistema FIZZ.

4.2.4.3 Comentários do Painel Sensorial

Ao final dos testes, os provadores ainda podiam manifestar livremente comentários sobre as amostras degustadas. Tais comentários foram lidos e compilados para análise dos pães, incluindo a capacidade dos provadores em identificar a presença dos extratos nos pães.

4.3 ASPECTOS ÉTICOS

O trabalho foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Saúde Pública da USP, conforme comprovante visualizado no anexo 5. Os participantes da análise sensorial assinaram o TCLE.

4.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para a tabulação dos dados e análises estatísticas utilizou-se os programas Excel 2016, STATA 14.0 e FIZZ 2,5. Seguido do teste ANOVA, foi aplicado o teste Tukey para comparação de médias, considerando-se diferenças significativas quando $p < 0,05$. Além disso, empregou-se histogramas para mostrar a distribuição dos dados.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ANÁLISES DOS EXTRATOS

5.1.1 Atividade Antioxidante

5.1.1.1 Análise da Atividade de Sequestro do Radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil)

A figura 5 mostra as curvas obtidas na referida análise, as quais foram utilizadas para o cálculo da EC_{50} para o padrão Trolox, para o extrato de própolis e para o *mix* de óleos essenciais. Nos gráficos estão expostas a porcentagem da atividade antioxidante, a quantidade do extrato ou antioxidante padrão por poço da microplaca e a equação da reta.

Figura 5 – Curvas obtidas no ensaio antioxidante (DPPH) demonstrando a porcentagem de atividade em função de concentrações variáveis do padrão Trolox (A), do extrato de própolis (B) e do *mix* de óleos essenciais (OE) (C).

Nota: DPPH - Atividade de Sequestro do Radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil.

A partir das equações da reta calculou-se a EC_{50} para cada amostra analisada. Para o padrão encontrou-se EC_{50} igual a $9,17\mu\text{g/mL}$, para a própolis $65,41\mu\text{g/mL}$ e para o *mix* $234,00\mu\text{g/mL}$. Comparando-se os valores encontrados para os extratos com o Trolox, constata-se que o potencial antioxidante da própolis é aproximadamente 7 vezes menor que o padrão, enquanto que o potencial do *mix* é aproximadamente 26 vezes menor, isto é, a própolis apresenta maior atividade antioxidante do que o *mix* de OE.

Pratami et al. (2018) encontraram, por meio de ensaios DPPH, valores de EC_{50} entre $25,53$ e $69,96\mu\text{g/mL}$ para extratos etanólicos de própolis da Indonésia, semelhantes ao resultado do presente trabalho. Já em estudos com própolis brasileira, observa-se valores de EC_{50} maiores. Bonamigo et al. (2017) avaliaram a propriedade antioxidante da própolis e encontraram EC_{50} entre 300 e $500\mu\text{g/mL}$, indicando potencial antioxidante menor se comparado à própolis estudada nesta pesquisa.

Com relação ao *mix* de óleos essenciais, Moraes e colaboradores (2009) avaliaram a atividade antioxidante de ervas, como o orégano, que apresentam óleos essenciais em suas composições químicas, e encontraram concentração da amostra que inibe em 50% o teor de radical livre DPPH (CI_{50}) variando de 370 a $47.410\mu\text{g/mL}$. Ribeiro-Santos et al. (2016) acharam valores de EC_{50} iguais a $140\mu\text{g/mL}$ e $38.500\mu\text{g/mL}$ para os óleos essenciais de canela e alecrim, respectivamente.

5.1.1.2 Análise da Atividade de Sequestro do Radical Peroxil - ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*)

A figura 6 mostra as curvas obtidas neste método, as quais foram utilizadas para o cálculo da EC_{50} para o padrão Trolox, para o extrato de própolis e para o *mix* de OE. Nos gráficos estão expostas a Net AUC, a quantidade do extrato ou antioxidante padrão por poço da microplaca e a equação da reta.

A partir das equações da reta calculou-se a EC_{50} de cada amostra. Para o padrão encontrou-se EC_{50} igual a $1,48\mu\text{g/mL}$, para a própolis $2,50\mu\text{g/mL}$ e para o *mix* $11,56\mu\text{g/mL}$. Os valores de EC_{50} obtidos são equivalentes aos resultados encontrados no teste DPPH, porém em proporções diferentes. O extrato de própolis apresenta potencial antioxidante aproximadamente 1,7 vezes menor que o padrão, enquanto que o *mix* apresentou potencial antioxidante 7,8 vezes menor que o padrão.

Figura 6 – Curvas obtidas no ensaio antioxidante (ORAC) demonstrando a Net AUC em função de concentrações variáveis do padrão Trolox (A), do extrato de própolis (B) e do *mix* de óleos essenciais (OE) (C).

Notas: ORAC - Oxygen Radical Absorbance Capacity, Atividade de Sequestro do Radical Peroxil;
Net AUC - Diferença entre a área da amostra subtraída pela área do branco/controle.

Comparando-se os valores encontrados para os extratos com os do Trolox, assim como identificado no teste DPPH, a própolis se aproxima mais do antioxidante padrão, apresentando, desta forma, maior atividade antioxidante do que o *mix* de OE.

Santos K. P. et al. (2018) testaram a capacidade antioxidante de extratos de plantas da família *Lamiaceae*. Ervas aromáticas como o alecrim e o tomilho compõem esta família. Nesta pesquisa foram analisados os extratos de plantas do gênero *Hyptis*, como *H. campestris* e *H. radicans*. Com a utilização do método ORAC encontrou-se valores de EC_{50} variando de 0,56 a 30,09 $\mu\text{g/mL}$, intervalo no qual se encontra a própolis e o *mix*, ambos avaliados no presente trabalho.

Gagliano et al. (2018) mediram a atividade antioxidante de extratos de *Merostachys pluriflora*, uma espécie de bambu nativa do Brasil, por vários métodos, dentre eles o método ORAC. Os autores encontraram EC_{50} igual a 5,79 $\mu\text{g/mL}$ para o extrato etanólico bruto das folhas e 4,20 $\mu\text{g/mL}$ para o extrato etanólico bruto do caule, resultados intermediários aos achados no presente trabalho.

5.1.2 Atividade antibacteriana

A figura 7 mostra as curvas obtidas nos ensaios com a bactéria *Escherichia coli* e a figura 8 as curvas obtidas para a bactéria *Bacillus subtilis*. Tais curvas foram utilizadas para o cálculo da CIM₅₀ para o antibiótico padrão (canamicina), para o extrato de própolis e para o *mix* de OE. Nos gráficos estão expostas a porcentagem de inibição de crescimento das bactérias, a quantidade dos extratos ou antibiótico padrão utilizado e a equação da reta.

Figura 7 – Curvas obtidas no ensaio antibacteriano demonstrando a porcentagem de inibição de crescimento da bactéria *Escherichia coli* em função de concentrações variáveis do padrão canamicina (A), do extrato de própolis (B) e do *mix* de óleos essenciais (OE) (C).

A partir das equações da reta calculou-se a CIM₅₀ para as amostras. Nas análises para *E. coli* obteve-se CIM₅₀ igual a 0,01mg/mL para o padrão, 0,99mg/mL para a própolis e 4,89mg/mL para o *mix*. Nas análises para *B. subtilis* encontrou-se CIM₅₀ igual a 0,01mg/mL para o padrão, 3,44mg/mL para a própolis e 5,49mg/mL para o *mix*.

Os testes antibacterianos realizados indicam que o extrato de própolis apresenta maior atividade para inibir o crescimento de bactérias se comparado ao *mix* de óleos essenciais, pois, tanto para *E. coli*, quanto para *B. subtilis*, os valores de CIM₅₀ foram menores.

Figura 8 – Curvas obtidas no ensaio antibacteriano demonstrando a porcentagem de inibição de crescimento da bactéria *Bacillus subtilis* em função de concentrações variáveis do padrão canamicina (A), do extrato de própolis (B) e do *mix* de óleos essenciais (OE) (C).

As bactérias utilizadas neste teste são padrão para análises da atividade antibacteriana no Laboratório de Fitoquímica do Departamento de Botânica da USP. Concomitantemente, analisar a atividade antibacteriana do extrato de própolis e do *mix* de OE frente a essas bactérias foi relevante, tendo em vista que a *E. coli*, bactéria gram-negativa anaeróbia facultativa, é a principal espécie do gênero e um indicador de contaminação de origem fecal de alimentos e a bactéria *B. subtilis*, gram-positiva e produtora de esporo é causadora de deterioração em pães, como citado no item 3.3.1.1, podendo ser a farinha a fonte dessa bactéria (FRANCO e LANDGRAF, 2008).

A pesquisa realizada por Cabral et al. (2009) analisou a atividade antibacteriana da própolis vermelha brasileira. Foi identificado que esta própolis possui elevada atividade antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus*, com CIM₅₀ variando de 0,06 e 0,125mg/mL, valores menores se comparados aos encontrados para a própolis do presente estudo.

Gomes e colaboradores (2016) avaliaram a atividade antibacteriana *in vitro* da própolis marrom e encontraram valores de CIM variando de 2,25 a 18,9mg/mL para as bactérias gram-positivas e 4,5 a 18,9mg/mL para gram-negativas, concluindo que esta própolis possui capacidade de aplicação como substância antibacteriana.

Com relação aos óleos essenciais, Santurio et al. (2007) avaliaram a atividade antibacteriana de óleos essenciais de ervas, como o orégano e o tomilho, sobre *Salmonella spp.* e encontraram CIM₅₀ de 0,20 a 1,60mg/mL, resultados inferiores aos achados no presente estudo para o *mix* de OE.

Semelhantemente, Santurio et al. (2011) analisaram a atividade antibacteriana *in vitro* de óleos essenciais de condimentos como orégano, manjerição e tomilho sobre a *E. coli*. Nos resultados encontraram valores de CIM₅₀ variando de 0,8 a 3,2mg/mL, números mais baixos do que os observados para o *mix* de OE na presente pesquisa.

Otoni e colaboradores (2014) aplicaram um filme comestível de óleos essenciais de cravo e orégano e metilcelulose em pães fatiados e verificaram que ambos os óleos diminuíram a contagem de fungos, estendendo a vida útil deste produto, devido a capacidade antimicrobiana dos extratos.

O potencial antibacteriano de óleos essenciais, dentre eles o orégano, o manjerição e o tomilho, foi testado no trabalho de Soković e colaboradores (2010). Os autores provaram que os óleos essenciais de orégano e de tomilho eram os mais promissores, destacando a possibilidade do uso de óleos essenciais em baixas concentrações para melhorar a segurança alimentar de produtos alimentícios.

5.2 ANÁLISES DOS PÃES

5.2.1 Caracterização das Amostras e Análises Físico-químicas

5.2.1.1 Medida de pH

A tabela 1 mostra os resultados das análises de pH das amostras e compara as médias de pH entre os pães e os dias de armazenamento analisados. Verifica-se que, no primeiro dia, houve diferença significativa da medida de pH entre os pães. No quarto dia de armazenamento, não houve diferença significativa entre o pão controle e o pão com *mix*, enquanto que houve diferença significativa entre o pão com própolis e os demais. No último dia de análise, observa-se que entre o pão controle e o pão com *mix* e entre o pão com própolis e o pão com *mix*, não houve diferença significativa entre as médias, por outro lado, houve diferença significativa entre o pão controle e o pão com própolis.

Ainda referente a tabela 1, os resultados das análises de pH das amostras, comparando-

se as médias dos dias de armazenamento para cada amostra de pão (colunas), revelam que: para o pão controle, entre o primeiro e o quarto dia e entre o primeiro e o sétimo dia, houve diferença significativa entre as médias, por outro lado, não houve diferença significativa entre o quarto e o sétimo dia. Para o pão com própolis, não houve diferença significativa entre o primeiro e quarto dia de armazenamento, enquanto que houve diferença significativa entre o sétimo dia e os demais. E, para o pão com *mix* de OE, não houve diferença significativa entre os dias analisados.

O exposto sugere que os extratos interferiram no pH dos pães, especialmente a própolis, tendo em vista que em todos os dias analisados, o pH do pão controle é diferente significativamente do pão com própolis. Por outro lado, o pão com *mix* é diferente significativamente do controle apenas no primeiro dia de armazenamento.

