

**EMBALAGENS ATIVAS COM ERVAS
AROMÁTICAS E CONDIMENTARES NA
CONSERVAÇÃO DE PÃES ARTESANAIS**

RITA DE CÁSSIA ZANÚNCIO ARAUJO

2005

RITA DE CÁSSIA ZANÚNCIO ARAUJO

**EMBALAGENS ATIVAS COM ERVAS AROMÁTICAS E
CONDIMENTARES NA CONSERVAÇÃO DE PÃES ARTESANAIS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, para a obtenção do título de “Mestre”.

Orientadora

Profa. Dra. Sára Maria Chalfoun de Souza

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2005

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Araujo, Rita de Cássia Zanúncio,

Embalagens ativas com ervas aromáticas e condimentares na conservação de
pães artesanais. / Rita de Cássia Zanúncio Araujo. -- Lavras : UFLA, 2005.

88 p. : il.

Orientadora: Sára Maria Chalfoun de Souza.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Pão artesanal. 2. Extrato alcóolico. 3. Alho. 4. Orégano. 5. Gengibre. 6.
Cravo. 7. Tomilho. 8. Canela. 9. Ervas aromáticas. 10. Condimentos. 11. Inibição
de fungos. 12. Embalagens ativas I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-664.7523

RITA DE CÁSSIA ZANÚNCIO ARAUJO

**EMBALAGENS ATIVAS COM ERVAS AROMÁTICAS E
CONDIMENTARES NA CONSERVAÇÃO DE PÃES ARTESANAIS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, para a obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 29 de novembro de 2005.

Profa. Dra. ^a Joelma Pereira

UFLA

Prof. Dr. José Eduardo Brasil Pereira Pinto

UFLA

Profa. Dra. Sára Maria Chalfoun de Souza
EPAMIG
(Orientadora)

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2005

DEDICATÓRIA

Ao meu marido João. Com você consegui vencer essa etapa. Essa vitória também é sua!

Às minhas queridas filhas, Ayana, Maria, Giovana, Daniela e Júlia

Aos meus amados pais Daniel (in memoriam) e Dirce

Aos meus irmãos José Venâncio, Paulo, Izabel, Silvana, Ana Luzia, Agostinho e Brígida (minha afilhada).

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida!!!

Quando “olho para trás” vejo quanta gente que contribuiu com seu saber, boa vontade, pensamento positivo, orações e acima de tudo, amizade. Valeu!!!

Não foi fácil conciliar o estudo com a vida familiar, a vida profissional, a perda de entes queridos, ou seja “a vida como ela é!”.

Ao Incaper pela liberação para a realização do mestrado. Às colegas do Departamento de Recursos Humanos pelo apoio.

Ao Aymbiré que soube compreender a necessidade dessa formação e apoiar minha luta. Ao Sr. Paulo Galvão pelo apoio.

Ao DCA/UFLA pela oportunidade de realizar o curso de mestrado. Aos professores e funcionários pelos ensinamentos, apoio e amizade.

À minha orientadora Sára que soube acolher uma extensionista ávida por novos conhecimentos. Agradeço seu apoio, ensinamentos, compreensão e amizade.

Joelma minha queridíssima amiga e professora, Maria Luísa e D. Glória (in memoriam) que me abriram as portas de sua casa no momento que mais precisei.

Obrigada de coração por tudo, jamais esquecerei!!!

Prof. José Eduardo e Prof^{ra} Susan pelas sugestões e contribuições em momentos decisivos.

Ao meu companheiro João pela dedicação, incentivo, compreensão, paciência, amor e parceria em todos os momentos vividos.

Aos compadres Márcia e Edu pelo incentivo e apoio. A todos dos CIERs.

À Gláucia e D. Carmem pela troca de idéias, abrindo sempre meus horizontes...

A todos da EPAMIG pelo acolhimento, pois realmente “me senti em casa”. Aos pesquisadores, funcionários e estagiários pela convivência saudável. Essa equipe vai ficar na saudade, assim como as festinhas de aniversário na hora do lanche...

À Carol parceira de ‘favoro’, dedicada e amiga... Vicenti na, Marcelo, Luís Roberto pela ajuda nas análises, identificação dos fungos ...

Aos produtores/as de Venda Nova do Imigrante: Tia Cila e Lúcia, D. Iria (in memoriam), D. Enedina, Adriana, Elza e Alcidenes por me apoiarem.

À Pastoral da Saúde de VNI por me possibilitar a montagem de experimento naquele espaço tão organizado e acolhedor.

Ao AGROTUR por ceder o espaço para realização da análise sensorial e a todos que contribuíram nessa etapa tão decisiva do trabalho.

Ao Sr Valerino pelo zelo e empenho dedicados às análises. Ao Élcio pelo apoio.

À Dirlei, Ana Lúcia e Woelpher pelos conhecimentos de informática, pela dedicação, amizade e energia positiva.

Aos colegas do Incaper: de Castelo, Venda Nova do Imigrante, Regional Centro Serrano e Fazenda Experimental de VNI pelo incentivo, apoio e amizade.

Ao colega José Mauro Balbino pelo aconselhamento e apoio.

À Rejeana amiga de fé, valeu por tudo que enfrentamos juntas. Ao Barbosa sempre dando forças com seu bom humor e dedicação.

Aos queridos amigos e amigas pela convivência, amizade e incentivo: Jaqueline e D. Joana, Washington e Cristina, Kellen e Ari, Ellem e Contado, Janielly, Vânia e Vivi, Cícero, Kelly, Sueli, Celeide, Ana Karla...

Ao Flávio Dessaune, João, Prof. Augusto, Maria Amélia, Alessandra e Fábria pela orientação e ajuda nas análises estatísticas.

A todo pessoal do Laboratório de Grãos e Cereais DCA/UFLA pela contribuição, torcida e amizade.

Rosana que bom te encontrar depois de tantos anos...

À todos da comunidade de Venda Nova do Imigrante pelo carinho e a todos aqueles não mencionados mas atuantes em minha vida!

BIOGRAFIA

Rita de Cássia Zanúncio Araújo, filha de Daniel Zanúncio e Dirce Maria Passamani Zanúncio, nasceu em Castelo, ES, no dia 18 de julho de 1958, casada com João Batista Silva Araújo e mãe de cinco filhas, tendo sido privilegiada com filhas trigêmeas.

Estudou em Castelo até concluir o 2º grau na Escola Estadual João Bley quando aos 17 anos ingressou na Universidade Federal de Viçosa (UFV) onde cursou Economia Doméstica.

Iniciou sua vida profissional trabalhando na área de Saúde e Educação na cidade de Boa Esperança, ES e depois fez parte do corpo técnico do Centro Integrado Rural de Boa Esperança – CIR, de 1983 a 1995. Em 1995 transferiu-se para o escritório local da EMATER de Venda Nova do Imigrante, atual INCAPER, para exercer a função de extensionista, atuando prioritariamente nas áreas de agroindústria artesanal, agroturismo e plantas medicinais.

Possui especialização em Planejamento Educacional pela Associação Salgado de Oliveira de Educação e Cultura - Faculdades Integradas de São Gonçalo/RJ e Plantas Medicinais pela UFLA/FAEPE, formada no Curso de Língua e Cultura Italiana pela ALCIES - Associação de Língua e Cultura Italiana do Espírito Santo.

Ingressou no mestrado no Departamento de Ciência dos Alimentos em março de 2003.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	i
ABSTRACT	iii
1 INTRODUÇÃO	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO	3
2.1 Panificação	3
2.1.1 Composição da massa do pão artesanal	3
2.1.2 Função dos ingredientes	4
2.1.3 Processo de panificação	5
2.1.4 Indicadores do tempo de prateleira	6
2.2 Embalagens	7
2.2.1 Embalagens ativas	7
2.3 Ervas aromáticas e condimentares como agentes antimicrobianos	9
2.4 Condimentos estudados, caracterização, principais constituintes químicos, indicação e utilização	15
2.4.1 Alho (<i>Allium sativum L.</i>)	15
2.4.2 Canela (<i>Laurus cinnamomum L.</i>)	15
2.4.3 Cravo-da-índia (<i>Caryophyllus aromaticus L.</i>)	16
2.4.4 Gengibre (<i>Zingiber officinale Roscoe</i>)	16
2.4.5 Orégano (<i>Origanum vulgare L.</i>)	17
2.4.6 Tomilho (<i>Thymus vulgare L.</i>)	17
2.5 Caracterização de alguns fungos associados a produtos de panificação	19
2.5.1 <i>Aspergillus ochraceus</i>	19
2.5.2 <i>Rhizopus stolonifer</i>	21
2.5.3 <i>Penicillium roqueforti</i>	22
2.5.4 Micotoxinas nos alimentos	23
2.6 Outros atributos indicadores do tempo de prateleira dos alimentos	25
3 MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1 Isolamento, identificação e seleção dos fungos de pães artesanais	29
3.2 Obtenção dos condimentos e preparação dos extratos	30
3.3 Testes <i>in vitro</i>	31
3.3.1 Avaliação da velocidade de crescimento micelial (IVCM) dos fungos em extratos alcoólicos e aquosos dos condimentos	31
3.3.2 Avaliação da esporulação dos fungos em extratos alcoólicos e aquosos dos condimentos.....	33
3.4 Testes <i>in vivo</i>	33
3.4.1 Avaliação visual da contaminação de pães artesanais	36
3.4.2 Avaliação da atividade fungitóxica de EA em pães artesanais	37
3.4.3 Análise sensorial.....	38

3.4.4 Análise de cor.....	39
3.4.5 Análise microbiológica dos pães aplicando-se as boas práticas de fabricação (BPF) e tratamentos com EA	40
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
4.1 Identificação e isolamento de fungos de pães artesanais	42
4.2 Testes <i>in vitro</i>	43
4.3 Testes <i>in vivo</i>	50
4.3.1 Avaliação visual da contaminação de pães artesanais	50
4.3.2 Avaliação da atividade fungitóxica de EA em pães artesanais	54
4.3.3 Análise sensorial – teste de aceitabilidade	59
4.3.4 Análise de cor.....	63
4.3.5 Análise microbiológica dos pães aplicando-se as boas práticas de fabricação (BPF) e tratamentos com EA	66
5 CONCLUSÃO.....	69
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70
7 ANEXOS.....	77

RESUMO

ARAÚJO, Rita de Cássia Zanúncio. **Embalagens ativas com ervas aromáticas e condimentares na conservação de pães artesanais**. 2005. 88p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, MG *

A presente pesquisa objetivou avaliar a atividade antifúngica de extratos alcoólicos de condimentos em embalagens de pães artesanais, em conjunto com a adoção de boas práticas de fabricação (BPF) e a relação com o aumento da conservação dos pães. Testaram-se *in vitro* extratos alcoólicos (EA) de canela, cravo e tomilho, a 10%, 20% e 25%, extrato aquoso (EAQ) a 10% e extrator alcoólico puro (EAP) desses condimentos e, ainda, com os extratos alcoólicos de planta fresca (EAF) de alho, gengibre e orégano, sobre a inibição do desenvolvimento dos fungos *Penicillium roqueforti*, *Aspergillus ochraceus*, e *Rhizopus stolonifer*, desenvolvidos em pães artesanais. Calcularam-se médias do índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) e esporulação. Os experimentos foram instalados no Laboratório de Fitopatologia do EcoCentro/EPAMIG, em Lavras, MG e no Laboratório de Fitopatologia do Incaper/CRDS-CS, em Domingos Martins, ES. Nos testes *in vivo* avaliaram-se visualmente a contaminação dos pães artesanais e a atividade antifúngica dos EA dos condimentos a 5%, 10%, 15% e 20%, testemunha sem EA nem álcool e EAP. Todos os EA mostraram efeito inibitório significativo no crescimento micelial e na esporulação dos fungos. As testemunhas apresentaram maior IVCM e esporulação. Na avaliação efetuada quanto à conservação dos produtos, verificou-se um efeito positivo de todos os tratamentos em relação às testemunhas, com resultados observados variando de 10,7 a 15 dias para os EA e 4,9 dias para a testemunha do pão doce. Para o pão de sal, os resultados referentes à conservação foram de 9,3 a 12,3 dias para EAP; de 13,3 a 15 dias para EA a 5%, 10%, 15% e 20% e de 3,7 dias para a testemunha do pão de sal. Na análise sensorial, não houve diferença significativa entre os tratamentos. A maior votação foi para as categorias positivas, variando de 85,98% a 91,59% para pão de sal e 92,52% a 94,39% para pães doces, indicando boas possibilidades de comercialização do produto. Nas análises de cor foram calculadas diferenças de cor das amostras em relação ao padrão $L^*a^*b^*$. Ocorreu diferença significativa apenas para tempo de armazenamento em pães de sal com EA 10% de gengibre e tomilho. Com EA 10% de canela e cravo em pães doces, observou-se diferença significativa entre os condimentos, tempo de armazenagem e interação entre condimentos versus tempo de armazenagem. A

* Comitê: Sára Maria Chalfoun de Souza - EPAMIG (orientadora). Joelma Pereira – UFLA (co-orientadora).

canela apresentou tendência em influenciar a cor dos pães. Na análise microbiológica, a adoção de BPF, aliada à utilização dos EA 10% de cravo e canela para pão doce e EA 10% de tomilho e gengibre para pão de sal, aumentou a conservação para 17 dias sem registro de fungos. As testemunhas apresentaram contaminação na casca dos pães, tendo durabilidade de 6 dias, período maior que o encontrado na etapa de avaliação visual de contaminação no início dos testes *in vivo*.

Palavras chave: pão artesanal, extrato alcoólico, alho, gengibre, orégano, canela, cravo e tomilho, inibição de fungos, ervas aromáticas, condimentos.

ABSTRACT

ARAÚJO, Rita de Cássia Zanúncio. **Active packing with flavoring and aromatic herbs in craft breads conservation.** 2005. 88p. Dissertation - Food Science Master's Degree – Federal University of Lavras, Lavras, MG*

This research was made to evaluate the anti-fungus alcoholic extracts activity of seasonings in packing of craft breads, together to good production practices (GPP) adoption and the relationship with the increase of shelf time (ST). Cinnamon, carnation and thyme *in vitro* alcoholic extracts (AE) were tested, at 0% (pure alcohol) 10%, 20% and 25%, aqueous extract (AQE) of those seasonings at 10%, and still with the fresh plant alcoholic extracts (FAE), of garlic, ginger and oregano (on fungus development inhibition: *Penicillium roqueforte*, *Aspergillus ochraceus*, and *Rhizopus stolonifer*, developed in craft breads. Micelial Index Growth Speed (MIGS) and sporulation were calculated. The experiments were installed at plant pathology laboratories from EcoCentro/EPAMIG, MG and in Incaper/CRDS-CS in Domingos Martins, ES. *In vivo* craft breads tests of ST, the anti-fungus seasonings alcoholic extracts activity was evaluated at 0%, 5%, 10%, 15% and 20% and control without AE. All the AE showed significant inhibitory effect in the micelial growth and fungus sporulation, and an unstable performance when the seasonings concentrations were AE was of 0%. The control presented larger (MIGS) and sporulation. There was a positive effect in all treatments in relation to check, changing from 10.7 to 15 days for AE and 4, 9 days for the sweet bread. For the salt bread the results referring to shelf life (SL) were 9.3 to 12.3 days for AE 0%; 13.3 to 15 days for AE at 5%, 10. %, 15% and 20% and 3, 7 days for the salt bread check. In sensorial analysis there was no significant difference among treatments. The greater voting was to positive categories 85.98% to 91.59% for salt bread and from 92, 52% to 94, 39% for sweet breads, indicating good commercialization product possibilities. In the color analyses sample differences were calculated in relation to the pattern $L^*a^*b^*$. Significant difference occurred just for salt bread storage with AE at 10% of ginger and thyme. With 10% AE of cinnamon and carnation in sweet breads, was observed significant differences among the seasonings, storage time and interaction among seasonings versus storage time. The cinnamon presented tendency in influencing the bread color. In the microbiological analysis the adoption of allied GPP of carnation and cinnamon at 10% AE use, for sweet bread and AE 10% of thyme and ginger for salt bread increased ST for 17 days without fungus presence. The control

* Guidance committee: Sára Maria Chalfoun de Souza – EPAMIG (Major Professor). Joelma Pereira – UFLA (Co-adviser).

presented contamination at the bread peel having 6 days of ST, larger than the found period in the evaluation stage at the ST *in vivo* beginning tests.

Index words: seasonings, alcoholic extracts, garlic, ginger, oregano, Cinnamon, carnation and thyme, fungus inhibition.

1 INTRODUÇÃO

A agroindústria artesanal encontra-se em pleno crescimento, está ligada à agricultura familiar e é baseada na agregação de valor ao produto primário, comercialização conjunta, resgate e valorização da cultura e produtos regionais. Além disso, contribui para a criação de oportunidades de trabalho e renda, principalmente para as mulheres e jovens, o que, por sua vez, tem contribuído significativamente para a melhoria da qualidade de vida das famílias envolvidas e para o desenvolvimento local de forma mais sustentável.

O Regulamento das Normas Sanitárias para Elaboração e Comercialização de Produtos Artesanais Comestíveis de Origem Animal e Vegetal do Estado do Espírito Santo define que “produtos artesanais são aqueles processados em pequena escala e que mantêm as características tradicionais, culturais ou regionais”. No entanto, as características destes processos produtivos, por vezes, conflitam com as tecnologias disponíveis que descaracterizam o produto final (sabor, odor, textura e aparência), ao incentivar ou exigir o uso de aditivos químicos para conservação e a adoção de outros procedimentos contrários ao que o produto dito “artesanal” inspira no consumidor. Além disso, o efeito de tais tecnologias pode ser negativo à medida que o produtor não domina as técnicas de aplicação que, sem o devido controle podem representar, ao contrário do que se pretende, riscos à saúde do consumidor.

O consumidor, ao procurar o produto artesanal, não o faz apenas por questões culturais, mas também porque acredita que está consumindo produtos mais saudáveis. O estabelecimento da relação entre alimentação e saúde está cada vez mais presente na escolha dos consumidores e, por isso, o crescimento da demanda por produtos mais naturais e de qualidade é uma tendência mundial.

A expansão da agroindústria visando atender à demanda de um maior número de consumidores, inclusive em supermercados, é limitada pelo tempo transcorrido entre a produção e comercialização, que representa aproximadamente a metade do período do tempo de prateleira dos pães assim produzidos. Um sério problema enfrentado pelos produtores ao comercializarem seus produtos é o curto tempo de prateleira dos mesmos, já que não dispõem de tecnologias apropriadas para melhor conservação do produto artesanal, garantindo ao consumidor maior segurança alimentar. Esse aspecto pode ser contornado pelo do aprimoramento de vários processos, entre eles aqueles que resultem no prolongamento do tempo de prateleira dos produtos. Dessa forma, a busca de alternativas nesta área torna-se imprescindível para que os produtos da agroindústria artesanal tenham condições de competir no mercado mantendo sua clientela e conquistando novos consumidores pelo estabelecimento de métodos alternativos visando melhor à conservação dos produtos.

Resgatando-se a utilização de condimentos como o cravo e a canela na conservação de pães guardados no armário da cozinha (guarda comida) pelas nonas¹ e a utilização comum do álcool como “desinfetante”, optou -se por somar ambos, utilizando-se o extrato alcoólico de plantas condimentares neste estudo.

A presente pesquisa tem como objetivo principal, a investigação sobre a eficácia da utilização de extratos alcoólicos de ervas aromáticas e condimentares, incorporadas às embalagens de pães artesanais por meio de pulverizações, somada à adoção de boas práticas de fabricação e sua relação com o aumento do tempo de prateleira desses produtos, garantindo a segurança e qualidade do produto final.

Almeja-se também possibilitar a imediata adoção da tecnologia gerada na pesquisa pelos produtores da agroindústria artesanal, com ações específicas para esse segmento.

¹nonas-palavra italiana que significa avós

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Panificação

Segundo a Associação Brasileira da Indústria de Panificação - ABIP (2003), o consumo anual de pães no país é de 27kg per capitã, sendo que o recomendado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) é de 60 Kg per capita e a Food Agricultural Organization (FAO) recomenda 50kg per capita. Na Europa, o maior consumidor de pães é a Alemanha, com 81kg per capita.

Embora o pão francês seja o mais consumido por todas as classes sociais no Brasil, o consumo de pães artesanais (caseiros) vem crescendo nos últimos anos, aliado à expansão das agroindústrias artesanais e do agroturismo.

O pão artesanal é um produto tradicional no interior do Brasil, fazendo parte da rotina de muitas famílias no campo. No estado do Espírito Santo, sua produção é pautada no Regulamento das Normas Sanitárias para Elaboração e Comercialização de Produtos Artesanais Comestíveis de Origem Animal e Vegetal do Estado do Espírito Santo que define que ‘produtos artesanais são aqueles processados em pequena escala e que mantêm as características tradicionais, culturais ou regionais’.

