

**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**

MARCELO CLÁUDIO PEREIRA

2001

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

Pereira, Marcelo Cláudio

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 / Marcelo Cláudio Pereira. -- Lavras : UFLA, 2001.

104 p. : il.

Orientadora: Sara Maria Chalfoun de Souza.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Condimento. 2. Panificação. 3. Café. 4. Micotoxina. 5. Controle. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

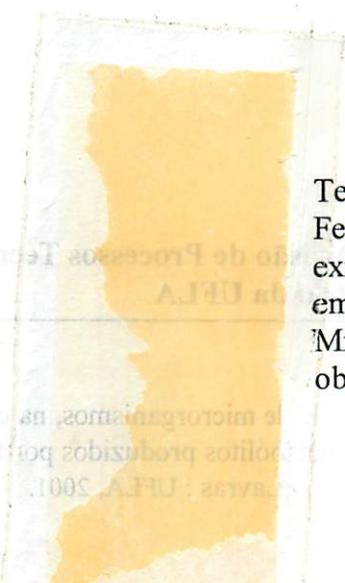
CDD-576.163

-664.5

52362
MFN-37187

MARCELO CLÁUDIO PEREIRA

**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**



Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Curso de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, área em Microbiologia de Alimentos, para obtenção do título de “Mestre”.

Orientadora

Dra. Sára Maria Chalfoun de Souza

**LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2001**

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

Pereira, Marcelo Cláudio

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 / Marcelo Cláudio Pereira. -- Lavras : UFLA, 2001.

104 p. : il.

Orientadora: Sara Maria Chalfoun de Souza.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Condimento. 2. Panificação. 3. Café. 4. Micotoxina. 5. Controle. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-576.163

-664.5

MARCELO CLÁUDIO PEREIRA

**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**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Curso de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, área de concentração em Microbiologia de Alimentos, para obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 31 de maio de 2001

Dra. Sára Maria Chalfoun de Souza	EPAMIG
Profa. Dra. Rosemary Gualberto Fonseca Alvarenga Pereira	UFLA
Profa. Dra. Ana Helena Romaniello Coelho	UFLA
Dr. Adauto Ferreira Barcelos	EPAMIG


Dra. Sára Maria Chalfoun de Souza
EPAMIG

(Orientadora)

**LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2001**

DEDICO

À DEUS,

**Aos meus Pais, Paulo Pereira
Cecília São José Batista Pereira**

Aos meus irmãos

Paulino

Maria

Marcos

Carlos

Márcio

OFEREÇO

**A minha esposa Simoni pelo amor, paciência e apoio
e aos sogros David e Marlene**

SEMPRE GRATO.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras, pela oportunidade oferecida para realização do curso.

Ao Departamento de Ciência dos Alimentos por ter me dado a oportunidade de demonstrar o meu trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pela bolsa de estudo.

A Pesquisadora Dra. Sára Maria Chalfoun de Souza, pela amizade, orientação, estímulo e paciência.

A Dra. Vânia Déa de Carvalho pela co-orientação.

A EPAMIG/EcoCentro onde foram realizados os trabalhos.

À Empresa SantosFlora Ervas Medicinais e Aromáticas por ceder os condimentos e informações técnicas sobre o material.

À Cooperativa Alto Rio Grande Ltda pelo o apoio.

À Panificadora P&C por ceder suas dependências para o desenvolvimento dos testes e ao Dr. Juventino Júlio de Souza Júnior, proprietário da P&C pelo apoio e sugestões.

Aos professores, Rosemary Gualberto e Luiz Carlos pela amizade e apoio científico.

Aos pesquisadores, Vicente Luiz de Carvalho; Silvio Júlio Rezende Chagas, Paulo Rebelles Reis, Aduino Ferreira Barcelos; Lenira Viana Costa Santa-Cecília, Adelson Ferreira de Oliveira; Elifas Nunes de Alcântara e Gabriel Ferreira Bartholo.

Aos amigos do Laboratório Caroline, Vicentina, Samuel, Odair, Everaldo e Marcelo pelo apoio e amizade.

Ao Igor Chalfoun Pomárico de Souza, pela amizade e auxílio na confecção dos gráficos.

Ao Luís Roberto Batista, pela amizade e pelo auxílio nas análises.

Aos colegas de mestrado, Rozane e Marcelo, Rubens, Disney, Rosana, Renil, Marluci, Ana Maria, Renata, Patrícia Nasser, Patrícia, Luiz, Vaninha, Eduardo, Mônica e Paulinho.

Aos colegas de infância, Binho, Bergue, Gilberto, Gilnei, Weber, Kildare, Gustavo, Reniane e Renivane.

Aos casais Weber e Giane, Jader e Cristina (Carol) pela amizade.

Aos amigos e parentes das cidades de “Passos e Varginha” pelo apoio e amizade.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
CAPÍTULO 1.....	01
1 INTRODUÇÃO GERAL.....	01
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	03
2.1 Microbiota associada a produtos de panificação e meios de conservação.....	03
2.2 Microbiota associados aos grãos de café.....	07
2.3 Aflatoxinas.....	11
2.4 Ocratoxina A.....	12
2.5 Condimentos no controle de microrganismos e micotoxina.....	13
2.6 Botânica das espécies e uso terapêutico.....	18
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	21
CAPÍTULO 2: Efeito da adição de condimentos em pó, cafeína e óleos essenciais no controle de fungos e metabólitos associados a produtos de panificação e a grãos de café.....	29
RESUMO.....	29
ABSTRACT.....	31
1 INTRODUÇÃO.....	33
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	35
2.1 Isolados de fungos utilizados.....	35
2.2 Material botânico.....	35
2.3 Avaliação do efeito dos condimentos em pó sobre o crescimento e esporulação dos fungos isolados de produtos de panificação.....	36

2.4 Avaliação do óleo essencial dos condimentos selecionados sobre o crescimento dos fungos isolados de produtos de panificação.....	37
2.5 Obtenção do óleo essencial	37
2.6 Avaliação dos condimentos em pó e cafeína sobre a produção de ocratoxina A e aflatoxina.....	38
2.7 Delineamento experimental.....	39
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
3.1 Efeito da adição de condimentos em pó e conservante químico sobre o crescimento micelial e esporulação de fungos associados a produtos de panificação.....	
3.2 Efeito da adição de óleos essenciais sobre o crescimento micelial de fungos associados a produtos de panificação.....	57
3.3 Efeito da adição de condimentos em pó e cafeína sobre a produção de aflatoxina B1e B2 e ocratoxina A de fungos isolados de grãos de café (<i>Coffea arabica</i> L.).....	64
4 CONCLUSÕES.....	70
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71
CAPÍTULO 3: Conservação de produtos de panificação através da adição de condimentos em pó.....	75
RESUMO.....	75
ABSTRACT.....	76
1 INTRODUÇÃO.....	77
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	79
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	84
4 CONCLUSÕES	91
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	92
ANEXOS.....	94

RESUMO

PEREIRA, Marcelo Cláudio. **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.** Lavras: 2001. 104p. (Dissertação – Mestrado em Ciência dos Alimentos).*

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito “in vitro” de condimentos em pó, alho, canela, cebola, cravo-da-índia, erva-doce, hortelã, louro, manjerição, orégano e tomilho. Os condimentos foram adicionados aos meios de cultura BDA e CYA20S nas concentrações de 0%, 1%, 2%, 3% e 4%. Testou-se também um conservante químico, propionato de cálcio, comumente utilizado em produtos de panificação nas concentrações de 0,15% e 0,30% sobre o crescimento micelial e esporulação dos fungos associados a produtos de panificação. Na primeira etapa do trabalho foram selecionados os condimentos alho, canela, cravo e tomilho para a extração dos óleos essenciais que foram testados nas concentrações de 500; 1000; 1500 e 2000ppm, exceto o cravo que foi testado nas concentrações de 200; 400; 600 e 800ppm. Como culturas teste foram utilizados os gêneros de fungos *Rhizopus* sp.; *Penicillium* spp.; *Eurotium repens* e *Aspergillus niger* obtidos de pães descartados para o consumo. Avaliou-se também o efeito dos condimentos em pó nas mesmas concentrações descritas anteriormente sobre a produção de aflatoxina e ocratoxina A de duas cepas produtoras *Aspergillus flavus* e *Aspergillus ochraceus* respectivamente, isoladas de grãos de café (*Coffea arabica* L.). A cafeína foi avaliada quanto ao seu efeito em inibir esses metabólitos nas concentrações de 0,5%, 0,8, 1,0 e 2,0. Na avaliação “in vivo” dos condimentos em pó, alho; canela e cravo foram testadas as concentrações de 0%, 0,5%, 1%, 1,5% e 2% e do conservante químico propionato de cálcio nas concentrações de 0,15 e 0,30%. Os produtos de panificação escolhidos para estes testes visando o aumento na vida de prateleira foram, pão integral; pão de centeio e rosca de maçã, por serem de fácil perecibilidade.

*Comitê orientador: Dra. Sára Maria Chalfoun de Souza – EPAMIG (Orientadora), Dra. Vânia Déa de Carvalho – UFLA (Co-orientadora).

ABSTRACT

PEREIRA, Marcelo Cláudio. **Effect of spices in the control of microorganisms, conservation of bread-making products and product metabolites produced by fungus associated with coffee.** Lavras: 2001. 104p. (Dissertation of Master's degree in Food Science)*

The objective of this work was to evaluate the effect "in vitro" of powdered spices, garlic, cinnamon, onion, clove, anise, mint, basil, laurel, oregano and thyme. The spices were then added through means of BDA and CYA2OS to concentrations of 0%, 1%, 2%, 3% and 4%. They were also tested the chemical preservative, calcium propionate, commonly used in bread-making products in concentrations of 0.15% and 0.30% in accordance with the micelial growth and esporulation of the fungus associated with bread-making products. In agreement with the first stage of the work, the following spices were selected ;garlic, cinnamon, clove and thyme ,for the extraction of the essential oils for test concentration of 500, 1000,1500 and 2000ppm. except clove ,which was tested in 200: 400: 600 and 800ppm concentrations. The culture test used were *Rhizopus* sp., *Penicillium* spp., *Eurotium repens* and *Aspergillus niger* from discarded breads.The effect of the powdered spices was also evaluated in the same concentrations previously mentioned over the production of aflatoxin and ochratoxin A, from two stump producers ; *Aspergillus flavus* and *Aspergillus ochraceus*, isolated from coffee beans (*Coffea arabica* L.) . Caffeine was also evaluated to see it's effect on inhibiting the metabolites in concentrations of 0.5% , 1.8% , 1.0% , and 2.0% . Evaluation "in vivo" of garlic, cinnamon and clove was tested in concentrations of 0%, 1.5%, 1%, 1.5%, and 2%, and of chemical preservative, calcium propionate, in concentrations of 0.15 and 0.30%. The bread-making products chosen for these tests that showed an increase in shelf life were, wholewheat bread, rye chisen bread and apple strudel, because they are seen as perishables.

*Guidance Committee: Dra. Sára Maria Chalfoun de Souza – EPAMIG (Major Professor), Dra. Vânia Déa de Carvalho – UFLA (Co-adviser).

CAPITULO 1

1 INTRODUÇÃO GERAL

O uso de condimentos como conservantes em alimentos é hoje evidente por várias razões. Substâncias naturais adicionadas aos alimentos torna-os mais atrativos ao consumidor por não apresentarem efeito tóxico mesmo quando empregadas em quantidades relativamente altas. A literatura popular e profissional está repleta de recomendações e sugestões de como incorporar vários condimentos na dieta.

Os produtos químicos comumente usados nos processos de conservação de alimentos além de elevar o custo do produto final, podem ser eventualmente tóxicos. A redução de sal e açúcar em alimentos por razões dietéticas tende a aumentar o uso de condimentos que contém baixos níveis de sódio e contribuem com uma quantidade desprezível de calorias. São recomendadas freqüentemente misturas de condimentos em substituição ao sal, sendo que o aumento no consumo de condimento pode produzir uma troca bacteriana na área intestinal, alteração esta que pode reduzir a incidência de câncer. (Shelef, 1983).

A ação preservativa de ervas e temperos, como canela, cravo-da-índia, hortelã-pimenta, alecrim, gengibre, pimenta, alho, cebola, louro, tomilho, manjeriço e eucalipto, entre tantos outros, tem recebido uma atenção especial na literatura científica em várias partes do mundo. Estudos têm relatado que a produção de micotoxinas e o desenvolvimento de fungos, bem como de bactérias patogênicas e leveduras, podem ser inibidos por extratos e ou óleos destes condimentos (Bullerman, Liew e Seier, 1977; Hitokoto et al., 1980).

Em alimentos para consumo humano e animal é crescente a preocupação com a qualidade microbiológica, principalmente em relação aos fungos toxigênicos e seus metabólitos, como as micotoxinas que são substâncias tóxicas e potencialmente cancerígenas.

Na intenção de inibir e diminuir a incidência dos fungos e das micotoxinas, alguns produtos químicos têm sido testados, porém, estes muitas vezes não podem ser adicionados aos alimentos pelos seus efeitos nocivos à saúde.

Desta forma, a presente pesquisa teve como objetivo confirmar a ação inibidora de condimentos sobre o desenvolvimento e esporulação de fungos associados a produtos de panificação através de testes “in vitro”, avaliando ainda a produção de aflatoxina e ocratoxina A por duas cepas de fungos toxigênicos isoladas de grãos de café (*Coffea arabica* L.). O teste “in vivo”, demonstrou a aplicação prática através da confecção de pães com condimentos visando a inibição de microrganismos em substituição a conservantes químicos que exercem ação detrimental à saúde humana.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Microbiota associada a produtos de panificação e meios de conservação

Pesquisadores de várias partes do mundo procuram incessantemente processos de produção e de conservação de alimentos que mantenham suas características físico-químicas, organolépticas e nutricionais, proporcionando-lhes o máximo de vida de prateleira e evitando quaisquer alterações indesejáveis (Nazato, 1991).