Vale comentar que, mesmo o pão com *mix* apresentando possível deterioração visível por fungos no sétimo dia de armazenamento, apresentou pH não diferente significativamente do pão controle, sugerindo que os fungos não alteraram essa característica do pão.

Tabela 1 – Valores médios e desvios padrão de pH das amostras de pães em três dias durante o período de armazenamento.

Dia de armazenamento	Amostras de pães integrais		
	Controle	Com própolis	Com <i>mix</i> de OE
Primeiro	5,72 (0,03) ^{a/A}	5,19 (0,06) ^{b/A}	5,43 (0,12) ^{c/A}
Quarto	5,40 (0,09) ^{a/B}	5,16 (0,02) ^{b/A}	5,38 (0,08) ^{a/A}
Sétimo	5,32 (0,10) ^{a/B}	5,58 (0,13) ^{b/B}	5,42 (0,04) ^{ab/A}

Notas:

- Letras minúsculas indicam que a comparação é na horizontal, enquanto que letras maiúsculas indicam que a comparação é na vertical;
- Letras diferentes indicam diferença significativa entre as amostras no teste Tukey ($p < 0,05$);
- Controle: pão elaborado sem extratos ou conservantes químicos; com própolis: pão elaborado com extrato de própolis; com *mix* de OE: pão elaborado com *mix* de óleos essenciais (orégano, tomilho e manjerição).

Apesar dos extratos possivelmente interferirem no pH, em todos os dias analisados, os pães estiveram dentro da faixa padrão de pH para este tipo de produto (4,6 a 7,0, baixa acidez). Santos C. M. et al. (2018) desenvolveram pães integrais de forma adicionado de farinha derivada do mamão. Os autores analisaram o pH dos pães e acharam valor semelhante ao presente estudo, igual a 5,57.

5.2.1.2 Medida de Atividade de Água (a_w)

A tabela 2 apresenta os resultados das análises de atividade de água das amostras e compara as médias de a_w entre os pães e os dias de armazenamento analisados. Verifica-se que, no primeiro e no quarto dia, não houve diferença significativa entre o pão controle e o pão com própolis, enquanto que houve diferença significativa entre o pão com *mix* e os demais. No último dia de análise, observa-se que não houve diferença significativa entre o pão controle e o pão com própolis.

Ainda, os resultados das análises de a_w das amostras, comparando-se as médias dos dias de armazenamento para cada amostra de pão (colunas), revelam que: para o pão controle, entre o primeiro e o quarto dia e entre o primeiro e o sétimo dia, não houve diferença significativa entre as médias, por outro lado, houve diferença significativa entre o quarto e o sétimo dia. Para o pão com própolis, não há diferença significativa entre as médias dos dias analisados. E, para o pão com *mix*, observa-se diferença significativa entre o primeiro e o quarto dia.

Tabela 2 – Valores médios e desvios padrão de atividade de água (a_w) das amostras de pães em três dias durante o período de armazenamento.

Dia de armazenamento	Amostras de pães integrais		
	Controle	Com própolis	Com <i>mix</i> de OE
Primeiro	0,95 (0,003) ^{a/AB}	0,96 (0,001) ^{a/A}	0,91 (0,008) ^{b/A}
Quarto	0,96 (0,00) ^{a/A}	0,96 (0,001) ^{a/A}	0,94 (0,001) ^{b/B}
Sétimo	0,95 (0,00) ^{a/B}	0,96 (0,001) ^{a/A}	...*

Notas:

- Letras minúsculas indicam que a comparação é na horizontal, enquanto que letras maiúsculas indicam que a comparação é na vertical;
- Letras diferentes indicam diferença significativa entre as amostras no teste Tukey ($p < 0,05$);
- Controle: pão elaborado sem extratos ou conservantes químicos; com própolis: pão elaborado com extrato de própolis; com *mix* de OE: pão elaborado com *mix* de óleos essenciais (orégano, tomilho e manjerição);
- *Não analisado devido a amostra se apresentar visualmente deteriorada por fungos.

Apesar do pão com *mix* de OE apresentar menor a_w , no último dia de análise, encontrava-se visualmente contaminado por fungos. O pão controle e o pão com própolis se mantiveram, durante os sete dias de armazenamentos, com a_w dentro da faixa padrão para este tipo de produto, que, segundo Franco e Landgraf (2008), é entre 0,95 e 0,96. Na pesquisa de

Pessanha (2016), avaliou-se as propriedades reológicas e sensoriais da massa de pão francês adicionada de fibra alimentar, solúvel e insolúvel. Na análise da atividade de água foram encontradas médias variando de 0,96 a 0,97, resultado próximo ao encontrado para o pão controle e para o pão com própolis do presente estudo.

Há outros estudos que testaram ingredientes não convencionais em pães e encontraram valores de atividade de água semelhantes ao exposto no presente trabalho. Stoll et al. (2015) avaliaram o efeito da substituição da gordura em pães de forma pela utilização de fibra de casca de laranja. Foram encontrados valores de a_w de 0,96 e 0,97 para os pães de forma.

5.2.1.3 Medida da Cor Instrumental

Observa-se na tabela 3 a comparação entre as médias dos intervalos de cor $L^*a^*b^*$ dos pães e os dias de armazenamento analisados. Para a luminosidade (L^*), houve diferença significativa entre o pão controle e os pães com própolis e *mix*, mas não houve diferença significativa entre os pães com própolis e com *mix* no primeiro dia de análise. No quarto dia de armazenamento, não houve diferença significativa entre as médias das amostras. E, no último dia, houve diferença significativa entre o pão controle e o pão com própolis.

Com relação a coordenada vermelho/verde (a^*), verifica-se no primeiro dia de análise que não houve diferença significativa entre a cor do pão controle e do pão com própolis, enquanto que houve diferença significativa entre o pão com *mix* e os demais. No quarto dia houve diferença significativa entre todas as amostras e, no sétimo dia, o pão controle e o pão com própolis não apresentaram diferenças significativas.

O resultado da coordenada amarelo/azul (b^*) indica que, no primeiro dia de armazenamento, não houve diferença significativa entre a cor do pão controle e do pão com própolis, enquanto que houve diferença significativa entre o pão com *mix* e os demais. No quarto dia houve diferença significativa entre todas as amostras e, no último dia de análise, houve diferença significativa entre o pão controle e o com própolis.

Ainda referente a tabela 3, os resultados das análises de intervalos de cor das amostras, comparando-se as médias dos dias de armazenamento para cada amostra de pão (colunas), revelam que: para a L^* , não houve diferença significativa entre os dias de análise do pão controle. As análises do pão com própolis indicam que não houve diferença significativa entre as médias do primeiro e quarto dia e entre o quarto e o sétimo dia, enquanto que houve diferença significativa entre o primeiro e último dia de análise. E, nas análises do pão com *mix* de OE, houve diferença significativa entre o primeiro e quarto dia de armazenamento.

Com relação a coordenada vermelho/verde (a^*) e a coordenada amarelo/azul (b^*), verifica-se nas análises do pão controle que não houve diferença significativa entre as médias dos dias analisados, assim também como verificado nos resultados dos pães com própolis e com *mix*.

Os achados indicam que os extratos podem ter interferido na cor instrumental dos pães, pois constatou-se elevada incidência de médias diferentes significativamente entre os pães com extratos e o pão controle.

Tabela 3 – Valores médios e desvios padrão dos intervalos de cor instrumental ($L^*a^*b^*$) das amostras de pães em três dias durante o período de armazenamento.

Dia de armazenamento	Intervalo de Cor	Amostras de pães integrais		
		Controle	Com própolis	Com <i>mix</i> de OE
Primeiro	L^*	61,95 (2,65) ^{a/A}	57,91 (1,98) ^{b/A}	57,11 (1,53) ^{b/A}
	a^*	0,24 (0,62) ^{a/A}	0,76 (0,38) ^{a/A}	1,79 (0,64) ^{b/A}
	b^*	22,83 (1,29) ^{a/A}	23,71 (0,72) ^{a/A}	25,12 (1,25) ^{b/A}
Quarto	L^*	61,04 (2,57) ^{a/A}	59,14 (1,13) ^{a/AB}	61,06 (2,01) ^{a/B}
	a^*	0,33 (0,52) ^{a/A}	0,85 (0,34) ^{b/A}	1,34 (0,34) ^{c/A}
	b^*	22,98 (1,09) ^{a/A}	23,90 (0,53) ^{b/A}	25,50 (0,60) ^{c/A}
Sétimo	L^*	63,50 (2,36) ^{a/A}	60,61 (2,53) ^{b/B}	...*
	a^*	0,20 (0,51) ^{a/A}	0,64 (0,52) ^{a/A}	...*
	b^*	22,89 (1,16) ^{a/A}	24,00 (0,57) ^{b/A}	...*

Notas:

- Letras minúsculas indicam que a comparação é na horizontal, enquanto que letras maiúsculas indicam que a comparação é na vertical;
- Letras diferentes indicam diferença significativa entre as amostras no teste Tukey ($p < 0,05$);
- Controle: pão elaborado sem extratos ou conservantes químicos; com própolis: pão elaborado com extrato de própolis; com *mix* de OE: pão elaborado com *mix* de óleos essenciais (orégano, tomilho e manjerição);
- *Não analisado devido a amostra se apresentar visualmente deteriorada por fungos.

Na pesquisa feita por Moura e colaboradores (2015) foi avaliada a cor de pães de forma com adição de grãos de linhaça. Os autores encontraram maiores valores de L^* para o miolo do pão, variando de 70,39 a 76,08. Comparados a estes, os pães analisados no presente trabalho apresentam valores de L^* menores, ou seja, são mais escuros, tendo em vista que há farinha de

trigo integral na receita. Para a coordenada a^* , os resultados da pesquisa de Moura et al. (2015) foram negativos, indicando coloração mais verde, enquanto que os resultados dos pães com própolis, com *mix* e o pão controle apresentaram valores de a^* positivos (coloração mais vermelha). Por último, estes autores obtiveram medidas variando entre 12,27 e 14,17 para a coordenada b^* , indicando coloração menos amarela que o encontrado no presente trabalho, que apresentou valores a partir de 22,83.

Pessanha (2016), avaliou a cor de pães do tipo francês adicionados de fibra alimentar, solúvel e insolúvel e encontrou valores de L^* variando de 74,1 a 78,5, a^* de 0,24 a 1,0 e b^* de 16,6 a 19,3. Estes pães indicam ser mais claros, possuir coloração de tonalidade vermelha semelhantes e ser menos amarelos se comparados aos pães elaborados com farinha integral no presente estudo. A farinha de trigo integral tem coloração mais escura e confere tonalidade característica, o que justifica as diferenças apresentadas.

A média da diferença total da cor (ΔE^*_{ab}) entre o pão controle e o pão com própolis nos três dias analisados foi de 3,15 e entre o pão controle e o pão com *mix* nos dois dias analisados foi de 4,14. Esses resultados indicam que o pão com própolis apresentou cor instrumental mais próxima ao pão controle (sem extratos).

Capriles (2009) avaliou, dentre outras análises, o efeito de diferentes níveis de mistura de inulina e oligofrutose sobre a cor do miolo em pães sem glúten. A autora encontrou ΔE variando de 0,70 a 3,95, próximos as médias de diferença total da cor encontradas no presente estudo.

5.2.1.4 Medida da Textura Instrumental

A tabela 4 mostra os resultados das análises da textura das amostras e compara as médias de força máxima de cisalhamento (N) entre os pães e os dias de armazenamento analisados. Verifica-se que, no primeiro dia, houve diferença significativa da textura entre os pães, enquanto que no quarto dia de armazenamento, não foi observada diferença significativa entre as amostras. No último dia de análise, houve diferença significativa entre as médias do pão controle e do pão com própolis e entre o pão com própolis e o pão com *mix*, por outro lado, não houve diferença significativa entre o pão controle e o pão com *mix* de OE.

Ainda referente a tabela 4, os resultados das análises da textura das amostras, comparando-se as médias dos dias de armazenamento para cada amostra de pão (colunas), revelam que: para todas as amostras, entre o primeiro e o quarto dia e entre o primeiro e o sétimo dia, houve diferença estatisticamente significante entre as médias, por outro lado, não

houve diferença significativa entre o quarto e o sétimo dia de armazenamento.