2.1.1 Composição da massa do pão artesanal

Pão artesanal ou caseiro pode ser definido como produto resultante da mistura de água ou leite, fermento biológico (levedura) ou fermento natural (pão azedo ou pão de Jesus), óleo, banha de porco ou manteiga, açúcar, sal, ovos e farinha de trigo, sovado com as mãos ou utilizando-se pequenos cilindros, não adicionado de qualquer conservante químico, assado em fornos à lenha ou a gás e produzidos em pequena escala. Segundo Pazinato (1999), panificação artesanal

é a elaboração de pães por processos caseiros sem a utilização de equipamentos especiais ou conservantes.

2.1.2 Função dos ingredientes

Farinha branca é o produto da moagem do grão de trigo, com exceção da casca (que é celulose), do farelo e do gérmen. Nada mais é que a moagem do endosperma (o núcleo branco composto de carboidratos e proteínas) (Araújo, 1975).

Conforme El-Dash et al. (1982), a composição da farinha de trigo depende da variedade do trigo e de seu grau de extração. O amido é o principal carboidrato da farinha de trigo, constituindo aproximadamente 57% do grão do trigo (64% da matéria seca) e cerca de 70% do endosperma do trigo.

Os elementos de qualidade da farinha de trigo incluem dois grandes grupos: elementos de qualidade devido, basicamente, à variedade de trigo e critério de qualidade induzido primariamente pelo manuseio, estocagem e processamento do grão (El-Dash et al., 1982).

Nas farinhas de trigo, os gêneros de fungos *Aspergillus* e *Penicillium* são os mais freqüentes, podendo também aparecer espécies de *Alternaria*, *Cladosporium* e outros gêneros.

O sal utilizado na massa do pão é o aditivo mais barato. Contribui, principalmente, para realçar o sabor e aroma do pão, regula os períodos de fermentação, estabiliza e reforça o glúten e melhora a digestibilidade dos produtos de panificação (Pazinato, 1999).

O açúcar é substrato para a fermentação e para as reações com aminoácidos (reação de Maillard) e de caramelização, responsáveis pela coloração e sabor característicos no final do assamento, Além disso, aumenta a maciez, incrementa o valor energético e aumenta a estabilidade microbiológica dos produtos (Ciacco, 1985). O açúcar, especialmente quando aliado ao

aquecimento, é um bom agente de conservação dos produtos alimentícios. A presença do açúcar irá aumentar a pressão osmótica do meio, criando, assim, condições desfavoráveis para o crescimento e a reprodução da maioria das espécies de bactérias, leveduras e mofos. Conseqüentemente, irá ocorrer uma diminuição no valor da atividade aquosa (a_w) (Gava, 1984).

As gorduras são utilizadas para conferir maciez, sabor e coloração aos pães, além de aumentar o valor nutritivo e o período de conservação. Podem ser utilizados óleos de diversos vegetais, banha, manteiga, nata, margarina ou gordura vegetal hidrogenada. O excesso de gordura afeta a fermentação da massa e altera também a consistência do pão (Pazinato, 1999).

2.1.3 Processo de panificação

De acordo com El-Dash et al. (1982), o elemento básico utilizado no processo de fermentação é a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, que metaboliza açúcares, sob condições anaeróbicas, produzindo gás dióxido de carbono (CO_2), responsável pelo crescimento da massa, álcool, outros produtos em menor quantidade e calorias. Foi estimado que 100g de glucose podem produzir 48,9g de CO_2 e 51,1g de etanol, além de 27 calorias durante o processo de fermentação.

A mistura consiste em homogeneizar os ingredientes uniformemente e o trabalho de sovagem da massa, que é realizado em pequenos cilindros ou à mão, contribui para o desenvolvimento da estrutura do glúten e incorpora bolhas de ar que são liberadas no assamento do pão.

A modelagem dos pães é feita para melhorar a textura e a estrutura da célula do pão, assim como para dar-lhe uma forma apropriada. Acondicionam-se os pães em tabuleiros e eles são cobertos com panos e plásticos para que os mesmos não ressequem. Este período de fermentação final, usualmente, leva de 40 a 60 minutos, dependendo do tipo de pão, formulação, qualidade da farinha e

temperatura de fermentação. O assamento da massa tem como objetivo o tratamento térmico do amido e a inativação das enzimas e da fermentação, permitindo também a formação da cor da crosta e o desenvolvimento de aroma e gosto. Ao saírem do forno, os pães estão muito quentes e devem ser esfriados antes do empacotamento. O pão é submetido a 200°C, aproximadamente, ao ser assado, temperatura que elimina os microrganismos. Acredita-se que haja uma recontaminação desses pães na etapa de resfriamento e embalagem. Castro (2003) cita que, atualmente, segundo o setor de panificação, as perdas em consequência da contaminação por mofo (fungo) variam de 5% a 15% sobre o volume de produção.

2.1.4 Indicadores de tempo de prateleira

Vida ou tempo de prateleira de um produto alimentício, segundo o Institute of Food Technologists (IFT) (1974), é definido como “o período de tempo decorrido entre a produção e o consumo de um produto alimentício, durante o qual este se caracteriza pelo nível satisfatório de qualidade avaliado pelo valor nutritivo, sabor, textura e aparência geral”.

Tempo de prateleira é um atributo importante de todos os alimentos e pode ser definido como o tempo que se passa desde a produção e a embalagem do produto até o ponto em que ele se torna inaceitável para o consumo. O primeiro requisito para se definir o tempo de prateleira de um produto alimentício é quantificar o parâmetro crítico que o torna inaceitável. A seguir, avaliando de alguma forma este parâmetro, determina-se o período de tempo em que o produto se mantém aceitável para o consumidor. O conhecimento preciso do tempo de prateleira é necessário para definir o prazo de validade do produto, de modo a atender às exigências legais, além de garantir a satisfação do consumidor. É relacionado, então, com a qualidade total do alimento e diretamente ligado ao planejamento da produção, às especificações dos

ingredientes, ao processo de manipulação e à estocagem (no varejo e na casa do consumidor). O tempo de prateleira depende do alimento e é essencial que os produtores identifiquem os parâmetros intrínsecos e extrínsecos que limitam esse período.

Forsythe (2002) cita que a vida de prateleira pode ser determinada pela combinação de análises microbiológicas e químicas de amostras dos alimentos tomadas durante o tempo de prateleira estimado. O tempo de prateleira esperado do pão sem aditivo químico é de até uma semana, em temperatura ambiente.

Em um teste feito com pão de forma, embalado no plástico antimicrobiano, o produto durou 14 dias sem registro de fungos, enquanto o tempo médio dos pães industrializados nas gôndolas de supermercados é de dez dias (Soares, 2003).

2.2 Embalagens

Quanto às embalagens utilizadas no setor de panificação, segundo Gava (1984), as mais utilizadas no Brasil são os sacos plásticos de polietileno de baixa densidade, devido à sua resistência, baixo custo, disponibilidade, transparência, facilidade de termossoldagem e excelente barreira à água, apesar de não ser boa barreira ao oxigênio e às gorduras. As embalagens de polipropileno possuem alta claridade e brilho, sendo melhor barreira ao oxigênio e à umidade do que o polietileno de baixa densidade o que as tornam envoltório apropriado para doces e pães. Apesar da indicação ser o polipropileno como embalagem apropriada para pães, na região pesquisada, as mais utilizadas são os sacos plásticos de polietileno de baixa densidade.

2.2.1 Embalagens ativas

As embalagens ativas são a grande inovação do momento na pesquisa de tecnologia de alimentos, pois elas interagem com os produtos que abrigam.

Segundo Soares (2003), “embalagens ativas são aquelas capazes de controlar uma propriedade que você deseja”. O objetivo principal dessas embalagens é conservar ou melhorar a qualidade do alimento. Os filmes antimicrobianos são uma alternativa ao uso de conservantes em alimentos, como pães, leites, carnes e queijos. Os pesquisadores incorporam diferentes aditivos químicos, aprovados pelo Ministério da Saúde, em materiais (plástico, papel etc.) usados para embalar os alimentos. No caso do pão de forma, o propionato – substância que inibe o crescimento de microrganismos, em vez de ser adicionado diretamente na massa, é liberado gradativamente pela embalagem. Assim, quem comer desses pães vai ingerir uma quantidade muito menor de propionato.

Diversas substâncias podem ser incorporadas às embalagens ativas, dependendo do alimento e do objetivo do pesquisador ou fabricante, como foram propionatos e sorbatos em pães de forma, nisina em queijo e lactato de sódio em salsichas. O objetivo principal é conservar os alimentos por mais tempo, usando doses menores de aditivos químicos. As embalagens ativas contêm conservantes e aditivos que são liberados progressivamente, evitando, assim, que os alimentos recebam diretamente essas substâncias. “Os componentes químicos entram em contato com o produto apenas na superfície, mais susceptível aos fungos e numa quantidade menor do que a permitida pela legislação, mas com o mesmo efeito”, de acordo com Soares (2003).

No mercado, encontramos o Citrol, produzido pela RAN Indústrias Químicas (2003), que é uma solução alcoólica de ácido cítrico e ácido sórbico, utilizada como conservante antimicrobiano que, pela ação sinérgica dos dois componentes, inibe o desenvolvimento de fungos. O citrol é pulverizado sobre a superfície do alimento e, quando a mesma está seca, coloca-se o produto na embalagem. O veículo utilizado é o álcool.

Vários aditivos químicos podem ser liberados a partir de uma embalagem, a fim de aumentar a vida de prateleira do produto. A maior parte

dos compostos assim liberados são os conservantes (especialmente ácidos orgânicos ou peróxidos), capazes de prevenir o crescimento de microrganismos deterioradores e patogênicos, e aumentar a segurança alimentar. Esses conservantes podem ser liberados controladamente sobre a superfície de um alimento, por meio de difusão e evaporação a partir de filme ou pela reação química ou enzimática. Além dos conservantes, outros agentes químicos têm sido incorporados às embalagens para prolongar a vida de prateleira dos alimentos; por exemplo, os antioxidantes, usados para alguns cereais (Labuza & Berne, 1989 ; Gontard, 1997; Azeredo et al., 2000).

2.3 Ervas aromáticas e condimentares como agentes antimicrobianos

A indústria alimentícia tem como propósito a produção de alimentos com uma longa vida útil ligada a uma inocuidade no que diz respeito à presença de microrganismos patogênicos e suas toxinas. Em particular, as tendências dos consumidores atuais e da legislação de alimentos têm tornado este propósito um desafio para a indústria de alimentos (Coote & Brul, 1999).

Sabendo-se que alguns preservativos químicos são suspeitos ou são tóxicos, há um aumento da pressão sobre as indústrias de alimentos para completa remoção destes produtos químicos e conseqüente adoção de alternativas naturais para a obtenção dos seus propósitos (Nychas, 1996).

Tassou et al. (1995) citam que as especiarias e seus produtos derivados podem agir potencializando outros agentes antimicrobianos ou, ainda, agirem como principal agente de conservação.

De acordo com Martins et al. (1994), a planta é um fitocomplexo e, quando é utilizada integralmente ou as suas preparações, isto é, com todos os seus constituintes químicos, conferem atividade terapêutica um pouco diferente daquela apresentada pelos princípios ativos isolados, pois, pode haver sinergismos que favoreçam a atividade farmacológica da planta.

Pelczar (1980) define agente antimicrobiano como aquele que interfere no crescimento ou atividade dos micróbios e, de acordo com o tipo de germes sobre os quais agem, recebem a designação de *antibacterianos ou antifúngicos*. O álcool etílico, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$, em concentrações de 50% a 70%, é eficaz contra formas vegetativas ou não esporuladas. Outras concentrações são também ativas. Não se pode confiar no álcool etílico como agente esterilizante porque as concentrações que agem sobre as células vegetativas são praticamente inertes contra os esporos bacterianos. Os álcoois são desnaturantes das proteínas e esta propriedade pode ser responsável, em grande parte, por sua atividade antimicrobiana. Esses compostos são também solventes de lipídeos, podendo, portanto, lesar a membrana citoplasmática. Os álcoois também são agentes desidratantes, o que resulta num efeito bacteriostático.

Por definição, condimentos e especiarias são produtos aromáticos de origem vegetal empregados principalmente para conferir sabor aos alimentos. Segundo Shelef (1983), além desta utilidade, os condimentos possuem também propriedades antimicrobianas, antioxidantes e medicinais, existindo aproximadamente 70 condimentos diferentes, cultivados e utilizados em todo mundo.

Zaika (1987) cita que especiarias e ervas podem ser agrupadas de acordo com a sua atividade antimicrobiana sendo que a canela, o cravo, a mostarda e o alho mencionados como fortes inibidores para uma variedade de microrganismos. As propriedades inibitórias significativas têm sido relatadas para inúmeras ervas, por exemplo, cominho, orégano, alecrim, sálvia, tomilho, dentre outras. Por outro lado, pimenta do reino, pimenta vermelha e gengibre possuem pouca ou nenhuma atividade antimicrobiana. Embora esteja disponível um volume considerável de dados, tem sido difícil quantificar o efeito antimicrobiano de uma dada erva ou seus componentes, devido à variedade de métodos de testes que têm sido utilizados.

Deans & Ritche (1987) ponderam que a substituição de aditivos sintéticos por naturais dependerá, fundamentalmente, da determinação de uma concentração ideal. Segundo Shelef (1983), as concentrações normalmente empregadas para realçar o aroma e sabor, que variam de 0,5% a 1%, não inibem o desenvolvimento microbiano, que depende de concentrações superiores a 1%.

Segundo Pereira (2001), os efeitos benéficos obtidos por meio da adição de condimentos aos produtos de panificação devem ser aliados à adoção de medidas preventivas, tais como a utilização de matérias-primas não contaminadas e a adoção de boas práticas de manejo durante as fases de preparo e comercialização, minimizando os índices de contaminação dos produtos.

Azzous & Bullerman (1982) avaliaram a atividade inibidora de condimentos e produtos químicos comerciais sobre fungos toxigênicos e relataram que o cravo, a canela, a mostarda, a pimenta-da-jamaica, o alho e o orégano foram, em ordem decrescente, os antifúngicos mais eficientes, e que as combinações de diferentes concentrações de cravo e sorbato de potássio levaram a um possível efeito inibidor sinérgico no crescimento dos fungos.

Segundo Suhr & Nielsen (2003), os efeitos antifúngicos de óleos essenciais dependem do método de aplicação. Compostos fenólicos, tais como o timol e o eugenol presentes no tomilho, na canela e no cravo, produziram melhor efeito quando aplicados diretamente ao meio, enquanto que compostos menores, como o alil-iso-tiocianato e o citral presentes na mostarda e no capim-limão, foram mais eficientes quando vaporizados sobre o meio.

Pereira (2001) avaliou a inibição do desenvolvimento de microrganismos associados a produtos de panificação e concluiu que a adição de cravo e canela em rosca de maçã e pão de centeio e adição de alho ao pão integral possibilitaram a inibição dos mesmos. O mesmo autor argumentou que a adição dos condimentos cravo e canela à rosca de maçã promoveu uma inibição no

desenvolvimento de fungos de aproximadamente 2 a 3 dias em relação à testemunha, sendo superadas apenas pelo tratamento com aditivo químico.

Bara (1992) avaliou o efeito de inibição dos condimentos em pó de alecrim, alho, canela, cebola, cominho, cravo, cúrcuma, gengibre, louro, mostarda, noz-moscada, orégano, páprica, pimenta-da-jamaica, pimenta-preta e sálvia no crescimento de *Yersinia enterocolitica* e verificou um efeito pronunciado do cravo. Esse mesmo autor constatou que o extrato alcoólico de cravo teve maior eficiência e sugere que este condimento exerce uma injúria nas células bacterianas. O efeito de quatro constituintes dos condimentos foram testados: timol, eugenol, mentol e anetol contra *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* e *Vibrio parahaemolyticus*. Dos componentes testados, o eugenol foi o mais efetivo, seguido por timol, anetol e mentol (Karapinar & Aktug, 1987).

Bullerman (1974), analisando o crescimento de fungos em pães brancos e adicionados de uva-passa e canela, verificou neste último uma inibição acentuada de micotoxinas e do crescimento micelial de *Aspergillus parasiticus*, chegando a 100% quando foi utilizado extrato alcoólico de canela a 20%. Já em concentrações menores, o extrato de canela foi mais eficiente na inibição de micotoxinas do que no crescimento micelial do fungo.

Hitokoto et al. (1980) testaram 29 condimentos e observaram uma completa inibição de três espécies toxigênicas de *Aspergillus* por extratos de cravo, semente de erva-doce e pimenta, enquanto que os outros condimentos foram eficientes somente na inibição da aflatoxina. O eugenol e o timol, extraídos, respectivamente, do cravo e do tomilho, causaram inibição completa no crescimento de *Aspergillus flavus* e *Aspergillus versicolor* a 0,4mg/ml ou menos; na concentração de 2mg/ml, o anetol extraído das sementes de erva-doce inibiu o crescimento de todas as estirpes testadas. Benjilali et al. (1984) testaram o efeito de seis óleos essenciais em 39 espécies de fungos do gênero *Penicillium*,

Aspergillus e outros. O óleo de tomilho foi o mais eficiente, seguido de 3 tipos, estragão, alecrim e eucalipto. Farag et al. (1989) obtiveram a seqüência decrescente de maior atividade fungicida de óleos essenciais para *Aspergillus parasiticus*: tomilho, cominho, cravo, alcaravia, alecrim e sálvia.

Nguefack et al. (2004) trabalharam com cinco óleos essenciais extraídos de *Cymbopogon citratus*, *Monodora myristica*, *Ocimum gratissimum*, *Thymus vulgaris* e *Zingiber officinale* para conhecer os seus efeitos inibitórios contra três fungos deteriorantes de alimentos e produtores de micotoxinas, *Fusarium moniliforme*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*. O óleo essencial do *O.gratissimum*, *T. vulgaris* e *C. citratus* foram mais efetivos e preveniram a germinação dos esporos e o crescimento de todos os três fungos a 800, 1.000 e 1.200ppm, respectivamente. Atividade moderada foi observada para o óleo de *Z. officinale* entre 800 e 2500ppm, enquanto que o óleo de *M. myristica* foi menos inibitória. Esses efeitos contra fungos produtores de micotoxinas e deteriorantes de alimentos indicaram a possível eficácia de óleos essenciais como preservativos de alimentos. Os mesmos autores compararam a propriedade preservativa do *O. gratissimum* e sorbato de potássio em pH 3 e 4,5 contra *Aspergillus flavus* e observaram que o óleo essencial permaneceu estável em ambos os pH. Entretanto, a eficácia do sorbato de potássio foi reduzida em pH mais alto.

Conner & Beuchat (1984) verificaram que, dentre 32 óleos essenciais extraídos de condimentos, os óleos de pimenta-da-jamaica, canela, cravo, cebola, alho, orégano, segurelha e tomilho foram, em ordem decrescente, os maiores inibidores.

Garc & Siddiqui (1992) realizaram trabalhos com constituintes isolados do óleo essencial de manjeriço (*Ocimum sanctum*) evidenciando ação fungistática em diversos fungos. O eugenol purificado foi testado na diluição de 1:100 e 1:200, apresentando forte ação contra *Absidia glauca*, *Alternaria*

alternata, *Aspergillus niger*, *Colletotricum capsici*, *Fusarium moliniforme* e *Rhizopus nodosus*. Singh et al. (1993) utilizaram extrato aquoso de manjeriço em frutas de banana para controle de doenças provocadas por fungos do gênero *Fusarium*, *Helminthosporium*, *Curvularia*, *Aspergillus* e *Trichothecium* e obtiveram resultados eficientes.

Ao avaliar o efeito do timol, principal componente dos óleos de orégano e de tomilho, Buchanan & Shepherd (1981) constataram uma atividade antiaflatoxigênica significante, decorrente da inibição do crescimento fúngico.

Pereira (2001) observou que o cravo e a canela apresentaram uma inibição total (100%) do desenvolvimento micelial e a esporulação do *Aspergillus niger*. O alho apresentou um efeito de inibição do desenvolvimento micelial a partir de concentrações menores que as do tomilho, erva-doce e menta. Os condimentos testados, louro, manjeriço, orégano e cebola não apresentaram significativa inibição do desenvolvimento micelial dos fungos. O mesmo autor concluiu que os condimentos testados apresentaram, de maneira geral, um elevado índice de controle do desenvolvimento micelial e da esporulação de fungos freqüentemente associados a produtos de panificação, a saber: *Aspergillus niger*, *Eurotium repens*, *Penicillium spp.* e *Rhizopus sp.* Houve elevada correlação positiva entre os condimentos e as concentrações testadas (1%, 2%, 3% e 4%).

A Resolução nº 382 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA (1999), de 5 de agosto de 1999, que regulamenta o uso de aditivos alimentares, suas funções e limites máximos para a categoria de molhos e condimentos, não restringe o uso de condimentos vegetais e especiarias (ANVISA, 1999).