De acordo com Calvel (1987), o pão é um dos alimentos energéticos de grande consumo com rápida e fácil absorção pelo organismo que ganha constantemente mais adeptos e participa na dieta de uma faixa considerável da população.

As características externas e internas dos produtos de panificação dependem da qualidade, da quantidade e do tipo dos ingredientes da fórmula, tipo de fermentação, tempo e temperatura de cozimento e práticas complementares do processamento. Dentre os ingredientes básicos, o fundamental é a farinha, que pode derivar de vários cereais, especialmente do trigo. (El-Dash, Camargo e Diaz, 1982).

Martinelli Filho (1987a) e Smith e White (1988) citam que os cereais e os alimentos deles derivados, são pouco sujeitos à deterioração microbiana se preparados e armazenados em condições adequadas. O impacto que exerce o nível de umidade sobre o desenvolvimento dos fungos é tão grande que basta um pequeno aumento no teor de umidade de 0,25% para causar diminuição no tempo necessário para que inicie o desenvolvimento de fungos, e um aumento da mesma abrirá uma porta de entrada para bactérias e leveduras.

Nas farinhas de trigo, as bactérias normalmente presentes incluem esporos de *Bacillus*, bactérias coliformes, e representantes dos gêneros

Achromobacter, *Flavobacterium*, *Sarcina*, *Micrococcus*, *Alcaligenes* e *Serratia*. Entre os fungos, *Aspergillus* e *Penicillium* são os mais frequentes, podendo também aparecer espécies de *Alternaria*, *Cladosporium* e outros gêneros.

Para Pence citado por 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.

Martinelli Filho (1987b) cita que os principais tipos de deterioração em pães são o “emboloramento” e a “viscosidade” aparecendo dentro de três dias após o cozimento. A “viscosidade” é uma alteração comumente observada em pães de fabricação caseira, especialmente durante estações quentes e úmidas. É causada por esporos de bactéria do gênero *Bacillus* contaminando os ingredientes, principalmente a farinha, equipamentos e lâminas cortadoras. Os contaminantes podem ser trazidos pelo ar e penetrar na massa devido a práticas inadequadas, como aquecimento insuficiente do forno, esfriamento prolongado e armazenamento em locais quentes e úmidos. Segundo Calvel (1987), a falta de acidez facilita o aparecimento desta alteração causada pelo *Bacillus mesentericus*, seus esporos podem ser tornarem resistentes à cocção do pão e, se o meio é favorável, podem desenvolver-se no interior do pão tornando o miolo cinzento e colante, originando odor e gosto pútridos.

O “emboloramento” é o tipo de deterioração mais importante nos produtos de panificação sendo causado pelo desenvolvimento de fungos. Os mais frequentes são: *Rhizopus nigricans*, *Penicillium expansum*, *Aspergillus niger* e *Neurospora setophilla*.

Segundo Martinelli Filho (1987b), 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 de água. 4) Armazenamento dos pães em lugar quente e úmido.

Segundo Martinelli Filho (1987b), os métodos de conservação de alimentos dependem dos ingredientes, da formulação do tipo de acondicionamento, do método de preservação, da temperatura, da circulação de ar, entre outros.

Dentre os métodos de conservação, na área de panificação os mais usados são a adição de conservantes químicos à massa e a preservação dos produtos a baixas temperaturas. Apesar de serem mais indicados, os conservantes possuem efeitos colaterais eventualmente tóxicos (Simão, 1985). O Comitê Misto FAO/OMS, reunido em 1976, reconheceu a preocupação dos países industrializados, ou em processo de industrialização, com os contaminantes carcinogênicos, mutagênicos, teratogênicos e compartilha com as autoridades sanitárias dos países em desenvolvimento, a inquietação com os riscos especiais a que estão expostos os grupos vulneráveis da população. O Comitê reconheceu que a cooperação dos especialistas em alimentos nestes países em desenvolvimento seria extremamente importante para seu trabalho em matéria de aditivos alimentares e contaminantes dos alimentos (Comitê Misto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios, 1975; 1976).

A refrigeração onera o custo final do produto, sendo que as panificadoras optam por uma produção diária, procurando evitar grandes perdas de produção. As temperaturas baixas são usadas em alimentos para retardar as reações químicas e a ação das enzimas, e diminuir ou paralisar o desenvolvimento e a atividade dos microrganismos. Quando mais baixa for a

temperatura, mais lentas serão as reações químicas, a ação enzimática e o desenvolvimento microbiano e, uma temperatura suficientemente ainda mais baixa impedirá o desenvolvimento de qualquer microrganismo. A preservação pelo uso de baixas temperaturas está associada à diminuição no metabolismo e no desenvolvimento dos microrganismos, tornando mais lentas as reações químicas e enzimáticas. Em temperaturas ligeiramente próximas do ponto de congelamento da água os alimentos manterão suas condições originais, sem a necessidade de pré-tratamentos.

O tempo de armazenamento, nessas condições é limitado; a refrigeração artificial é cara, e a temperatura de armazenamento é crítica para alguns alimentos. O congelamento e o armazenamento sob refrigeração são mais caros e podem ainda resultar em mudanças desagradáveis em alguns alimentos.

O congelamento dos alimentos depende de uma série de fatores, como: o método empregado, a temperatura, a circulação do ar, tipo de refrigerador, tamanho e forma dos recipientes, espécie do alimento, entre outros (Martinelli Filho 1987b).

Preservativos são agentes químicos que servem para retardar, impedir, ou mascarar mudanças indesejáveis em alimentos. Essas mudanças podem ser causadas por microrganismos, pelas enzimas dos microrganismos, ou por reações químicas. Os preservativos podem inibir os microrganismos por interferir em suas membranas celulares, em sua atividade enzimática, ou em seu mecanismo genético. Os preservativos também podem ser usados como antioxidantes para impedir a oxidação das gorduras não saturadas, como neutralizadores de acidez, como estabilizadores para prevenir mudanças físicas, como fixadores, como revestimento ou envoltório para prevenção de invasão dos microrganismos e para prevenir a perda de água, ou impedir indesejáveis reações microbiológicas, enzimáticas e químicas (Martinelli Filho, 1987b).

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

2.2 Microbiota associada a grãos de café

Um dos primeiros relatos sobre a influência de microrganismos na qualidade do café foi realizado por Camargo em 1936, que concluiu que o gosto "ruim" do café estava associado à população microbiana presente durante o período de secagem. O início das investigações se deu, no entanto, através dos trabalhos de Krug em (1940a), quando chamado à Estação Experimental de Pindorama para dar o parecer sobre uma amostra de café "ardido". Com o auxílio de uma lente de bolso, avaliou os grãos cortados, e constatou a existência do micélio de *Fusarium*, resultado esse complementado por Krug, (1940b) que comparou isolados de café cereja, café seco na planta e seco do chão. O café cereja não apresentou contaminação por fungos e bactérias, enquanto os cafés secos no chão, geralmente considerados como os de gosto pior, continham vinte e um por cento de fungos e bactérias no interior das sementes.

Em um ensaio para procurar explicar a razão pela qual existe variação da qualidade dos cafés de duas zonas diferentes, Krug (1941b) verificou, através das observações, que os cafés pioraram gradativamente a qualidade da bebida à medida que aumentavam as percentagens de microrganismos isolados do interior das sementes. O autor notou que o mesmo acontecia para percentagens médias

de *Fusarium roseum*, que provocava uma coloração rósea nas fendas, a qual afetava principalmente a película prateada.

Vários são os fatores ligados à qualidade da bebida do café e estes vão desde influências externas: umidade, temperatura, tipo de solo, etc., até a presença de microrganismos responsáveis por fermentações e podridões que alteram o gosto da bebida, passando ainda pela colheita e preparo do café (Bitancourt 1957a, b), este autor fez diversos isolamentos e observou que os fungos mais abundantes foram *Colletotrichum gloeosporioides* Penz e bolores verdes *Penicillium* spp. Também foram identificados: *Aspergillus niger* v. Tiegh no café seco de terreiro, *Cladosporium*, que se desenvolve ainda no pé e no terreiro, durante a secagem, como normalmente ocorre com outros fungos, como *Rhizopus nigricans* Ehr., *Rhizopus* sp., *Phomopsis* sp. e *Epicoccum* sp.

Hiscocks, citado por Moreau (1979), sustenta que a qualidade organoléptica dos alimentos pode ser alterada pela presença de fungos e, na maioria das vezes, para pior. Espécies de *Aspergillus* são responsáveis pelo sabor amargo e desagradável no café.

Segundo Carvalho e Chalfoun (1985), as enzimas produzidas pelos microrganismos atuam sobre os componentes químicos da mucilagem, principalmente os açúcares, fermentando-os, produzindo álcool, que é desdobrado em ácido acético, láctico, butírico e outros ácidos carboxílicos. Ao se iniciar a produção de ácido butírico, começa a haver prejuízo na qualidade do café. A descoberta do composto 2,4-6 tricloroanizole (TCA) presente em amostras de café "rio" que sofreram a ação dos fungos e bactérias está relacionada com a má qualidade da bebida (Liardon et al., 1989).

Carvalho et al. (1989) verificaram que cafés classificados como de bebida mole e duro apresentaram índices de infecção dos fungos *Fusarium roseum*, *Aspergillus ochraceus* e *Aspergillus flavus* acentuadamente menores que nos cafés classificados como de bebida riada e rio. Por outro lado

apresentaram índices igualmente elevados dos fungos *Fusarium* sp. e *Penicillium*. O fungo do gênero *Cladosporium* predominou nos cafés classificados como de bebida mole e dura.

Para Christensen e Kaufman (1969), conhecer os fungos e entender como, onde e porque eles crescem, é necessário para aqueles que lidam com grãos e sementes armazenadas, porque um dos principais requisitos para um bom armazenamento é a prevenção de desenvolvimento dos fungos.

Entre os integrantes da população fúngica associada a frutos e grãos de café beneficiados Silva et al. (1998), encontraram *Cercospora coffeicola*, *Cladosporium cladosporioides*, *Fusarium semitectum* e *Penicillium* spp., sendo que no gênero *Aspergillus* as espécies *A. niger* e *A. ochraceus* ocorreram com predominância.

Meirelles (1990), demonstrou que a população fúngica é variável com o local de cultivo e tipo de preparo do café após a colheita e com a qualidade da bebida, predominando os seguintes fungos *Cladosporium*, *Penicillium*, *Fusarium* e *Aspergillus* spp. fungos estes também encontrados por Alves e Castro (1993) e Chalfoun et al. (1994)

Mislivec, Bruce e Gibson(1983), estudando a incidência de fungos toxigênicos e outros, sobre grãos de café provenientes de 31 países produtores, antes e após a realização de uma desinfecção superficial com hipoclorito de sódio a 5%, observaram uma ocorrência de fungos que variou de 93,4 a 100% para todos os países, antes da realização da desinfecção. Após a realização desta, constataram uma diferença entre os países Asiáticos e Africanos (80,50%) em relação às amostras provenientes de países da América Central e do Sul (49,40%). O fungo *Aspergillus* spp. que predominou na microflora de 944 amostras, antes e após a desinfecção, incluía várias espécies toxigênicas, tais como: *Aspergillus ochraceus*, *A. flavus* e *A. versicolor*. O

gênero *Penicillium* foi encontrado regularmente, embora com índices de ocorrência baixos: 7,8% antes de desinfecção e 1,5% depois.

Freitas (2000), avaliando a microflora de diversos municípios cafeeiros do Sul de Minas, constatou a presença de espécies potencialmente toxigênicas tais como *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* e *Penicillium verrucosum* que apresentam ameaças concretas para o comprometimento da qualidade em termos de segurança do produto final.

Segundo Chalfoun e Carvalho (1997), as principais medidas de controle destes microrganismos consistem, na fase pré-colheita de cuidados dispensados as lavouras tais como: adubação equilibrada, realização de controle de doenças foliares e dos frutos tais como ferrugem, cercosporiose, phoma e outras, controle de pragas, enfim todos os cuidados que evitem o desenvolvimento de microrganismos que venham do campo juntamente com os frutos. Na fase pós-colheita o manejo adequado de frutos e grãos, principalmente durante a secagem, o café deverá ser armazenado em locais adequados e em armazéns padrões.

A incidência e a infecção dos fungos de armazenamento depende da temperatura do armazém, da umidade da semente, da intensidade de infecção na pré-colheita e dos danos mecânicos ocorridos. Em condições favoráveis de temperatura, espécies do fungo *Aspergillus* podem crescer em sementes com teor de água abaixo de 13,5%, enquanto que *Penicillium* sp. necessita de um grau de umidade acima de 16,5% (Smith e White, 1988).

Os fungos de armazenamento são os mais comuns e destrutivos agentes de deterioração e, de acordo com dados FAO (1997), aproximadamente 5% dos cereais armazenados no mundo são perdidos pela ação desses microrganismos, sendo que em alguns países, essa perda chega a atingir mais de 35% (Neergaard, 1977).

2.3 Aflatoxinas

As aflatoxinas são metabólitos secundários sintetizados por fungos, principalmente, do gênero *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus*. Tais toxinas são responsáveis por graves intoxicações e têm se mostrado carcinogênicas, mutagênicas e teratogênicas a diversas espécies animais, inclusive ao homem.

A ação tóxica do fungo *Aspergillus flavus* já foi descrita em 1913, mas a toxina não foi isolada e o assunto foi esquecido, até que em 1960 morreram 100.000 perus em granjas inglesas. A doença foi inicialmente denominada de *Turkey-x-disease*. Havia graves modificações do fígado com hemorragias. A doença fora ocasionada por ração contendo amendoim brasileiro contaminado com o fungo *Aspergillus flavus*. A substância isolada destes amendoins foi chamada de aflatoxina originada do nome *A. fla-vus*. Atualmente sabemos que a denominação de aflatoxinas cobre uma série de substâncias semelhantes que possuem diferentes graus de toxicidade (Scussel, 1998).