Os resultados revelam que apenas no quarto dia de armazenamento os pães com extratos apresentaram valores de textura sem diferenças significativas, enquanto que, nos demais dias de análises, o pão com própolis mostrou-se mais duro que as outras amostras, sugerindo que a própolis não preservou a textura dos pães.

Vale comentar que, mesmo o pão com *mix* apresentando as características de deterioração visíveis por fungos no último dia de análise, apresentou textura não diferente significativamente do pão controle, sugerindo que os fungos não alteraram essa característica do pão.

Tabela 4 – Valores médios expressos em força máxima de cisalhamento (N) e desvios padrão da textura instrumental das amostras de pães em três dias durante o período de armazenamento.

Dia de armazenamento	Amostras de pães integrais		
	Controle	Com própolis	Com <i>mix</i> de OE
Primeiro	18,6 (2,55) ^{a/A}	50,2 (0,19) ^{b/A}	29,3 (1,36) ^{c/A}
Quarto	11,9 (0,74) ^{a/B}	15,0 (0,88) ^{a/B}	14,0 (3,88) ^{a/B}
Sétimo	9,1 (1,01) ^{a/B}	22,6 (6,11) ^{b/B}	12,2 (2,74) ^{a/B}

Notas:

- Letras minúsculas indicam que a comparação é na horizontal, enquanto que letras maiúsculas indicam que a comparação é na vertical;
- Letras diferentes indicam diferença significativa entre as amostras no teste Tukey ($p < 0,05$);
- Controle: pão elaborado sem extratos ou conservantes químicos; com própolis: pão elaborado com extrato de própolis; com *mix* de OE: pão elaborado com *mix* de óleos essenciais (orégano, tomilho e manjeriço).

Na pesquisa feita por Moura e colaboradores (2015) foi avaliada a textura de pães de forma com adição de grãos de linhaça por cisalhamento. Os autores encontraram medidas de 16,4 N para o pão controle (sem adição de linhaça), 23,3 N para o pão com adição de 3% de linhaça, 20,1 N para o pão com adição de 6% de linhaça e 24,4 N para o pão com adição de 9% de linhaça. Esses valores são intermediários às medidas de força apresentadas no presente trabalho.

Alcântara (2017) produziu pães do tipo francês com adição de farinha de milho, farinha de arroz e farinha de banana verde, com o objetivo de avaliar o efeito dessas farinhas em substituição a farinha de trigo nos pães. O autor encontrou força de cisalhamento máxima variando de 17 a 57 N, faixa de textura semelhante a encontrada no presente estudo, provavelmente pelo fato dessas farinhas contribuírem com o aumento de fibras no pão.

Durante o armazenamento dos pães da presente pesquisa, verifica-se que a força máxima de cisalhamento diminuiu com o passar dos dias de armazenamento. Tais resultados persistiram mesmo após as medidas da textura instrumental serem refeitas. Porém, outros estudos mostram resultados contrários, tendo em vista que durante o envelhecimento de pães ocorre a retrogradação do amido, o que causa o aumento da firmeza dos mesmos (GANDRA et al., 2008; WANG et al., 2015).

A diminuição da força máxima de cisalhamento pode ter ocorrido devido ao resfriamento inadequado dos pães antes de serem embalados, fato que proporciona a absorção de umidade durante o armazenamento.

5.2.2 Análise Macroscópica Observacional

Os pães elaborados nesta pesquisa foram observados visualmente com relação ao possível aparecimento de fungos em dois períodos diferentes do ano. No primeiro período, início de julho de 2017, constatou-se apenas no sétimo dia de armazenamento que alguns pães controle e com *mix* de OE apresentavam visualmente possíveis fungos (figura 9), possuindo os últimos pães maior número de colônias visíveis. Para o consumidor, considera-se o pão inaceitável quando há presença de colorações escuras ou manchas (deteriorações visíveis), como neste caso. Por outro lado, neste dia de armazenamento, o pão com própolis não apresentava essas alterações indicativas de presença de possíveis fungos.

Figura 9 – Possíveis colônias de fungos observadas nos pães controle e com *mix* de óleos essenciais no sétimo dia de armazenamento, elaborados no início do mês de julho de 2017.

Fonte: Registro fotográfico da autora.

Neste período, no primeiro e no quarto dia de armazenamento para o pão controle e para o pão com *mix* e nos três dias de observação para o pão com própolis, não foram identificados odores desagradáveis e formação de gás nas embalagens. Da mesma forma, não foram verificadas deteriorações de aspecto viscoso, com formação de “fiapos” quando o pão é cortado ou partido vagarosamente, que poderiam ser ocasionados por algumas linhagens de *Bacillus subtilis* (JAY, 2005).

Na segunda análise, realizada no final do mês de abril de 2018, constatou-se no sétimo dia de armazenamento que todos os pães apresentavam visualmente manchas com colorações escuras (possíveis fungos), porém em proporção diferente, possuindo o pão com *mix* maior número de colônias visíveis e o pão com própolis menor número (figura 10).

Figura 10 – Possíveis colônias de fungos observadas nos pães no sétimo dia de armazenamento, elaborados no final do mês de abril de 2018.

Fonte: Registro fotográfico da autora.

Notas: (A) - Pão controle (sem extratos) deteriorado; (B) - Pão com própolis deteriorado; (C) Pão com *mix* de óleos essenciais deteriorado.

O menor tempo de armazenamento aceitável dos pães observado na segunda análise possivelmente se deve ao fato da temperatura do ambiente estar mais elevada em comparação ao primeiro período analisado, sendo mais propício para o desenvolvimento de microrganismos (RIBOTTA e TADINI, 2009).

A sugestão macroscópica de que os pontos de contaminação observados sejam colônias de fungos, é evidenciada pela descrição das mesmas. Como visualizado nas figuras 9 e 10, observam-se dois tipos de colônias de aspecto aveludado, uma de coloração verde acinzentada e a outra de coloração preta. As possíveis colônias aveludadas, provavelmente os micélios, apresentavam estrutura formada por filamentos (hifas) (FRANCO e LANDGRAF, 2008).

As colônias verde acinzentadas observadas são indicativas de contaminação por fungos *Penicillium* e/ou *Aspergillus*, enquanto que as de coloração preta, podem ser constituídas por fungo do gênero *Rhizopus* (FORSYTHE, 2002; JAY, 2005).

Araújo R. C. Z. et al. (2009) isolaram os seguintes fungos de pães artesanais deteriorados: *Penicillium roqueforti*, *Penicillium citrinum*, *Penicillium glabrum*, *Penicillium aurantiogriseum*, *Penicillium miczynskii*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus niger* var. *awamori*, *Aspergillus sydowii*, *Aspergillus flavus*, *Eurotium chevalieri*, *Rhizopus stolonifer*, *Cladosporium cladosporioides* e *Fusarium* sp. Destes fungos, a autora selecionou três para realizar testes *in vitro*: *Penicillium roqueforti*, *Aspergillus ochraceus* e *Rhizopus stolonifer*.

A figura abaixo mostra as colônias dos fungos testados *in vitro* da pesquisa citada.

Figura 11 - Colônias dos fungos: *Aspergillus ochraceus* (A), *Penicillium roqueforti* (B) e *Rhizopus stolonifer* (C). Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, 2005.

Fonte: Araújo R. C. Z. et al. (2009).

Dessas três colônias apresentadas, a colônia B, que é do *Penicillium roqueforti*, é macroscopicamente semelhante às colônias visualizadas nos pães deteriorados do presente trabalho, indicando, fortemente, que este seja um dos fungos que ocasionou a deterioração.

A contaminação responsável pela inaceitabilidade dos pães para o consumo pode ter sido ocasionada pelo não total resfriamento antes de serem embalados, fato que proporciona o armazenamento em umidade elevada (FRANCO e LANDGRAF, 2008).

Esta observação visual sugere que a própolis apresentou maior capacidade de conservar o pão. O maior tempo de armazenamento aceitável dos pães com própolis pode ter ocorrido devido a presença do composto pinocembrina, que tem efeito antifúngico (BORGES et al., 2009).

Kim e colaboradores (1997) adicionaram extrato de própolis em pão branco com o objetivo de avaliar o efeito desse extrato no prazo de validade e no endurecimento do pão. Os autores encontraram resultados positivos nas amostras P1 (1,48% de própolis) e P2 (0,74% de própolis), pois houve inibição do crescimento microbiano.

Por outro lado, o *mix* de óleos essenciais provavelmente foi adicionado na formulação em uma concentração insuficiente para promover ação conservante ou o sinergismo entre as ervas não foi positivo para a conservação, o que o descaracteriza, neste aspecto, como conservante natural, pois foi observado maior número de colônias visíveis comparado ao pão controle, o qual não apresentava nenhum tipo de conservante em sua formulação, em ambos os períodos.

Segundo Ribotta e Tadini (2009), o conservante natural deve possuir as seguintes características: ter um amplo espectro antimicrobiano, não ser tóxico, ser eficaz em baixas concentrações, ter efeito mínimo sobre o pH dos produtos, não afetar sensorialmente os produtos nas doses usadas, estar disponível na forma desidratada, não ser corrosivo, possuir boa estabilidade em água e durante o armazenamento, não exercer efeito adverso sobre a fermentação e sobre as demais características do pão, além de ser de baixo custo.

A concentração insuficiente utilizada para o *mix* pode ter estimulado o crescimento microbiano. Há possibilidade de que o conservante utilizado em concentrações insuficientes seja metabolizado pelo microrganismo que deveria inibir, podendo, então, ocorrer uma adaptação fenotípica e desenvolver resistência (FORSYTHE, 2002; FRANCO e LANDGRAF, 2008).

A atividade antifúngica da própolis é comprovada no estudo de Longhini et al. (2007), que verifica a eficiência de extratos de própolis frente às leveduras isoladas *in vitro*. Os autores concluíram que o extrato etanólico é mais eficiente do que o glicólico com relação a atividade

antifúngica.

Forsythe (2002) relata que os pães possuem vida de prateleira esperada de até uma semana à temperatura ambiente. Dessa forma, observou-se de uma maneira geral que, os pães elaborados e estocados durante o período (estação do ano) de temperatura mais baixa apresentaram um bom tempo de armazenamento visualmente aceitável próximo a uma semana para o pão controle e para o pão com *mix* de OE e de um tempo mais elevado que este para o pão com própolis, no que diz respeito ao surgimento de fungos detectados visualmente.

Por outro lado, os pães elaborados em período (estação do ano) de temperatura mais elevada não alcançaram tempo de armazenamento aceitável próximo a uma semana. Contudo, espera-se que, se os mesmos fossem elaborados em uma indústria de panificação, onde o controle de produção é mais rígido, a validade poderia ter aumentado em ambos os períodos de produção.

5.2.3 Análise Sensorial

Participaram da análise sensorial um total de 103 provadores, os quais avaliaram e indicaram o quanto aceitavam ou não as amostras de pães com relação aos atributos cor, textura, umidade e impressão global. Além disso, o painel sensorial avaliou a intenção de compra dos produtos, caso estivessem disponíveis no mercado. Antes da aplicação das escalas, os provadores responderam a um breve questionário para a identificação do perfil do painel sensorial (tabela 5).

A maioria dos provadores possuíam idade entre 22 e 40 anos (44,7%), eram do sexo feminino (85,4%) e apresentavam elevado consumo habitual de pão (46,6%). Este consumo observado nos resultados reflete o crescimento encontrado atualmente no segmento de panificação e confeitaria, assim como a análise do consumo alimentar pessoal no Brasil, realizada pela POF 2008-2009, na qual o consumo de pão é referido pelos brasileiros com elevada frequência (IBGE, 2011; ABIP, 2018).

Tabela 5 – Perfil de provadores participantes da análise sensorial.