2.4 Condimentos estudados, caracterização, principais constituintes químicos, indicação e utilização

2.4.1 Alho (*Allium sativum L.*)

O alho é uma erva bulbosa, perene, cujo bulbo fornece óleo essencial (0,1 a 0,2%). O princípio ativo, a alicina, encontra-se na droga fresca sob a forma de um precursor inativo, a aliina. A trituração dos bulbos provoca rápida reação enzimática por ação da enzima aliinase que converte a aliina em alicina cujo odor característico do alho é imediatamente reconhecido (Sousa et al., 1991).

Os principais constituintes químicos do alho são a alicina, inulina, ácidos fosfórico e sulfúrico, vitaminas A, B e C, proteínas e sais minerais.

O alho apresenta em sua composição nutricional um teor de glicídios de 29,3g, 134 calorias, 5,30g de proteína e 0,20g de lipídios (Franco, 1987).

Em culinária é um condimento utilizado universalmente com largo emprego pelo sabor e odor característicos. Alguns condimentos industrializados são feitos à base de macerado de alho com frutos cítricos para prevenir a hidrólise da alicina e evitar a perda do odor dos produtos comerciais, pois a alicina só é estável na presença de ácidos diluídos (Sousa et al., 1991).

Entre os usos terapêuticos do alho, destacam-se bactericida, antisséptico, laxante suave, vermífugo, antiparasitário intestinal, diurético, diaforético, indicado na arteriosclerose, prevenção da trombose e na hipertensão arterial, expectorante e combate manifestações gripais.

2.4.2 Canela (*Laurus cinnamomum L.*)

A canela é uma pequena árvore originária da Índia e do Ceilão. Possui casca de superfície pardo-amarelada escura com regiões acinzentadas com a parte interna lisa. Suas folhas são simples e agudas na base. A droga comercial corresponde à parte interna da casca do tronco e dos ramos. Contém até 4% de

óleo essencial, constituído, principalmente, de aldeído cinâmico (65% a 76%) e eugenol (4% a 10%). Apresenta ainda, sacarose, frutose e manitol, que lhe conferem o sabor adocicado. A canela em experiências de laboratório mostrou atividade bactericida, fungicida, inseticida e nematicida (Sousa et al., 1991).

Universalmente, utiliza-se a canela como condimento e aromatizante, sendo também empregada como componente de fórmulas farmacêuticas e corretivos do odor e do sabor na preparação de alguns medicamentos (Coimbra & Silva, 1958).

O uso terapêutico da canela pode ser como estimulante do apetite, estomáquico, carminativo, emenagogo, antisséptico, adstringente e sudorífico.

2.4.3 Cravo-da-índia (*Caryophyllus aromaticus L.*)

A árvore do cravo-da-índia pode atingir até 15 metros de altura e é originária da Índia. No Brasil, as principais áreas de cultivo se localizam em São Paulo e na Bahia. O cravo-da-índia é assim denominado por causa da forma de seus botões florais e de sua origem. Contém de 14% a 20% de óleo volátil nos botões florais secos, sendo constituído de eugenol (70% a 95%), acetato de eugenol e α -cariofileno (5% a 8%). O eugenol confere ao óleo aroma e propriedades terapêuticas. Em culinária, é utilizado para conferir sabor e aroma aos pratos. Muito utilizado para aromatizar doces, licores e chás. O eugenol, além do emprego medicinal, é utilizado na indústria de síntese de vanilina (Coimbra & Silva, 1958).

O uso terapêutico do cravo-da-índia inclui estimulante do apetite, digestivo e carminativo. Tem ação germicida, antisséptica, desinfetante e anestésica local de uso tópico, muito usado em odontologia.

2.4.4 Gengibre (*Zingiber officinale Roscoe*)

O gengibre é uma erva anual cultivada em todo o mundo, principalmente como condimento. Tem folhas longas e seu caule nasce de um rizoma do qual saem os filhos. O rizoma é horizontal com superfície externa pardo-acinzentada, rugosa, estriada longitudinalmente, fibrosa, amilácea e resinosa. Seus principais constituintes químicos são óleos essenciais: zingibereno, felandreno, canfeno, cineol, borneol e citral (Pinto et al., 2000).

De acordo com a composição nutricional do gengibre, ele possui um teor de glicídios de 4,40g, 31,5 calorias, 1,87g de proteína e 0,72g de lipídios (Franco, 1987).

Serve como tempero de carnes, de doces, bolos e bebidas. É estimulante da digestão e carminativo quando usado por via oral e usado para tratamento local de dores e inflamações (Matos, 1994).

2.4.5 Orégano (*Origanum vulgare L.*)

O orégano é uma planta ramosa de folhas veludas, pecioladas, ovais, levemente denticuladas, flores de cor púrpura clara ou brancas, dispostas em inflorescências terminais. Tem como principais constituintes o carvacrol e o timol (Coimbra & Silva, 1958).

O orégano apresenta em sua composição nutricional um teor de glicídios de 3,10g, 19,6 calorias, 0,90g de proteína e 0,40g de lipídios (Franco, 1987).

Na culinária emprega-se na condimentação de pizzas, massas e carnes. Para uso terapêutico é empregado como antisséptico, diurético, digestivo, antiespasmódico, expectorante, emenagogo e sedativo.

2.4.6 Tomilho (*Thymus vulgare L.*)

O tomilho é uma planta de odor aromático e sabor picante. Atinge aproximadamente 30cm de altura, tem caule lenhoso e ramos acinzentados. As

folhas são opostas, pequenas, lanceoladas, oblongas ou ovais. Seus principais constituintes químicos são o timol e carvacrol, presentes em 50% do óleo essencial (Pinto et al., 2000).

Em culinária, utilizam-se os ramos frescos para condimentar carnes, peixes, hortaliças e massas. É antisséptico intestinal, bactericida, fungicida e antioxidante; é utilizado nas afecções do aparelho respiratório e como estimulante da digestão.

No Quadro 1 encontra-se a classificação botânica dos condimentos estudados e seus principais constituintes químicos.

QUADRO 1 Classificação botânica dos condimentos e principais constituintes químicos.

Nome popular	Nome científico	Família	Principais princípios ativos
Alho	<i>Allium sativum L.</i>	<i>Liliaceae</i>	Alicina, ajoeno e inulina
Canela	<i>Laurus cinnamomum L.</i>	<i>Lauraceae</i>	Aldeído cinâmico, eugenol, felandreno
Cravo-da-índia	<i>Caryophyllus aromaticus L.</i>	<i>Mirtaceae</i>	Eugenol, cariofileno
Gengibre	<i>Zingiber officinalis Roscoe</i>	<i>Zingiberaceae</i>	Zingibereno, cineol, felandreno, canfeno, borneol e citral.
Orégano	<i>Origanum vulgare L.</i>	<i>Labiatae</i>	Carvacrol, timol
Tomilho	<i>Thymus vulgare L.</i>	<i>Labiatae</i>	Timol, carvacrol, cimeno,

2.5 Caracterização de alguns fungos associados a produtos de panificação

2.5.1 *Aspergillus ochraceus*

O fungo é encontrado nos solos, em matéria orgânica em decomposição ou em sementes, proliferando durante o armazenamento se as condições de temperatura e umidade permitirem. Normalmente, se desenvolvem em grãos com umidade acima de 13% (Resende & Machado, 2000).

O *Aspergillus. ochraceus*, bem como o *Penicillium verrucosum* produzem as ocratoxinas que são compostos com estrutura geral de beta-fenilalanina com ligação amida com dehidroisocumarina. A produção das ocratoxinas pelas espécies de *Aspergillus* parece estar limitada às condições de altos teores de umidade e temperatura.

No Brasil, somente no início da década de 1980 é que foram efetuadas as primeiras análises para se detectar a ocorrência de ocratoxinas em alimentos.

Dentre as ocratoxinas, a mais tóxica é a ocratoxina A, que foi identificada pela primeira vez em 1965, por Van der Merwe et al. (1965), como sendo um metabólito tóxico do *A. ochraceus*. Esta descoberta foi realizada por meio indução da micotoxicose em animais de laboratório, isto é, não ocorrendo naturalmente, diferente de uma micotoxicose natural, como ocorreu com a descoberta da aflatoxina (Adams & Moss, 2000). A ocratoxina A tem demonstrado ser uma potente toxina nefrotóxica em muitas espécies animais. Produz outros efeitos negativos, como hepatotoxicidade, produção de enterites em animais intoxicados, imunossupressão, teratogênese e carcinogênese, além de demonstrar efeitos genotóxicos em diferentes sistemas biológicos, porém, não tem demonstrado efeitos mutagênicos. É uma micotoxina que representa grande risco à saúde humana e animal e, por isso, vem despertando a atenção de cientistas do mundo todo. É um contaminante de várias plantas e produtos animais, porém, é freqüentemente encontrada em grãos de cereais estocados.

A ocratoxina A tem sido relatada em até 50% das amostras de milho, trigo, arroz e feijão analisadas em vários estados do Brasil. Apesar da legislação brasileira não prever níveis máximos dessa micotoxina em alimentos, são necessários programas de monitoramento para subsidiar estudos de exposição humana e avaliar a necessidade de estabelecer esses níveis.

Vários alimentos são contaminados naturalmente, tais como cereais, amendoim, verduras, pimenta preta, suco de maçã, suco de uva, aveia, pão, semente de papoula, nozes, cerveja e café (Wiltshko et al., 2000).

A produção de ocratoxina A por algumas espécies de fungos é influenciada por muitos fatores, tais como atividade de água, temperatura, tipo de substrato, presença da microbiota competitiva, linhagem do fungo e a integridade da semente (Marquardt & Frohlich, 1992).

A produção de ocratoxina A pelo *A.ochraceus* tem sido relatada à temperatura de 12°C a 37°C em vários substratos. A atividade de água (a_w) mínima reportada para o *A.ochraceus* é de 0,77 (Pitt & Hocking, 1997).

Segundo Warren & Hamilton (1980), citados por Batista (2000), a ocratoxina A é citada por diminuir a resistência do intestino grosso de aves. Esta conclusão é baseada na descoberta de que a ocratoxina A, em rações de frango, provocou rompimento no intestino grosso durante o experimento. Esta diminuição na resistência do intestino grosso foi associada com o decréscimo do conteúdo do colágeno, que é a principal proteína do tecido conectivo e o maior componente das membranas inferiores das células epiteliais e endoteliais.

A ocratoxina A, uma vez formada nos alimentos, é de difícil remoção pela maioria das formas de processamento dos alimentos (Moss, 1996). É relativamente estável, resiste em aveias e em outros cereais autoclavados. Alguns autores concluíram que a sua destruição térmica não foi observada durante o processo de aquecimento de 100°C a 250°C por ter sido detectada após

o processamento térmico, sendo necessário um melhor método de descontaminação.

A ocratoxina se concentra mais nos rins, seguidos do fígado e tecido adiposo.

O Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives and Contaminants (JECFA) avaliou os riscos produzidos pela ocratoxina A para a população humana, estabelecendo, em 1995, a ingestão semanal aceitável (ISA) de 100 ng/peso corpóreo/semana, cerca de 14,3 ng/peso corpóreo/dia (Soares, 1999).

2.5.2 *Rhizopus stolonifer*

Rhizopus stolonifer é um fungo cosmopolita que vive particularmente em regiões tropicais e subtropicais, em quase todo tipo de alimento fresco, úmido e parcialmente seco. A espécie mais comumente encontrada é o *Rhizopus stolonifer*, classe Zygomycetos, ordem Mucorales, sendo as espécies dessa ordem as que predominam em alimentos. Morfologicamente, são fungos não septados, com micélios cotonosos e formando esporangiosporos nos nódulos onde se encontram os rizóides. Seus esporângios são usualmente muito grandes e negros e suas columelas são hemisféricas. A base do esporângio, ou apófise, tem a forma de taça. O micélio produz estolões aéreos que, em determinados pontos, formam rizóides, capazes de formar raiz onde pode se originar um novo organismo. A característica primordial do *Rhizopus stolonifer* é o excessivo crescimento a 25°C, sendo o esporângio primeiramente branco, havendo mudança para preto com o amadurecimento. O crescimento a 5°C e 37°C é fraco ou ausente. As micotoxinas possivelmente envolvidas não estão bem esclarecidas (Pitt & Hocking, 1997).

Trata-se de fungo que cresce principalmente em pães, mas, desenvolve-se também em vegetais, frutas, queijos e outros alimentos.

Isolamento de *Rhizopus* tem sido relatado em muitas outras fontes de alimentos, inclusive o trigo (Pelhate (1968) citado por Pitt & Hocking, (1997)) e especiarias (Shrisvastava & Jain, 1992, citado por Pitt & Hocking). Algumas vezes, eles podem parasitar tecidos de plantas, causando podridão em tubérculos e frutos.

2.5.3 *Penicillium roqueforti*

Penicillium roqueforti é um fungo saprófita comum, amplamente difundido na natureza e pode ser isolado do solo, das substâncias orgânicas, etc. Está agrupado como fungo imperfeito.

O *Penicillium roqueforti* é considerado um dos fungos contaminantes mais importantes em bebidas, como cerveja e vinho e em produtos cárneos, em ovos, em queijo, em pão e em cereais no armazenamento hermético (Frisvad & Samson, 1991). Ele cresce uniforme na presença de ácido láctico a 5% (Moreau, 1979). A maioria das cepas também é resistente ao ácido sórbico (Liewen & Marth, 1985).

O principal uso industrial do fungo *P. roqueforti* está na produção do queijo roquefort. É também usado para produzir compostos que podem ser empregados como antibióticos, aromatizantes e fragrâncias (Sharpell, 1985).

Duas variedades foram designadas por Frisvad & Filtenborg (1989): *P. roqueforti* var. *roqueforti*, utilizada na produção de queijo e *P. roqueforti* var. *carneum*, um fungo deteriorante. Estas variedades diferem na produção de micotoxinas e, até certo ponto, na ecologia. Entretanto, com base na produção de metabólitos secundários, estas duas variedades permanecem muito próximas (Svendsen & Frisvad, 1994).

Recentemente, tendo como base as diferenças moleculares, o *P. roqueforti* foi separado em 3 espécies: *P. roqueforti*, *P. carneum* e *P. paneum*,

sendo as duas últimas indistinguíveis por técnicas morfológicas (Boysen et al., 1996).

A variação em características macroscópicas pode confundir a identificação, e a análise de metabólitos secundários é, conseqüentemente, um complemento útil sempre que toda a incerteza existir no que diz respeito à identificação das subespécies *do P. roqueforti*.

O *Penicillium roqueforti* cresce vigorosamente em temperatura de refrigeração (psicrófilo), mas não acima de 35°C (Moreau, 1979). O *Penicillium roqueforti* var. *carneum* produz patulina e ácido penicílico. Produz ainda roquefortina C e ácido micofenólico, mas estes dois últimos compostos têm muito baixa toxicidade (Scott, 1984).

2.5.4 Micotoxinas em alimentos

São metabólitos secundários produzidos por fungos filamentosos, liberados ou não no substrato nos quais eles crescem. A enfermidade oriunda da ingestão desses metabólitos fúngicos, geralmente por meio de alimentos contaminados, denomina-se micotoxicose, podendo causar ao animal ou ser humano, vários problemas relacionados ao crescimento, funções do organismo, desenvolvimento de tumores, podendo, inclusive, ser letal (Scussel, 1998).

As micotoxinas já foram detectadas em quase todos os tipos de alimentos, como o arroz, milho, feijão, trigo, soja, cevada, castanha do Brasil, amendoim, mandioca, café, sorgo, semente de algodão, frutas, presunto, queijo, leite, cerveja, vinho, etc.

Micotoxinas em geral podem estar nos alimentos em concentrações muito baixas, como ng (ppb), não sendo percebidas por não afetarem as propriedades sensoriais, principalmente odor e sabor, devido ao alimento não estar aparentemente bolorento.

Existem diferenças entre as espécies de fungos produtoras da mesma toxina quanto à habilidade de produzi-la. As cepas dentro da mesma espécie também têm diferenças em toxigenicidade.

O grande interesse pelo estudo das micotoxinas deve-se à ameaça à saúde pública e ao prejuízo à economia nacional, já que muitas micotoxinas encontram-se naturalmente presentes em vários produtos agrícolas e a atividade biológica destes metabólitos tóxicos varia desde efeitos carcinogênicos, mutagênicos e teratogênicos até a produção de desordens hormonais.

Fungos produtores de micotoxinas podem ser classificados em três grupos, de acordo com o hábitat e o substrato oferecido para o desenvolvimento: fungos de campo, que contaminam as plantas mesmo antes da colheita; fungos de armazenamento, que se desenvolvem durante o armazenamento do alimento e fungos de decomposição, que levam o alimento a um estado de decomposição, tornando-o impróprio para o consumo (Concon, 1988; Mídio & Martins, 2000).

A FAO estima que cerca de 5% a 10% da produção anual de grãos são perdidos em função da deterioração provocada por microrganismos, na sua maioria fungos, durante o armazenamento. Estas perdas ocorrem, principalmente, em países de clima tropical e subtropical devido às condições favoráveis de umidade e temperatura.

Dentre as principais medidas de controle do desenvolvimento de fungos em grãos armazenados estão: secagem dos grãos, aeração e controle da temperatura do ambiente de armazenamento e uso de inibidores fúngicos.

O gerenciamento da contaminação por micotoxinas é um assunto complexo, visto que este envolve a saúde pública e a disponibilidade de alimentos, bem como outros fatores sociais e econômicos. Um integrado programa de controle de micotoxina somente terá sucesso no momento em que prevenção, controle, boas práticas agrícolas e de processamento, e controle de

qualidade forem utilizadas durante todos os estádios da produção (Lopez-Garcia, 2000; Pereira, 2001).

2.6 Outros atributos indicadores do tempo de prateleira dos alimentos

A qualidade dos alimentos é também definida por um conjunto de atributos demonstrados, principalmente, pela análise sensorial, análise de cor e análise microbiológica.

A complexa sensação, que resulta da interação de nossos sentidos, é usada para medir a qualidade do alimento em programas de controle de qualidade, no qual uma equipe pode dar respostas que indicarão: a preferência entre as amostras, a seleção do melhor processo e a determinação do grau ou nível de qualidade do produto. A análise sensorial pode ainda auxiliar no desenvolvimento de produtos novos, medindo a aceitação do consumidor para esse determinado produto (Moraes, 1993).

Segundo Morales (1994), a análise sensorial é uma técnica de análise tão importante como os métodos químicos, físicos, microbiológicos, etc. Este tipo de análise tem a vantagem de que a pessoa que efetua as medições leva consigo seus próprios instrumentos de análises, ou seja: os sentidos.

Os testes afetivos são utilizados quando se necessita conhecer o “status afetivo” dos consumidores com relação ao(s) produto(s) e, para isso, utilizam-se as escalas hedônicas. Dos valores relativos de aceitabilidade, pode-se inferir a preferência e vice-versa (Ferreira et al., 2000).

Um exemplo de escala hedônica bastante usada, segundo Chaves (1980), é a que tem nove categorias. São usadas diferentes formas de escala hedônica, sem maiores efeitos sobre os resultados. Podem ser utilizadas algumas alternativas na forma da escala, como: exclusão da categoria neutra, uso de mais categorias gosta que desgosta e redução do número de categorias (menos que

cinco categorias não é recomendado). As variações na forma da escala tendem a não interferir nas medidas relativas que devem permanecer constantes.

Os sinais de deterioração representados pelo crescimento de microrganismos, mesmo que insipiente, limitam o tempo de prateleira dos alimentos.

Para Nazato (1991), os produtos de panificação frescos são facilmente perecíveis e muito sensíveis às práticas dos métodos de conservação, estocagem e distribuição. As características dos produtos de panificação declinam rapidamente a partir do momento que são retirados do forno.

Segundo Legan (1993), pão é um dos principais alimentos consumidos no mundo e pode ser deteriorado por muitos fungos, dos quais espécies de *Penicillium*, sem dúvida, são as mais comuns. Entretanto, a deterioração dominante varia com o tipo de pão e a temperatura de estocagem.

O “emboloramento” é o tipo de deterioração mais importante nos produtos de panificação, sendo causado pelo desenvolvimento de fungos. Os pães devem ser resfriados sobre grades, para evitar a formação de umidade, possibilitando melhor conservação. Devem ser embalados somente depois de totalmente frios, pois, se embalados mornos, podem favorecer o crescimento de bolor (Pazinato, 1999).

Segundo Martinelli Filho (1987), os métodos de conservação de alimentos dependem dos ingredientes, da formulação, do tipo de acondicionamento, do método de preservação, da temperatura e da circulação de ar, entre outros. A deterioração por fungos pode ser favorecida por várias causas, tais como: 1) tempo de resfriamento muito prolongado do produto, contaminação muito densa do ar, intensa e desnecessária circulação de ar na sala, etc.; 2) fatiamento, operação na qual maior quantidade de ar é introduzida no pão, além do perigo de forte contaminação nas próprias lâminas cortadoras; 3)

acondicionamento dos pães ainda quentes com posterior evaporação e condensação de água e 4) armazenamento dos pães em lugar quente e úmido.