As aflatoxinas se encontram nos alimentos de origem vegetal, bem como produtos modificados originados destas matérias primas. Aflatoxinas não ficam retidas no micélio dos fungos, elas migram para o substrato adjacente. A velocidade de migração na massa crua do pão, no pão pronto e nas nozes do coco é de vários centímetros em poucos dias. Por exemplo, foram encontrados 45.000µg de aflatoxina B₁/Kg no pão integral a 7 centímetros do micélio após uma migração de 9 dias.

Deve-se considerar ainda, que segundo vários autores, levantamentos efetuados sobre amostras de café quanto à presença de micotoxinas, entre eles a aflatoxina, demonstraram que a frequência de contaminação é extremamente baixa e que quando a toxina é encontrada, o nível de contaminação é baixo (Levi e Bocker, 1968; Levi, 1980).

Segundo Micco (1992), 93% da aflatoxina B₁ presente no café é reduzida durante uma torração leve e 99% são eliminadas durante uma torração escura.

2.4 Ocratoxina A (OTA)

Tem sido relatado de maneira crescente que a OTA, devido ao seu efeito hepatotóxico, nefrotóxico, teratogênico e carcinogênico, é considerado um fator de risco para a saúde humana (Xiao et al., 1996).

A OTA tornou-se um problema de saúde pública mundial desde que foi associada com nefropatologia dos Balcans (Krogh et al., 1997). Vários trabalhos tem sido desenvolvidos para documentar a ocorrência de OTA em alimentos para o homem e em rações para animais.

De acordo com Frisvad e Samson (1991), a OTA, é produzida principalmente por duas espécies fúngicas *Penicillium verrucosum* e *Aspergillus ochraceus* que, normalmente, se desenvolvem em grãos com umidade acima de 16% (ICMSF, 1996a e b).

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 (Wiltschko, Pately e Gilbert, 2000).

De acordo com Lopez-Garcia (2000) 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.

2.5 Condimentos no controle de microrganismos e micotoxinas.

As plantas condimentares vêm acompanhando a civilização há mais de 5.000 anos, exercendo grande influência na história mundial, sendo alvo da atenção dos povos e até ligadas diretamente à descoberta de muitos países.

O valor condimentar de uma planta está quase sempre associado ao teor de óleos essenciais, que são compostos químicos gerados durante o desenvolvimento da planta (Furlan, 1998).

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.

Os condimentos são selecionados com base no sabor e cor que eles dão aos alimentos como exemplo, quente (pimenta), pungente (alho), aromático (canela, cravo), herbáceo (sálvia, alecrim) e colorindo (tunérico), Shelef (1983).

A utilização de substâncias naturais, de origem vegetal, torna o alimento mais atrativo ao consumidor por não apresentarem efeito tóxico, mesmo quando empregadas em concentrações relativamente elevadas. Além dos benefícios proporcionados à saúde, diversos estudos têm demonstrado o efeito inibidor de condimentos sobre o desenvolvimento de microrganismos deterioradores e patogênicos veiculados por alimentos. Existe também a perspectiva de substituir os aditivos sintéticos por conservantes naturais presentes nos condimentos (Bara, 1992); Deans e 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 à 1%.

As propriedades antimicrobianas dos condimentos e de seus óleos essenciais tem sido estudadas, principalmente com relação ao efeito inibidor de microrganismos patogênicos presentes em alimentos.

Azzous e 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; as combinações de diferentes concentrações de cravo e sorbato de potássio levaram a um possível efeito inibidor sinérgico no desenvolvimento dos fungos.

Akgul e Kivanç (1988) avaliaram a atividade inibidora de cominho, coentro, endro, louro, orégano, salsa, hortelã, manjeriço e mostarda no desenvolvimento de fungos veiculados por alimentos e verificaram um efeito inibidor pronunciado do orégano, observando um efeito sinérgico resultante da combinação de orégano com cloreto de sódio.

Beuchat (1976) observou que o orégano e o tomilho foram bactericidas para *Vibrio parahaemolyticus* na concentração de 0,15%, enquanto seus óleos essenciais demonstraram esta atividade em concentrações de 100 µg/ml.

Nazrul Islan et al. (1990) avaliaram a eficácia de extratos de canela, cardamom e pimenta e, verificaram que o extrato de canela era bactericida promissor contra 27 cepas testadas.

Bara (1992) avaliou o efeito de inibição de condimentos em pó de alecrim, alho, canela, cebola, cominho, cravo, cúrcuma, gengibre, louro, mostarda, noz-moscada, orégano, páprica, pimenta-da-jamaica, pimenta-preta ou sálvia no desenvolvimento de *Yersinia enterocolitica* e verificou um efeito pronunciado do cravo. Esse mesmo autor constatou que o extrato alcoólico de cravo teve maior eficiência, sugerindo que este condimento exerce uma injúria nas células bacterianas.

O efeito de quatro constituintes de condimentos, timol, eugenol, mentol e anetol foi testado contra *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* e *Vibrio parahaemolyticus*, dos componentes testados, o eugenol foi mais efetivo seguido por timol, anetol e mentol (Karapinar e Aktug, 1987).

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

Hitokoto et al. (1980) testaram 29 condimentos e observaram uma inibição completa de 3 espécies toxigênicas de *Aspergillus* por extratos de cravo, semente de anis 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 desenvolvimento de *Aspergillus flavus* e *A. versicolor* a 0,4mg/ml ou menos; na concentração de 2mg/ml o anetol extraído das sementes de erva-doce inibiu o desenvolvimento de todas as estirpes testadas. Benjilali et al. (1984) testaram o efeito de 6 óleos essenciais em 39 espécies de fungos do gênero *Penicillium*, *Aspergillus* e outros, o óleo de tomilho foi o mais eficiente, seguido pelos óleos, de estragão, alecrim e eucalipto. Farag, Daw e Abo-Raya (1989) obtiveram a seqüência decrescente de maior atividade fungicida de óleos essenciais para *A. parasiticus*: tomilho> cominho>cravo>alcaravia> alecrim>sálvia.

Vários estudos tem evidenciado que os princípios ativos dos condimentos localizam-se na fração de óleo essencial (Parry, 1962; Hitokoto et al., 1980; Pruthi, 1980; Farag, Daw e Abo-Raya, 1989; Koketsu e Gonçalves, 1991). Os óleos essenciais dos condimentos são misturas complexas de

diferentes compostos, que contribuem com as propriedades antimicrobianas (Parry, 1962; Pruthi, 1980).

Bullerman, Liew e Seier (1977), observaram que os óleos essenciais de canela a 200ppm e de cravo a 250ppm foram inibidores do desenvolvimento e da produção de toxina de *Aspergillus parasiticus*, enquanto que o aldeído cinâmico e o eugenol, principais constituintes dos óleos essenciais, apresentaram efeito inibidor a 150 e 125ppm respectivamente, e concluíram que estes são os compostos de maior atividade antifúngica.

Conner e Beuchat (1984a) 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. Conner e Beuchat (1984b) analisaram a sensibilidade de oito leveduras a presença de óleos essenciais de condimentos que, comprovadamente exerceram efeito inibidor sobre este grupo de microrganismos.

Dewit et al. (1979) estudaram o efeito dos óleos de alho e de cebola na produção da toxina botulínica, verificando que a concentração 1.500 µg/g, ambos inibiram a produção da toxina tipo A mas não afetaram a produção das toxinas tipo B e E.

Garc e Siddiqui (1992) realizaram trabalhos com constituintes isolados do óleo essencial de manjeriço (*Ocimum sanctum*) e evidenciaram 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, Prasad e Sinha (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 e Shepherd, (1981) constataram uma atividade antiflatoxigênica significativa, decorrente da inibição do desenvolvimento fúngico.

O óleo essencial de menta e o mentol podem ser usados numa infinidade de outros produtos, pois seu efeito sobre os microrganismos pode ser aproveitado de várias maneiras (Maia, 1994). Singh, Dikhit e Dixit (1983) demonstraram o efeito fungicida e fungistático desse óleo sobre 23 espécies, entre elas *Alternaria* sp, *Curvalaria lunata*, *Fusarium moliniforme*, *F. solani* e *Rizoctonia bataticola*; os autores usaram concentrações variando de 500 a 10.000 ppm de óleo de menta nos respectivos meios de cultura, e observaram inibição de 100% dos micélios, a partir de 2.000ppm, o que levou a afirmar que o óleo de menta (*Menta arvensis*), devido à sua forte atividade fungicida e largo espectro de atividade, superior a alguns fungicidas comerciais, pode ser usado como um forte produto no controle de doenças de plantas e animais. Singh et al. (1992) concluíram em seus estudos que o óleo de menta, além de antifúngico, desempenha um papel antibacteriano, controlando o desenvolvimento de *Salmonella* sp e *Staphylococcus* sp; entre os fungos controlou-se *Alternaria* sp, *Fusarium* sp, *Cochiliobolus sativus*, *Sclerotum rolfsi* e *Aspergillus parasiticus*. Os autores sugerem o uso direto sobre grãos e alimentos armazenados, visando o controle de microrganismos e insetos.

Segundo Bara (1992), o Brasil, por ser um país com imensas áreas agricultáveis e que apresenta um clima favorável ao cultivo de muitos condimentos, necessita de investimentos na formação de recursos humanos para o desenvolvimento desta linha de pesquisa, que constitui uma reivindicação atual de grande parte da população.

2.6 Botânica das espécies e uso terapêutico

A descrição botânica das espécies utilizadas encontram-se relacionadas de acordo com o Laudo Técnico e Identificativo SantosFlora Ervas Medicinais e Aromáticas.

a) *Allium sativum* (alho)

Pertence à família *Liliaceae*. Possui porte de 50 a 60 cm de altura, folhas lineares, inflorescência com flores brancas avermelhadas na forma de umbela pedunculada. As partes utilizadas são os dentes que se encontram nos bulbos. Uso terapêutico: anti-séptico das vias digestivas, antiespasmódico, hipotensor, carminativo e vermífugo. Algumas pesquisas têm indicado que o consumo do alho diminui os níveis de colesterol (Furlan, 1998 e Serrano, 2000a)

b) *Allium cepa* (cebola)

Pertence à família *Liliaceae*. Possui bulbos escamosos. Uso terapêutico: anti-séptico, diurético, antibiótico e bactericida, (Serrano, 2000b)

c) *Cinnamomum burmannil* (canela)

Pertence à família *Lauraceae*. Possui casca enrolada de superfície pardo-amarelada escura, com algumas regiões acinzentadas, face interna pardacenta e lisa. Sabor aromático adocicado. Uso terapêutico: estimulante, contra gripes resfriados e febres, antiespasmódico, etc. (Serrano, 2000c)

d) *Caryophyllus aromaticus* L. (cravo-da-índia)

Pertence à família *Mytaceae*. O botão floral apresenta-se de cor pardo-negra ou vermelho-escura; é formado por um ovário ínfero, arredondado – quadricular, levemente dilatado na parte superior, onde se encontram 2 lojas ovarianas multiovuladas. É coroado por 4 sépalas sub-ovais triangulares, espessas que circundam uma pequena massa globosa, facilmente separável, formada por pétalas arredondadas de cor mais clara. Possui odor fortemente aromático e sabor aromático, ardente. Uso terapêutico: anti-séptico, estomacal, digestivo, contra gases, etc., (Serrano, 2000d)

e) *Pimpinella anisum* (Erva-doce)

Pertence à família *Umbelliferae*. O fruto é constituído por um esquizocarpo ovóide, alargado na base e estreito no vértice, o qual é coroado por um estilopódio espesso com dois estiletos reflexos. São de coloração verde-acinzentada e apresentam cinco quinas pouco salientes, retilíneas e lisas e cobertas de pêlos tectores com cutícula verrucosa; o mesocarpo possui canal secretor; células obliteradas e endosperma. O odor é aromático agradável. Uso terapêutico: estimulante geral, contra gases intestinais, cólicas, etc., (Serrano, 2000e)

f) *Mentha piperita* L. (Hortelã)

Pertence à família *Labiatae*. Possui folhas opostas pecioladas, margens serreadas, de cor verde clara e verde escuro, com nervuras e numerosas pêlos glandulares. Uso terapêutico: anti-séptico, vermífugo, digestivo, expectorante, etc., (Serrano, 2000f)

g) *Laurus nobilis* L. (Louro)

Pertence à família *Lauraceae*. Possui folhas persistentes, pecioladas, alternas, elípticas ou lanceoladas, coriáceas, com bordas onduladas inteiras, lisas, de cor verde-escura, brilhante na face superior e verde-pálida e opaca na inferior. Uso terapêutico: calmante, facilitador da digestão e no tratamento de bronquites crônicas (Rudder, 1998 e Serrano, 2000g)

h) *Ocimum basilicum* L. (Manjerição)

Pertence à família *Labiatae*. Possui folhas persistentes, pecioladas, alternas, elípticas ou lanceoladas, coriáceas, com bordas onduladas inteiras, lisas, de cor verde-escura e brilhante na face superior, e verde pálida e opaca na inferior. Uso terapêutico: anti-séptico hepatoprotetor, digestivo, contra afecções das vias respiratórias e dores de cabeça., (Serrano, 2000h)

i) *Origanum vulgare* L. (Orégano)

Pertence à família *Labiaceae*. Possui folhas veludosas, ovais, levemente denticuladas, odor aromático e sabor amargo. Uso terapêutico: antiespasmódico, carminativo, bactericida, fungicida, (Serrano, 2000i).

j) *Thimus vulgaris* L. (Tomilho)

Pertence à família *Labiatae*. Possui ramos eretos compostos, com bordos enrolados para baixo, de cor verde na parte superior e acinzentado na inferior, com penugens. Flores pequenas de coloração rósea ou branca, às vezes em tons lilases ou avermelhados, nascendo em forma de espigas na axilas das folhas superiores. O odor é aromático e o sabor é levemente picante e levemente amargo. Uso terapêutico: anti-séptico das vias respiratórias e intestinais, antiepasmódico, vermífugo, (Serrano, 2000j).