Itens avaliados		N	%
Provadores		103	100
Faixa etária (anos)	>19 e ≤ 22	39	37,9
	> 22 e ≤ 40	46	44,7
	> 40	18	17,5
Gênero	Feminino	88	85,4
	Masculino	15	14,6
Consumo habitual de pão	Baixo: < 2 vezes na semana	18	17,5
	Moderado: De 2 a 4 vezes na semana	37	35,9
	Elevado: > 4 vezes na semana	48	46,6

5.2.3.1 Teste de Aceitação por Escala Hedônica

No teste de aceitação aplicado, escala hedônica de 7 pontos, o painel sensorial analisou quatro atributos para cada pão: cor, textura, umidade e impressão global. As pontuações dadas pelos provadores variaram desde a nota mais baixa (1) até a mais alta (7), porém as médias das notas obtidas para os atributos nas amostras de pães revelam boa aceitação, pois indicam intensidade entre “gostei ligeiramente” (média nota 5) e “gostei moderadamente” (média nota 6) (tabela 6).

Comparando-se as médias dos atributos para cada amostra analisada, verifica-se que: para os atributos “cor”, “umidade” e “impressão global” não houve diferença significativa entre o pão controle e o pão com *mix* e entre o pão com própolis e o com *mix* de OE, porém houve diferença significativa entre o pão controle e o pão com própolis. Para o atributo “textura”, não houve diferença significativa entre o pão controle e o pão com *mix*, contudo houve diferença significativa entre o pão com própolis e os demais (tabela 6).

A média de aceitação inferior dada ao atributo “textura” para o pão com própolis pode ter correlação com os resultados obtidos na análise de textura realizada com texturômetro. Nesta análise evidenciou-se que o pão com própolis, na maioria dos dias de armazenamento

analisados, mostrou-se mais duro que as outras amostras. Contudo, houveram comentários relatando que o pão com *mix* ou o pão controle estavam secos ou que a maciez das três amostras de pães estava satisfatória: “...O último 345 (pão com *mix* de OE) não estava com o sabor bom e estava seco.”; “O pão 232 (com própolis) possui textura e cor muito boas, mas o sabor de própolis é muito intenso. O pão 748 (controle) é muito seco. O pão 345 (com *mix* de OE) foi o melhor em questão”; “...Gostei muito da maciez das 3 amostras”; “Todos os pães são fantásticos, tanto no sabor como na maciez”.

Tabela 6 – Valores médios e desvios padrão das notas obtidas por atributo e por amostra no teste de aceitação por escala hedônica de 7 pontos.

Atributos sensoriais	Amostras de pães integrais	
Cor	Controle	6,3 (1,00) ^a
	Com própolis	5,8 (1,60) ^b
	Com <i>mix</i> de OE	6,0 (1,33) ^{ab}
Textura	Controle	6,0 (1,22) ^a
	Com própolis	5,3 (1,53) ^b
	Com <i>mix</i> de OE	5,8 (1,24) ^a
Umidade	Controle	5,8 (1,43) ^a
	Com própolis	5,2 (1,56) ^b
	Com <i>mix</i> de OE	5,4 (1,48) ^{ab}
Impressão global	Controle	6,0 (1,08) ^a
	Com própolis	5,3 (1,61) ^b
	Com <i>mix</i> de OE	5,7 (1,28) ^{ab}

Notas:

- Letras diferentes indicam diferença significativa entre as amostras por atributo no teste Tukey ($p < 0,05$);
- Controle: pão elaborado sem extratos ou conservantes químicos; com própolis: pão elaborado com extrato de própolis; com *mix* de OE: pão elaborado com *mix* de óleos essenciais (orégano, tomilho e manjeriço).

Diante destes resultados, observa-se que o pão elaborado com própolis obteve médias de aceitação menores do que o pão controle em todos os atributos analisados, enquanto que o pão com *mix* apresentou médias não diferentes significativamente nos atributos em relação ao pão controle. Porém, todos os pães, inclusive o com própolis, obtiveram boa aceitação com relação à “cor”, “textura”, “umidade” e “impressão global”, pois, como já mencionado, as médias apontam as interpretações “gostei ligeiramente” e “gostei moderadamente”.

A menor aceitação significativa do pão com própolis pode ser explicada pelo fato de haver um maior número de provadores que escolheram notas baixas para os atributos analisados na escala hedônica, que indicam desgostei muito (nota 1), desgostei moderadamente (nota 2), desgostei ligeiramente (nota 3) e nem gostei/nem desgostei (nota 4). Essa situação ocorreu em

menor proporção para o pão controle e o pão com *mix* OE (figura 12).

Figura 12 – Distribuição das notas obtidas no teste de aceitação por escala hedônica de 7 pontos para os pães controle (A), com própolis (B) e com *mix* de óleos essenciais (OE) (C) por atributos analisados.

(A)

“Continua”

Figura 12 – Distribuição das notas obtidas no teste de aceitação por escala hedônica de 7 pontos para os pães controle (A), com própolis (B) e com *mix* de óleos essenciais (OE) (C) por atributos analisados.

“Continuação”

(B)

(C)

Semelhante a estes resultados, na pesquisa feita por Moura et al. (2015) foi avaliada a aceitação de pães de forma com adição de grãos de linhaça por escala hedônica de 9 pontos e constatou-se que todas as amostras analisadas obtiveram boa aceitação pelos provadores, com notas variando de “gostei moderadamente” a “gostei muito”.

Outros estudos têm utilizado a análise sensorial para avaliar a adição de ingredientes não convencionais em pães. Souza-Borges e Conti-Silva (2018) adicionaram prebióticos (frutanos) na formulação de pães caseiros e aplicaram a escala hedônica de 9 pontos no painel sensorial composto por 50 provadores para avaliar a “aparência”, o “aroma”, a “textura”, o “sabor” e a “aceitação global”. Semelhante ao presente estudo, a maioria dos provadores recrutados pelos autores eram do sexo feminino, possuíam idade entre 18 e 27 anos e consumo habitual elevado de pão. Como conclusão, verificou-se uma boa aceitação dos pães com frutanos em comparação ao controle, sendo um produto promissor para consumo como fonte de prebióticos.

Capriles (2009) avaliou diferentes níveis de frutanos nas características tecnológicas e nutricionais do pão sem glúten. A aceitabilidade dos pães elaborados foi verificada por meio da escala hedônica de 9 pontos para os atributos aparência, cor, textura, sabor e aceitação global. As médias das notas atribuídas aos pães com frutanos variaram entre “gostei ligeiramente” e “gostei muito”, indicando a possibilidade de aumentar a variedade e adequação da dieta de celíacos.

Pessanha (2016) aplicou a escala hedônica de 9 pontos para avaliar a aceitação de pães do tipo francês adicionados de fibra alimentar sobre os atributos “sabor”, “aroma”, “textura” e “aspecto geral”. O painel sensorial foi composto por 68 provadores, os quais julgaram boa aceitação dos pães, com notas variando de “gostei regularmente” e “gostei muito”.

Ainda, Silva (2013) verificou a aceitação de pães adicionados de farinha de jatobá-docereado com uma escala estruturada de 9 pontos. A autora concluiu que a adição da farinha proporcionou um pão de menor índice glicêmico e carga glicêmica moderada, aceitos sensorialmente.

O Índice de Aceitabilidade (IA) calculado para o atributo “impressão global” para o pão controle foi igual a 86%, para o pão com própolis 75,3% e para o pão com *mix* de OE 81,6%. Percebe-se que todos os pães analisados apresentaram índice de aceitabilidade maior que 70%, o que significa boa aceitação dos produtos pelos provadores, levando-se em consideração a impressão global das amostras. O mais aceito foi o pão controle, seguido do pão com *mix* de óleos e do pão com própolis.

Coelho (2014) desenvolveu pães adicionando chia na elaboração dos mesmos e avaliou

a aceitabilidade. A análise sensorial para o atributo “qualidade global” revela IA de 92,1% para a formulação com 7,8% de farinha de chia e IA de 90,1% para a formulação com 11% de farinha de chia, indicando boa aceitação dos mesmos.

No trabalho de Graça et al. (2017) avaliou-se o efeito da adição de colágeno na elaboração de pães sem glúten. Os autores calcularam o IA e obtiveram um valor de 76,4%, da mesma forma, encontrando um índice que revela boa aceitação.

Sobre os comentários que o painel sensorial realizou, mais da metade (61%) demonstraram a sua opinião, porém observam-se comentários variáveis, sendo característico de métodos afetivos. Verificam-se comentários positivos, como “todas as amostras estão muito saborosas” e “gostei bastante”, além de negativos, como “para o meu paladar estão um pouco secas as três amostras” e “devia ser mais fofinho”.

Ressalta-se que alguns provadores perceberam a presença do *mix* de OE e/ou da própolis na formulação dos pães: “eu senti um sabor diferenciado nas amostras 345 (pão com *mix* de OE) e 232 (pão com própolis) comparadas à 748 (pão controle), que não me agradou muito”; “o primeiro (748- pão controle) estava saboroso e mais familiar com sabores já provados anteriormente. O segundo (232 - pão com própolis) estava com sabor muito forte de própolis embora textura ainda estava agradável. O último (345 - pão com *mix* de OE) não estava com sabor bom e estava seco”.

Devido a interferência dos extratos na análise sensorial, há limitações no que diz respeito ao aumento da concentração dos mesmos. Gutiérrez et al. (2009) comentam que, embora os conservantes naturais sejam eficientes agentes antimicrobianos, um dos principais problemas para introduzi-los em alimentos é o odor e o sabor que possuem. Estes autores sugerem uma solução para minimizar as características sensoriais acentuadas dos óleos essenciais pela combinação destes com aromas típicos, como o de baunilha, por exemplo. Contudo, considera-se essa alternativa contraditória à proposta de reduzir o consumo de aditivos químicos, se os aromatizantes forem artificiais.

Na presente pesquisa, esperava-se que os extratos naturais testados fossem uma alternativa para substituir aditivos químicos conservantes, como o propionato de cálcio e o ácido sórbico, comumente usados em produtos de panificação, que não alteram sensorialmente os pães. Porém, verifica-se que os extratos adicionados aos pães, apesar de receberem uma boa aceitação média, foram detectados por parte do painel sensorial, o que não os caracterizam como substitutos.

Por outro lado, caso os pães fossem vendidos com alegações como “pão com erva” ou “pão com própolis” no rótulo da embalagem, provavelmente o público que compraria, já tendo

o conhecimento prévio que esses produtos possuem ervas ou própolis na formulação, demonstraria aceitação ainda melhor.

5.2.3.2 Teste de Aceitação por Escala de Intenção de Compra

No segundo teste de aceitação aplicado, escala de intenção de compra, os provadores avaliaram a intenção de compra das amostras de pães, caso estivessem disponíveis no mercado. As pontuações dadas pelo painel sensorial variaram desde a nota mais baixa (1) até a mais alta (5), porém as médias obtidas nas amostras revelam boa aceitação, pois indicam intenção mais próxima da nota 4, “provavelmente compraria” (tabela 7).

Tabela 7 – Valores médios e desvios padrão das notas obtidas no teste de aceitação por escala de intenção de compra de 5 pontos.

Amostras de pães integrais		
Controle	Com própolis	Com <i>mix</i> de OE
3,6 (1,20)	3,7 (0,99)	3,5 (1,27)

Notas:

- Não há diferença significativa entre as amostras no teste ANOVA ($p < 0,05$);
- Controle: pão elaborado sem extratos ou conservantes químicos; com própolis: pão elaborado com extrato de própolis; com *mix* de OE: pão elaborado com *mix* de óleos essenciais (orégano, tomilho e manjerição).

Comparando-se as médias das intenções de compra para as amostras dos pães analisados, verifica-se que não há diferença significativa entre as médias obtidas, conforme visualiza-se na tabela 7.

O pão elaborado com própolis obteve poucas notas baixas (“certamente não compraria” e “provavelmente não compraria”) se comparado às demais amostras de pães, como demonstra a figura 13, o que influenciou na apresentação de uma média maior, embora não significativa.

Silva et al. (2014) elaboraram pães com farinhas de linhaça e de casca de maracujá. Os autores aplicaram a escala de intenção de compra de 5 pontos e encontraram médias variando de 3,0 a 4,2, indicando “tenho dúvida se compraria” e “provavelmente compraria”, resultado próximo ao observado no presente estudo.

Ainda, Santos C. M. et al. (2018) desenvolveram um pão de forma integral adicionado de farinha proveniente das cascas e sementes do mamão Havaí, em diferentes porcentagens de adição. Para verificar a aceitação sensorial dos pães, aplicaram a escala de intenção de compra

de 5 pontos, encontrando médias de notas variando de 2,2 a 4,2. As melhores notas foram atribuídas ao pão controle (sem adição de farinha) e ao pão com 3% de farinha, indicando “provavelmente compraria” e “talvez compraria”, respectivamente. Os pães elaborados com 6% e 9% de farinha apresentaram notas mais baixas se comparadas as notas de intenção de compra dadas aos pães do presente estudo.