O crescimento de fungos em pães pode ser reduzido por um conjunto de técnicas denominadas de boas práticas de fabricação, como, por exemplo, uso de matéria-prima de boa qualidade, atenção para higiene dentro da área de manipulação, embalagem e estoque e higiene dos manipuladores, para reduzir a oportunidade de acesso de esporos de fungos nos produtos, dentre outros procedimentos.

No processo de panificação convencional, habitualmente, são utilizados preservativos (conservantes), sendo a escolha feita de acordo com a legislação de cada região e uso de novos ingredientes com propriedades antimofos.

Teoricamente, um conservante deverá matar os microrganismos, em vez de apenas inibi-los. Ele deverá ser eficiente contra os organismos prováveis de crescerem em alimentos, especialmente contra os contaminantes microbiológicos. Ele não poderá ser inativado pelo alimento, ou por qualquer substância que este contenha, ou por produtos do metabolismo microbiano. Se germicida, deverá ser decomposto e tornar-se inócuo ou deve ser destruído pela cocção. Não deverá estimular o desenvolvimento de “cepas” resistentes, conforme Martinelli Filho (1987).

Segundo El-Dash et al. (1982), as características internas e externas dos produtos de panificação dependem da qualidade, da quantidade e do tipo dos ingredientes da formulação, tipo de fermentação, tempo e temperatura de cozimento e práticas complementares do processamento.

O aspecto dos alimentos no caso de produtos de panificação, particularmente alterações na coloração, é um fator que, aliado aos demais atributos, pode limitar a preferência dos consumidores.

Para os produtos que se destinam à venda a um público consumidor leigo, no varejo, a aparência torna-se um fator básico ao sucesso da

comercialização. Pode-se citar a cor como de grande importância, pois, a maioria dos produtos é comercializada em exposição e o comprador, usualmente, é atraído pelo aspecto visual.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Foram realizados testes *in vitro* no Laboratório de Fitopatologia do EcoCentro da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG), localizado na Universidade Federal de Lavras (UFLA), município de Lavras, Minas Gerais e no Laboratório de Fitopatologia do Centro Regional de Desenvolvimento Rural Centro Serrano (CRDR-CS) do Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural (Incaper), localizado no município de Domingos Martins, Espírito Santo.

3.1 Isolamento, identificação e seleção dos fungos de pães artesanais

Os fungos dos testes *in vitro* foram isolados, identificados e selecionados a partir de dois lotes de pães artesanais, compondo um total de dez pães de sal e dez pães doces, coletados no município de Venda Nova do Imigrante, ES, no mês de agosto de 2003, de dois produtores do Centro Regional de Desenvolvimento do Agroturismo (AGROTUR).

Os pães foram transportados para o Laboratório de Fitopatologia do EcoCentro/EPAMIG, Lavras, MG e para o Laboratório de Fitopatologia do Incaper/CRDR-CS, Domingos Martins, ES e armazenados em prateleira até o aparecimento de fungos. Estes foram então, isolados, purificados e identificados segundo Raper & Fennell (1965), Christensen (1981) e (1982), Klich & Pitt (1988), Klich (1993), Sansom et al. (1995) citados por Pitt & Hocking (1997).

Posteriormente à identificação dos fungos, foram selecionados três para a realização da pesquisa.

3.2 Obtenção dos condimentos e preparação dos extratos

As ervas aromáticas e condimentares (condimentos) selecionadas para os testes *in vitro* e *in vivo* foram: alho (*Allium sativum* L.), canela (*Laurus cinnamomum* L.), cravo-da-índia (*Caryophyllus aromaticus* L.), gengibre (*Zingiber officinalis* Roscoe), orégano (*Origanum vulgare* L.) e tomilho (*Thymus vulgare* L.).

As ervas aromáticas e condimentares desidratadas foram obtidas da empresa Santos Flora Comércio de Ervas Ltda, São Paulo, SP, devidamente identificadas e embaladas. O orégano fresco foi coletado no Horto Medicinal da UFLA e o alho e gengibre frescos foram adquiridos no comércio de Lavras, MG e imediatamente transportados para o Laboratório de Fitopatologia do EcoCentro/EPAMIG.

Os condimentos desidratados foram moídos em moinhos elétricos TECNAL TE650 e Quimis-298A21 e imediatamente preparados os extratos alcoólicos a 25%. Cada condimento dessecado moído e previamente pesado ficou macerando em álcool de cereais 70%, em vidro âmbar esterilizado, em ambiente protegido da ação da luz e calor, sendo o recipiente agitado diariamente e o extrato filtrado em papel de filtro após 20 dias. Posteriormente foram feitas as diluições para 10% e 20% sendo a forma de preparação segundo os métodos farmacêuticos básicos – maceração (Farmacopéia Homeopática Brasileira II, 1997).

O extrato alcoólico (EA) das plantas frescas foi preparado a 10%, conforme indicação da Farmacopéia Homeopática Brasileira II (1997). Foram pesados 100g de plantas frescas, triturados em processador doméstico e colocados em vidro âmbar esterilizado com 1.000mL de álcool de cereais 96,28% em ambiente protegido da ação da luz e calor, sendo o recipiente agitado diariamente e o extrato filtrado em papel de filtro após 10 dias. Todos os extratos alcoólicos foram preparados em dezembro de 2003.

O extrato aquoso (EAQ) a 10% foi preparado no dia da montagem do experimento, por infusão, vertendo-se, em um Bequer 100mL de água destilada fervente sobre 10g de cada condimento desidratado, agitado para homogeneização, coberto com papel alumínio, deixado em repouso até esfriar e filtrado em papel de filtro pregueado dentro da capela de fluxo laminar.

3.3 Testes *in vitro*

3.3.1 Avaliação da velocidade de crescimento micelial (IVCM) dos fungos em extratos alcoólicos e aquosos dos condimentos

Avaliou-se *in vitro* a atividade fungitóxica dos extratos sobre o crescimento micelial e esporulação de colônias jovens (7 a 10 dias) dos fungos *Aspergillus ochraceus*, *Penicillium roqueforti* e *Rhizopus stolonifer*. O experimento foi conduzido de janeiro a abril de 2004.

A avaliação dos extratos dos condimentos alho, gengibre e orégano foi feita em delineamento inteiramente casualizado, com sete tratamentos e três repetições para cada erva. Os tratamentos foram: extrato alcoólico (EA) a 10%, 20% e 25%, extrato aquoso (EAQ) a 10%, extrato alcoólico das plantas frescas (EAF) a 10% com bulbos de alho, raízes de gengibre e folhas de orégano, testemunha (sem extrato e sem álcool) e extrator alcoólico puro (EAP) – álcool de cereais a 96,28%, que foi incluído em cada teste dos diferentes condimentos considerando-se que esses testes foram feitos separadamente utilizando-se os mesmos gêneros e espécies dos fungos testados, mas diferentes isolados. As culturas puras utilizadas para os testes não foram originadas de um único esporo (monospórica), refletindo o que ocorre sob condições naturais (ambiente das agroindústrias).

A avaliação dos extratos dos condimentos cravo, canela e tomilho foi igual à de alho, gengibre e orégano, exceto por não conter o extrato alcoólico das plantas frescas (EAF) a 10%, não incluído porque o cravo e a canela,

tradicionalmente, são utilizados desidratados e difíceis de serem encontrados frescos e o tomilho fresco não foi encontrado no momento da montagem do experimento.

Em capela de fluxo laminar, os extratos foram solubilizados na proporção de 2mL de cada extrato para 18mL do meio BDA (batata, dextrose, ágar) à temperatura média de 55°C, previamente dissolvido em microondas, estando, acrescido de 0,02g de cloranfenicol por 200mL de BDA, para inibir o desenvolvimento de bactérias. As soluções foram transferidas para placas de Petri previamente esterilizadas. Ver-teu-se apenas BDA com cloranfenicol para placas que serviram de testemunhas. O extrator alcoólico puro (EAP) foi preparado misturando-se 2mL do álcool de cereais em 18mL de BDA com cloranfenicol, para testar a atuação do álcool. As placas foram secas em capela com fluxo laminar e luz ultravioleta.

Com o auxílio de palitos de madeira, esterilizados em autoclave (20 minutos a 121°C), os fungos foram inoculados no centro das placas de Petri que, posteriormente, foram lacradas com filme PVC e incubadas em BOD a 25 ±1°C, com fotoperíodo de 12 horas, durante 10 dias. Durante este período de crescimento, foram efetuadas medições ortogonais diárias do diâmetro das colônias (cm). Os resultados foram utilizados para o cálculo do índice de velocidade do crescimento micelial dos fungos (IVCM) utilizando-se a fórmula de Maguire, adaptada por Oliveira (1991):

$$IVCM = \frac{\sum_{i=1}^N (D_i - D_{i-1})}{N}$$

Onde: IVCM= índice de velocidade de crescimento micelial

D= diâmetro médio da colônia (cm)

N= número de dias após a inoculação.

Devido à natureza dos dados, esses foram transformados em raiz quadrada de $y+1$ para fins de análise estatística. Os efeitos de tratamentos foram avaliados pelo teste F e, quando houve efeito significativo, aplicou-se o teste de Tukey. Os efeitos dos tratamentos somente com extratos alcoólicos foram avaliados pelo teste F e, quando houve efeito significativo, as variáveis foram submetidas à análise de regressão.

3.3.2 Avaliação da esporulação dos fungos em extratos alcoólicos e aquosos dos condimentos

A contagem de esporos foi realizada no décimo dia. As placas de Petri nas quais ocorreu crescimento micelial do fungo, foram lavadas com 10mL de água destilada estéril e homogeneizadas com bastão de vidro. Depois deste procedimento, filtrou-se em gaze e uma gota deste filtrado foi colocada em câmara de Neubauer e feita a leitura em 5 campos e 3 repetições. Foi feito então o cálculo para transformação do volume da suspensão utilizada na Câmara de Neubauer, para 1mL da suspensão e o resultado expresso em mL.

Devido à natureza dos dados, esses foram transformados em logaritmo na base 10, para fins de análise estatística. Os efeitos de tratamentos foram avaliados pelo teste F e, quando houve efeito significativo, aplicou-se o teste de Tukey. Os efeitos dos tratamentos somente com extratos alcoólicos foram avaliados pelo teste F e, quando houve efeito significativo, as variáveis foram submetidas à análise de regressão.

3.4 Testes *in vivo*

Após os resultados dos testes *in vitro*, foram realizados os testes *in vivo*. Os pães utilizados tiveram como base formulações utilizadas pelos produtores de Venda Nova do Imigrante, ES (Figura 1). A formulação do pão doce artesanal utilizado na pesquisa contém os seguintes ingredientes, 250mL de açúcar,

250mL de água morna, 500mL de leite morno, 150mL de óleo, 1 colher (de sopa) rasa de sal, 3 ovos e 90g de fermento biológico. O pão de sal artesanal contém: 250mL de água morna, 500mL de leite morno, 150mL de óleo, 3 ovos, 90g de fermento biológico, 4 colheres de açúcar e 2 colheres (de sopa) de sal.

A mistura dos ingredientes inicialmente foi feita com auxílio de uma colher e, a seguir, com as mãos, até homogeneizar bem os ingredientes e formar a massa. A sovagem também foi feita com as mãos até a massa tornar-se macia, elástica e apresentar bolhas de ar. Os pães foram assados em fornos domésticos (Figura 1).

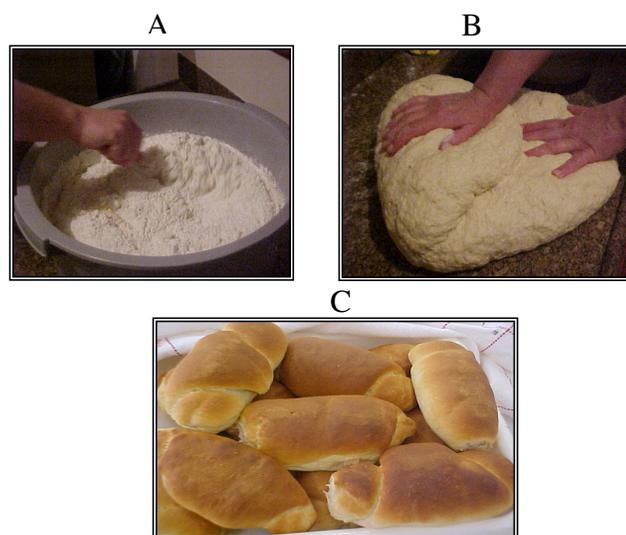


FIGURA 1 Processo de mistura dos ingredientes para a formação da massa dos pães pesquisados (A); sovagem à mão da massa dos pães (B); pães artesanais assados (C). Venda Nova do Imigrante, ES, 2005.

O fluxograma da produção do pão artesanal é similar ao fluxograma do pão convencional. Na presente pesquisa na qual aplicaram-se extratos de condimentos, no interior de sacos de PEBD, a alteração no fluxograma de produção fica por conta apenas da etapa de aplicação dos EA, conforme apresentado na Figura 2.

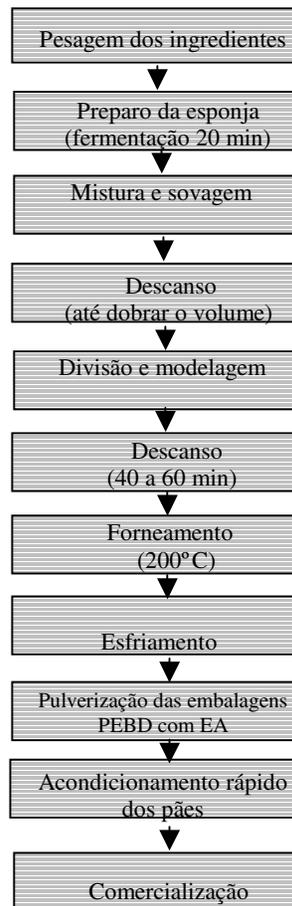


FIGURA 2: Fluxograma da produção de pães artesanais utilizados nos testes *in vivo*.

Os testes *in vivo* compreenderam as seguintes etapas: 1) avaliação visual de contaminação de pães artesanais; 2) avaliação da atividade fungitóxica de EA em pães artesanais; 3) análise sensorial; 4) análise de cor; 5) análise microbiológica dos pães aplicando-se as boas práticas de fabricação e tratamentos com EA.

As três primeiras etapas foram conduzidas com pães fabricados por produtores da agroindústria artesanal, membros integrantes do Centro Regional de Desenvolvimento do Agroturismo (AGROTUR), localizado no município de Venda Nova do Imigrante, ES.

A análise de cor (etapa 4) foi realizada no Laboratório de Grãos e Cereais do Departamento de Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras (UFLA), MG. Os pães destinados à análise foram fabricados na Panificadora P&C, localizada no município de Lavras, MG.

A avaliação visual e a análise microbiológica dos pães, aplicando-se as BPF e tratamentos com EA (etapa 5), foram realizadas no Laboratório de Fitopatologia do Incaper/CRDR-CS, Domingos Martins, ES.

3.4.1 Avaliação visual da contaminação de pães artesanais

Foram coletados cinco pães doces e cinco de sal, de cinco produtores artesanais designados pelas letras A, B, C, D, E, perfazendo o total de 25 pães doces e 25 pães de sal. O delineamento estatístico foi inteiramente casualizado (DIC). Os efeitos de tratamentos foram avaliados pelo teste F e, quando houve efeito significativo, aplicou-se o teste de Scott-Knott.

Os produtores fazem parte do Centro Regional de Desenvolvimento do Agroturismo em Venda Nova do Imigrante, ES. O experimento foi conduzido no mês de maio de 2004.

Os pães foram transportados para o Laboratório de Fitopatologia do Incaper/CRDR-CS, onde foram dispostos em prateleiras e mantidos em

condições ambientais de temperatura e umidade, semelhantes às condições que são armazenados nos pontos de venda das propriedades e comércio local. Durante a presente etapa do trabalho, mediu-se, duas vezes ao dia, a umidade relativa do ar com psicrômetro e as temperaturas mínima e máxima, com termômetro extremo TK.

Foi realizada observação diária da contaminação do lote de pães por microrganismos, através da avaliação visual com lupa manual, anotando-se o dia anterior ao aparecimento de microrganismos como um dos indicadores do tempo de prateleira daquela amostra.

3.4.2 Avaliação da atividade fungitóxica de EA em pães artesanais

Em pães de sal foram utilizados extratos alcoólicos (EA) dos condimentos cravo, tomilho, alho, orégano e gengibre a 5%, 10%, 15% e 20%. O quinto tratamento utilizado foi o extrator alcoólico puro (EAP) e o sexto tratamento foi a testemunha (sem extrato e sem álcool).

De acordo com a utilização popular dos condimentos na culinária da região estudada, foi observada a combinação do condimento com o tipo de pão. O cravo e o gengibre foram utilizados nas pulverizações das embalagens, tanto para pão doce como para pão de sal porque são condimentos de uso comum, tanto em pratos doces como em pratos salgados. A canela é mais utilizada em pratos doces e, por isso, foi utilizada para pulverizar as embalagens somente dos pães doces. O alho, o orégano e o tomilho são comumente utilizados em receitas de pratos salgados, então, foram usados somente nos sacos plásticos que embalarão os pães de sal.

Em pães doces foram utilizados extratos alcoólicos dos condimentos cravo, canela e gengibre a 5%, 10%, 15% e 20%. O quinto tratamento utilizado foi o extrator alcoólico puro (EAP) e o sexto tratamento foi a testemunha (sem extrato e sem álcool).

Aplicaram-se em média, 2,5mL de cada extrato alcoólico (EA) e também do extrator alcoólico puro (EAP) dentro dos sacos plásticos transparentes de polietileno de baixa densidade (PEBD), com pulverizador manual, até total cobertura da superfície interna dos mesmos e, imediatamente, os pães de 50g cada foram embalados, etiquetados e mantidos em prateleira, em condições de temperatura e umidade ambiente, como ficam expostos nos pontos de venda para comercialização. Foram monitorados duas vezes ao dia, a temperatura e a umidade relativa do ar, com psicrômetro e as temperaturas mínima e máxima, com termômetro extremo TK. O experimento foi realizado no mês de junho de 2004, na agroindústria do produtor C, na etapa de avaliação visual da contaminação de pães artesanais.

Diariamente, foi observada contaminação do lote de pães por microrganismos, por meio da avaliação visual com lupa manual, anotando-se o dia anterior ao aparecimento de microrganismos como um dos indicadores do tempo de prateleira daquela amostra. A duração dessa etapa foi fixada para quinze dias, tempo este estabelecido perante as alterações na textura.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com seis tratamentos e três repetições. Os efeitos de tratamentos foram avaliados pelo teste F e, quando houve efeito significativo, aplicou-se o teste de Tukey. Os efeitos dos tratamentos somente com extratos alcoólicos foram avaliados pelo teste F e, quando houve efeito significativo, as variáveis foram submetidas à análise de regressão.

3.4.3 Análise sensorial

O teste de aceitabilidade foi aplicado para mensurar a aceitação dos pães pelos consumidores, já que os extratos alcoólicos dos condimentos aplicados no interior das embalagens alteram o sabor dos mesmos. As amostras foram os pães

embalados em sacos plásticos de PEBD, pulverizados com os extratos alcoólicos.

Esta etapa foi realizada na Loja do AGROTUR, Venda Nova do Imigrante, ES, no dia 08 de junho de 2004, de 7 às 17 horas. Participaram do teste 107 consumidores, com idade entre 14 e 77 anos. Utilizou-se a escala hedônica de oito pontos: gosta extremamente, gosta muito, gosta moderadamente, gosta pouco, desgosta pouco, desgosta moderadamente, desgosta muito e desgosta extremamente, em que os consumidores escolheram as amostras de sua preferência e marcaram em fichas individuais (Tabela 9A) que, posteriormente, foram tabuladas e os resultados foram submetidos à análise de variância utilizando-se o programa do SISVAR.

Realizou-se o teste de aceitabilidade com pães artesanais impregnados com extrato alcoólico a 10% de cada um dos condimentos: cravo, tomilho, orégano, alho e gengibre para pão de sal e cravo, canela e gengibre para pão doce. Ambos os tipos de pães também foram submetidos ao tratamento com EAP, compondo seis amostras de pão de sal e quatro amostras de pão doce.

3.4.4 Análise de cor

A análise de cor foi realizada por meio de colorímetro Minolta, modelo CR- 300, utilizando-se os padrões CIE $L^*a^*b^*$:

L^* variando de zero (preto) a 100 (branco);

a^* de verde (-60) ao vermelho (+60);

b^* de azul (-60) ao amarelo (+60).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2×7 , com três repetições, sendo os fatores dois tipos de extrato e os dias para avaliação. Foram utilizados 14 pães artesanais de sal com embalagens pulverizadas com extrato alcoólico de tomilho e extrato alcoólico de gengibre, ambos a 10%. Para os pães artesanais doces, foram utilizados 14 pães com

extratos alcoólicos a 10% de cravo e canela. Nesta etapa, não foram utilizadas testemunhas (sem EA e sem álcool) devido à baixa durabilidade dos pães que apresentam presença de deterioração por microrganismos, aproximadamente no 4º dia após fabricação.