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKGUL, A.; KIVANÇ, M. Inhibitory effect of selected Turkish spices and oregano components on some common foodborne fungi. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.6, p.263-268, 1988.
- ALVES, E.; CASTRO, H.A. de. Fungos associados ao café (*Coffea arabica* L.) e sua relação com a bebida. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 26., 1993, Aracaju. **Resumos...** Brasília: SBF, 1993. p.329.
- AZZOUS, M.A.; BULLERMAN, L.R. Comparative antimycotic effects of selected herbs, spices, planta components and commercial anti-fungal agents. **Journal of Food Protection**, Ames, v.45, n14, p.1298-1301, Dec. 1982.
- BARA, M.T.F. **Avaliação do efeito inibidor de condimentos no desenvolvimento de *Yersinia enterocolitica***. Viçosa: UFV, 1992. 73p. (Dissertação - Microbiologia Agrícola).
- BENJILALI, B.; TANTAQUI-ELARAKI, A.; AYADI, A.; IHLAL, M. Method to study antimicrobial e effects of essential oils: Application to the antifungal activity of six moroccan essences. **Journal of Food Protection**, Ames, v.47, n.10, p.748-752, Oct. 1984.
- BEUCHAT, L.R. Sensitivity of *Vibrio parahemolyticus* to spices and organic acids. **Journal of Food Science**, Chicago, v.41, n.4, p.899-902, July/Aug. 1976.
- BITANCOURT, A.A. As fermentações e podridões da cereja do café. **Boletim da Superintendência dos Serviços do Café**, São Paulo, v.32, n.359, p.7-14, jan. 1957a.
- BITANCOURT, A.A. O tratamento das cerejas de café para melhorar a bebida. **O Biológico**, São Paulo, v.23, n.1, p.1-11, jan. 1957b.
- 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 Science**, Chicago, v.39, n.6, p.1163-1165, Nov./Dec. 1974.
- BULLERMAN, L.B.; LIEW, F.Y.; SEIER S.A.. Inhibition of growth and aflatoxin production by cinamon and clove oils, cinnamic aldehyde and eugenol. **Journal of Food Science**, Chicago, v.42, n.6, p.1107-1109, Nov./Dec. 1977.
- CAMARGO, R. **Cultura cafeeira: visando qualidade**. São Paulo, s. ed. 1936. 141p.
- CALVEL, R. **O pão francês e os produtos correlatos: tecnologia e prática da anificação**. Fortaleza: J. Macêdo/Comércio, Administração e Participações, 1987. 287p.
- CARVALHO, V.D. de.; CHALFOUN, S.M. Aspectos qualitativos do café. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.11, n.126, p.79-92, jun. 1985.
- CARVALHO, V.D. de; CHALFOUN, S.M.; COSTA COUTO, A.; CHAGAS, S.J. de R.; VILELA, E.R. Efeito do tipo de colheita e local de cultivo na composição físico-química do grão beneficiado. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 15., 1989, Maringá. **Resumos...** Rio de Janeiro: MIC/IBC, 1989. p.23-24.
- CHALFOUN, S.M.; CARVALHO, V.L. de. Efeito de Microrganismos na Qualidade da Bebida do Café. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.18, n.187, p.21-26, 1997.
- CHALFOUN, S.M.; CARVALHO, V.L. de; CHAGAS, S.J. de R; COSTA, L. Controle da microflora associada a frutos e grãos de café (*Coffea arabica* L.) nas fases pré e pós colheita. **Informe Fegatex**, São Paulo, v.1, n.1, p.4-10, nov. 1994.
- CHRISTENSEN, C.M.; KAUFMANN, H.H. **Grain storage: o role of fungi in quality loss**, Minneapolis: University of Minnesota Press, 1969. 153p.
- COMITÊ MIXTO FAO/OMS DE EXPERTOS EN ADITIVOS ALIMENTARIOS. Ginebra, 1975. **Evaluación de ciertos aditivos alimentarios: Algunos colorantes alimentarios, espesantes considerados de humo y otras sustancias: 19º Informe**. Ginebra, 1976. (Org. Mund. Salud Ser. Inf. Tecn. 576).

- COMITÉ MIXTO FAO/OMS DE EXPERTOS EN ADITIVOS ALIMENTARIOS. Roma, 1976. **Evaluación de ciertos aditivos alimentarios: 20º Informe**. Ginebra, 1976. (Org. Mund. Salud Ser. Inf. Tecn. 599).
- CONNER, D.E.; BEUCHAT, L.R. Effects of essential oils from plants on growth of food spoilage yeasts. **Journal of Food Science**, Chicago, v.49, n.2, p.429-434, Mar./Apr. 1984a.
- CONNER, D.E.; BEUCHAT, L.R. Sensitivity of heatstressed yeasts to essential oils of plants. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v.47, n.2, p.229-233, Feb. 1984b.
- DEANS, S.G.; RITCHIE, G. Antibacterial properties of plant essential oils. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.5, n.2, p.165-180, 1987.
- DEWIT, J.C.; NOTERMANS, S.; GORIN, N.; KAMPELMACHER, E.H. Effects of garlic and onion oil on toxin production by *C. botulinum* in meat slurry. **Journal of Food Protection**, Ames, v.42, p.222-224, 1979.
- EL-DASH, A.A.; CAMARGO, C.O.; DIAZ, N.M. **Fundamentos da tecnologia de panificação**. São Paulo: Secretária da Indústria, Comércio, Ciência e Tecnologia, 1982. 349p. (Série Tecnológica Agroindustrial).
- FARAG, R.S.; DAW, Z.Y.; ABO-RAYA, S.H. Influence of some spice essential oils on *Aspergillus parasiticus* growth and production of aflatoxins in a synthetic medium. **Journal of Food Science**, Chicago, v.54, n.1, p.54-74, Jan./Feb. 1989.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). **Recommend practices for the prevention of mycotoxins in food, feed and their products**. Roma, 1997. p. 29-32.
- FREITAS, R.F. **Fungos associados a grãos de café (*Coffea arabica* L.) beneficiado de diversos municípios da região Sul de Minas Gerais**. Lavras: UFLA, 2000. 72p. (Dissertação – Mestrado em Ciência dos Alimentos).
- FRISVAD, J.C.; SAMSON, R.A. Mycotoxins produced by species of *Penicillium* and *Aspergillus* occurring in cereals. In: CHELKOWAKI, J.

- (ed.). **Cereals Grain: mycotoxins, fungi and quality in dryng and storage.** Amsterdam: Elsevier, 1991. p. 441-476.
- FURLAN, M.R. **Ervas e temperos: cultivo e ccomercialização.** Cuiabá: SEBRAE/MT, 1998. v.15, 128p.
- GARC, S.C.; SIDDIQUI, N. Antifungal activity of some essential oil isolates. **Phormazil.** v.47, n.6, p.467- 468, 1992.
- HITOKOTO, H.; MOROZUMI, S.; WAUKE, T.; SAKAI, S.; KURATA, H. Inhibitory effects of spices on growth and toxin production of toxigenic fungi. Tokyo. **Applied and Evironmental Microbiology**, Washington, v.39, n.4, p.818-822, Apr. 1980.
- INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS - ICMSF. Toxigenic fungi: *Aspergillus*. In *Microorganisms in foods, 5. Characteristics of Food Pathogens*. London: Blakie Academic and Professional, 1996a. p.374-381.
- INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS – ICMSF. 1996. Toxigenic fungi: *Aspergillus*. In *Microorganisms in foods, 5. Characteristics of Food Pathogens*. London: Blakie Academic and Professional, 1996b. p.397-413.
- KARAPINAR, M.; AKTUG, S.E. Inhibition of foodborne pathogens by thymol, eugenol, menthol and anethole. **International Journal of food Microbiology**, Amsterdam, v.4, n.2, p.161-166, 1987
- KOKETSU, M., GONÇALVES, S.L. **Óleos essenciais e sua extração por arraste a vapor.** Rio de Janeiro: EMBRAPA-CTAA, 1991. 24p. (EMBRAPA-CTAA. Documentos, 8).
- KROGH, P.; HALD, B.; PLESTINA, R.; CEOVIC, S. Balkan (endemic) nephropathy and foodborne ochratoxin A: preliminary results of a survey of foodstuffs. **Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica, Section B: Microbiology**, Copenhagen, v.85, p.238-240, 1997.
- KRUG, H.P. Cafés duros III. Relação entre a porcentagem de microrganismos e qualidade do café. **Revista do Instituto do Café**, São Paulo, v.15, n.163, p.1827-1831, nov. 1941a.

- KRUG, H.P. Cafés duros. II. Um estudo sobre a qualidade dos cafés de varrição. **Revista do Instituto do Café**, São Paulo, v.15, p.1393- 396, set. 1940b.
- KRUG, H.P. Cafés duros. **Revista do Instituto do Café**, São Paulo, v.15, n.159, p.636-638, maio 1940a.
- KRUG, H.P. **A origem da variação de bebida dos nossos cafés**. Campinas: Sociedade Rural Brasileira, 1941b. 393p.
- LEVI, C.P.; BOKER, E. Survey of green coffee for potential aflatoxins contamination. **Journal of Association Official Analytical Chemistry**, Arlington, v.51, p.600-602, 1968.
- LEVI, C.P. Mycotoxins in coffee. **Journal of Association Official Analytical Chemistry**, Arlington, v.63, p.1282-1285, 1980.
- LIARDON, R.; SPADONE, J.C.; BRAENDLIN, N.; DETAIN, E. Multidisciplinary study of rio flavor in brazililian green coffee. ASIC, 13° Colloque, Paipa, 1989. p.117-126.
- LOPEZ-GARCIA, R. Integrated mycotoxin management systems. In: INTERNATIONAL IUPAC SYMPOSIUM ON MYCOTOXINAS AND PHYCOTOXINS, 10., 2000, Guaruja. **Official program and abstrat book..** Guaruja: Instituto Adolfo Lutz, 2000. p.155.
- MAIA, N.B. **Nutrição mineral, desenvolvimento e qualidade do óleo essencial da mentha (*Mentha arvensis* L.) cultivada em solução nutritiva**. Piracicaba: ESALQ, 1994. 69p. (Dissertação - Mestrado).
- MARTINELLI FILHO, A. **Microbiologia de alimentos I**. Piracicaba: ESALQ/USP. 1987a. 72p.
- MARTINELLI FILHO, A. **Microbiologia de alimentos I**. Piracicaba, ESALQ/USP. 1987b. 248p.
- MEIRELLES, A.M.A. **Ocorrência e controle da microflora associada aos frutos de café (*Coffea arabica* L.) provenientes de diferentes localidades do estado de Minas Gerais**. Lavras: UFLA, 1990. 71p. (Dissertação - Mestrado em Fitotecnia).

- MICCO, M.; MIRAGLIA, M.; BRERA, C.; DESIDERIO, C.; MASCI, V. The effect of roasting on the fate aflatoxin B1 in artificial. Y contamination green coffe beans. **Mycotoxin Research**, Mainz, v.8, p.93-97, 1992.
- MISLIVEC, P.B., BRUCE, V.R.; GIBSON, R. Incidence of toxigenic and other molds in green coffee beans. **Journal of Food Protection**, Washington, v.46, n.11, p.969-973, Nov. 1983.
- MOREAU, C. **Moulds toxins and food**. New York: John Wiley, 1979. 477p.
- 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, 1991. 64p. (Dissertação - Mestrado em Energia Nuclear na Agricultura).
- NAZRUL ISLAM, S.; AHSAN, M.; FERDOUS, A.J.; FAROQUE, A.B.M. In vitro antibacterial activities of commonly used spices. **Bangladesh Journal of Botany**, Dhaka, v.19, p.99-101, 1990.
- NEERGAARD, P. **Seed pathology**. London: Mac Millan Press, 1977. 1119p.
- PARRY, J.W. **Spices: morphology, histology, chemistry**. New York: Chemical Publishing Company, 1962. v.2, p.183.
- PRUTHI, J.S. **Spices and condiments: chemistry, microbiology, techonology**. New York: Academic Press, 1980. p.449.
- RUDDER, E.A.M.C. **Enciclopedia compacta da cura pelas plantas medicinais**. São Paulo: Rideel, 1998. 479p.
- SCUSSEL, V.M. **Micotoxinas em alimentos**. Florianópolis: Insular, 1998. 144p.
- SERRANO, A.M.O. **Laudo técnico e identificativo: alho (*Allium sativum*)**. São Paulo: Santos Flora Ervas Medicinais e Aromáticas, 2000a. (Validade – 07/1999 – 07/2002).
- SERRANO, A.M.O. **Laudo técnico e identificativo: cebola (*Allium cepa*)**. São Paulo: Santos Flora Ervas Medicinais e Aromáticas, 2000b. (Validade – 07/1999 – 07/2002).