Figura 13 – Distribuição das notas obtidas no teste de aceitação por escala de intenção de compra de 5 pontos por amostras de pães analisados.

6 CONCLUSÕES

O extrato de própolis apresentou maior potencial antioxidante e antimicrobiano do que o *mix* de óleos essenciais elaborado. Quando adicionados em pães do tipo integral, o extrato de própolis apresentou maior capacidade em conservar os pães, ultrapassando sete dias de armazenamento aceitável na análise realizada no período de menor temperatura ambiente.

A caracterização dos pães e as análises físico-químicas realizadas sugerem que os extratos interferiram no pH, na a_w , na cor e na textura instrumental dos pães. Ambos os extratos parecem modificar a cor dos pães e a própolis, possivelmente, aumentou a dureza do pão. Porém, as amostras se mantiveram dentro da faixa padrão para pães com relação ao pH e a a_w .

A análise sensorial revela que os pães foram bem aceitos pelo painel avaliador, apesar disso os comentários feitos por alguns provadores mostram que os extratos foram percebidos nas amostras. Sendo assim, os extratos utilizados não são caracterizados em todos os parâmetros como substitutos de conservantes químicos em pães.

6.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Apesar do extrato de própolis apresentar melhor potencial antioxidante e antibacteriano frente ao *mix* de óleos essenciais e, por isso, observar-se um aumento do tempo de armazenamento aceitável para mais de sete dias na análise macroscópica realizada no período (estação do ano) de menor temperatura ambiente, a presença deste extrato não foi suficiente para conservar os pães elaborados no período de maior temperatura ambiente.

Como limitações do presente estudo, cita-se a não realização de análises microbiológicas nos pães, como contagem de bolores e leveduras, coliformes a 45°C/g e *Salmonella sp*/25g, que afirmariam com maior propriedade a validade dos mesmos; e o controle durante o resfriamento e embalagem dos pães, o qual deveria ser melhorado, visando obter resultados melhores na textura e na análise macroscópica observacional que possam contribuir com o aumento da vida de prateleira desses produtos.

O Brasil, terceiro lugar na produção mundial de própolis, apresenta capacidade de investir em mais estudos utilizando este produto em alimentos (SILVA et al., 2016). Sendo assim, sugere-se que o extrato de própolis, que apresentou melhor resultado geral comparado ao *mix* de OE, seja testado pulverizando-se no interior das embalagens dos pães, como realizado por Araújo (2005), o qual obteve tempo de conservação maior que 10 dias para pães

armazenados com embalagem contendo extratos alcoólicos de ervas.

O presente trabalho foi importante, pois, além das análises *in vitro*, testou conservantes naturais diretamente no alimento, situação não encontrada com facilidade nas pesquisas, cuja maioria possui o objetivo de analisar extratos em testes *in vitro* (NANDITHA e PRABHASANKAR, 2009; MONTES et al., 2013; HINTZ et al., 2015; GOMES et al., 2016). Além disso, recomenda-se, que o extrato de própolis seja testado em outros tipos de alimentos, buscando encontrar resultados melhores, como, por exemplo, em linguças, no revestimento de ovos, em alimentos congelados ou que não precisem ir ao forno ou sofram algum tipo de aumento de temperatura, como ocorre na produção do pão. Dessa forma, se reduz perdas de substâncias presentes nos extratos por temperaturas elevadas (BORGES et al., 2009; NANDITHA e PRABHASANKAR, 2009; CARVALHO et al., 2013).

Na fabricação de pães, a indústria pode ainda aplicar estratégias de conservação físico-químicas e sensoriais para prolongar o tempo de frescura e/ou retardar o envelhecimento desses produtos, como o uso de hidrocoloides e enzimas (GUARDA et al., 2004; LÉON et al., 2002).

Há outras substâncias naturais que podem ser utilizadas na conservação de alimentos, como a nisina. Ribotta e Tadini (2009) exemplificam a nisina como sendo uma alternativa para essa substituição. Trata-se de uma bacteriocina produzida por *Lactococcus lactis*, aceita como segura em vários países, inclusive nos Estados Unidos da América, sendo eficaz contra bactérias gram-positivas, particularmente formadoras de esporos, além de não ser tóxica (JAY, 2005).

7 CONFLITO DE INTERESSE

Este trabalho de pesquisa não apresenta conflito de interesse.

REFERÊNCIAS¹

- ABIP - Associação Brasileira da Indústria de Panificação e Confeitaria. Tendências de mercado e indicadores (2018): Balanço e tendências do mercado de panificação e confeitaria. c2018. Disponível em: < <http://www.abip.org.br/site/tendencias-de-mercado-e-indicadores-2018/>>. Acesso em: 04 de agosto de 2018.
- AGUIAR, A. P. S. et al. Avaliação *in vitro* da ação do extrato glicólico de gengibre sobre *Candida albicans*. **Rev. de Odont. da Univ. Cid. de São Paulo**, São Paulo, v. 21, n. 2, p. 144-9, 2009.
- ALBUQUERQUE, M. V. et al. Educação alimentar: uma proposta de redução do consumo de aditivos alimentares. **Quím. Nova na Esc.**, Alagoas, v. 34, n. 2, p. 51-57, 2012.
- ALCÂNTARA, R. G. **Avaliação da substituição parcial da farinha de trigo nas propriedades de pães do tipo francês**. 2017. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2017.
- ALVES, R. S. **Avaliação da atividade antimicrobiana entre óleos essenciais obtidos de folhas de manjerição, pimenta de macaco e tomilho sobre patógenos veiculados por alimentos**. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras (MG), 2010.
- ALVES, C. Q. et al. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Quim. Nov.**, Salvador, v. 33, n. 10, p. 2202-2210, 2010.
- ALVES, E.; KUBOTA, E. H. Conteúdo de fenólicos, flavonoides totais e atividade antioxidante de amostras de própolis comerciais. **Rev. Ciên. Farm. Bás. Apl.**, Rio Grande do Sul, v. 34, n. 1, p. 37-41, 2013.
- ANTUNES, L. M. G.; ARAÚJO, M. C. P. Mutagenicidade e antimutagenicidade dos principais corantes para alimentos. **Rev. Nutr.**, Campinas, v. 13, n. 2, p. 81-88, 2000.
- ARAÚJO, R. C. Z. **Embalagens ativas com ervas aromáticas e condimentares na conservação de pães artesanais**. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, 2005.
- ARAÚJO, R. C. Z. et al. Avaliação *in vitro* da atividade fungitóxica de extratos de condimentos na inibição de fungos isolados de pães artesanais. **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v. 33, n. 2, p. 545-551, 2009.
- ARAÚJO, W. M. C. et al. **Alquimia dos alimentos**. Brasília: Senac, 2009.
- AUN, M. V. et al. Aditivos em alimentos. **Rev. Bras. de Aler. e Imunop.**, São Paulo, v. 34, n. 5, p. 177, 2011.
- BANKOVA, V. Recent trends and important developments in propolis research. **eCAM**,

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023).

Bulgária, v. 2, n. 1, p. 29–32, 2005.

BASTOS, E. M. A. F. et al. Indicadores físico-químicos e atividade antibacteriana de própolis marrom frente à *Escherichia coli*. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, Belo Horizonte, v. 63, n.5, p.1255-1259, 2011.

BEMRAH, N. et al. Assessment of dietary exposure in the French population to 13 selected food colours, preservatives, antioxidants, stabilizers, emulsifiers and sweeteners. **Food Addit. Contam. Part B Surv.**, France, v. 1, n. 1, p. 2-14, 2008.

BHARTI, V.; VASUDEVA, N. In vitro Synergistic/Antagonistic Antimicrobial Effect of Culinary Herb *Oreganum vulgare* with Antibiotic and Antifungal Agents. **Journ. of Herb., Spic. & Medic. Plant.**, India, v. 19, p. 207–215, 2013.

BISSACOTTI, A. P. et al. Implicações dos aditivos químicos na saúde do consumidor. **Discip. Scien.**, Santa Maria, v. 16, n. 1, p. 43-59, 2015.

BONAMIGO, T. et al. Antioxidant and cytotoxic activity of propolis of *Plebeia droryana* and *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae) from the Brazilian Cerrado biome. **PLoS ONE**, Canada, v. 12, n. 9, 2017.

BORGES, C. H. F. et al. Atividade antibacteriana e antifúngica de diferentes concentrações de extratos hidroalcoólicos de própolis (EHP) em linguiça frescal suína. **FAZU em Rev.**, Uberaba, n. 6, p. 53-82, 2009.

BORUGA, O. et al. Thymus vulgaris essential oil: chemical composition and antimicrobial activity. **J Med Life**, Romania, v. 7, p. 56-60, 2014.

BRASIL. Presidência da República. Casa Civil. Decreto-lei nº 986, de 21 de outubro de 1969. Institui normas básicas sobre alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 21 de outubro de 1969. Seção 1, p. 8935.

BRASIL. Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos. Resolução CNNPA nº 12 de 1978. Normas Técnicas Especiais. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. **Diário Oficial da União**, 24 de julho de 1978.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 540, de 27 de outubro de 1997. Aprova o regulamento técnico de aditivos alimentares – definições, classificação e emprego. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 27 de outubro de 1997.

BRASIL. ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 383, de 05 de agosto de 1999. Regulamento técnico que aprova o uso de Aditivos Alimentares, estabelecendo suas funções e seus Limites Máximos para a Categoria de Alimentos 7- Produtos de Panificação e Biscoitos. **Diário Oficial da União**, Brasil, 09 de agosto de 1999.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Gabinete do Ministro. Instrução normativa nº 8 de 02 de Junho de 2005. Regulamento técnico de identidade e qualidade da farinha de trigo. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 03 de Junho de 2005.

BRASIL. Federação das Indústrias do Estado de São Paulo. Instituto de Tecnologias de

Alimentos. **Brasil Food Trends 2020**. São Paulo, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. **TACO - Tabela brasileira de composição de alimentos**. Universidade Estadual de Campinas, Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação, Campinas: 4. ed., 2011.

BRASIL. ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 8, de 06 de março de 2013. Dispõe sobre a aprovação de uso de aditivos alimentares para produtos de frutas e de vegetais e geleia de mocotó. **Diário Oficial da União**, Brasil, 08 de março de 2013. Seção 1, p. 68.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Guia alimentar para a população brasileira**. 2. ed. Brasília, DF, 2014.

BRESCIA, P. J. Determination of antioxidant potential using an oxygen radical absorbance capacity (ORAC) assay with SynergyTM H4. **BioTek Instruments**, Winooski, p. 1-4, 2012.

CABRAL, I. S. R. et al. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. **Quim. Nov.**, São Paulo, v. 32, n. 6, p. 1523-1527, 2009.

CALVEL, R. **O Pão Francês e os Produtos Correlatos: Tecnologia e Prática da Panificação**. Fortaleza: J. Macedo, 1987.

CANELLA-RAWLS, S. **Pão: arte e ciência**. 2. ed. São Paulo: Senac, 2006.

CAPRILES, V. D. **Otimização de propriedades funcionais e sensoriais de produtos a base de amaranto enriquecidos com frutanos, para intervenção em celíacos**. 2009. Tese (Doutorado em Nutrição em Saúde Pública) – Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, 2009.

CAROCHO, M. et al. Adding molecules to food, pros and cons: a review on synthetic and natural food additives. **Comp. Rev. in Food Scien. and Food Saf.**, Portugal, v. 13, p. 377-399, 2014.

CARVALHO, P. R. Aditivos dos Alimentos. **Rev. Logos**, São José do Rio Pardo, n. 12, p. 57-69, 2005.

CARVALHO, J. X. et al. Extensão da vida de prateleira de ovos pela cobertura com própolis. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 34, n. 5, p. 2287-2296, 2013.

CATTELAN, M. G. et al. **Óleo essencial de orégano: efeito sobre a aceitabilidade sensorial**. 2015. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, 2015.

CECCHI, H. M. **Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos**. Campinas: Editora da Unicamp, 2003.