As leituras foram efetuadas nas cascas dos pães (parte externa) em 10 pontos diferentes em cada tratamento nos dois tipos de pães. Os testes foram realizados no dia da fabricação e no 2º, 4º, 6º, 8º, 10º e 12º dias após a fabricação dos pães. O experimento foi conduzido no mês de julho de 2004.

A diferença de cor (ΔE^*) foi calculada de acordo com a seguinte equação:

$$\Delta E^* = [(L^*)^2 + (a^*)^2 + (b^*)^2]^{0,5}$$

em que L^* , a^* e b^* são os diferenciais entre os cromas das amostras e do padrão branco.

Os padrões de cor de pães artesanais não foram encontrados em literatura para comparação/afereção, sendo a análise de cor realizada, portanto, para medir a variação deste parâmetro no tempo de armazenagem.

3.4.5 Análise microbiológica dos pães aplicando-se as boas práticas de fabricação (BPF) e tratamentos com EA

Como a análise visual com lupa é limitada, nesta etapa também foi feita a análise microbiológica das cascas e miolos dos pães. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 4x9, com cinco repetições, sendo os fatores os tipos de extratos e os dias de avaliação.

Foram utilizados 27 pães de sal com embalagens pulverizadas com EA 10% de tomilho e gengibre e duas testemunhas sem extrato e sem álcool e 27 pães doces com EA 10% de cravo e canela e duas testemunhas sem extrato e sem álcool.

Os testes foram realizados no 1º, 3º, 5º, 7º, 9º, 11º, 13º, 15º e 17º dias após a fabricação dos pães. Na oportunidade, foram plaqueados cinco fragmentos de miolo e cinco fragmentos de casca dos pães, com três repetições em meio BDA com 0,01% de cloranfenicol. As placas de petri foram lacradas com filme PVC e incubadas em BOD a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ com fotoperíodo de 12 horas. A leitura das placas foi feita no sétimo dia, anotando-se a presença ou a ausência de fungos.

Os pães foram fabricados empregando-se as BPF, aplicando-se ações corretivas baseadas em observações realizadas durante o processamento e embalagem dos pães, junto aos produtores, nas etapas anteriores.

O experimento foi conduzido no mês de agosto de 2004, no Laboratório de Fitopatologia do CRDR-CS/Incaper. Os pães foram armazenados em prateleiras à temperatura ambiente. Monitoraram-se duas vezes ao dia a temperatura e a umidade relativa do ar, com psicrômetro e temperatura mínima e máxima, com termômetro extremo TK.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Isolamento, identificação e seleção dos fungos de pães artesanais

Os fungos isolados e identificados em dez pães de sal e dez pães doces coletados de dois produtores do Centro Regional de Desenvolvimento do Agroturismo – AGROTUR, foram os seguintes:

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

Fusarium sp

Conforme constatação de Legan (1993), espécies do gênero *Penicillium*, sem dúvida, são as mais comuns encontradas em pães deteriorados. Entretanto, o agente causal da deterioração varia com o tipo de pão e a temperatura de estocagem.

Dos fungos identificados foram selecionados: *Penicillium roqueforti*, *Aspergillus ochraceus* e *Rhizopus stolonifer* para os testes *in vitro* (Figura 3).

O *Aspergillus ochraceus* foi selecionado para ser estudado por ser um fungo produtor de micotoxina extremamente danosa à saúde. O *Penicillium*

roqueforti foi selecionado para o estudo por ser produtor de micotoxinas, sendo um dos fungos causadores de danos econômicos pelo grande desenvolvimento nos pães. O *Rhizopus stolonifer*, que também foi selecionado para os testes, é um fungo comum em pães, tendo excessivo crescimento a 25°C e, por isso, causando rápida deterioração. As micotoxinas possivelmente envolvidas não estão bem esclarecidas (Pitt & Hocking, 1997).

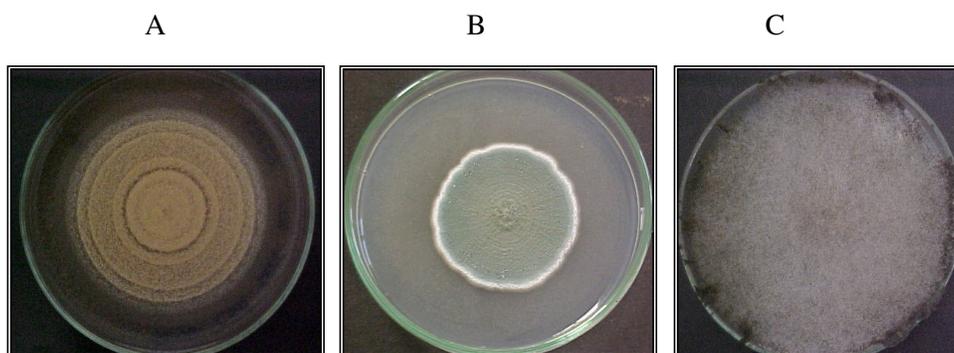


FIGURA 3 Colônias dos fungos: *Aspergillus ochraceus* (A), *Penicillium roqueforti* (B) e *Rhizopus stolonifer* (C) UFLA, MG, 2005.

4.2 Testes *in vitro*

Na Tabela 1 são apresentadas as médias do índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) dos fungos *Aspergillus ochraceus*, *Penicillium roqueforti* e *Rhizopus stolonifer* submetidos a sete tratamentos com alho, gengibre e orégano: EA 10%, EA 20% e EA 25%, EAQ 10%, EAF 10%, testemunha (sem extrato e sem álcool) e EAP e seis tratamentos para cravo, canela e tomilho: EA 10%, EA 20% e EA 25%, EAQ 10%, testemunha (sem extrato e sem álcool) e EAP.

TABELA 1 Médias do Índice de velocidade do crescimento micelial (IVCM) *in vitro* dos fungos *Aspergillus. ochraceus*, *Penicillium. roqueforti* e *Rhizopus stolonifer* submetidos a diferentes concentrações de extratos de alho, gengibre, orégano, cravo, tomilho e canela. UFLA, MG, 2005.

Tratamentos	IVCM					
	alho			gengibre		
	<i>Aspergillus ochraceus</i>	<i>Penicillium roqueforti</i>	<i>Rhizopus stolonifer</i>	<i>Aspergillus ochraceus</i>	<i>Penicillium roqueforti</i>	<i>Rhizopus stolonifer</i>
EAP	0,258 a	0,224 a	0,000 a	0,287 b	0,000 a	0,469 a
EA 10%	0,135 a	0,130 a	0,000 a	0,000 a	0,000 a	0,104 a
EA 20%	0,157 a	0,528 a	0,000 a	0,000 a	0,000 a	0,000 a
EA 25%	0,079 a	0,636 ab	0,000 a	0,115 ab	0,000 a	0,000 a
EAF 10%	0,249 a	0,164 a	0,434 a	0,155 ab	0,000 a	0,090 a
EAQ 10%	0,000 a	0,344 a	0,000 a	1,645 c	1,164 b	6,855 b
Test	1,623 b	1,335 b	6,883 b	1,734 c	1,230 b	7,733 b
CV%	6,14	6,53	8,81	2,36	1,64	8,11
Tratamentos	orégano			Cravo		
	<i>Aspergillus ochraceus</i>	<i>Penicillium roqueforti</i>	<i>Rhizopus stolonifer</i>	<i>Aspergillus ochraceus</i>	<i>Penicillium roqueforti</i>	<i>Rhizopus stolonifer</i>
	EAP	0,000 a	0,050 a	2,833 ab	0,840 c	0,165 b
EA 10%	0,000 a	0,000 a	0,443 a	0,000 a	0,000 a	0,000 a
EA 20%	0,000 a	0,000 a	0,000 a	0,000 a	0,000 a	0,000 a
EA 25%	0,000 a	0,000 a	0,000 a	0,000 a	0,000 a	0,000 a
EAF 10%	0,000 a	0,000 a	2,728 ab	-----	-----	-----
EAQ 10%	1,503 b	1,092 b	7,317 b	0,583 b	0,413 c	0,076 b
Test	1,790 c	1,370 c	7,533 b	2,079 d	1,240 d	7,717 c
CV%	0,93	0,67	19,15	0,69	0,79	0,34
Tratamentos	tomilho			canela		
	<i>Aspergillus ochraceus</i>	<i>Penicillium roqueforti</i>	<i>Rhizopus stolonifer</i>	<i>Aspergillus ochraceus</i>	<i>Penicillium roqueforti</i>	<i>Rhizopus stolonifer</i>
	EAP	0,145 a	0,104 a	0,469 a	0,323 b	0,014 a
EA 10%	0,000 a	0,000 a	0,000 a	0,000 a	0,000 a	0,000 a
EA 20%	0,000 a	0,000 a	0,000 a	0,000 a	0,000 a	0,000 a
EA 25%	0,000 a	0,000 a	0,000 a	0,000 a	0,000 a	0,000 a
EAQ 10%	1,496 b	1,181 b	5,661 b	0,000 a	1,048 b	5,614 b
Test	1,814 b	1,352 c	6,039 b	1,823 c	1,265 c	8,092 c
CV%	2,66	1,31	7,35	3,01	1,02	1,28

** Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 1%.

1) EAP: extrator alcoólico puro; 2) EA: extrato alcoólico condimentos secos; 3) EAF: extrato alcoólico condimentos frescos; 4)EAQ: extrato aquoso.

Verifica-se que todos os extratos alcoólicos (EA) exerceram um significativo e, às vezes, total efeito inibitório sobre os fungos *Aspergillus ochraceus*, *Penicillium roqueforti* e *Rhizopus stolonifer*. Todos os tratamentos de EA foram superiores à testemunha na inibição dos fungos e não apresentaram diferenças significativas do EAF a 10% de alho, gengibre e tomilho. Em relação ao EAQ 10%, os EA foram superiores com gengibre, orégano, cravo e tomilho sobre os três fungos estudados e canela sobre *P. roqueforti* e *R. stolonifer*, não apresentando diferenças significativas com alho sobre os três fungos estudados e com canela sobre *A. ochraceus* (Tabela 1).

Os extratos alcoólicos de plantas desidratadas (EA) 10%, 20% e 25% inibiram totalmente o crescimento micelial dos fungos estudados, com exceção do EA 25% de alho sobre o *Penicillium roqueforti* e o EA 25% de gengibre sobre o desenvolvimento do *Aspergillus ochraceus* que não se diferenciaram da testemunha (Tabela 1).

O EAP exerceu um significativo e, às vezes, total efeito inibitório sobre os fungos, tendo sido superior a testemunha em todos os testes (Tabela 1). Em relação aos EA, o EAP promoveu menor inibição que EA 10% e EA 20% de gengibre sobre *A. ochraceus*, que os EA 10%, 20% e 25% de cravo sobre *A. ochraceus* e *P. roqueforti* e de canela sobre *A. ochraceus*. Comparado aos EAF, o EAP não se diferenciou nos testes com alho, gengibre e orégano. Em relação a EAQ, o EAP apresentou maior inibição nos tratamentos com gengibre e tomilho para os três fungos estudados, com orégano sobre *A. ochraceus* e *P. roqueforti* e com cravo e canela sobre *P. roqueforti* e *R. stolonifer*. O EAP apresentou menor inibição que EAQ 10% com cravo e canela sobre *A. ochraceus*, não se diferenciando nos outros testes.

O EAQ 10% do gengibre e a testemunha sem extrato e sem álcool apresentaram o mesmo comportamento na inibição do três fungos estudados. Os

EAQ 10% de cravo e canela tiveram um resultado significativamente superior ao das testemunhas na inibição dos fungos.

Ao se realizar a análise de regressão dos tratamentos com extratos alcoólicos, constata-se que houve significância para *Aspergillus ochraceus* e *Penicillium roqueforti* submetidos a extratos de gengibre e alho, respectivamente.

Na Figura 4 observa-se a representação gráfica, as equações de regressão e os coeficientes de determinação do índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) de *A. ochraceus* submetido a diferentes concentrações de EA de gengibre.

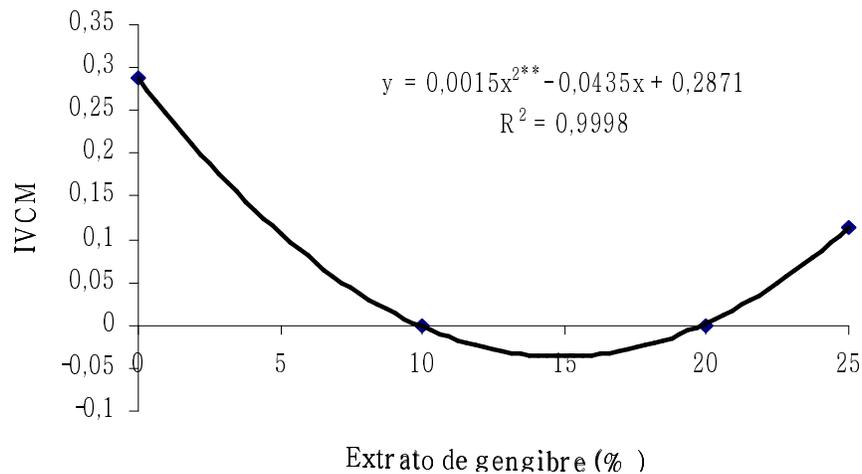


FIGURA 4 Representação gráfica, equação de regressão e coeficiente de determinação do índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) do fungo *Aspergillus ochraceus* submetido a diferentes concentrações de extrato alcoólico de gengibre. UFLA, MG, 2005.

O IVCM de *A. ochraceus* sob EA de gengibre apresenta dois pontos de mínimo nas concentrações de 10,2% e 18,8%, correspondente ao intervalo de 100% de inibição do crescimento micelial do fungo (Figura 4). Portanto, ocorreu uma redução do crescimento micelial até a concentração de 10,2% e um aumento a partir de 18,8% até 25%. Provavelmente, nas concentrações acima de 18,8%, os componentes do gengibre nutram o fungo, reduzindo o efeito inibidor.

Na Figura 5 observa-se a representação gráfica, equações de regressão e coeficientes de determinação do índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) de *Penicillium roqueforti* submetido a diferentes concentrações de extrato alcoólico de alho. Observa-se um aumento do crescimento micelial do fungo de 0,019cm/dia e um efeito não inibitório do condimento alho.

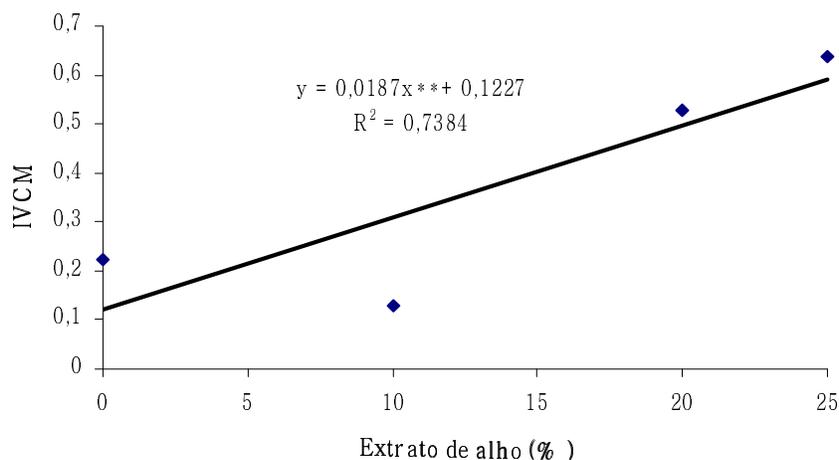


FIGURA 5 Representação gráfica, equação de regressão e coeficiente de determinação do índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) do fungo *Penicillium roqueforti* submetido a diferentes concentrações de extrato alcoólico de alho. UFLA, MG, 2005.

Em se tratando do extrato alcoólico de alho sobre o *Penicillium roqueforti*, verificou-se efeito não inibitório indicando que o alho promove o crescimento dos fungos devido aos seus componentes nutricionais. Franco (1987) cita que o alho apresenta, em sua composição nutricional, um teor de glicídios de 29,3g, 134 calorias, 5,30g de proteína e 0,20g de lipídios e o gengibre possui um teor de glicídios de 4,40g, 31,5 calorias, 1,87g de proteína e 0,72g de lipídios. Supõe-se que o sinergismo que ocorre entre os constituintes químicos dos condimentos possa também favorecer o comportamento apresentado nos testes realizados (Figuras 4 e 5).

Na Tabela 2 são apresentadas as médias da esporulação dos fungos *Aspergillus ochraceus*, *Penicillium roqueforti* e *Rizopus stolonifer*, que foram submetidos a extratos de alho, gengibre, orégano, cravo, tomilho e canela. Observa-se, nas Tabelas 3A e 4A do Anexo, que houve um total e, às vezes, significativo efeito inibitório dos extratos alcoólicos sobre a esporulação dos fungos, indicando um efeito positivo dos condimentos.

A testemunha apresentou maior esporulação, com diferença significativa dos extratos alcoólicos, inclusive os de planta fresca exceto, com gengibre e cravo sobre a esporulação do *R. stolonifer*.

Os tratamentos com gengibre e cravo sobre a esporulação do *R. stolonifer* não apresentaram diferenças significativas sobre os tratamentos.

Com relação ao extrato aquoso, verificou-se um efeito semelhante ao da testemunha, principalmente para o fungo *Penicillium roqueforti*, tendo a atuação do gengibre sobre a esporulação do *Aspergillus ochraceus* sido maior no tratamento com extrato aquoso que na testemunha. O extrato aquoso de alho inibiu totalmente a esporulação dos fungos *Aspergillus ochraceus* e *Rhizopus stolonifer*, igualando-se à atuação dos extratos alcoólicos, o que pode ser devido aos princípios voláteis do alho, pois o princípio ativo, a alicina, encontra-se na droga fresca sob a forma de um precursor inativo, a aliina. A trituração dos

bulbos provoca rápida reação enzimática por ação da enzima aliinase que converte a aliina em alicina, responsável pelo odor característico do alho, o qual é imediatamente reconhecido (Sousa et al., 1991).

TABELA 2 Esporulação *in vitro* dos fungos *Aspergillus ochraceus*, *Penicillium roqueforti*, *Rhizopus stolonifer* submetidos a diferentes concentrações de extratos de alho, gengibre, orégano, cravo, tomilho e canela. UFLA, MG, 2005.

Tratamentos	Alho			gengibre		
	<i>Aspergillus ochraceus</i>	<i>Penicillium roqueforti</i>	<i>Rhizopus stolonifer</i>	<i>Aspergillus ochraceus</i>	<i>Penicillium roqueforti</i>	<i>Rhizopus stolonifer</i>
EAP	0,05x10 ⁶ a	0,00 a	0,00 a	0,05x10 ⁶ a	0,00 a	0,05x10 ⁶ a
EA 10%	0,00 a	0,00 a	0,00 a	0,00 a	0,00 a	0,00 a
EA 20%	0,00 a	0,87x10 ⁶ ab	0,00 a	0,00 a	0,00 a	0,00 a
EA 25%	0,00 a	16,00x10 ⁶ ab	0,00 a	0,00 a	0,00 a	0,00 a
EAF 10%	0,00 a	0,00 a	0,03x10 ⁶ a	0,00 a	0,00 a	0,00 a
EAQ 10%	0,00 a	27,75x10 ⁶ ab	0,00 a	81,87x10 ⁶ c	267,00x10 ⁶ b	0,53x10 ⁶ a
Test	21,67x10 ⁶ b	182,75x10 ⁶ b	4,68x10 ⁶ b	40,97x10 ⁶ b	154,15x10 ⁶ b	0,20x10 ⁶ a
CV%	57,12	95,63	205,23	16,52	18,18	196,48
Tratamentos	orégano			cravo		
	<i>Aspergillus ochraceus</i>	<i>Penicillium roqueforti</i>	<i>Rhizopus stolonifer</i>	<i>Aspergillus ochraceus</i>	<i>Penicillium roqueforti</i>	<i>Rhizopus stolonifer</i>
EAP	0,00 a	0,00 a	0,17x10 ⁶ a	0,00 a	0,00 a	0,00 a
EA 10%	0,00 a	0,00 a	1,18x10 ⁶ a	0,00 a	0,00 a	0,00 a
EA 20%	0,00 a	0,00 a	0,00 a	0,00 a	0,00 a	0,00 a
EA 25%	0,00 a	0,00 a	0,00 a	0,62x10 ⁶ a	0,00 a	0,00 a
EAF 10%	0,00 a	0,00 a	1,37x10 ⁶ a	-----	-----	-----
EAQ 10%	15,75x10 ⁶ b	99,55x10 ⁶ b	3,12x10 ⁶ a	16,13x10 ⁶ b	5,58x10 ⁶ b	0,00 a
Test	244,53x10 ⁶ c	127,50x10 ⁶ b	4,62x10 ⁶ a	28,77x10 ⁶ c	46,52x10 ⁶ c	0,85x10 ⁶ a
CV%	11,33	27,92	106,21	12,54	26,26	329,18
Tratamentos	tomilho			canela		
	<i>Aspergillus ochraceus</i>	<i>Penicillium roqueforti</i>	<i>Rhizopus stolonifer</i>	<i>Aspergillus ochraceus</i>	<i>Penicillium roqueforti</i>	<i>Rhizopus stolonifer</i>
EAP	0,00 a	0,00 a	1,95x10 ⁶ a	0,00 a	0,00 a	0,00 a
EA 10%	0,00 a	0,00 a	0,00 a	0,00 a	0,00 a	0,00 a
EA 20%	0,00 a	0,00 a	0,00 a	0,00 a	0,00 a	0,00 a
EA 25%	0,00 a	0,00 a	0,00 a	0,00 a	0,00 a	0,00 a
EAF 10%	-----	-----	-----	-----	-----	-----
EAQ 10%	59,22x10 ⁶ b	65,20x10 ⁶ b	6,25x10 ⁶ a	20,20x10 ⁶ b	38,75x10 ⁶ b	5,12x10 ⁶ b
Test	47,40x10 ⁶ b	82,90 x10 ⁶ b	3,05x10 ⁶ a	19,39x10 ⁶ b	131,00x10 ⁶ c	5,33x10 ⁶ b
CV%	16,20	19,51	119,74	13,30	26,51	53,20

** Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 1%.

1)EAP: extrator alcoólico puro; 2) EA: extrato alcoólico condimentos secos; 3) EAF: extrato alcoólico condimentos frescos; 4)EAQ: extrato aquoso.