- SERRANO, A.M.O. **Laudo técnico e identificativo:** canela (*Cinnamomum burmannil* Meissn). São Paulo: Santos Flora Ervas Medicinais e Aromáticas, 2000c. (Validade – 11/1999 – 11/2002).
- SERRANO, A.M.O. **Laudo técnico e identificativo:** cravo da Índia (*Caryophyllus aromaticus* L.). São Paulo: Santos Flora Ervas Medicinais e Aromáticas, 2000d. (Validade – 09/1999 – 09/2002).
- SERRANO, A.M.O. **Laudo técnico e identificativo:** erva doce importada (*Pimpinella anisum* L.). São Paulo: Santos Flora Ervas Medicinais e Aromáticas, 2000e. (Validade – 11/1999 – 11/2002).
- SERRANO, A.M.O. **Laudo técnico e identificativo:** menta importada (*Mentha piperita* L.). São Paulo: Santos Flora Ervas Medicinais e Aromáticas, 2000f. (Validade – 07/1999 – 07/2001).
- SERRANO, A.M.O. **Laudo técnico e identificativo:** louro (*Laurus nobilis* L.). São Paulo: Santos Flora Ervas Medicinais e Aromáticas, 2000g. (Validade – 07/1999 – 07/2002).
- SERRANO, A.M.O. **Laudo técnico e identificativo:** manjeriço (*Ocimum basilicum* L.). São Paulo: Santos Flora Ervas Medicinais e Aromáticas, 2000h. (Validade – 07/1999 – 07/2002).
- SERRANO, A.M.O. **Laudo técnico e identificativo:** orégano (*Origanum vulgare* L.). São Paulo: Santos Flora Ervas Medicinais e Aromáticas, 2000i. (Validade – 11/1999 – 11/2002).
- SERRANO, A.M.O. **Laudo técnico e identificativo:** tomilho (*Thymus vulgaris* L.). São Paulo: Santos Flora Ervas Medicinais e Aromáticas, 2000j. (Validade – 07/1999 – 07/2002).
- SHELEF, L.A. Antimicrobial effects os spices. **Journal of Food Safety**, Connecticut, n.6, n.1, p.29-44, Aug. 1983.
- SILVA, F.A.N.; FREITAS, R.F.; MACHADO, J.C.; CHALFOUN, S.M. População fúngica associada a frutos de café (*Coffea arabica* L.) durante as fases pré e pós colheita, e sua relação com a qualidade de bebida. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 24., 1998, Poços de Caldas. **Resumos...** Poços de Caldas: IBC, 1998. p.23-24.

- SIMÃO, A.M. **Aditivos para alimentos sob aspecto toxicológico.** São Paulo: NOBEL, 1985. 274p.
- SINGH, A.K.; DIKHIT, A.; DIXIT, S.N. Fungitoxic proprieties of essential oil of *Mentha arvensis* var. *piperascens*. **Perfumer and Flavorist International**, Wheaton, v.8, p.55-58, 1983.
- 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**, Oxford, v.17, n.6, p.269-271, Dec. 1993.
- SINGH, S.P.; CHAND, L.; NEGRI, S.; SINGH, A.K. Antibacterial and antifungal activities of *Mentha arvensis* essential oil. **Fitoterapia**, Milan, v.63, n.1, p.76-78, 1992.
- SMITH, D.R.; WHITE, D.G. Disease of corn. In: SPRAGUE, G.F.; DUDLEY, J.W. **Corn and corn improvement.** 3.ed. Madison: ASA/CSSH/SSSH, 1988. p.687-766.
- WILTSCHKO, D.; PATELY, L.A.; GILBERT, J. Results from an international mycotoxin proficiency testing scheme. In: INTERNATIONAL IUPAC SYMPOSIUM ON MYCOTOXINAS AND PHYCOTOXINS, 10., 2000, Guaruja. **Official program and abstrat book..** Guaruja: Instituto Adolfo Lutz, 2000. p.50.
- XIAO, H., MADHYASTHA, S., MARQUARDT, R.R., LI, S., VODELA, J.K., FROHLICH, A.A.; KEMPPAINEN, B.W. Toxicity of ochratoxin A, its opened lactone from and several of its analogs: structure-activity relationships. **Toxicology and Applied Pharmacology**, San Diego, v.137, p.182-192, 1996.

CAPÍTULO 2

EFEITO DA ADIÇÃO DE CONDIMENTOS EM PÓ, CAFEÍNA E ÓLEOS ESSENCIAIS NO CONTROLE DE FUNGOS E METABÓLITOS ASSOCIADOS A PRODUTOS DE PANIFICAÇÃO E A GRÃOS DE CAFÉ

RESUMO

PEREIRA, Marcelo Cláudio. Efeito da adição de condimentos em pó, cafeína e óleos essenciais no controle de fungos e metabólitos associados a produtos de panificação e a grãos de café. Lavras: 2001. 104p. (Dissertação – Mestrado em Ciência dos Alimentos)*.

O efeito de dez plantas condimentares em pó foi avaliado nas concentrações de 1%,2%,3% e 4% e um conservante químico propionato de cálcio em duas concentrações 0,15% e 0,30% sobre o desenvolvimento micelial e esporulação dos seguintes fungos *Aspergillus niger*, *Rhizopus* sp., *Eurotium repens* e *Penicillium* spp., associados a produtos de panificação os condimentos foram adicionados em meios de culturas (BDA e CYA20S). O condimento cravo inibiu completamente o desenvolvimento micelial de todos os fungos testados. Os demais condimentos canela>alho>tomilho>menta> erva-doce> orégano> cebola foram em ordem decrescente antifúngicos promissores. Os condimentos louro e manjerição não exerceram um efeito fungistático pronunciado. Na primeira etapa de trabalho foram selecionados quatro condimentos para extração do óleo essencial pela técnica de arraste a vapor. Os condimentos canela, alho e tomilho foram testados nas concentrações de 500, 1000, 1500 e 2000 ppm exceto o cravo que foi testado em concentrações de 200, 400, 600 e 800 ppm. O óleo essencial da canela inibiu completamente o desenvolvimento dos fungos testados. Os óleos de tomilho e alho tiveram um efeito pronunciado com o aumento das concentrações. O cravo inibiu o desenvolvimento dos fungos *Aspergillus niger*, *Rhizopus* sp. e *Eurotium repens* a partir da concentração de 600ppm e do fungo *Penicillium* spp. a partir de 800ppm. Para avaliação do potencial antitoxigênico dos condimentos, foram utilizadas duas cepas produtoras de micotoxinas *Aspergillus flavus*, produtora de aflatoxina e *Aspergillus ochraceus* produtora de ocratoxina A, ambas isoladas de grãos de

café (*Coffea arabica* L.). Os condimentos foram testados nas mesmas concentrações citadas anteriormente e foram adicionados em meio de cultura YES, apropriado para a produção de metabólitos. O cravo inibiu completamente o desenvolvimento micelial dos fungos *Aspergillus flavus* e *Aspergillus ochraceus*. A canela e erva-doce inibiram totalmente a produção de aflatoxina B1 e B2. O louro e o manjerição inibiram a síntese de produção de aflatoxina a partir da concentração de 2%. Os demais condimentos não tiveram uma ação antiaflatoxigênica pronunciada. Em relação a produção de ocratoxina A, os condimentos alho e louro inibiram completamente a produção de OTA. Canela e erva-doce tiveram uma ação sobre a produção de OTA, a partir da concentração de 3%. A cafeína também foi testada sobre a produção desses metabólitos nas seguintes concentrações 0,5%; 0,8%; 1,0% e 2,0%. A cafeína inibiu o desenvolvimento dos fungos testados e impediu completamente a síntese de produção metabólitos destes microrganismos em todas as concentrações.

* Comitê orientador: Sára Maria Chalfoun de Souza - EPAMIG (Orientadora), Dra. Vânia Déa de Carvalho - UFLA (Co-orientadora).

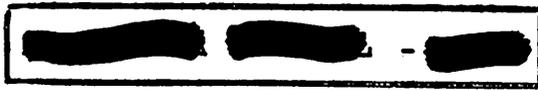
ABSTRACT

PEREIRA , Marcelo Claudio. **Effect of the addition of powdered spices, caffeine and essential oils in the control of fungus and metabolites associated to bread-making products and coffee beans.** Lavras: 2001. 104p. (Dissertation of Master's degree in Food Science)*.

The effect of ten powdered spice plants was evaluated in the concentration of 1 %,2 %,3% and 4% and a chemical preservative in two concentrations 0.015% and 0.30% of the growth micelial and esporulation of the fungi *Aspergillus niger*, *Rhizopus*, *Eurotium repens* and *Penicillium spp.* associated to bread-making products. The spice, clove, inhibited the micelial growth of all the tested fungi completely. The other spices: cinnamon, garlic, thyme, mint, anise, oregano, onion were in a decreasing order of promising antifungal. The spices laurel and basil didnt exercise a pronounced fungistatic effect. In agreement with the first stage of work four spices were selected for the extraction of the essential oil by utilizing the vapor "draging" technique. The spices cinnamon, garlic and thyme were tested in concentrations of 500, 1000, 1500 and 2000 ppm except clove, which was tested in concentrations of 200, 400, 600, and 800 ppm. The essential oil from cinnamon inhibited the growth of the tested fungi completely. The thyme and garlic oils had a pronounced effect in the increase of the concentrated oils Clove inhibited the growth of the fungus *Aspergillus niger*, *Rhizopus sp.* and *Eurotium repens* starting from the concentration of 600 ppm and of the fungus *Penicillium spp.* starting from 800 ppm. For evaluation of the antitoxigenic potential of the spices ,two stump producers of micotoxin *Aspergillus flavus* were used ,the producer of aflatoxin and *Aspergillus ochraceus*; a producer of ochratoxin A , both isolated in coffee beans (*Coffea arabica* L.). The spices were tested in the same concentrations mentioned previously and they were added to the middle of culture YES, appropriate for the metabolites production. Clove, inhibited the growth micelial of the fungus *Aspergillus flavus* and *Aspergillus ochraceus* completely. Cinnamon and anise totally inhibited the aflatoxin production of B1 and B2. Laurel and basil inhibited the synthesis of aflatoxin production starting from the concentration of 2%. The other spices didn't have a pronounced antiaflatoxigenic action. In relation to ochratoxin A production, the spices garlic and laurel inhibited the production of OTA completely. Cinnamon and anise, had an action over the production of OTA over the 3% concentrations. Caffeine was also tested over the production of those metabolites in concentrations of 0.5%;0.8%;1.0% and 2.0%. Caffeine

had a fungistatic action inhibiting the growth of the tested fungus and it prevented the synthesis of metabolites production of these microorganisms completely in all the concentrations.

* Guidance Committee: Dra. Sára Maria Chalfoun de Souza – EPAMIG (Major Professor), Dra. Vânia Déa de Carvalho – UFLA (Co-adviser).



1 INTRODUÇÃO

As plantas condimentares foram amplamente utilizadas por civilizações antigas para melhorar a palatabilidade de alimentos e bebidas. Os egípcios aproveitavam também as características preservativas destas plantas e as propriedades dos óleos essenciais de cravo, canela e cássia, no processo de mumificação de seus mortos. Igualmente, a literatura dos romanos e gregos continham numerosas referências ao uso desses óleos para propósitos medicinais.

Estudos nos últimos anos confirmam a inibição do desenvolvimento de bactérias, leveduras e fungos por alho, cebola, canela, cravo-da-índia, tomilho, sálvia e outros condimentos (Shelef, 1983).

Diversos autores têm pesquisado as atividades antifúngicas e antitoxigênicas dos condimentos (Bullerman, 1974; Bullerman, Liew e Seier, 1977; Arun Sharma, et al., 1979; Dewit et al. 1979; Hitokoto et al. 1980; Azzous e Bullerman, 1982; Farag, Daw e Abo-Raya, 1989).

Segundo Farag et al. (1981) e Krogh et al. (1997), a aflatoxina e a ocratoxina A são metabólitos hepatocarcinogênicos, mutagênicos, teratogênicos, e tóxicos produzidos por fungos do gênero *Aspergillus* e *Penicillium* que podem se desenvolver em uma variedade de alimentos que são contaminados naturalmente, tais como: cereais, amêndoas, frutas secas, leite, café e suco de frutas, podendo produzir efeitos indesejáveis. A quantidade e tipo de micotoxinas, produzidas é altamente dependente da composição química do substrato (Farag, Daw e Abo-Raya, 1989).

Bullerman, Liew e Seier (1977) relataram que os pães de uva passa que continham canela em sua composição, tiveram o desenvolvimento de *Aspergillus parasiticus* e a produção de aflatoxina inibidos.

A cafeína foi responsável pela inibição da produção de aflatoxina em cacau e grãos de café (Nartowicz et al., 1979).

Tais resultados apoiam a hipótese de que a composição química do substrato interfere com a produção de metabólitos (Fischer et al., 1986a).

Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito da adição de condimentos em pó e óleos essenciais sobre a germinação micelial e esporulação de fungos associados a produtos de panificação e a produção de metabólitos (aflatoxina e ocratoxina A) por fungos associados ao café.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Fitopatologia do EcoCentro/EPAMIG, localizado na Universidade Federal de Lavras, no município de Lavras, Região Sul do Estado Minas Gerais.

2.1 Isolados de fungos utilizados

Como culturas de teste foram utilizados espécies de fungos, *Rhizopus* sp., *Penicillium* spp. *Eurotium repens*, *Aspergillus. niger*, que foram obtidos de pães descartados para o consumo por apresentarem sinais de contaminação por esses fungos e mantidos na micoteca do Laboratório de Fitopatologia da EPAMIG.

Foram também utilizadas duas cepas de *Aspergillus flavus* n° EcoCentro 1011T02-01, produtora de aflatoxina e *Aspergillus ochraceus* n° EcoCentro 1161T01-01, produtora de ocratoxina A, isoladas de grãos de café (*Coffea arabica* L) já disponíveis em cultura pura na micoteca do EcoCentro do CTSM/EPAMIG - Lavras, MG.

A cafeína foi testada nas concentrações de 0,5%; 0,8%; 1,0e% e 2,0% visando a inibição da produção de metabólitos dos fungos *Aspergillus flavus* e *Aspergillus ochraceus*.