COAN, C. M.; MATIAS, T. A utilização das plantas medicinais pela comunidade indígena de Ventarra Alta- RS. **SaBios: Rev. Saúd. e Biol.**, Rio Grande do Sul, v.9, n.1, p.11-19, 2014.

COELHO, M. S. **Pão enriquecido com chia (*Salvia hispanica L.*):** desenvolvimento de um produto funcional. 2014. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande (RS), 2014.

COIMBRA, R.; SILVA, E. D. **Notas de fitoterapia:** catálogo dos dados principais sobre plantas utilizadas em medicina e farmácia. 2. ed. Rio de Janeiro: Laboratório Clínico Silva Araújo, 1958.

DEL RÉ, P. V.; JORGE, N. Especiarias como antioxidantes naturais: aplicações em alimentos e implicação na saúde. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v. 14, n. 2, p. 389-399, 2012.

ELANSARY, H. O. et al. Effective antioxidant, antimicrobial and anticancer activities of essential oils of horticultural aromatic crops in northern Egypt. **BMC Compl. and Altern. Med.**, Saudi Arabia, v. 18, n. 214, p. 1-10, 2018.

ERKMEN, O.; OZCAN, M. M. Antimicrobial Effects of Turkish Propolis, Pollen, and Laurel on Spoilage and Pathogenic Food-Related Microorganisms. **J. Med. Food**, Turkish, v. 11, n. 3, p. 587-92, 2008.

ERNANDES, F. M. P. G.; GARCIA-CRUZ, C. H. Atividade antimicrobiana de diversos óleos essenciais em microrganismos isolados do meio ambiente. **B.CEPPA**, Curitiba, v. 25, n. 2, p. 193-206, 2007.

FAI, A. E. C. et al. Potencial biotecnológico de quitosana em sistemas de conservação de alimentos. **Rev. Iberoam. de Polím.**, São Paulo, v. 9, n. 5. p. 435-451, 2008.

FAO. Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura. Avaliação dos riscos associados a substâncias químicas (JECFA). Itália, c2018. Disponível em: <<http://www.fao.org/food/food-safety-quality/scientific-advice/jecfa/es/>>. Acesso em: 17 fev. 2018.

FAVERO, D. M. et al. Sulfitos: importância na indústria alimentícia e seus possíveis malefícios à população. **Seg. Alim. e Nut.**, Campinas, v. 18, n. 1, p. 11-20, 2011.

FERREIRA, E. L. et al. Natural antioxidant from yerba maté (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) prevents hamburger peroxidation. **Braz. Arch. Biol. Technol.**, São Paulo, v. 54, n. 4, p. 803-809, 2011.

FERREIRA, F. S. Aditivos alimentares e suas reações adversas no consumo infantil. **Rev. da Univ. Val. do R. Ver.**, Três Corações, v. 13, n. 1, p. 397-407, 2015.

FIANCO, A. L. B. **Estudo sobre a atividade antifúngica e antioxidante de extratos de própolis obtidos com CO₂ supercrítico.** 2014. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Tecnologia de Materiais) - Faculdade de Engenharia, Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.

FIB. Food Ingredients Brasil. Panificação: os ingredientes enriquecedores. **Revista FI**, n. 10, p. 22-27, 2009.

FIB. Food Ingredients Brasil. Agentes antimicrobianos químicos e naturais. **Revista FI**, n. 15, p. 36-42, 2010.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança alimentar**. Porto Alegre: Artmed, 2002.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2008.

GAGLIANO, J. et al. Antioxidant potential and HPLC-DAD profile of phenolic compounds from leaves and culms of *Merostachys pluriflora*. **Sout. Afric. Journ. of Bot.**, São Paulo, v. 115, p. 24-30, 2018.

GANDRA, K. M. et al. Aplicação de lipase e monoglicerídeo em pão de forma enriquecido com fibras. **Cien. e Tecn. de Alim.**, Campinas, v. 28, n.1, p. 182-192, 2008.

GARCIA, R. W. D. Reflexos da globalização na cultura alimentar: considerações sobre as mudanças na alimentação urbana. **Rev. de Nut.**, Campinas, v. 16, n. 4, p. 483-492, 2003.

GAVA, A. J. **Princípios de tecnologia de alimentos**. 5.ed. São Paulo: Livraria Nobel, 1983.

GOMES, M. F.F. et al. Atividade antibacteriana *in vitro* da própolis marrom. **Pesq. Vet. Bras.** Campo Grande, v. 36, n. 4, p. 279-282, 2016.

GRAÇA, C. S. et al. Adição de colágeno em pão sem glúten elaborado com farinha de arroz. **Braz. Jour. of Food Tech.**, Campinas, v. 20, p. 1-10, 2017.

GRANDIS, R. A. et al. Avaliação da atividade antibacteriana do gengibre (*Zingiber officinale Roscoe*) e do maracujá amarelo (*Passiflora edulis Sims*). **Rev. de ciên. Farm. Bás. e Aplic.**, São Paulo, v. 36, n. 1, p. 77-82, 2015.

GUARDA, A. et al. Different hydrocolloids as bread improvers and antistaling agents. **Food Hydroc.**, Chile, v. 18, p. 241-247, 2004.

GUTIÉRREZ, L. et al. Effect of Mixed Antimicrobial Agents and Flavors in Active Packaging Films. **J. Agric. Food Chem.**, Spain, v. 57, n. 18, p. 8564–8571, 2009.

HINTZ, T. et al. The use of plant antimicrobial compounds for food preservation. **Biom. Resear. Intern.**, USA, 2015.

HONORATO, T. C. et al. Aditivos alimentares: aplicações e toxicologia. **Rev. Ver.**, Mossoró, v. 8, n. 5, p. 01 - 11, 2013.

HUNTERLAB. CIE L*a*b* color scale. **Applications Note**, v. 8, n. 7, p. 1-4, 1996.

HUSAIN, A. et al. Estimates of dietary exposure of children to artificial food colours in Kuwait. **Food Add. Cont.**, Kuwait, v. 23, n. 3, p. 245-51, 2006.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009**. Análise do consumo alimentar pessoal no Brasil. Rio de Janeiro, 2011.

INMET. Instituto Nacional de Meteorologia. Estações e Dados: Estações automáticas - Gráficos. Brasil, c2018. Disponível em:

<http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=home/page&page=rede_estacoes_auto_graf>. Acesso em: 05 ago. 2018.

JAY, J. M. **Microbiologia de alimentos**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

KHANUM, H. et al. Synergistic Antioxidant Action of Oregano, Ajowan and Borage Extracts. **Food and Nut. Sci.**, India, v. 2, p. 387-392, 2011.

KIM, C-T. et al. Effect of propolis addition on the shelf-life and staling of white bread. **Korean J. Food Sci. Tech.**, Korean, v. 29, n. 5, p. 982-986, 1997.

KONICA MINOLTA SENSING AMERICAS. Entendendo o espaço de cor L*a*b*, c2018. Disponível em <<http://sensing.konicaminolta.com.br/2013/11/entendendo-o-espaco-de-cor-lab/>>. Acesso em: 14 abr. 2018.

KOWALSKI, S.; MAKAREWICZ, M. Functional properties of honey supplemented with bee bread and própolis. **Nat. Prod. Res.**, Poland, v. 31, n. 22, p. 2680–2683, 2017.

KUNRATH, C. A. et al. Application and evaluation of propolis, the natural antioxidant in Italian-type salami. **Braz. Jour. of Food. Tech.** Campinas, v. 20, p. 1-10, 2017.

LEÓN, A. E. et al. Utilization of enzyme mixtures to retard bread crumb firming. **Journ. of Agric. and Food Chem.**, Spain, v. 50, n. 6, p. 1416-1419, 2002.

LONGHINI, R. et al. Obtenção de extratos de própolis sob diferentes condições e avaliação de sua atividade antifúngica. **Rev. Bras. de Farmacog.**, Paraná, v. 17, n. 3, p. 388-395, 2007.

MARTINS, A. P. B. et al. Participação crescente de produtos ultra processados na dieta brasileira (1987-2009). **Rev. Saúd. Púb.**, São Paulo, v. 47, n. 4, p. 656-65, 2013.

MESQUITA, M. K. et al. Plantas calmantes utilizadas entre famílias quilombolas. **Ciênc. Cuid. Saúd.**, Pelotas, v. 7, 2008.

MINIM, V. P. R. **Análise sensorial: estudos com consumidores**. 2. ed. Viçosa: UFV, 2012.

MITCHELL, T. C. C. C. **Efetividade do óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare*) na inibição do crescimento de espécies *Aspergillus* potencialmente tóxicas**. 2008. Dissertação (Mestrado em Nutrição) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 2008.

MONTES, S. S. et al. Óleos essenciais em embalagens para alimentos: revisão de literatura de 2000 a 2012. **Persp. da Ciên. e Tecn.**, Salvador (BA), v. 5, n. 1/2, p. 1-11, 2013.

MORAIS, S. M. et al. Ação antioxidante de chás e condimentos de grande consumo no Brasil. **Rev. Bras. de Farmacog.**, Fortaleza, v. 19, n. 1B, p. 315-320, 2009.

MOREIRA, A. V. B.; MANCINI-FILHO, J. Influência dos compostos fenólicos de

especiarias sobre a lipoperoxidação e o perfil lipídico de tecidos de ratos. **Rev. Nutr.**, Campinas, v. 17, n. 4, p. 411-424, 2004.

MOURA, N. C. et al. Caracterização física e sensorial de pães de forma com adição de grãos de linhaça (*Linum usitatissimum*). **Bioen. em Rev.: Diálogos**, São Paulo, v. 5, n. 1, p. 08-28, 2015.

NAIDU, J. R. et al. Chemical Profiling and Antioxidant Activity of Thai Basil (*Ocimum basilicum*). **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, Malaysia, v. 19, 2016.

NANDITHA, B; PRABHASANKAR, P. Antioxidants in bakery products: a review. **Crit. Ver. Food. Sci. Nutr.**, v. 49, n. 1, p. 1-27, 2009.

NASCIMENTO, J. M. L. et al. Ação antimicrobiana de óleo essencial frente a cepas bacterianas contaminantes de alimentos. **Act. Veter. Bras.**, Bahia, v. 8, n. 3, p. 221-225, 2014.

NCCLS. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Eighth Edition. **NCCLS document M2-A8** (ISBN 1-56238-485-6). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.

NIELSEN, P. V.; RIOS, R. Inhibition of fungal growth on bread by volatile components from spices and herbs, and the possible application in active packaging, with special emphasis on mustard essential oil. **Int J Food Microb.**, v. 60, n. 2-3, p. 219-29, 2000.

ORDÓÑEZ, J. A. (Org.). **Tecnologia de Alimentos: Alimentos de Origem Animal**. Porto Alegre: Artmed, 2005.

ORNELLAS, L. H. **Técnica dietética: seleção e preparo dos alimentos**. 8. ed. São Paulo: Atheneu, 2006.

OTONI, C. G. et al. Edible Films from Methylcellulose and Nanoemulsions of Clove Bud (*Syzygium aromaticum*) and Oregano (*Origanum vulgare*) Essential Oils as Shelf Life Extenders for Sliced Bread. **J. Agric. Food Chem.**, Brazil, v. 62, n. 22, p. 5214–5219, 2014.

ÖZCAN, M.; CHALCHAT, J. Essential Oil Composition of *Ocimum basilicum* L. and *Ocimum minimum* L. in Turkey. **Czech J. Food Sci.** Turkey, v. 20, n. 6, p. 223-228, 2002.

PEREIRA, A. S. et al. Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. **Quim. Nov.**, Rio de Janeiro, v. 25, n. 2, p. 321-326, 2002.

PEREIRA, F. G. et al. Antifungal activities of the essential oil and its fractions rich in sesquiterpenes from leaves of *Casearia sylvestris* Sw. **An. Acad. Bras. Cienc.**, Rio de Janeiro, v. 89, n 4, p. 2817-2824, 2017.