O efeito dos EAP sobre os fungos estudados foi semelhante ao dos demais extratos alcoólicos, apresentando pequena esporulação sem, contudo, apresentar diferença significativa em relação aos outros tratamentos.

Observa-se que o comportamento dos extratos alcoólicos de cravo, tomilho e canela sobre a inibição da esporulação dos fungos foi total, indicando efeito positivo dos condimentos na inibição da esporulação, com diferença significativa dos demais tratamentos (Tabela 2).

Quanto à inibição da esporulação, pelos extratos aquosos, não houve eficiência dos tratamentos em todos os condimentos sobre os fungos, diferindo significativamente dos extratos alcoólicos, exceto no extrato aquoso de cravo sobre o *R. stolonifer*, em que não ocorreu esporulação em nenhum tratamento.

Constata-se, pelos dados das Tabelas 1 e 2, que o comportamento do EAP foi significativamente superior ao do extrato aquoso e da testemunha, tanto na inibição do desenvolvimento micelial quanto na esporulação para a maioria dos testes realizados, porém, esse comportamento foi instável. Esse resultado é concordante com o de Pelczar (1980), que descreve que, apesar do álcool ser um agente antimicrobiano, ele não atua sobre as células vegetativas sendo inerte contra os esporos bacterianos. Comparando-se os dados obtidos com o que foi descrito pelo autor, pode-se inferir que o mesmo que ocorre com as bactérias pode vir a ocorrer com os fungos.

4.3 Testes *In Vivo*

4.3.1 Avaliação visual da contaminação de pães artesanais

Os produtores de Venda Nova do Imigrante, ES que participaram da pesquisa estão representados no texto pelas letras A, B, C, D, E. A média da umidade relativa do ar no período de avaliação foi de 80,5% e a temperatura variou de 18,5°C a 24°C.

Observam-se, pelos dados da Tabela 3, as médias da conservação microbiológica estabelecida de acordo com a avaliação visual da contaminação de pão de sal e doce, produzidos pelos cinco produtores artesanais com a tecnologia da região, sem a aplicação dos EA dos condimentos.

TABELA 3 Médias da conservação microbiológica avaliada visualmente, de pães de sal e doce, produzidos por cinco produtores artesanais. Venda Nova do Imigrante, ES, 2005.

Produtor	Pão de sal	Produtor	Pão doce
	Conservação microbiológica avaliada visualmente (dias)		Conservação microbiológica avaliada visualmente (dias)
A	3,0 a	C	2,8 a
E	3,4 a b	E	3,6 a b
C	3,4 a b	A	4,4 a b
D	5,0 b c	B	6,2 b c
B	5,2 c	D	7,4 c
Média	4,0	Média	4,9

Médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 1%

Os pães apresentaram a conservação microbiológica avaliada visualmente com lupa manual, variando de 3,0 a 5,2 dias para pão de sal e 2,8 a 7,4 dias para pão doce, com médias de 4,0 dias e 4,9 dias, respectivamente. A maior conservação microbiológica avaliada visualmente foi para o pão de sal do produtor B, com a média de 5,2 dias e do pão doce do produtor D com 7,4 dias (Tabela 3). Essa maior conservação dos pães do produtor D, quando comparada a dos pães dos demais produtores, pode ser atribuída à adoção de práticas diferenciadas no processamento, indicando que essas prováveis diferenças levam a uma menor contaminação e, conseqüentemente, maiores períodos de conservação.

Constatou-se, com a análise visual, que a média da conservação microbiológica do pão de sal foi menor do que o pão doce. Pode-se supor que o pão doce conserva-se melhor devido ao açúcar ser um bom agente de conservação dos produtos alimentícios, especialmente quando aliado ao aquecimento (Gava, 1984).

Na Figura 6 observa-se a representação gráfica da conservação microbiológica estabelecida de acordo com a avaliação visual da contaminação de pães de sal e doce, produzidos pelos cinco produtores artesanais com a tecnologia da região, sem a aplicação dos EA dos condimentos.

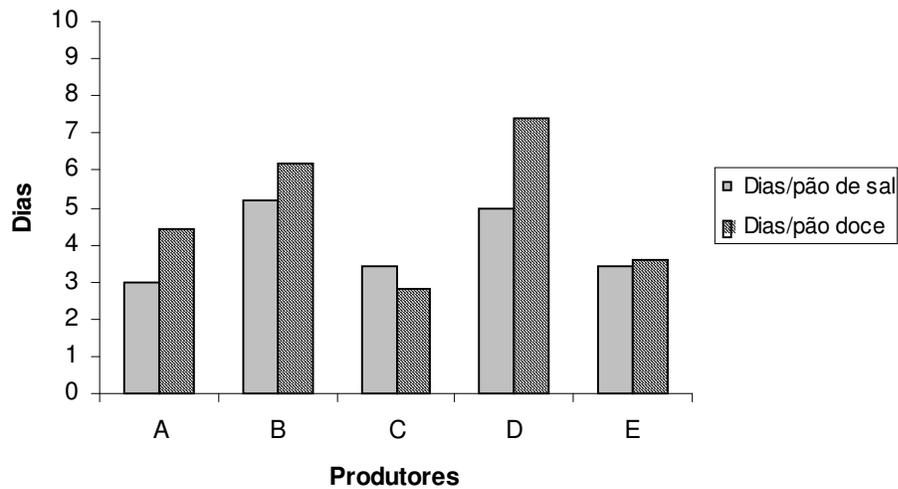


FIGURA 6 Representação gráfica da conservação microbiológica avaliada visualmente, de pães de sal e doce, produzidos por cinco produtores artesanais de Venda Nova do Imigrante, ES, 2005.

Os pães sem fungos, na implantação da etapa de avaliação visual da contaminação de pães artesanais e ao final, com a presença de fungos podem ser observados na Figura 7.



FIGURA 7 Pães sem fungos no início do experimento (A); Pães com fungos ao final do experimento (B). Venda Nova do Imigrante, ES, 2005.

Durante a produção dos pães, foram observados alguns pontos críticos no processamento, que podem propiciar a contaminação do produto, como, por exemplo, o resfriamento, que normalmente é feito sobre bancadas ou mesas, cobertos ou não com panos. Essa etapa do processamento é muito problemática, visto que muitos produtores fabricam e embalam os pães no mesmo local, e eles podem se recontaminar após o forneamento com esporos dos fungos em suspensão no ambiente (Castro, 2003). Outro problema detectado é a utilização de embalagem inadequada para armazenagem dos pães, pois, todos os produtores pesquisados utilizam sacos plásticos de polietileno de baixa densidade (PEBD), comercializados em rolos, de baixo custo, não específicos para armazenagem. Essa pode ser uma fonte de contaminação, sendo mais indicada a embalagem de polipropileno (Gava, 1984). Outra constatação foi a de que alguns produtores estão inseridos no processo de Agroturismo, ramo do

turismo rural e interrompem suas atividades de produção principalmente para atendimento aos turistas que, muitas vezes, entram nas áreas de manipulação, aumentando a exposição do produto ao risco de contaminação e diminuindo a sua durabilidade.

4.3.2 Avaliação da atividade fungitóxica de EA em pães artesanais

São apresentadas na Figura 8 algumas etapas da avaliação fungitóxica dos extratos alcoólicos dos condimentos em pães artesanais, sendo: A) os frascos de armazenamento dos extratos alcoólicos e os borrifadores; B) aplicação dos extratos alcoólicos utilizando borrifadores manuais; C) pães embalados em sacos de polietileno de baixa densidade (PEBD), fechados e etiquetados de acordo com o tratamento recebido.

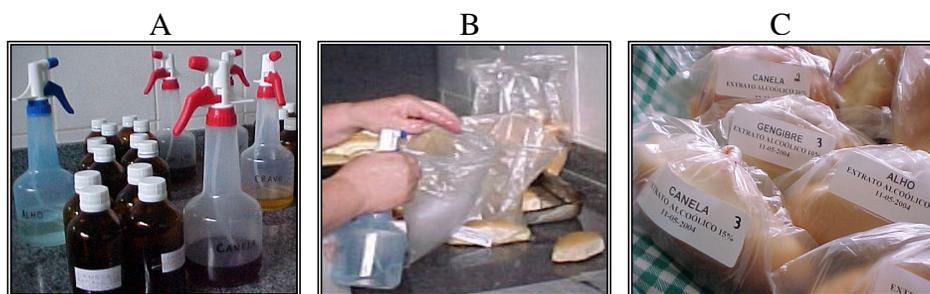


FIGURA 8 Extratos alcoólicos dos condimentos em diferentes concentrações (A); pulverização dos extratos alcoólicos no interior das embalagens (B); pães embalados e identificados de acordo com o tratamento recebido (C) Venda Nova do Imigrante, ES, 2005.

Durante o experimento a média da umidade relativa do ar foi de 80% e a temperatura variou de 14°C a 27°C.

Na Tabela 4 são apresentadas as médias da conservação microbiológica de pão de sal avaliada visualmente sob os tratamentos com extratos alcoólicos de cravo, gengibre, orégano, tomilho e alho, EAP e testemunha sem extrato nem álcool.

TABELA 4 Médias da conservação microbiológica, avaliada visualmente, de pão de sal produzido por produtor artesanal de Venda Nova do Imigrante, ES, submetido a extratos alcoólicos (EA) a 5%, 10%, 15% e 20% de cravo, tomilho, alho, orégano e gengibre, (EAP) e testemunha (sem EA e sem álcool). Venda Nova do Imigrante, ES, 2005.

Tratamentos	Concentração do EA	Conservação microbiológica do pão de sal avaliada visualmente (dias)
Testemunha		3,7 a
EA Cravo	EAP	9,3 b
	5%	13,3 c
	10%	13,7 c
	15%	14,0 c
	20%	15,0 c
EA Tomilho	EAP	12,0 b
	5%	9,7 b
	10%	11,7 b
	15%	14,7 c
	20%	14,3 c
EA Orégano	EAP	12,0 b
	5%	12,3 b
	10%	15,0 c
	15%	13,7 c
	20%	15,0 c
EA Gengibre	EAP	11,3 b
	5%	14,7 c
	10%	15,0 c
	15%	15,0 c
	20%	15,0 c
EA alho	EAP	11,0 b
	5%	10,0 b
	10%	12,3 b
	15%	13,7 c
	20%	11,7 b

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5%

Observa-se, pelos dados da Tabela 4, que todos os extratos alcoólicos (EA) têm efeito positivo na inibição de fungos em pães de sal e no conseqüente aumento da conservação microbiológica em relação à testemunha. Formaram-se três grupos diferentes de tratamentos tendo, no primeiro grupo, somente a testemunha com 3,7 dias, no segundo, os tratamentos no intervalo de 9,3 a 12,3 dias e, no terceiro, os tratamentos entre 13,3 e 15,0 dias. Comparados à testemunha com 3,7 dias, as menores concentrações para efeito inibitório foram a 5% para cravo e gengibre, 10% para orégano e 15% para alho e cravo, com aparecimento de fungos entre 13,3 a 15,0 dias, correspondendo a 9,6 dias ou 359% a mais que a testemunha. O tempo de conservação dos pães tratados com álcool puro foi de nove dias (9,3 a 12 dias), ou seja 5,6 dias ou 251% a mais que o da testemunha.

A testemunha apresentou tempo conservação de apenas 3,7 dias (Tabela 4), sendo semelhante ao tempo encontrado para os pães produzidos pelos produtores de Venda Nova do Imigrante, ES (Figura 6), que variou de 3 a 5,2 dias para pão de sal, com média de 4 dias.

Com o extrato de alho verificou-se o mesmo comportamento observado nos teste *in vitro* (Tabelas 1 e 2), em que o aumento da concentração do extrato alcoólico de alho para 20%, diminuiu o poder de inibição sobre os fungos (Tabela 4). Esse comportamento, provavelmente, é explicado pela composição nutricional do alho, que possui um teor de glicídios de 29,3g, 134 calorias e 5,30g de proteína (Franco, 1987) e pelo sinergismo entre os seus componentes químicos que pode ter propiciado o desenvolvimento dos fungos a partir da concentração de 20% do extrato alcoólico.

Considerando-se que a presente pesquisa testou o efeito inibitório de condimentos sobre fungos comprovadamente toxigênicos (*A. ochraceus* e *P. roqueforti*), pode-se inferir que a inibição da fase de crescimento micelial e da

fase reprodutiva desses fungos representou uma redução do nível de exposição ao risco de contaminação das micotoxinas.

Na Figura 9 encontram-se a representação gráfica, a equação de regressão e o coeficiente de determinação da conservação microbiológica avaliada visualmente de pães de sal, correspondente às médias dos EA (5%, 10%, 15% e 20%) de alho, tomilho, gengibre, orégano e cravo e do EAP.

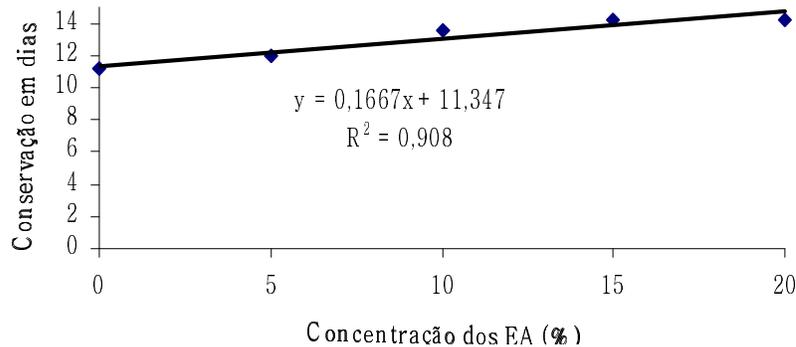


FIGURA 9 Avaliação da conservação microbiológica avaliada visualmente de pães de sal com as médias dos extratos alcoólicos de alho, tomilho, gengibre, orégano e cravo, Venda Nova do Imigrante, ES, 2005.

Observa-se, pelo gráfico da Figura 9, que, na média, os condimentos elevaram a conservação microbiológica avaliada visualmente em 0,1667 dia para cada aumento de 1% na concentração dos extratos alcoólicos. No EAP obteve-se uma média de 11,347 dias, porém, quando compara-se à Tabela 4 o EAP variou de 9,3 a 12 dias e, por motivo de segurança, na prática, deve-se considerar 9 dias de conservação microbiológica avaliada visualmente. Os cinco extratos

alcoólicos, nas quatro concentrações empregadas, mais o EAP em pães de sal tiveram um comportamento crescente com o aumento da concentração empregada.

Na Tabela 5 são apresentadas as médias da conservação microbiológica avaliada visualmente de pães doces submetidos a tratamentos com extratos alcoólicos de cravo, canela, gengibre, EAP e testemunha sem extrato nem álcool.

TABELA 5 Médias da conservação microbiológica avaliada visualmente, de pão doce produzido por produtor artesanal de Venda Nova do Imigrante, ES, submetido a tratamentos com extratos alcoólicos (EA) de cravo, canela, gengibre, extrator alcoólico puro (EAP) e testemunha (sem EA e sem álcool). Venda Nova do Imigrante, ES, 2005.

Tratamentos	Concentração do EA	Conservação microbiológica avaliada visualmente/ pão doce (dias)
Testemunha		4,0 a
EA Cravo	EAP	10,7 b
	5%	14,0 b
	10%	13,7 b
	15%	14,7 b
	20%	14,7 b
EA Gengibre	EAP	10,7 b
	5%	13,3 b
	10%	13,7 b
	15%	15,0 b
	20%	15,0 b
EA Canela	EAP	10,7 b
	5%	13,0 b
	10%	11,3 b
	15%	14,3 b
	20%	11,3 b

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5%

Constata-se que houve diferença significativa da testemunha em relação aos demais tratamentos em pão doce artesanal (Tabela 5). A média da conservação microbiológica avaliada visualmente da testemunha (sem EA e sem álcool) foi de apenas quatro dias, sendo semelhante ao tempo encontrado na Tabela 3, em que a conservação de pães doces produzidos por cinco produtores de Venda Nova do Imigrante, ES, variou de 2,8 a 7,4 dias, com média de 4,9 dias.

Todos os tratamentos com extratos alcoólicos sobressaíram-se em relação à testemunha, com um aumento de 4,0 para 10,7 dias, correspondendo a mais 6,7 dias ou 267,5 % na conservação microbiológica dos pães. Como não há diferença significativa entre os extratos alcoólicos de condimentos e o EAP, pode-se observar que o EAP, álcool de cereais 96,28%, é satisfatório como tratamento para a conservação microbiológica avaliada visualmente para 10 dias (Tabela 5).

4.3.3 Análise sensorial – teste de aceitabilidade

Nesta etapa da pesquisa foi realizado o teste de aceitabilidade tendo como base a escala hedônica de oito categorias para pão de sal e oito categorias para pão doce: 1) gosta extremamente, 2) gosta muito, 3) gosta moderadamente, 4) gosta pouco, 5) desgosta pouco, 6) desgosta moderadamente, 7) desgosta muito, e 8) desgosta extremamente. O peso foi igual a 4 (quatro) para gostei extremamente até -4 (menos quatro) para desgostei extremamente.

Observa-se, no Anexo Tabela 10 A, a escala hedônica com os respectivos pesos, pontuação do teste de aceitabilidade, notas totais e notas médias para os seis tratamentos em pão de sal: EAP, orégano 10%, alho 10%, tomilho 10%, cravo 10% e gengibre 10%.

Na análise sensorial aplicada para pães artesanais de sal não houve diferença significativa entre os tratamentos (a, b, c, d, e, f), ou seja, os

tratamentos não diferiram quanto à aceitabilidade pelo público (Anexo Tabela 10A).

Os resultados obtidos no teste de aceitabilidade para pães de sal com embalagens submetidas aos seis tratamentos tiveram pontuação variando de 172 a 221 (Figura 10). Os valores foram divididos em duas categorias (gostei e não gostei) transformados em percentual (Figura 11). Pode-se verificar que a maior aceitação foi para as categorias positivas (gostei), indicando que, possivelmente, os consumidores poderiam comprar os produtos por eles avaliados, pois obteve-se para pão de sal, de 85,98% a 91,59% nas categorias positivas (gostei). Pode-se inferir que todos os tratamentos foram bem aceitos pelos consumidores que participaram do teste, indicando boas possibilidades de comercialização do produto.

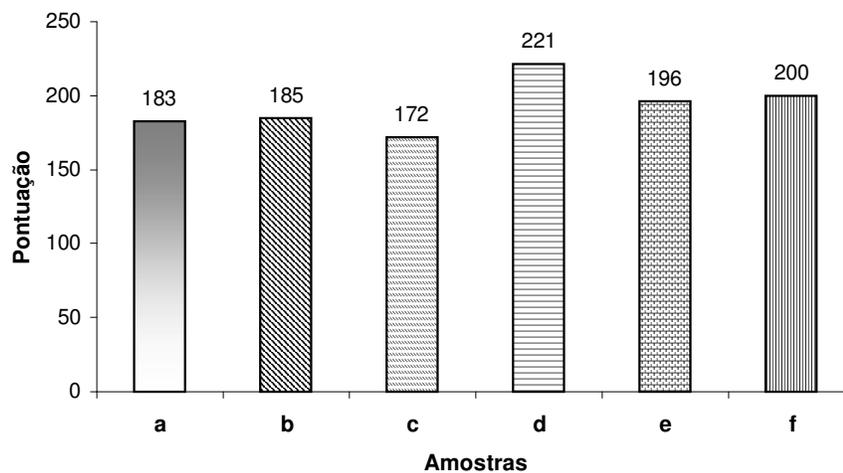


FIGURA 10 Representação gráfica da pontuação do teste de aceitabilidade de pão de sal com amostras submetidas aos tratamentos com (EAP) (a); orégano 10% (b); alho 10% (c), tomilho 10% (d); cravo 10% (e) e gengibre 10% (f). Venda Nova do Imigrante, ES, 2005.