2.2 Material botânico

Foi avaliado o efeito inibidor de 10 condimentos em pó nas concentrações de 1%, 2%, 3% e 4%, cedidos pela empresa SantosFlora Ervas Medicinais e Aromáticas, São Paulo-SP. Os condimentos foram acrescentados aos meios de cultura na forma de pó e óleos essenciais.

Os condimentos relacionados na Tabela 1 foram testados quanto ao seu efeito inibidor sobre o desenvolvimento dos fungos e a produção de aflatoxina e ocratoxina A, através de testes “in vitro”.

TABELA 1 Classificação botânica e princípios ativos dos condimentos.

Nome Vulgar	Nome Científico	Família	Princípio Ativo
Alho	<i>Allium sativum</i>	<i>Liliaceae</i>	Alicina
Canela	<i>Cinnamomum burmannil</i>	<i>Lauraceae</i>	Aldeído cinâmico
Cebola	<i>Allium cepa</i>	<i>Liliaceae</i>	Oxido tiopropanol
Cravo-da-índia	<i>Caryophyllus aromaticus</i>	<i>Myrtaceae</i>	Eugenol
Erva-doce	<i>Pimpinella anisum</i>	<i>Umbelliferae</i>	Anetol
Hortelã	<i>Mentha piperita L</i>	<i>Labiatae</i>	Carvona
Louro	<i>Laurus nobilis</i>	<i>Lauraceae</i>	Cineol
Manjerição	<i>Ocimum basilicun</i>	<i>Lauraceae</i>	Linalool
Orégano	<i>Origanum vulgare</i>	<i>Lamiaceae</i>	Carvacrol
Tomilho	<i>Thymus vulgaris</i>	<i>Labiatae</i>	Timol

2.3 Avaliação do efeito dos condimentos e em pó sobre o desenvolvimento e esporulação dos fungos isolados de produtos de panificação.

Os estudos “in vitro” das atividades antifúngica dos condimentos em pó foram feitos utilizando os meios de cultura com a adição de um bactericida (cloranfenicol), BDA para *Aspergillus niger* e *Rhizopus* sp. e CYA+20S para *Eurotium repens* e *Penicillium* spp. (Sanson et al., 1995), utilizando-se placas de Petri com 9 cm de diâmetro. Os condimentos foram acrescentados nas concentrações de 0,0 a 4% do pó. Estes foram esterilizados, utilizando irradiação (UV) de uma capela de fluxo durante 6 horas e revolvidos de duas em duas

horas com o auxílio de bastão de vidro, com exceção dos condimentos manjerição, menta e louro que foram autoclavados junto com os meios de cultura (Bara, 1992), por estarem com o índice de contaminação superiores aos demais condimentos.

Após sete dias de incubação, foram efetuadas medições ortogonais do diâmetro das colônias, tendo como referência o desenvolvimento da placa controle.

Para contagem de esporos foi utilizado Câmara de Newbauer.

2.4 Avaliação do óleo essencial dos condimentos selecionados sobre o desenvolvimento dos fungos isolados de produtos de panificação.

A seleção dos condimentos para extração dos óleos baseou-se na eficiência apresentada pelos mesmos em etapa anterior do presente estudo, quando foram testados adicionados ao meio de cultura sob a forma de pó.

Os óleos essenciais dos condimentos cravo-da-índia, canela, alho e tomilho, selecionados para os testes “in vitro” foram acrescentados nas concentrações de 0, 500, 1000, 1500 e 2000 ppm aos meios de cultura BDA E CYA+20S; o cravo foi testado em concentrações 200,400,600 e 800 ppm.

Após sete dias de incubação em BOD com temperatura de 25 °C e fotoperíodo de 12 horas, foram efetuadas medições ortogonais do diâmetro das colônias, tendo como referência o desenvolvimento da placa controle.

2.5 Obtenção do Óleo Essencial

Para obtenção dos óleos essenciais das plantas, utilizou-se a metodologia de arraste a vapor descrita por Koketsu e Gonçalves (1991).

Foram pesados 50g e 100g dos condimentos em pó (cravo), folhas secas (tomilho), casca (canela) e bulbos (alho), ficando estes em contato direto com 1 litro de água em ebulição, flutuando ou imerso no líquido, dependendo da

densidade ou da quantidade de material que foi colocado no recipiente de destilação. A água foi posta em ebulição por aquecimento direto conduzindo o vapor d'água.

2.6 Avaliação dos condimentos em pó e da cafeína sobre a produção de ocratoxina A e aflatoxina

Foi avaliado o efeito dos condimentos em pó e da cafeína sobre a produção de aflatoxina pelo o fungo *Aspergillus flavus* e ocratoxina A pelo fungo *Aspergillus ochraceus* em meio de cultura YES, incubados por 10 dias a 25-26°C (Filtenborg e Frisvad, 1980).

Com o auxílio de uma ponteira de pipeta automática, foi feito um corte circular de aproximadamente 25 mm do micélio do fungo com agar contendo condimentos. Este micélio foi colocado sobre uma placa de CCD (Merk-Sílica Gel 60, 20x20) previamente ativada, junto com o micélio, um ao lado do outro 1,5 cm de distância, a seguir foi feita a eluição em uma cuba de vidro contendo como fase móvel TEF – Tolueno, Acetato de Etila e Ácido fórmico 90% (50:40:10).

Após a eluição as placas foram secas em capela de fluxo. A confirmação foi feita em luz ultravioleta com λ 366nm em cromatovisor CAMAG (UV-BETRACHTER).

A intensidade da fluorescência foi expressa em símbolo (+) adotado subjetivamente, sendo que os que apresentaram a fluorescência mais intensa receberam a nota (+++); fluorescência mediana (++); menor fluorescência (+) e (ND) para os que não apresentaram a fluorescência característica da produção de ocratoxina A e aflatoxina B1 e B2.

Considerando-se que, segundo Llewellyn, Burkett e Eadie (1981), há necessidade de estudar-se, além da sua atividade antimicótica e de seu potencial antitoxigênico, também a possibilidade de serem os próprios condimentos

naturalmente contaminados por micotoxinas, testou-se a presença de micotoxina em cada condimento.

2.7 Delineamento Experimental

Utilizou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado, com 3 repetições sendo que os fatores analisados foram dispostos num esquema fatorial $9 \times 4 \times 3$ (condimentos x fungos x repetições) conforme modelo estatístico: $Y_{ijl} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \delta_{ij} + e_{ijl}$

μ : média geral

Y_{ijl} : observação referente ao condimento na concentração j e repetição l

α_i : efeito do condimento $i = 1$ a 9

β_j : efeito da concentração $j = 1$ a 4

δ_{ij} : efeito da interação condimento i e concentração j .

e_{ijl} : erro aleatório associado a cada observação, sendo $l = 1$ a 3 .

Os dados foram analisados utilizando-se pacote estatístico Sistema de Análise de Variância para Dados Balanceados - Sisvar, segundo Ferreira (2000) e as médias foram comparadas pelo teste de Scott e Knott (1974).

Os condimentos que inibiram totalmente o desenvolvimento micelial não entraram na análise estatística.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Efeito da adição de condimentos em pó e do conservante químico propionato de cálcio sobre o desenvolvimento micelial e a esporulação de fungos associados a produtos de panificação

Os condimentos testados no presente estudo apresentaram, de uma 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%).

Com relação à atuação dos condimentos sobre o desenvolvimento micelial e a esporulação do fungo *A. niger*, observou-se que o cravo e a canela apresentaram uma inibição total (100%) do desenvolvimento micelial do fungo, confirmando a eficiência demonstrada por estes condimentos em trabalhos anteriores (Bachamann, 1916;1918; Hitokoto, 1980; Azzous e Bullerman, 1982; Bara, 1992), motivo pelo qual não foram incluídos nas análises de regressão cuja a representação gráfica para os demais condimentos encontra-se apresentada no texto.

Pelos resultados apresentados na Figura 1, pode-se observar que os condimentos (Alho, Erva-Doce, Menta e Tomilho), apresentaram índices de inibição variáveis de acordo com as concentrações testadas, sendo que 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, manjeriçao, orégano e cebola não apresentaram significativa inibição do desenvolvimento micelial do fungo.

A Figura 2 mostra os resultados referentes aos contrastes entre tratamentos com adição de condimentos e adição de propionato de cálcio nas concentrações de 0,15% e 0,30% e testemunha, observou-se um índice de controle equivalente entre o propionato e os condimentos, e uma superioridade do tratamento com propionato sobre a testemunha, sendo que as duas doses de propionato de cálcio não diferiram entre si.

Deve-se considerar, no entanto, de acordo com Simão (1985) e Martinelli Filho (1987), os eventuais efeitos colaterais tóxicos proporcionados pela adição de conservantes químicos, o que não ocorre através de outros métodos tais como a adição de condimentos que são inócuos à saúde do consumidor.

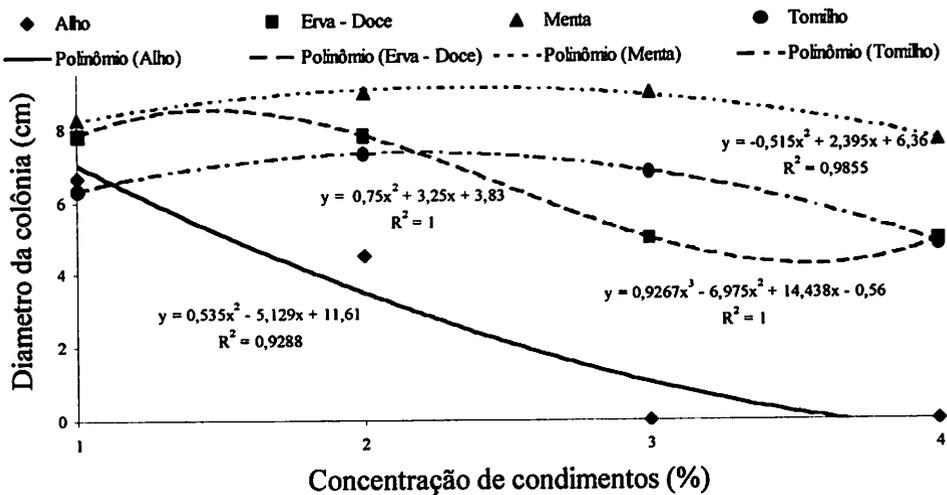


FIGURA 1 Efeito das concentrações dos condimentos em pó sobre o desenvolvimento micelial do fungo *Aspergillus niger*.

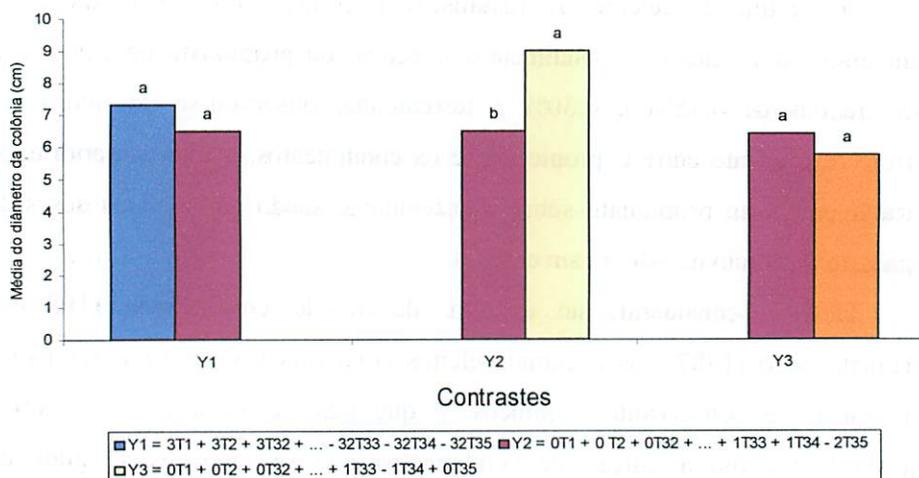


FIGURA 2 Contraste das médias de controle do fungo *Aspergillus niger* expresso em diâmetro das colônias quando submetidos aos tratamentos: condimentos, propionato de cálcio 0,15% e 0,30% e testemunha (sem controle), Y1= Contraste (Condimento vs propionato): Y2 = (propionato vs testemunha) e Y3 = (propionato de cálcio 0,15% vs propionato de cálcio 0,30%).

Quando se analisou o efeito inibidor dos condimentos em pó sobre a esporulação do fungo, verificou-se uma mesma tendência de aumento progressivo da eficiência da inibição da esporulação com a elevação das concentrações dos condimentos testados, conforme ilustrado na Figura 3. Esses resultados concordam com aqueles obtidos por Sharma et al. (1981), que observaram um efeito inibidor do princípio lacrimatório (óxido tiopropanol) da cebola sobre os esporos de *Aspergillus parasiticus*, proporcional à sua concentração e ao tempo de exposição dos esporos ao fator de inibição.

Observou-se, ainda, conforme representado na Tabela 1, que os condimentos alho, menta, tomilho, orégano e louro apresentaram os maiores níveis de inibição de esporulação, seguidos pela cebola, manjerição e erva doce.

Os resultados referentes à análise dos contrastes entre a adição de condimentos, a adição de conservante químico e a testemunha em relação à esporulação do fungo encontram-se representados na Figura 4.

Observa-se que houve uma diferença significativa quanto à esporulação do fungo entre os tratamentos com adição de condimentos e de conservante químico, o qual mostrou-se superior à testemunha e que, de forma semelhante a análise do desenvolvimento micelial, as concentrações do conservante químico propionato de cálcio não diferiram entre si, no controle da esporulação.

O efeito inibidor da esporulação aumenta a eficiência dos tratamentos, uma vez que mesmo que o fungo apresente um determinado grau de desenvolvimento micelial, a redução de sua esporulação reduz o seu potencial de inóculo para outras áreas sadias do produto.