PESSANHA, M. D. F. **Propriedades reológicas da massa de pão francês adicionada de fibra alimentar e características sensoriais do produto após assamento**. 2016. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

- PIMENTEL, T. C.; SIMÕES, G. S. Percepção dos consumidores em relação às fibras alimentares e seus produtos. **Rev. Bras. de Pesq. em Alim.**, Campo Mourão, v. 3, n. 1, p. 11-18, 2012.
- PINHO, L. et al. Atividade antimicrobiana de extratos hidro alcoólicos das folhas de alecrim-pimenta, aroeira, barbatimão, erva baleeira e do farelo da casca de pequi. **Ciênc. Rur.**, Minas Gerais, v. 42, n.2, p. 326-331, 2012.
- PINTO, J. E. B. P. et al. **Compêndio de plantas medicinais**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2000.
- POLÔNIO, M. L. T.; PERES, F. Consumo de aditivos alimentares e efeitos à saúde: desafios para a saúde pública brasileira. **Cad. Saúd. Púb.**, Rio de Janeiro, v. 25, n. 8, p. 1653-1666, 2009.
- PRATAMI, D. K. et al. Phytochemical profile and antioxidant activity of propolis ethanolic extract from *Tetragonula bee*. **Pharm. J.**, Indonesia, v. 10, n. 1, p. 128-135, 2018.
- PROBST, I. S. et al. Antimicrobial activity of propolis and essential oils and synergism between these natural products. **The Jour. of Ven. Ani. and Tox. Incl. Trop. Dise.**, São Paulo, v. 17, n. 2, p. 159-167, 2011.
- RIBEIRO-SANTOS, R. et al. Óleos essenciais: atividade biológica *in vitro* e sua potencial aplicação a embalagens alimentares. **Inst. Nac. de Saúd.**, Portugal, n. 7, p. 29-33, 2016.
- RIBOTTA, P. D.; TADINI, C. C. **Alternativas tecnológicas para la elaboración y conservación de productos panificados**. Córdoba: Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Universidad Nacional de Córdoba, 2009.
- RODRIGUES, R. S.; SILVA, R. R. A história sob o olhar da química: as especiarias e sua importância na alimentação humana. **Quím. Nov. na Esc.**, Brasília, v. 32, n. 2, p. 84-89, 2010.
- ROSADO, L. D. S. et al. Influência do processamento da folha e tipo de secagem no teor e composição química do óleo essencial de manjerição cv. Maria Bonita. **Ciênc. Agrotec.**, Lavras, v. 35, n. 2, p. 291-296, 2011.
- RUFINO, M. S. M. et al. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre DPPH. **Comunicado técnico 127**, Ceará, 2007.
- SAKKAS, H.; PAPADOPOULOU, C. Antimicrobial Activity of Basil, Oregano, and Thyme Essential Oils. **J. Micr. Biot.**, Greece, v. 27, n. 3, p. 429-438, 2017.
- SALATINO, A. et al. Propolis research and the chemistry of plant products. **Nat. Prod. Rep.**, São Paulo, v. 28, p. 925-936, 2011.
- SANTOS, J. L. P. **Modelagem preditiva da deterioração de pães integrais multigrãos por fungos filamentosos**. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2015.

SANTOS, K. P. et al. Antioxidant activity of flavonoids from *Croton sphaerogynus* Baill. **Braz. J. Bot.**, São Paulo, v. 39, n. 4, p. 1021-1030, 2016.

SANTOS, C. M. et al. Preparação, caracterização e análise sensorial de pão integral enriquecido com farinha de subprodutos do mamão. **Braz. J. Food Technol.**, Campinas, v. 21, 2018.

SANTOS, K. P. et al. Biological activity of *Hyptis Jacq. (Lamiaceae)* is determined by the environment. **Indust. Crops & Prod.**, São Paulo, v. 112, p. 705-715, 2018.

SANTURIO, J. M. et al. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de orégano, tomilho e canela frente a sorovares de *Salmonella* entérica de origem avícola. **Ciênc. Rur.**, Santa Maria, v. 37, n. 3, p. 803-808, 2007.

SANTURIO, D. F. et al. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de condimentos frente a amostras de *Escherichia coli* isoladas de aves e bovinos. **Ciênc. Rur.**, Santa Maria, v. 41, p.1051-1056, 2011.

SARTORATTO, A. et al. Rehder Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Braz. Journ. of Microb.**, Campinas, v. 35, p. 275-280, 2004.

SCHUMANN, S. P. A. et al. Avaliação do consumo de corantes artificiais por lactentes, pré-escolares e escolares. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 28, n. 3, p. 534-539, 2008.

SEDANO-PARTIDA, M. D. et al. Anti-HIV-1 and antibacterial potential of *Hyptis radicans* (Pohl) Harley & J.F.B. Pastore and *Hyptis multibracteata* Benth. (*Lamiaceae*). **Jour. of Herb. Med.**, 2018. No prelo.

SEHN, G. A. R.; STEEL, C. J. Técnica classifica farinhas para pão integral de forma. **Jorn. da Unicamp.**, Campinas, 14 a 20 de março de 2016. p. 9.

SILVA, B. B. et al. Chemical Composition and Botanical Origin of Red Propolis, a New Type of Brazilian Propolis. **eCAM**, São Paulo, v. 5, n. 3, p. 313–316, 2008.

SILVA, C. P. **Efeito da adição de farinha de Jatobá-do-cerrado (*Hymenaea stigonocarpa* Mart.) na resposta glicêmica de pães.** 2013. Dissertação (Mestrado Nutrição em Saúde Pública) - Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

SILVA, M. N. et al. Elaboração e aceitação sensorial de pão francês aditivado com farinhas de linhaça e da casca do maracujá. **Cad. Ver. de Agr. e Des. Sust.**, Paraíba, v. 4, n. 1, 2014.

SILVA, R. et al. Indicadores como ferramentas para análise de aditivos em alimentos industrializados. **Rev. GEINTEC**, São Cristóvão, v. 5, n. 4, p. 2664-2677, 2015.

SILVA, V. A. **Atividades antimicrobiana, citotóxica e genotóxica do óleo essencial de *Ocimum basilicum* (Lamiaceae) e do linalol.** 2015. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) - Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2015.

SILVA, R. P. D. et al. Aplicação de extrato de própolis em produtos alimentícios: uma prospecção baseada em documentos de patentes. **Rev. Virt. Quim.**, Salvador, 2016.

SOUSA, C. M. M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Quim. Nov.**, Piauí, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

SOUZA-BORGES, P. K.; CONTI-SILVA, A. C. Sensory profile and evaluation of the degree of acceptability of bread produced with inulin and oligofructose. **Braz. J. Food Technol.**, Campinas, v. 21, 2018.

STOLL, L. et al. Fibra de casca de laranja como substituto de gordura em pão de forma. **Ciênc. Rur.**, Santa Maria, v.45, n.3, p.567-573, 2015.

SOKOVIĆ, M. et al. Antibacterial Effects of the Essential Oils of Commonly Consumed Medicinal Herbs Using an In Vitro Model. **Molec.**, Serbia, v. 15, p. 7532-7546, 2010.

SUHR, K. L.; NIELSEN, P. V. Antifungal activity of essential oils evaluated by two different application techniques against rye bread spoilage fungi. **J Appl Microb.**, v. 94, n. 4, p. 665-74, 2003.

TEIXEIRA, E. et al. **Análise sensorial de alimentos**. Florianópolis: UFSC, 1987.

TEXEIRA, L. V. Análise sensorial na indústria de alimentos. **Rev. Inst. Latic.** Minas Gerais, v. 64, n. 366, p.12-21, 2009.

TRAJANO, V. N. et al. Propriedade antibacteriana de óleos essenciais de especiarias sobre bactérias contaminantes de alimentos. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 29, n. 3, p. 542-545, 2009.

VARGAS, A. C. et al. Atividade antimicrobiana “in vitro” de extrato alcóolico de própolis. **Ciênc. Rur.**, Santa Maria, v. 34, n. 1, p. 159-163, 2004.

VIN, K. et al. Estimation of the dietary intake of 13 priority additives in France, Italy, the UK and Ireland as part of the FACET Project. **Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess**, France, v. 30, n. 12, p. 2050-80, 2013.

WANG, S. et al. Starch Retrogradation: A Comprehensive Review. **Comp. Ver. in Food Sci. and Food Saf.**, China, v.14, 2015.

ANEXOS

Anexo 1 - Frasco do Extrato de Própolis

Anexo 2 - Laudo do Extrato de Própolis

APIS NATIVA PRODUTOS NATURAIS LTDA. Rua Irineu Bornhausen, 315 - Centro Araranguá -SC -CEP 88900-000 Fone (48) 3521-0753 fax (48) 3521-0725 www.prodapys.com.br
---	--

LAUDO DE ANÁLISE - EXTRATO DE PRÓPOLIS			LOTE	205
Produto	Extrato Concentrado de própolis 15%	Fabricação	11/16	
Código	20	Validade	11/18	
Acondicionamento	Frasco vidro ambar 30mL	Classificação	Marrom	

Análise Sensorial

Teste	Especificação	Método	Resultado
Sabor	característico, de suave a forte, amargo e picante	PPLA 001	característico
Aroma	Característico, (balsâmico e resinoso) dependendo da origem botânica;	PPLA 002	característico
Cor	variada, conforme origem e concentração (tons de âmbar, avermelhada e esverdeada);	PPLA 003	âmbar escuro
Aspecto	Líquido límpido e homogêneo	PPLA 004	Líquido límpido homogêneo
Crítérios Macroscópicos e Microscópicos	Ausência de impurezas	PPLA 005	Conforme especificação

Análise Físico-Química Quantitativa e Qualitativa

Teste	Especificação	Método	Resultado
Extrato Seco	mínimo 11% (m/v)	PPLA 025	15,50
Teor Alcoólico	máximo 70° GL(v/v)	PPLA 008	70,00
Atividade de Oxidação	máximo 22 segundos	PPLA 013	9,06
Acetato de Chumbo (Flavonóides)	Positivo	PPLA 015	positivo
Hidróxido de Sódio (Flavonóides)	Positivo	PPLA 016	positivo

Observações:

DECLARAMOS QUE O REFERIDO MATERIAL FOI INSPECIONADO CONFORME INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 3, DE 19/01/2001.

RESULTADO

Aprovado

☒

Reprovado

☐

Laudo Emitido Eletronicamente

Cyntia Santos da Silva

Data

21/11/2016

Anexo 3 - Frascos dos Óleos Essenciais

Anexo 4, A - Laudo Técnico do Óleo Essencial de Manjeriço

SUN FOODS IND. DE PRODS. ALIM. Al. Rio Negro, 585. 1�andar sala 105 Alphaville, Barueri, São Paulo, Brasil Fone/Fax: +55 11 4689-8949 / 4195-8451 sunfoods@sunfoods.com.br www.sunfoods.com.br		SUN FOODS	
LAUDO TÉCNICO			
Produto: Manjeriço O.E	Código:	AMOSTRA - sem valor comercial	
Data de Fabricação: 02/06/17	Prazo de validade: 12 meses		
Condições de transporte:			
Transportar em temperatura ambiente, em veículo fechado e seco.			
Condições de armazenamento:			
Armazenar em local coberto, seco e ventilado. Evitar exposição à luz solar. Manter embalagem original, sempre bem fechada.			
Características da embalagem do Produto para venda:			
Balde plástico de 20 kg lacrada.			
Características Organolépticas:			
Aparência: Líquido			
Cor: Amarelo			
Odor: Característico			
Sabor: Característico			
Análise Físico-química:			
	Mínimo	Máximo	Resultado
Densidade	0,93	0,983	0,955
�ndice de Refracção	1,501	1,521	1,513
Dosagem: q.s.p			
Analista:	Controle de Qualidade:	Visto:	
Data 02/06/17	Data 02/06/17	Data / /

Anexo 4, B - Laudo Técnico do Óleo Essencial de Orégano

DEPTO ADMINISTRACAO DA QUALIDADE

LAUDO DE ANALISE

Produto.....: OE Oregano

Lote Numero.....: 105504

Pedido Int.....:

Validade : 24 Meses

Pedido Cliente.....:

Fabricação: 06/2015

Quantidade.....: 1,000 KG

ANALISES	ESPECIFICACOES	RESULTADOS
Controle Olfativo	Conforme Padrão	Conforme
Aspecto	Liquido	Conforme
Sabor	Conforme Padrão	Conforme
Cor	Incolor a Lev. Amarelado	Conforme
Refracção (20°C)	1,500 – 1,522	1,508
Densidade (g/cm³)	0,918 – 0,966	0,931
Pureza	50 (min carvacrol)	Conforme