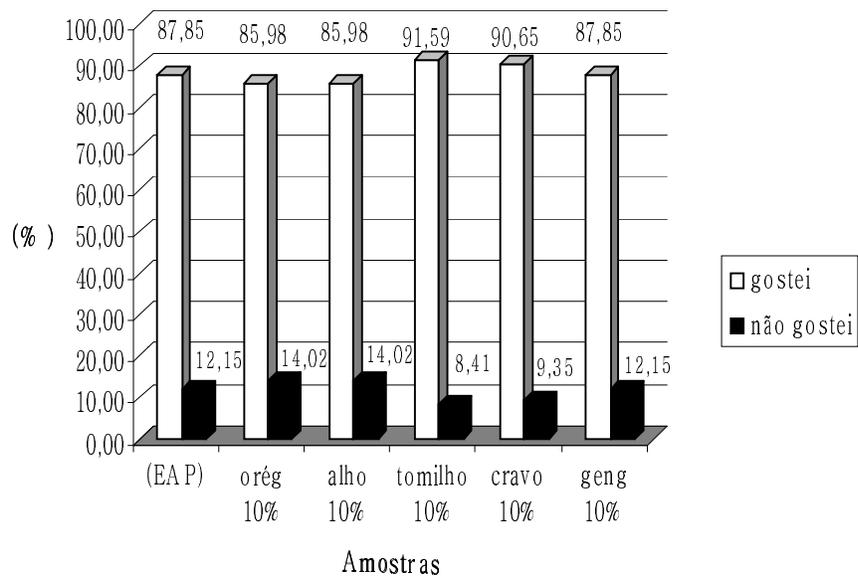


FIGURA 11 Representação do percentual obtido no teste de aceitabilidade para pão de sal com embalagens submetidas a EAP e extratos alcoólicos a 10% de orégano, alho, tomilho, cravo e gengibre. Venda Nova do Imigrante, ES, 2005.

Na análise sensorial de pães doces realizada com os consumidores, com amostras submetidas aos tratamentos EAP (g), canela 10% (h), cravo 10% (i) e gengibre 10% (j), aplicando-se o teste de aceitabilidade, não houve diferença quanto à aceitabilidade do produto pelo teste F, a 5% de probabilidade (Anexo Tabela 11A). A pontuação obtida em cada tratamento variou de 242 a 275 (Figura 12).

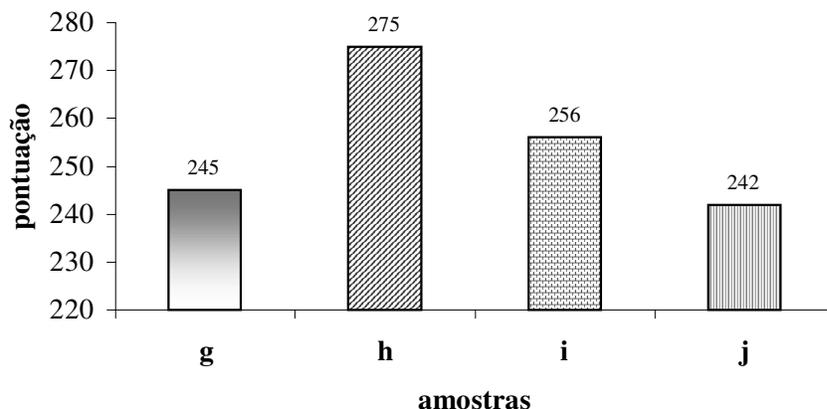


FIGURA 12 Representação gráfica da pontuação do teste de aceitabilidade de pão doce com amostras submetidas aos tratamentos com EAP (g), canela 10% (h), cravo 10% (i) e gengibre 10% (j). Venda Nova do Imigrante, ES, 2005.

Os valores obtidos no teste de aceitabilidade para pães doces com embalagens submetidas a EAP e EA a 10% de canela, cravo e gengibre, foram divididos em duas categorias (gostei e não gostei) e transformados em percentual para a visualização do alto nível de aceitabilidade do produto pesquisado por parte dos consumidores-provadores (Figura 13). Verifica-se que houve uma expressiva percentagem para as categorias positivas (gostei), indicando que, possivelmente, os consumidores poderiam comprar os produtos por eles avaliados, pois obteve-se para pão doce, de 92,52% a 94,39% em categorias positivas (gostei). Pode-se inferir que todos os tratamentos foram bem aceitos pelos consumidores que participaram do teste, indicando boas possibilidades de comercialização do produto.

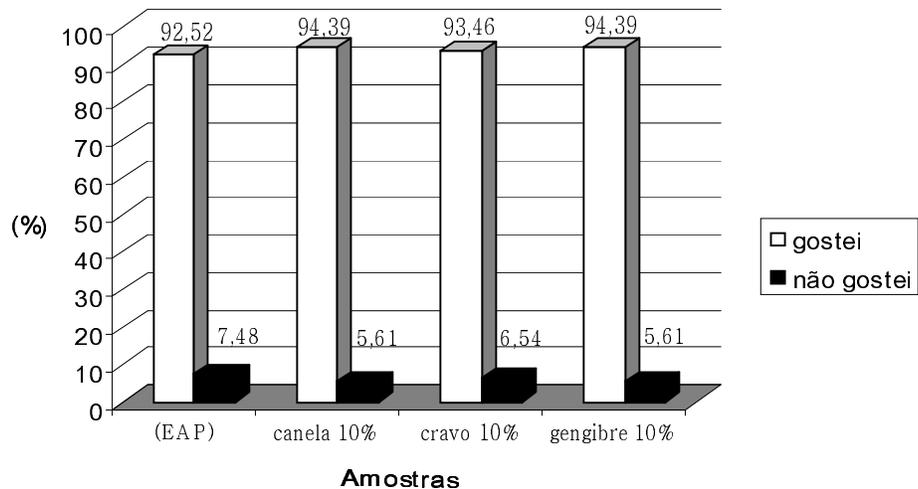


FIGURA 13 Representação do percentual obtido no teste de aceitabilidade para pão doce com amostras submetidas aos tratamentos com EAP (g), canela 10% (h), cravo 10% (i) e gengibre 10% (j). Venda Nova do Imigrante, ES, 2005.

4.3.4 Análise de cor

Optou-se por eleger dois condimentos de pão de sal e de pão doce com a maior pontuação geral, incluindo as categorias positivas e negativas, com o objetivo de diminuir os custos nos testes de cor e análise microbiológica. Qualquer condimento poderia ter sido selecionado, já que não diferiram estatisticamente entre si.

Foram calculadas as diferenças de cor das amostras em relação ao padrão $L^*a^*b^*$.

Não foram observadas diferenças significativas entre os condimentos em pães de sal com extrato alcoólico de gengibre a 10% com média de 41,16 e extrato alcoólico de tomilho a 10% com média de 42,09. No entanto, ocorreu

diferença significativa para a variável tempo de armazenamento (dia), com uma variação de 39,96 a 44,24 para tomilho e de 38,36 a 43,95, em relação à diferença de cor (E^*) (Figura 14).

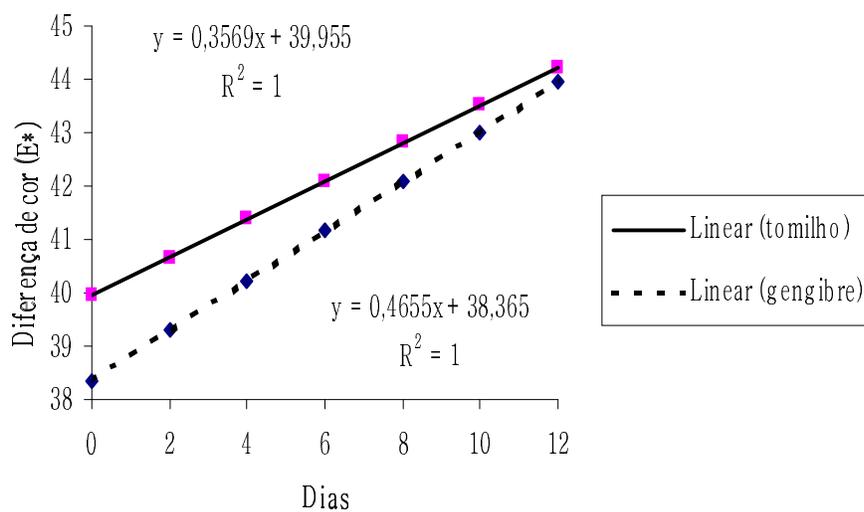


FIGURA 14 Representação gráfica da equação da cor de pão de sal submetido a extratos alcoólicos de tomilho e gengibre a 10 %. UFLA, MG, 2005.

Quanto à diferença de cor (E^*), os extratos alcoólicos de tomilho e gengibre a 10% apresentaram um decréscimo de 40,62 a 39,88 de 0,0 até 3,2 dias e elevação de 39,88 a 45,55 até o 12º dia, quando houve tendência crescente de escurecimento do pão até o décimo segundo dia do armazenamento (Figura 15).

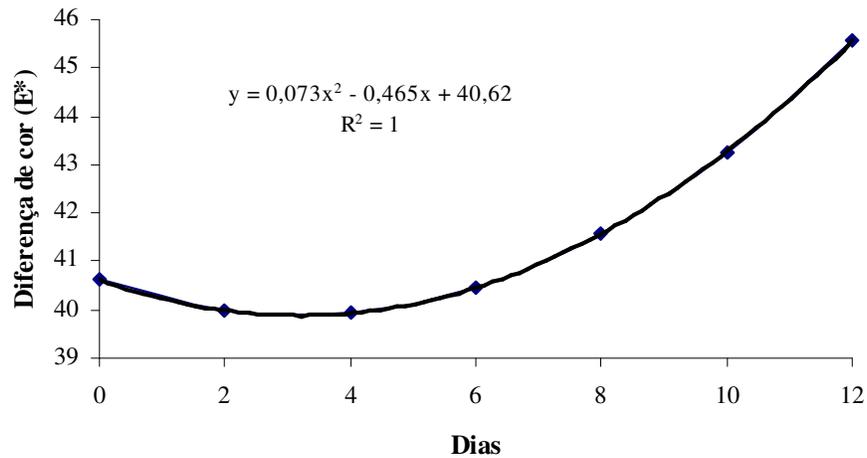


FIGURA 15 Representação gráfica da média da equação da cor de pão de sal submetido a extratos alcoólicos de tomilho e gengibre a 10 %. UFLA, MG, 2005.

Em pães doces pulverizados com extrato alcoólico de canela a 10% e extrato alcoólico de cravo a 10%, observou-se diferença significativa entre os condimentos, tempo de armazenagem (dias) havendo também interação entre condimento versus dia (Anexo Tabela 15A).

Observa-se, na Figura 16, a representação gráfica da equação da cor de pão doce submetido a extrato alcoólico a 10% de canela. Verifica-se que a canela apresentou uma tendência em influenciar a cor dos pães, ao longo do período de armazenamento, provocando o escurecimento.

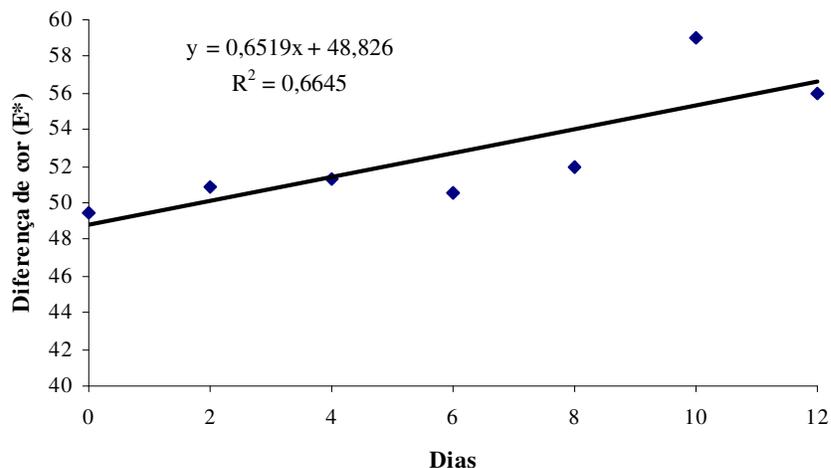


FIGURA 16 Representação gráfica da equação da cor de pão doce submetido a extrato alcoólico de canela. UFLA, MG, 2005.

4.3.5 Análise microbiológica dos pães aplicando-se as boas práticas de fabricação (BPF) e tratamentos com EA

Optou-se por eleger as duas amostras de pão de sal e de pão doce com a maior pontuação geral, incluindo as categorias positivas e negativas, com o objetivo de diminuir os custos nos testes de cor e análise microbiológica. Qualquer amostra poderia ter sido selecionada, já que não diferiram estatisticamente entre si.

A temperatura média durante o experimento variou entre 13°C e 21°C e a média da umidade relativa do ar foi de 78,4%.

Verificou-se, nesta etapa do trabalho, que a adoção das BPF, aliada à utilização dos extratos alcoólicos a 10% de cravo e canela para pão doce e extratos alcoólicos a 10% de tomilho e gengibre para pão de sal, aumentou a

conservação microbiológica dos pães para 17 dias, sem registro de fungos. Soares (2003) encontrou tempo de prateleira de 14 dias para pão de forma, embalado em plástico antimicrobiano, enquanto o tempo médio dos pães industrializados nas gôndolas de supermercados é de dez dias.

As testemunhas apresentaram contaminação no 7º dia, tanto para pão doce como para pão de sal, tendo a conservação microbiológica de 6,0 dias (Figura 17), tempo este maior que 4,0 dias para pão de sal e 4,9 dias para pão doce encontrados na etapa de avaliação visual da contaminação de pães artesanais (Tabela 5).

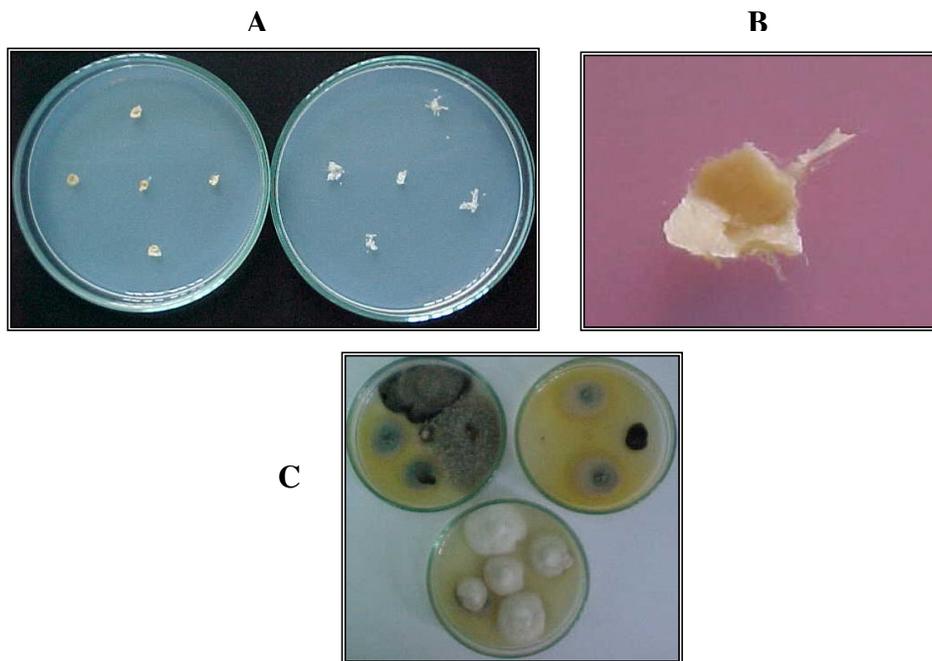


FIGURA 17 Amostras de casca e miolo de pães (A), fragmento de casca de pão (B), fungos associados a pães (testemunhas) (C). Domingos Martins, ES, 2005.

Foram analisados a casca e também o miolo dos pães, constatando-se contaminação apenas nas as cascas dos pães nas placas testemunhas, não surgindo contaminação no miolo do pão. O nível de contaminação das testemunhas por fungos foi, em média, em 40% das amostras de pão doce e 86,7% das amostras de pão de sal.

Com essa constatação da contaminação das cascas dos pães, pode-se reforçar a afirmativa de que os pães se recontaminam na etapa de resfriamento e embalagem conforme afirma Castro (2003).

O resultado obtido neste trabalho confirma o que sugere Pereira (2001), que relata que os efeitos benéficos obtidos pela adição de condimentos aos produtos de panificação devem ser aliados à adoção de medidas preventivas, tais como a utilização de matérias-primas não contaminadas e a adoção de boas práticas de manejo durante as fases de preparo e comercialização, minimizando os índices de contaminação dos produtos.

5 CONCLUSÃO

Os extratos alcoólicos (EA) foram eficientes no controle do crescimento micelial e esporulação dos fungos estudados.

Os EA dos condimentos e o extrator alcoólico puro (EAP) foram eficientes na redução do crescimento micelial e esporulação dos fungos, quando testados *in vitro*.

A cor foi alterada no decorrer do armazenamento do produto, pela adição de EA 10% de tomilho, gengibre, canela e cravo.

O EA 10% de tomilho e gengibre para pão de sal e o cravo e a canela para pão doce, quando aliado às BPF, foram eficientes no prolongamento da conservação microbiológica dos pães para 17 dias sem ocorrência de fungos.

Os EA dos condimentos cravo, canela, gengibre, orégano, tomilho e alho e o EAP, utilizados na conservação dos pães, apresentaram boa aceitabilidade pelos consumidores.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Regulamento técnico para o uso de aditivos alimentares, suas funções e limites máximos para a categoria de molhos e condimentos.** Resolução nº 382 de 05 de agosto de 1999.

ARAÚJO, A.F. **Panificação moderna.** São Paulo: Brusco, 1975. 165p.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE PANIFICAÇÃO. São Paulo, 2002. **Perfil de mercado.** Disponível em: <<http://www.abip.org.br>>. Acesso em 20 mar. 2003.

AZEREDO, H.C.; FARIA, J.A.F.; AZEREDO, A.M.C. Embalagens ativas para alimentos. **Ciência e Tecnologia de Alimento**, v.20, n.3, p.337-341, 2000.

AZZOUS, M.A.; BULLERMAN, L.R. Comparative antimycotic effects of selected herbs, spices, planta components and commercial anti-fungal agents. **Journal Food of Protection**, v.45, p.1298-1301, 1982.

BARA, M.T.F. **Avaliação do efeito inibidor de condimentos no crescimento de *Yersinia enterocolitica*.** 1992. 73p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola)-Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

BATISTA, L.R. **Identificação, potencial toxigênico e produção de micotoxinas de fungos associados a grãos de café (*Coffea arabica* L.).** 2000. 188p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

BENJILALI, B. et al. Method to study antimicrobial e effects of essential oils: Application to the antifungal activity of six moroccan essences. **Journal of Food Protection**, v.47, n.10. p.748-752, Oct. 1984.

BOYSEN, M.P.S.; FRISVAD, J.; ROSSEN, L. Reclassification *do grupo do *Penicillium roqueforti** em três espécies na base de perfis GENETIC e biochemical molecular. **Microbiology**, v.142, p.541-549, 1996.

BUCHANAN, R.L.; SHEPARD, A.J. Inhibition of *Aspergillus parasiticus* by timol. **Journal of Food Science**, Chicago, v.46, p.76-977, 1981.

BULLERMAN, L.B. Inhibition of aflatoxin production by cinamon. **Journal of Food Protection**, v.39, p.1163-1165, 1974.

CASTRO, I. **Abaixo o mofo!** São Paulo, v.55, p38-40. Disponível em: <<http://www.padaria2000.com.br>>. Acesso em: 15 abr. 2003.

CHAVES, J.B.P. **Avaliação sensorial de alimentos**. Viçosa, MG: UFV, 1980. 69p. (Apostila, 37).

CIACCO, C.F.; DIAS, N.M.; OLIVEIRA, C.R. **Apostila de panificação**. Santo André, SP: EMULZINT ADIT. ALIMENT., 1985.

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. 429p.

CONNER, D.E.; BEUCHAT, L.R. Effects of essential oils from plants on growth of food spoilage yeasts. **Journal of Food Protection**, v.49, p.429-434, 1984.

COOTE, P.; BRUL, S. Preservatives agents in food: mode of action and microbial resistance mechanisms. **International Journal of Food Microbiological**, v.50, p.1-17, 1999.

DEANS, S.G.; RITCHIE, G. Antibacterial properties of plant essential oils. **Int. Journal of Food Microbiology**. n.5, p.165-180. 1987.