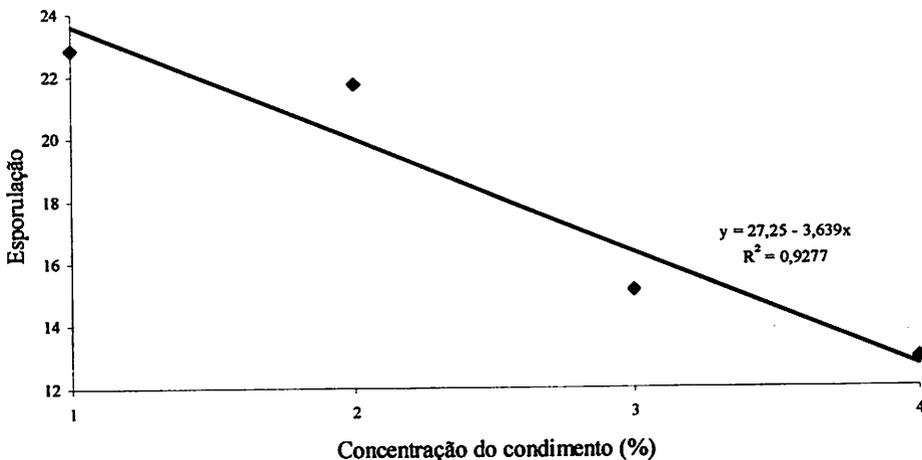


FIGURA 3 Efeito das concentrações dos condimentos em pó sobre a esporulação média do fungo *Aspergillus niger*.

Tabela 1 Efeito de condimentos em pó sobre a esporulação do fungo *Aspergillus niger*.

Condimentos	Esporulação média *
1. Alho	5.41 a
2. Cebola	23.19 b
3. Erva-Doce	37.00 c
4. Menta	14.79 a
5. Tomilho	11.45 a
6. Orégano	18.19 a
7. Manjericão	23.59 b
8.Louro	11.57 a

* Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste Scott & Knott ao nível de 5% de probabilidade.

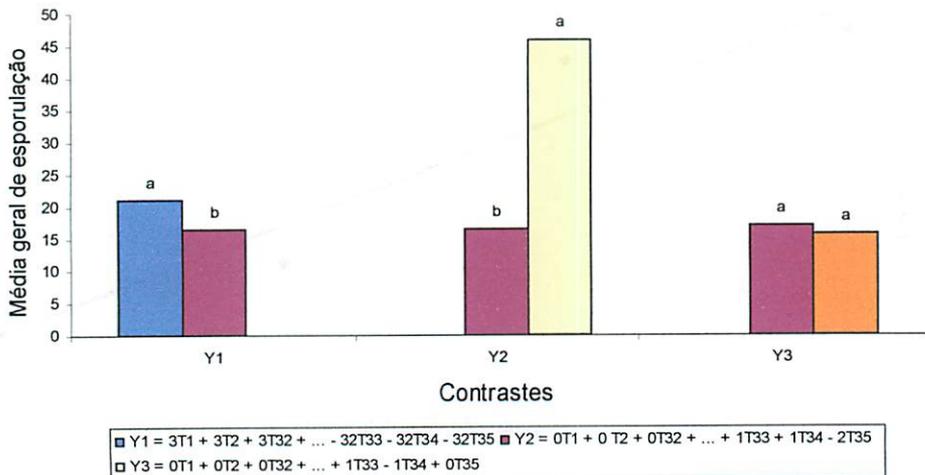


FIGURA 4 Contraste das médias de controle do fungo *Aspergillus niger* expresso em média geral de esporos quando submetidos aos tratamentos: condimentos, propionato de cálcio 0,15% e 0,30% e testemunha (sem controle), Y1= Contraste (Condimento vs propionato); Y2 = (propionato vs testemunha) e Y3 = (propionato de cálcio 0,15% vs propionato de cálcio 0,30%).

A avaliação da eficiência da adição de condimentos sobre o desenvolvimento micelial do fungo *Eurotium repens* demonstrou uma inibição total pelo cravo, em todas as doses testadas, motivo pelo qual não foi incluído nas análises de regressão cuja representação gráfica para os demais condimentos encontra-se apresentada no texto, e uma correlação positiva e significativa entre os condimentos alho, cebola, canela, menta e tomilho em diferentes concentrações testadas conforme representado na Figura 5. Observa-se elevado índice de inibição do fungo por alguns condimentos, entre eles o alho e o tomilho. A canela apresentou uma tendência de controlar totalmente o fungo nas maiores concentrações, enquanto que os menores efeitos foram observados por doses crescentes de menta e cebola.

Os condimentos louro, orégano e erva-doce não tiveram efeito sobre o desenvolvimento micelial do fungo *Eurotium repens*.

A análise dos contrastes entre tratamentos à base da adição de condimentos, conservante químico e testemunha, no controle do diâmetro da colônia do fungo *Eurotium repens*, (Figura 6), demonstrou eficiência superior dos condimentos em relação ao conservante químico, ambos estatisticamente superiores à testemunha. As doses testadas do conservante químico diferiram entre si, a maior dosagem apresentou um comportamento superior.

Com relação aos efeitos da adição de condimentos ao meio em relação esporulação do fungo *Eurotium repens*, (Figura 7), verificou-se que apenas a canela, o tomilho, o louro e o orégano apresentaram elevada correlação entre as concentrações crescentes e a redução da esporulação, enquanto que os condimentos cebola e menta, embora tenham apresentado eficiência quanto a redução do desenvolvimento micelial, não foram capazes de inibir significativamente a esporulação do fungo.

A análise do contraste entre os tratamentos com adição de condimentos, adição de propionato de cálcio e testemunha, quando relacionados com a

esporulação do fungo *Eurotium repens*, (Figura 8), demonstrou a inferioridade dos tratamentos com condimentos em relação ao conservante químico, o qual foi superior à testemunha e confirmou a tendência da semelhança das duas concentrações testadas do conservante químico.

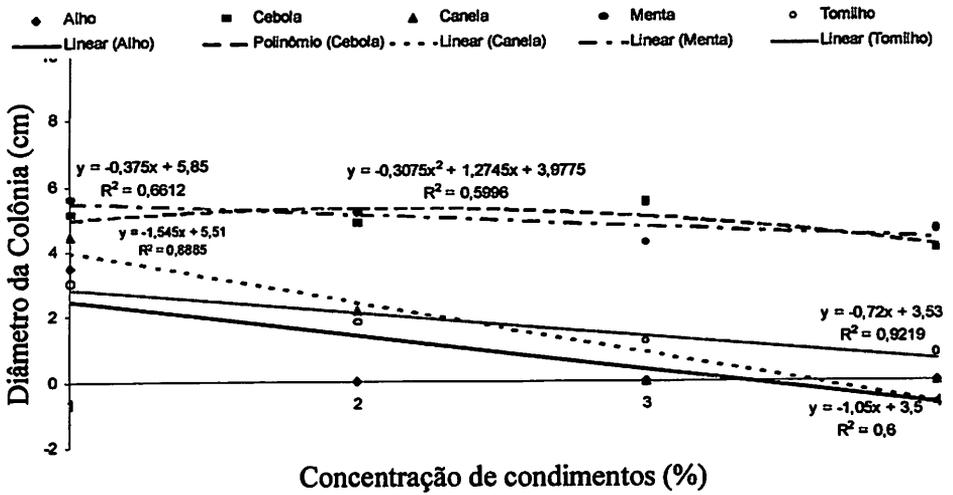


FIGURA 5 Efeito das concentrações dos condimentos em pó sobre o desenvolvimento micelial do fungo *Eurotium repens*.

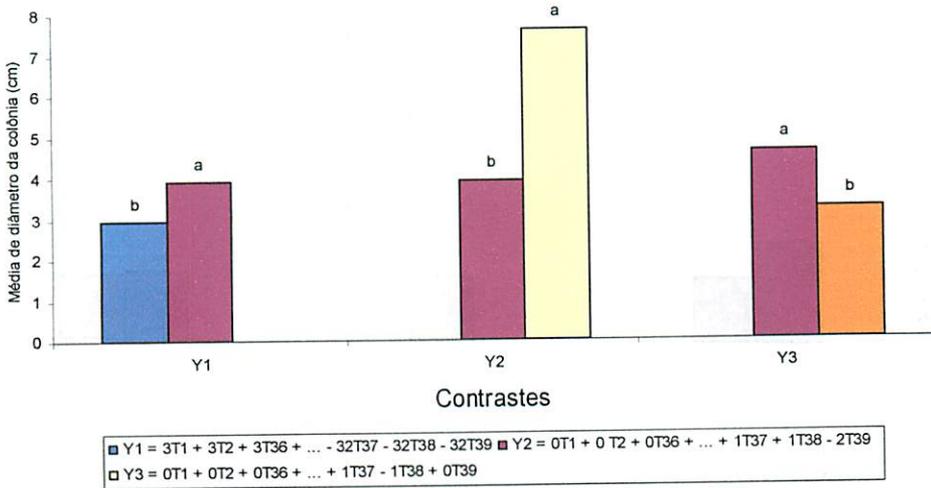


FIGURA 6 Contraste das médias de controle do fungo *Eurotium repens* expresso em diâmetro das colônias quando submetidos aos tratamentos: condimentos, propionato de cálcio 0,15% e 0,30% e testemunha (sem controle), Y1= Contraste (Condimento vs propionato); Y2 = (propionato vs testemunha) e Y3 = (propionato de cálcio 0,15% vs propionato de cálcio 0,30%).

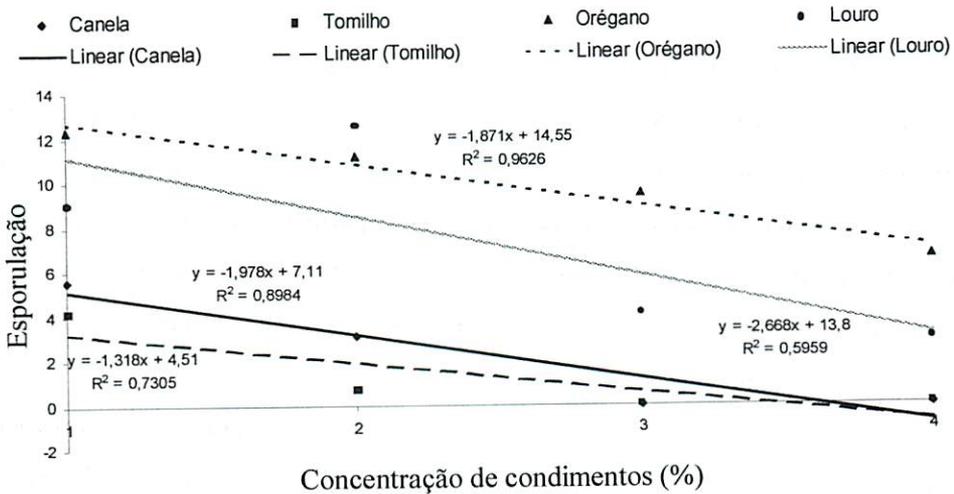


FIGURA 7 Efeito das concentrações dos condimentos em pó sobre a esporulação do fungo *Eurotium repens*.

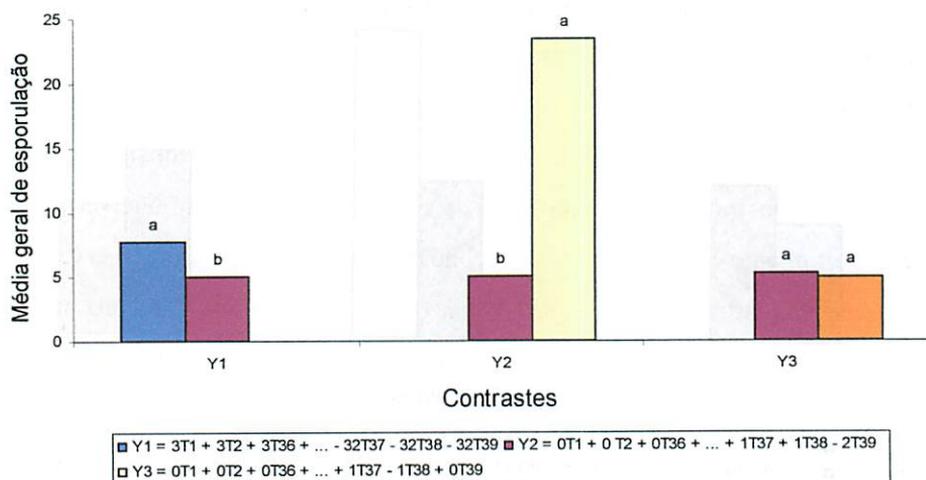


FIGURA 8 Contraste das médias de controle do fungo *Eurotium repens* expresso em média geral de esporos quando submetidos aos tratamentos: condimentos, propionato de cálcio 0,15% e 0,30% e testemunha (sem controle), Y1= Contraste (Condimento vs propionato): Y2 = (propionato vs testemunha) e Y3 = (propionato de cálcio 0,15% vs propionato de cálcio 0,30%).

Com relação à atuação dos condimentos, sobre o desenvolvimento micelial e esporulação do fungo *Penicillium* spp., observou-se que de forma semelhante aos fungos *Aspergillus niger* e *Eurotium repens* um controle total do desenvolvimento micelial e consequentemente esporulação através da adição de cravo em todas as concentrações testadas, motivo pelo qual não foi incluído nas análises de regressão cuja representação gráfica para os demais condimentos encontra-se apresentada no texto.