Observação:

Data : 05/11/2015

Hora : 10:03:04

Telefone fax : (11) 4689-0268

Celular : (11) 9712-4634

Documento emitido por computador, não é assinado

Comercial Florêncio Químicos e aromas

Rua Martin Hein, 226 – Jardim Alvorada – Jandira – SP 06612-240 Brasil

Fone Fax (11) 4689 – 0268 – Celular -9712-4634 – edsonflorencio@terra.com.br

Anexo 4, C - Laudo Técnico do Óleo Essencial de Tomilho

OK

CFQA
Comercial Florêncio
Químicos e Aromas

DEPTO ADMINISTRACAO DA QUALIDADE

LAUDO DE ANALISE

Produto.....: Tomilho Branco Oleo

Lote Numero.....: 147538

Pedido Int.....: Validade : 24 Meses

Pedido Cliente.....: Fabricação: 08/2016

Quantidade.....: 5,000 Kg

ANALISES	ESPECIFICACOES	RESULTADOS
Cor	Amarelado	Conforme
Controle Olfativo	Conforme Padrão	Conforme
Aspecto	Líquido	Conforme
Sabor	Conforme Padrão	Conforme
Índice Refração (20°C)	1,470 – 1,505	1,500
Densidade Relativa (g/cm3)	0,910 – 0,939	0,927

Observação:

Data : 19/06/2017
Hora : 16:03:04

Telefone fax : (11) 4689-0268
Celular : (11) 9712-4634

Documento emitido por computador, não é assinado

Comercial Florêncio Químicos e aromas
Av. Marginal Esquerda do Tiete, 111 – Aldeinha – Barueri – SP 06440-175 Brasil
Fone Fax (11) 4689 – 0268 – Celular -9712-4634 – edsonflorencio@terra.com.br

Anexo 5 - Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa

USP - FACULDADE DE SAÚDE
PÚBLICA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO - FSP/USP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Atuação de plantas com efeito antimicrobiano sobre a conservação de pães do tipo integral: alternativa ao uso de aditivos sintéticos.

Pesquisador: EMILY BEZERRA FERNANDES DA MOTA

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 80279817.0.0000.5421

Instituição Proponente: Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo - FSP/USP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.622.625

Apresentação do Projeto:

Métodos – Será elaborado um único extrato alcoólico, com base na Farmacopeia Homeopática Brasileira, em três concentrações diferentes a partir de quatro plantas secas que possuem atividade antimicrobiana: Zingiber officinale (gingibre), Oreganum vulgare (orégano), Rosmariuns officinalis (alecrim) e Thymus vulgaris (tomilho). Será elaborado o pão integral, com a técnica da massa direta, onde o extrato será borrifado, e posteriormente embalado em condições semelhantes aos comercializados. Serão avaliados sensorialmente pelo teste de aceitabilidade, através da escala hedônica de sete pontos. A vida de prateleira será avaliada pela alteração de cor (colorímetro), tempo de validade dos pães por meio de ensaios de detecção e contagem microbiológica para bactérias e plaqueamento em meio de extrato de malte 2% para identificação de fungos. Participarão indivíduos consumidores de pães que assinarem o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Endereço: Av. Doutor Arnaldo, 715

Bairro: Cerqueira Cesar

CEP: 01.246-904

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3061-7779

Fax: (11)3061-7779

E-mail: coep@fsp.usp.br

USP - FACULDADE DE SAÚDE
PÚBLICA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO - FSP/USP

Continuação do Parecer: 2.622.625

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar a ação de extratos de plantas com efeito antimicrobiano sobre a conservação de pães integrais, visando propor um substituto para aditivos químicos conservantes.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos mínimos considerando-se que os extratos a serem utilizados nos pães para análise sensorial serão extraídos de alimentos naturais de consumo habitual e seguro.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Apresentação clara dos propósitos e metodologia.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

TCLE adequado, com descrição de riscos mínimos.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_954973.pdf	12/04/2018 22:46:09		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	12/04/2018 22:45:40	EMILY BEZERRA FERNANDES DA MOTA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.docx	17/10/2017 23:18:30	EMILY BEZERRA FERNANDES DA MOTA	Aceito
Folha de Rosto	FolhaDeRosto.pdf	16/10/2017 21:01:21	EMILY BEZERRA FERNANDES DA MOTA	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Endereço: Av. Doutor Arnaldo, 715
Bairro: Cerqueira Cesar CEP: 01.246-904
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)3061-7779 Fax: (11)3061-7779 E-mail: coep@fsp.usp.br

USP - FACULDADE DE SAÚDE
PÚBLICA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO - FSP/USP

Continuação do Parecer: 2.622.625

Não

SAO PAULO, 26 de Abril de 2018

Assinado por:
Maria Regina Alves Cardoso
(Coordenador)

Endereço: Av. Doutor Arnaldo, 715

Bairro: Cerqueira Cesar

CEP: 01.246-904

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3061-7779

Fax: (11)3061-7779

E-mail: coep@fsp.usp.br

Anexo 6 - Questionário para Caracterização do Painel Sensorial**SEJA BEM VINDO À ANÁLISE SENSORIAL DE PÃES INTEGRAIS!**

Por favor, preencha os dados abaixo:

Idade (anos) _____

Sexo: () Masculino () Feminino

Com qual frequência você consome pão?

() Não consumo

() De 1 a 2 vezes no mês

() 1 vez na semana

() De 2 a 4 vezes na semana

() De 5 a 6 vezes na semana

() Todos os dias

Anexo 7 - Escala Hedônica de 7 Pontos

Avalie e indique o quanto você gostou ou desgostou da amostra, utilizando a escala abaixo; caso prefira, prove-as com a margarina disponibilizada

- 7- Gostei muito
- 6- Gostei moderadamente
- 5- Gostei ligeiramente
- 4- Nem gostei/Nem Desgostei
- 3- Desgostei ligeiramente
- 2- Desgostei moderadamente
- 1- Desgostei muito

COR
748

	7
	6
	5
	4
	3
	2
	1

TEXTURA
748

	7
	6
	5
	4
	3
	2
	1

UMIDADE
748

	7
	6
	5
	4
	3
	2
	1

IMPRESSÃO GLOBAL
748

	7
	6
	5
	4
	3
	2
	1

Anexo 8 - Escala Intenção de Compra

	Avalie a sua intenção de compra do produto, caso estivesse disponível no mercado				
	1	2	3	4	5
5- Certamente compraria	☐	☐	☐	☐	☐
4- Provavelmente compraria					
3- Tenho dúvida se compraria					
2- Provavelmente não compraria					
1- Certamente não compraria					

CURRÍCULO LATTES – AUTORA

Êmily Bezerra Fernandes

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/3911995424376009>
Última atualização do currículo em 31/07/2018

Possui graduação em Nutrição pela Universidade Federal do Rio Grande do Norte (2013); especialização em Fitoterapia Funcional pela VP Consultoria Nutricional (2015) e atualmente cursa mestrado em Nutrição em Saúde Pública pela Universidade de São Paulo, com previsão de conclusão em Setembro de 2018. **(Texto informado pelo autor)**

Identificação

Nome Social	Êmily Bezerra Fernandes
Nome em citações bibliográficas	FERNANDES, Ê. B.

Formação acadêmica/titulação

2016	Mestrado em andamento em Nutrição em Saúde Pública. Universidade de São Paulo, USP, Brasil. Orientador: Maria Elizabeth Machado Pinto e Silva.
2013 - 2015	Especialização em Fitoterapia Funcional. (Carga Horária: 370h). VP Consultoria Nutricional, VP, Brasil. Título: ESTUDO DE CASO CLÍNICO: APLICANDO A FITOTERAPIA NA ARTRITE REUMATOIDE. Orientador: Natalia Marques.
2008 - 2013	Graduação em Nutrição. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, UFRN, Brasil.
2002 - 2006	Ensino Médio (2º grau). Colégio Nossa Senhora das Neves, CNSN, Brasil.

Formação Complementar

2013 - 2013	Curso a Distância Nutrição e Envelhecimento. (Carga horária: 15h). Universidade Estadual do Rio de Janeiro, UERJ, Brasil.
--------------------	--

Atuação Profissional

Universidade Federal do Rio Grande do Norte, UFRN, Brasil.

Vínculo institucional

2014 - 2015	Vínculo: Servidor Público, Enquadramento Funcional: Professora temporária, Carga horária: 40
Outras informações	No semestre 2014.2 ministrei nas seguintes disciplinas: Análise sensorial de alimentos; Bioquímica dos alimentos; Tecnologia dos alimentos; Toxicologia de alimentos; Nutrição e Dietética II; e Processos de trabalho em nutrição. No semestre 2015.1 ministrei nas seguintes disciplinas: Análise sensorial de alimentos; Bioquímica dos alimentos; Fundamentos de Nutrição Humana; Microbiologia de Alimentos; e Tecnologia dos alimentos.
Vínculo institucional	
2014 - 2014	Vínculo: Supervisora de campo, Enquadramento Funcional: Supervisora de campo de estágio curricular, Carga horária: 20
Outras informações	Estágio supervisionado em administração de serviços de alimentação

CURRÍCULO LATTES – ORIENTADORA

Maria Elisabeth Machado Pinto e Silva

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/8554723044448622>
Última atualização do currículo em 02/08/2018

Possui graduação em Nutrição pela Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo (1975), mestre em Ciência dos Alimentos pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (1989), doutor em Saúde Pública pela Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo (1995) e livre docente pela Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo (2016). Atualmente é docente da Universidade de São Paulo. Tem experiência na área de Nutrição, com ênfase em Alimentos, atuando principalmente nos seguintes temas: análise sensorial, experimento com alimentos, desenvolvimento de produtos, comportamento alimentar, técnica dietética e dietoterapia. **(Texto informado pelo autor)**

Identificação

Nome Social	Maria Elisabeth Machado Pinto e Silva
Nome em citações bibliográficas	PINTO-e-SILVA, M. E. M.; SILVA, M.E.M.P.; MACHADO, M.E.O.; PINTO E SILVA. MEM; SILVA, M. E. M. P.; PINTO-E-SILVA, MARIA ELISABETH MACHADO; PINTO E SILVA, MARIA ELISABETH MACHADO

Endereço

Endereço Profissional	Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública, Departamento de Nutrição. Avenida Doutor Arnaldo, 715 Cerqueira César 01246-904 - São Paulo, SP - Brasil Telefone: (11) 30617861 Fax: (11) 30626748 URL da Homepage: http://
------------------------------	---

Formação acadêmica/titulação

1990 - 1995	Doutorado em Saúde Pública. Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, FSP/USP, Brasil. Título: Hidrolisado de carne como recurso dietético, Ano de obtenção: 1996. Orientador: Rosa Nilda Mazzilli. Palavras-chave: hidrolisado proteico; hidrolisado de carnes; dietoterapia. Grande área: Ciências da Saúde Setores de atividade: Nutrição e Alimentação.
1982 - 1989	Mestrado em Ciência dos Alimentos. Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, FCF/USP, Brasil. Título: Teor de vitamina C em alimentos de consumo habitual na região de São Paulo, Ano de Obtenção: 1990. Orientador: Marilene del Vuono Camargo Penteado. Palavras-chave: ácido ascórbico; alimentos preparados; alimentos de consumo habitual. Grande área: Ciências da Saúde Setores de atividade: Nutrição e Alimentação.
1982 - 1982	Especialização em Dietoterapia. Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, FSP/USP, Brasil. Título: Protocolo de atendimento nutricional para pacientes de um ambulatório de Pneumologia.
1978 - 1978	Especialização em IV Proahsa. Fundação Getúlio Vargas e Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, FGV/HCFMUSP, Brasil. Título: A Unidade de Alimentação e sua organização.
2008 - 2008	Aperfeiçoamento em Pedagogia Universitária. (Carga Horária: 180h). Universidade de São Paulo, USP, Brasil. Título: O Curso de Nutrição. Ano de finalização: 2008.
1972 - 1975	Graduação em Nutrição. Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, FSP/USP, Brasil.
1996 - 1996	Curso técnico/profissionalizante em Análise Sensorial de Alimentos. Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia André de Tosello, FUND.TROP.PESQ.T,