EL-DASH, A. A.; CAMARGO, C.O.; DIAZ, N. M. **Fundamentos da Tecnología de Panificação**. São Paulo: Secretaria da Indústria, Comércio, Ciência e Tecnologia, (Série Tecnologia Agroindustrial). 349p., 1982.

FARAG, R.S.; DAW, Z.Y.; ABO-RAYA, S.H. Influence of some spice essential oils on *Aspergillus parasiticus* growth and production of aflatoxinas in a synthetic medium. **Journal of Food Science**, v.54, n.1, p.54-74, 1989.

FARMACOPÉIA HOMEOPÁTICA BRASILEIRA. **Métodos gerais**, 2.ed. São Paulo: Atheneu, 1997. Parte 1.

FERREIRA, V.L.P. **Análise sensorial**: testes discriminativos e afetivos. Campinas, SP: SBCTA, 2000. 127p. (Manual Série Qualidade).

- FORSYTHE, S.J. **Microbiologia da segurança alimentar**. Tradução de GUIMARÃES, M.C.M.; LEONHARDT, C. Porto Alegre: ARTMED, 2002. 424p.
- FRANCO, G. **Tabela de composição química dos alimentos**. 8.ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 1987. 230p.
- FRISVAD, J.C.; FILTENBORG, O. Classification of terverticillate penicillia based on profiles of mycotoxins and other secondary metabolites. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.46, n.6, p.1301-1310, June 1983.
- FRISVAD, J.C.; SAMSON, R.A. **Fungos filamentosos nos alimentos: ecologia, deterioração e produção de micotoxinas**. Nova York, 1991. p.31-68. (Manual Aplicado de Micologia, 3).
- GARC, S.C.; SIDDIQUI, N. Antifungal activity of some essential oil isolates. **Phormazil**, v.47, n. 6, p. 467- 468, 1992.
- GAVA, A.J. **Princípios de tecnologia de alimentos**. 7.ed. São Paulo: Nobel, 1984. 284p.
- GONTARD, N. **Active packaging**. In: SOBRAL, P.J.A.; CHUZEL, G. (Ed.). Workshop sobre biopolímeros. Pirassununga, SP: FZEA, 1997. p.23-27.
- GRAVESEN, S.; FRISVAD, J.C.; SAMSON, R.A. **Microfungi**. Munksgaard, Copenhagen, 1994.
- HITOKOTO, H. et al. Inhibitory effects of spices on growth and toxin production of toxigenic fungi. Tokyo. **Applied and Environmental Microbiology**, n.39 p.818-822, 1980.
- KARAPINAR, M.; AKTUG, S.E. Inhibition of foodborne pathogens by thymol, eugenol, menthol and anethole. **International Journal of Food Microbiology**, v.4, p.161-166, 1987.
- LABUZA, T.P.; BREENE, W.M. Applications of "active packaging" for improvement of shelf-life and nutritional quality of fresh and extended shelf-life foods. **Journal of Food Processing and Preservation**, v.13, n.1, p.1-69, 1989.

- LEGAN, J.D. Mould spoilage of bread: the problem and some solutions. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.32, Issues 1-3, 1993, p. 33-53. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com>>. Acesso em 15 abr. 2004.
- MARQUARDT, R.R.; FROHLICH, A.A. A review of recent advances in understanding ochratoxigenesis, **Journal of Animal Science**, Campaign, v.70, n.12, p.3968-3988, Dec. 1992.
- MARTINELLI FILHO, A. **Microbiologia de alimentos I**. Piracicaba, SP: ESALQ/USP, 1987. 248p.
- MARTINS, E.R. et al. **Plantas medicinais**. Viçosa, MG: UFV, 1994. 220p.
- MATOS, F. J. A. **Farmácias vivas: sistema de utilização de plantas medicinais, projetado para pequenas comunidades**. 2.ed. Fortaleza: UFC, 1994. 179p.
- MIDIO, A.F.; MARTINS, D.I. **Toxicologia de alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 2000. 290p.
- MORAES, M.A.C. **Métodos para avaliação sensorial dos alimentos**. 8.ed. Campinas, SP: UNICAMP, 1993. 93p.
- MORALES, A.A. **La evaluación sensorial de los alimentos en la teoría y la práctica**. Zaragoza, España: Acribia, 1994. 198p.
- MOREAU, C. **Moldes, toxins & food. 2ª ed.** Chichester: J. Wiley & Filhos, 1979.
- MOSS, M.O. Mode of formation of Ochratoxin A. **Food Additives and Contaminants**, Hants, v.13, p.5-9, 1996. Supplement.
- NAZATO, R.E.S. **Uso de radiação gama do cobalto-60 para aumentar a vida de prateleira de pães de forma fatiados e embalados**. Piracicaba: USP/ Centro de Energia Nuclear na Agricultura, 1991. 64p.
- NGUEFACK, J. et al. Evaluation of five essential oils from aromatic plants of Cameroon for controlling food spoilage and mycotoxin producing fungi. **International Journal of Food Microbiology**, n.94, p.329-334, 2004.

NYCHAS, G. J. E. **Natural antimicrobial from plants**. In: GOULD, G.W. New methods of food preservation. London: Blackie Academic and Professional, 1996.

OLIVEIRA, J.A. **Efeito do tratamento fungicida em sementes e no controle de tombamento de pântulas de pepino (*Cucumis sativus L.*) e pimentão (*Capsicum annuum L.*)**. 1991. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia)-Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras, MG.

PAZINATO, B.C. **Panificação artesanal**. Campinas, SP: Cati, 1999. 46p.

PELCZAR, M.J. et al. **Microbiologia**. São Paulo: McGraw-Hill do Brasil, 1980. v.1, 566p.

PEREIRA, M.C. **Efeito da Adição de condimentos no controle de microrganismos, na conservação de produtos de panificação e na inibição de metabólitos produzidos por fungos associados ao café**. 2001. 104p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos)-Universidade Federal de Lavras, Lavras/MG.

PINTO, J.E.B.P.; SANTIAGO, E.J.A.; LAMEIRA, O.A. **Compêndio de plantas medicinais**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2000. 208p. (Pós-Graduação 'Lato Sensu' a Distância Especialização em Plantas Medicin ais: Manejo, Uso e Manipulação).

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and food spoilage**. 2.ed. London: Blackie Academic and Professional, 1997. 593p.

RAN INDÚSTRIAS QUÍMICAS. **Conservantes** – conservante de superfície (citrol). Disponível em: <<http://www.ransa.com>>. Acesso em: 06 set. 2003.

RESENDE, M.L.V.; MACHADO, J.C. **Manejo de doenças em pós-colheita de produtos vegetais**. Lavras, MG: UFLA/FAEPE/DFP, 2000. 180p.

SCOTT, P.M. Roquefortine. In: BETINA, V. **Mycotoxins production, isolation, separation and purification**. Amsterdam: Elsevier Science, 1984.

SCUSSEL. V.M. **Micotoxinas em alimentos**. Florianópolis: Insular, 1998. 144p.

SHARPELL, F.H., Jr. Microbial flavors and fragrances. In: _____.
Comprehensive biotechnology: the principle and applications, and regulations of biotechnology in industry and agriculture. New York: Pergamon, 1985. p.81.

SHELEF, L.A. Antimicrobial effects os spices. **Journal of Food Safety**, n.6, p.29-44, 1983.

SINDICATO DAS INDÚSTRIAS DE PANIFICAÇÃO DE BAURU. **Jornal da Cidade.** Bauru, SP, 2004. Disponível em: <<http://jcnnet.com.br>>. Acesso em: 16 dez. 2004.

SINGH, H.N.P.; PRASAD, M.M.; SINHA, K.K. Efficacy of leaf extracts of some medicinal plantas against disease deve lop ment in banana. **Letters in Applied Microbiology**, n.17, p.269-271, 1993.

SOARES, L.S. **Ocratoxinas e aflatoxinas em café brasileiro.** In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL SOBRE BIOTECNOLOGIA NA AGROINDÚSTRIA CAFEEIRA, 3., 1999, Londrina. **Anais...** Londrina, PR: IAPAR/IRD, 1999. p.447-452.

SOARES, N. F. Embalagens ativas: tecnologia de alimentos. **Revista Minas Faz Ciência**, n.9. Disponível em: <<http://revista.fapemig.br/9/alimentos.html>>. Acesso em: 06 set. 2003.

SOUSA, M. P. et al. **Constituintes químicos ativos de plantas medicinais brasileiras.** Fortaleza, Ceará: EUFC, 416p., 1991.

SUHR, K.I.; NIELSEN, P.V. Antifungal activity of essential oils evaluated by two different application techniques against rye bread spoilage fungi. **Journal of Applied Microbiology**, n.94, p.665-674, 2003.

SVENDESEN, A.; FRISVAD, J. C. A chemotaxonomic study of the terverticillate penicillia based on high performance liquide chtomatography of secondary metabolites. **Micological Research**, Cambrige, v. 98, n. 11, p. 1317-1328, Nov. 1994.

TASSOU, C.C.; DROSINOS, E.H.; NYCHAS, G.J.E. Inhibition of resistenc microbial flora and phatogen inocula on could fresh fish filets in olive oil, orégano, and lemon juiceundes modified atmosphere or air. **Journal Food Protection**, v.9, n.1, p.31-34, 1995.

Van der MERVE, K. J. et al. Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* With. **Nature**, London, v.205, p.1112-1113, 1965.

WILTSCHKO, D.; PATELY, L.A.; GILBERT, J. Results from an international mycotoxin proficiency testing scheme. In: INTERNATIONAL IUPAC SYMPOSIUM ON MYCOTOXINS AND PHYCOTOXINS, 10., 2000, Guarujá. **Official program and abstrat book...** Guarujá, SP: Instituto Adolfo Lutz, 2000. p.50.

ZAICA, L.L. **Spices and herbs:** their antimicrobial activity and its determination. Philadelphia, 1987. p.97-114.

7 ANEXOS

		Página
ANEXO A		
TABELA 1A	Fontes de variação, números de graus de liberdade, quadrados médios e respectivas significâncias para o índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) <i>in vitro</i> , dos fungos <i>Aspergillus ochraceus</i> , <i>Penicillium roqueforti</i> e <i>Rhizopus stolonifer</i> sob diferentes extratos de cravo, tomilho e canela.....	80
TABELA 2A	Fontes de variação, números de graus de liberdade, quadrados médios e respectivas significâncias para Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM), <i>in vitro</i> dos fungos <i>Aspergillus ochraceus</i> , <i>Penicillium roqueforti</i> e <i>Rhizopus stolonifer</i> , sob diferentes extratos de alho, gengibre e orégano.....	80
TABELA 3A	Fontes de variação, números de graus de liberdade, quadrados médios e respectivas significâncias para esporulação <i>in vitro</i> dos fungos <i>Aspergillus ochraceus</i> , <i>Penicillium roqueforti</i> e <i>Rhizopus stolonifer</i> , sob diferentes extratos de cravo, tomilho e canela.....	81
TABELA 4A	Fontes de variação, números de graus de liberdade, quadrados médios e respectivas significâncias para esporulação <i>in vitro</i> dos fungos <i>Aspergillus ochraceus</i> , <i>Penicillium roqueforti</i> e <i>Rhizopus stolonifer</i> sob diferentes extratos de alho, gengibre e orégano.....	81
TABELA 5A	Fontes de variação, números de graus de liberdade, quadrados médios e respectivas significâncias para tempo de prateleira de pães de sal e pães doces fabricados por produtores artesanais de Venda Nova do Imigrante, ES.....	82

TABELA 6A	Fontes de variação, números de graus de liberdade, quadrados médios e significância para a variável tempo de prateleira de pães de sal produzidos por produtor artesanal de Venda Nova do Imigrante, ES, submetidos aos extratos alcoólicos a 5%, 10%, 15% e 20% dos condimentos alho, tomilho, gengibre, orégano e cravo e EAP	82
TABELA 7A	Fontes de variação, números de graus de liberdade, quadrados médios e significância para a variável tempo de prateleira de pães doces produzidos por produtor artesanal de Venda Nova do Imigrante, ES, submetidos aos extratos alcoólicos a 5%, 10%, 15% e 20% dos condimentos canela, cravo e gengibre e EAP.....	83
TABELA 8A	Número conferido às amostras de extratos alcoólicos de condimentos na concentração de 10% e álcool puro (EA 0%) pulverizados em embalagens de pães artesanais doces e de sal que foram submetidos aos provadores.....	83
TABELA 9A	Modelo de ficha aplicada na análise sensorial – teste de aceitabilidade.....	84
TABELA 10A	Escala hedônica, pesos, número de votos, pontuação do teste de aceitabilidade, respectivas notas totais e notas médias para os condimentos álcool puro (a), orégano 10% (b), alho 10% (c), tomilho 10% (d), cravo 10% (e) e gengibre 10% (f), em pão de sal.....	85
TABELA 11A	Escala hedônica, pesos, número de votos, pontuação do teste de aceitabilidade, respectivas notas totais e notas médias para os condimentos álcool puro (g), canela 10% (h), cravo 10% (i), gengibre 10% (j) em pão doce. Venda Nova do Imigrante, ES, 2005.....	86

TABELA 12A	Fontes de variação, números de graus de liberdade, quadrados médios e respectivas significâncias para pontuação do teste de aceitabilidade dos condimentos álcool puro (g), canela 10% (h), cravo 10% (i), gengibre 10% (j), em pão doce. Venda Nova do Imigrante, ES, 2005.....	87
TABELA 13A	Fontes de variação, números de graus de liberdade, quadrados médios e respectivas significâncias para pontuação do teste de aceitabilidade dos condimentos álcool puro (a), orégano 10% (b), alho 10% (c), tomilho 10% (d), cravo 10% (e) e gengibre 10% (f), em pão de sal. Venda Nova do Imigrante, ES, 2005.....	87
TABELA 14A	Fontes de variação, números de graus de liberdade, quadrados médios e respectivas significâncias para cor de pães de sal artesanais submetidos a extratos alcoólicos a 10% de tomilho e gengibre. UFLA, MG, 2005.....	88
TABELA 15A	Fontes de variação, números de graus de liberdade, quadrados médios e respectivas significâncias para cor de pães doces artesanais submetidos a extratos alcoólicos a 10% de cravo e canela.....	88

TABELA 5A Fontes de variação, números de graus de liberdade, quadrados médios e respectivas significâncias para a avaliação visual da contaminação de pães de sal e pães doces fabricados por produtores artesanais de Venda Nova do Imigrante, ES.

FV	GL	QM	
		Pão doce	Pão de sal
Produtor	4	17,860000**	5,200000**
Erro	20	1,460000	0,460000
CV (%)		24,76	16,96
Média		4,88	4,00

** Significativo, a 1% de probabilidade, pelo teste F.

TABELA 6A Fontes de variação, números de graus de liberdade, quadrados médios e significância para a variável tempo de prateleira de pães de sal produzidos por produtor artesanal de Venda Nova do Imigrante, ES, submetidos ao EAP e aos extratos alcoólicos a 5%, 10%, 15% e 20% dos condimentos alho, tomilho, gengibre, orégano e cravo.

FV	GL	QM pão de sal
Condimento	4	13,46667
Concentração	4	28,80000**
Condimento*Concentração	16	4,71667
erro	50	6,06667
CV (%)		20,20
Média geral		13,01

** Significativo, a 1% de probabilidade, pelo teste F.

TABELA 7A Fontes de variação, números de graus de liberdade, quadrados médios e significância para a variável tempo de prateleira de pães doces produzidos por produtor artesanal de Venda Nova do Imigrante, ES, submetidos ao EAP e aos extratos alcoólicos a 5%, 10%, 15% e 20% dos condimentos canela, cravo e gengibre.

FV	GL	QM pão doce
Condimento	2	9,800000
Concentração	4	19,922222
Condimento*Concentração	8	2,272222
erro	30	8,244444
CV (%)		21,97
Média geral		13,07

TABELA 8A Número conferido às amostras de extrato alcoólico de condimentos a 10% e EAP, pulverizados em embalagens de pães artesanais doces e de sal que foram submetidos aos provadores.

Tipo de pão	Amostras	Extratos alcoólicos
Doce	01	EA 0%
Doce	02	EA canela 10%
Doce	03	EA cravo 10%
Doce	04	EA gengibre 10%
De sal	05	EA 0%
De sal	06	EA orégano 10%
De sal	07	EA alho 10%
De sal	08	EA tomilho 10%
De sal	09	EA cravo 10%
De sal	10	EA gengibre 10%

TABELA 9A Modelo de ficha aplicada na análise sensorial.

TESTE DE ACEITABILIDADE DE PÃO

Sexo: Idade: Data:

Por favor, avalie as amostras de pão e faça um x na resposta que melhor descreve sua opinião. Obrigada.

<p>Amostra 1</p> <ul style="list-style-type: none"> • Gostei extremamente • Gostei muito • Gostei moderadamente • Gostei pouco • Desgostei pouco • Desgostei moderadamente • Desgostei muito • Desgostei extremamente 	<p>Amostra 2</p> <ul style="list-style-type: none"> • Gostei extremamente • Gostei muito • Gostei moderadamente • Gostei pouco • Desgostei pouco • Desgostei moderadamente • Desgostei muito • Desgostei extremamente
<p>Amostra 3</p> <ul style="list-style-type: none"> • Gostei extremamente • Gostei muito • Gostei moderadamente • Gostei pouco • Desgostei pouco • Desgostei moderadamente • Desgostei muito • Desgostei extremamente 	<p>Amostra 4</p> <ul style="list-style-type: none"> • Gostei extremamente • Gostei muito • Gostei moderadamente • Gostei pouco • Desgostei pouco • Desgostei moderadamente • Desgostei muito • Desgostei extremamente
<p>Amostra 5</p> <ul style="list-style-type: none"> • Gostei extremamente • Gostei muito • Gostei moderadamente • Gostei pouco • Desgostei pouco • Desgostei moderadamente • Desgostei muito • Desgostei extremamente 	<p>Amostra 6</p> <ul style="list-style-type: none"> • Gostei extremamente • Gostei muito • Gostei moderadamente • Gostei pouco • Desgostei pouco • Desgostei moderadamente • Desgostei muito • Desgostei extremamente
<p>Amostra 7</p> <ul style="list-style-type: none"> • Gostei extremamente • Gostei muito • Gostei moderadamente • Gostei pouco • Desgostei pouco • Desgostei moderadamente • Desgostei muito • Desgostei extremamente 	<p>Amostra 8</p> <ul style="list-style-type: none"> • Gostei extremamente • Gostei muito • Gostei moderadamente • Gostei pouco • Desgostei pouco • Desgostei moderadamente • Desgostei muito • Desgostei extremamente
<p>Amostra 9</p> <ul style="list-style-type: none"> • Gostei extremamente • Gostei muito • Gostei moderadamente • Gostei pouco • Desgostei pouco • Desgostei moderadamente • Desgostei muito • Desgostei extremamente 	<p>Amostra 10</p> <ul style="list-style-type: none"> • Gostei extremamente • Gostei muito • Gostei moderadamente • Gostei pouco • Desgostei pouco • Desgostei moderadamente • Desgostei muito • Desgostei extremamente

TABELA 12A Fontes de variação, números de graus de liberdade, quadrados médios e respectivas significâncias para pontuação do teste de aceitabilidade do EAP(a) e dos condimentos orégano 10% (b), alho 10% (c), tomilho 10% (d), cravo 10% (e) e gengibre 10% (f) em pão de sal.

FV	GL	QM (pão de sal)
Tratamento	5	2,704361
Resíduo	636	2,472257
Total	641	
Desvio	1,572341	
Média geral	1,80	
CV (%)	87,25	

TABELA 13A Fontes de variação, números de graus de liberdade, quadrados médios e respectivas significâncias para pontuação do teste de aceitabilidade do EAP (g) e os condimentos canela 10% (h); cravo 10% (i), gengibre 10% (j) em pão doce.

FV	GL	QM (pão doce)
Tratamento	3	2,084112
Resíduo	424	2,123655
Total	427	
Desvio	1,457277	
Média geral	2,38	
CV (%)	61,27	

TABELA 14A Fontes de variação, números de graus de liberdade, quadrados médios e respectivas significâncias para cor de pães de sal artesanais submetidos a extratos alcoólicos a 10% de tomilho e gengibre, durante armazenamento.

FV	GL	QM
		Cor pão de sal
CONDIMENTO 10%	1	30,812834
DIA	6	106,053590**
CONDIMENTO 10%*DIA	6	48,184997
Erro	126	29,632540
CV%		13,08
Média Geral		41,63

** Significativo, a 1%. de probabilidade, pelo teste F.

TABELA 15A Fontes de variação, números de graus de liberdade, quadrados médios e respectivas significâncias para cor de pães doces artesanais submetidos a extratos alcoólicos a 10% de cravo e canela, durante armazenamento.

FV	GL	QM
		Cor pão doce
CONDIMENTO 10%	1	98,324384**
DIA	6	97,738280**
CONDIMENTO 10%*DIA	6	100,695863**
Erro	126	8,114237
CV (%)		5,49
Média Geral		51,90

** Significativo, a 1%. de probabilidade, pelo teste F.