Observou-se ainda, conforme representado na Figura 9, uma tendência de aumento nos índices de inibição do desenvolvimento micelial do fungo proporcional ao aumento nas concentrações testadas, principalmente para os condimentos canela e tomilho, seguidos pela menta e pelo orégano. O alho afetou o desenvolvimento micelial do fungo *Penicillium* spp. de maneira

bimodal, sendo que nas concentrações próximas de 2 e 4% o desenvolvimento micelial decresceu e nas concentrações de 1 e 3% o desenvolvimento micelial aumentou. Em relação a esse tipo de comportamento (bimodal), requer um estudo específico por se tratar de vários fatores como, tipo de substrato, reação do fungo ao substrato e diferentes tipos de compostos que podem interferir sobre o comportamento do fungo. Os condimentos cebola, louro, erva-doce, manjerição não apresentaram significativa redução do desenvolvimento micelial do fungo nas doses testadas.

Com relação à análise dos contrastes dos tratamentos com adição dos condimentos, adição do conservante químico e testemunha (Figura 10), observou-se que os tratamentos com condimentos e conservante químico apresentaram eficiência semelhante e comportamento superior em relação à testemunha e que as doses testadas do propionato de cálcio não diferiram entre si.

Na Figura 11 encontram-se representados os resultados referentes à eficiência dos tratamentos com adição de condimentos sobre a esporulação, observando-se que apenas o manjerição apresentou um efeito significativo. Observa-se que a esporulação foi afetada de maneira bimodal, sendo que em concentrações próximas de 1 e 3% a esporulação decresceu, enquanto que nas concentrações de 2 e 4% a esporulação tendeu a aumentar.

O contraste das médias dos tratamentos com adição dos condimentos, adição de conservante químico e testemunha (Figura 12), confirmou a semelhança entre tratamentos com condimentos e conservante químico, a superioridade dos tratamentos em relação à testemunha e a semelhança estatística entre as concentrações testadas do conservante químico.

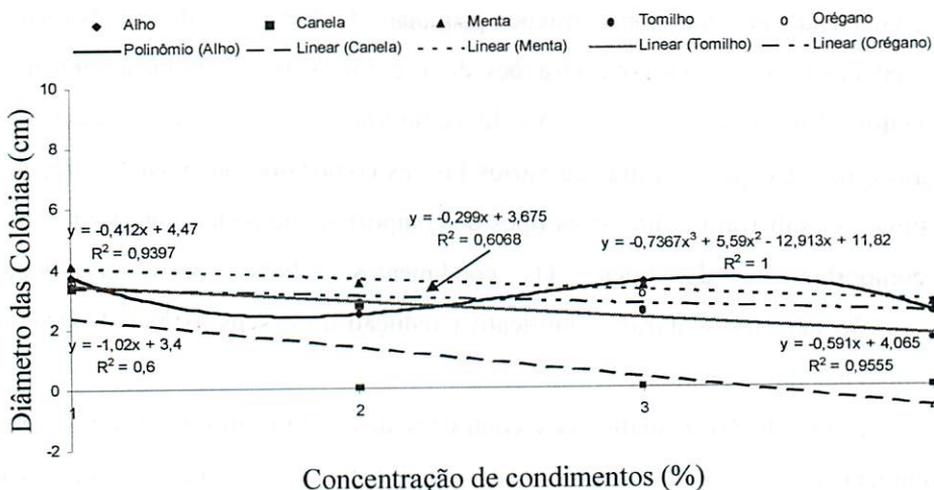


FIGURA 9 Efeito das concentrações dos condimentos sobre o desenvolvimento micelial do fungo *Penicillium* spp.

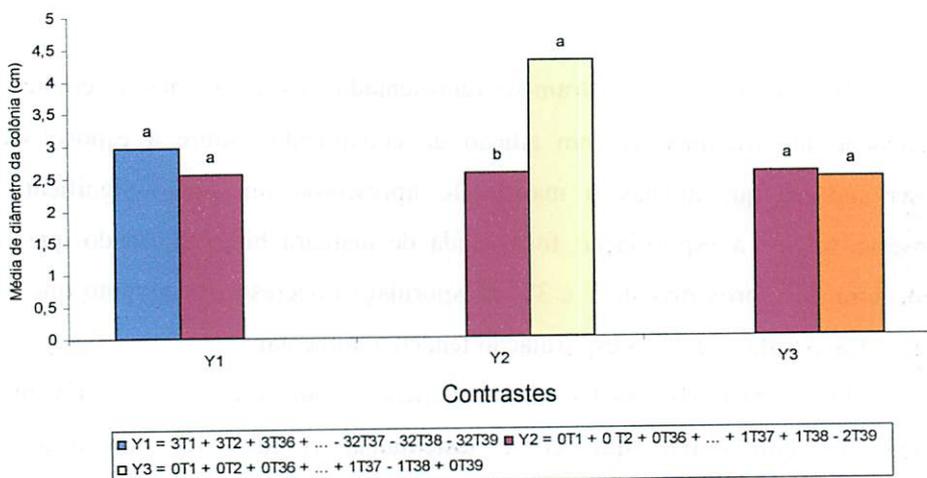


FIGURA 10 Contraste das médias de controle do fungo *Penicillium* spp. expresso em diâmetro das colônias quando submetidos aos tratamentos: condimentos, propionato de cálcio 0,15% e 0,30% e testemunha (sem controle), Y1= Contraste (Condimento vs propionato): Y2 = (propionato vs testemunha) e Y3 = (propionato de cálcio 0,15% vs propionato de cálcio 0,30%).

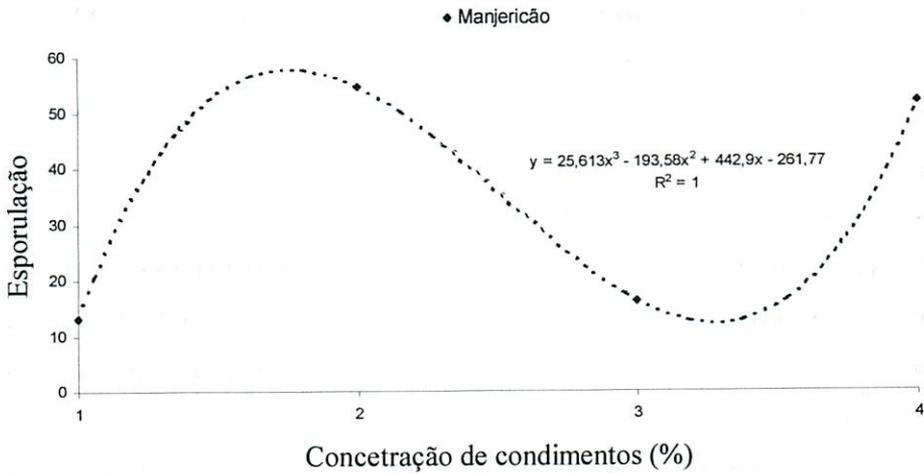


FIGURA 11 Efeito das concentrações do condimento manjeriço em pó sobre a esporulação do fungo *Penicillium* spp.

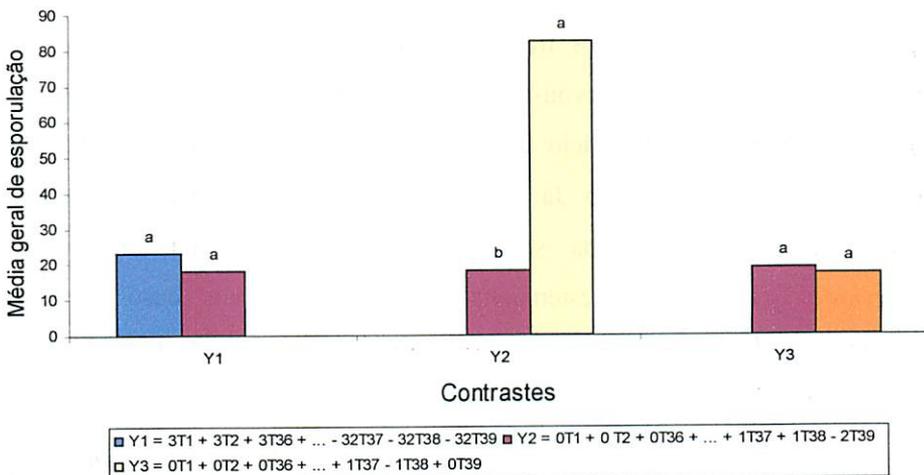


FIGURA 12 Contraste das médias de controle do fungo *Penicillium* spp. expresso em média geral de esporos quando submetidos aos tratamentos: condimentos, propionato de cálcio 0,15% e 0,30% e testemunha (sem controle), Y1= Contraste (Condimento vs propionato); Y2 = (propionato vs testemunha) e Y3 = (propionato de cálcio 0,15% vs propionato de cálcio 0,30%).

Os resultados referentes à eficiência dos tratamentos com adição de condimentos no controle do fungo *Rhizopus* sp., demonstrou um controle total através da adição do cravo, motivo pelo qual não foi incluído nas análises de regressão cuja representação gráfica para os demais condimentos encontra-se apresentada no texto, enquanto que os condimentos canela e tomilho (Figura 13), apresentaram índices crescentes de inibição do desenvolvimento micelial do fungo, à medida que se aumentava a concentração desses condimentos de 1 a 4%. O alho apresentou maiores índices de inibição nas concentrações de 2% e 4%, indicando um efeito bimodal sobre o desenvolvimento micelial do fungo.

Os condimentos cebola, erva-doce, menta, orégano, manjerição e louro não exerceram efeito significativo ($p \geq 0,05$), sobre a inibição do desenvolvimento micelial do fungo *Rhizopus* sp.

A análise de contraste entre tratamentos com adição de condimentos adição do conservante químico e testemunha encontram-se representados na (Figura 14). Com relação aos tratamentos com adição de condimentos e do conservante químico, observou-se uma superioridade dos condimentos em relação ao propionato de cálcio no controle do crescimento do diâmetro da colônia do fungo *Rhizopus* sp. Já no contraste entre o conservante químico e a testemunha, observou-se uma semelhança entre os tratamentos com o conservante químico e a testemunha. Como nos demais casos, as duas concentrações de propionato de cálcio avaliadas não apresentaram diferenças significativas no controle do desenvolvimento microbiano.

Com relação ao efeito da adição de condimentos sobre a esporulação (Figura 15), observou-se que apenas a canela em pó apresentou uma correlação significativa com as diferentes concentrações testadas, sendo que os demais condimentos testados não exerceram efeito na redução da esporulação, independente das concentrações testadas. Observou-se um crescente efeito

inibitório da esporulação do fungo *Rhizopus* sp., com o aumento da concentração da canela em pó.

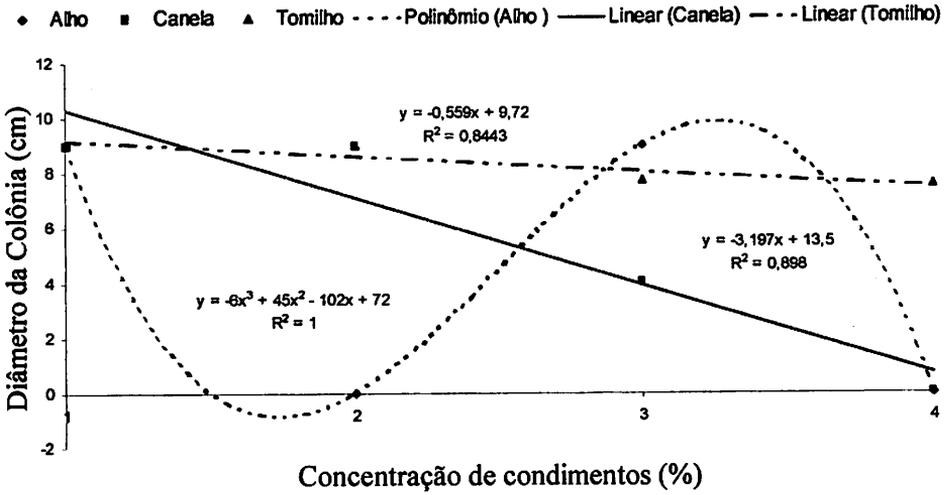


FIGURA 13 Efeito das concentrações dos condimentos em pó sobre o desenvolvimento micelial do fungo *Rhizopus* sp.

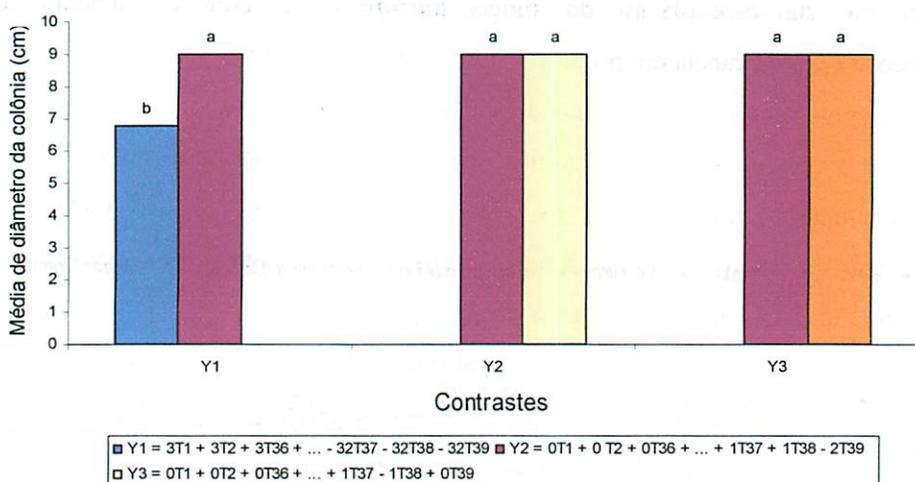


FIGURA 14 Contraste das médias de controle do fungo *Rhizopus* sp. expresso em diâmetro das colônias quando submetidos aos tratamentos: condimentos, propionato de cálcio 0,15% e 0,30% e testemunha (sem controle), Y1= Contraste (Condimento vs propionato); Y2 = (propionato vs testemunha) e Y3 = (propionato de cálcio 0,15% vs propionato de cálcio 0,30%).

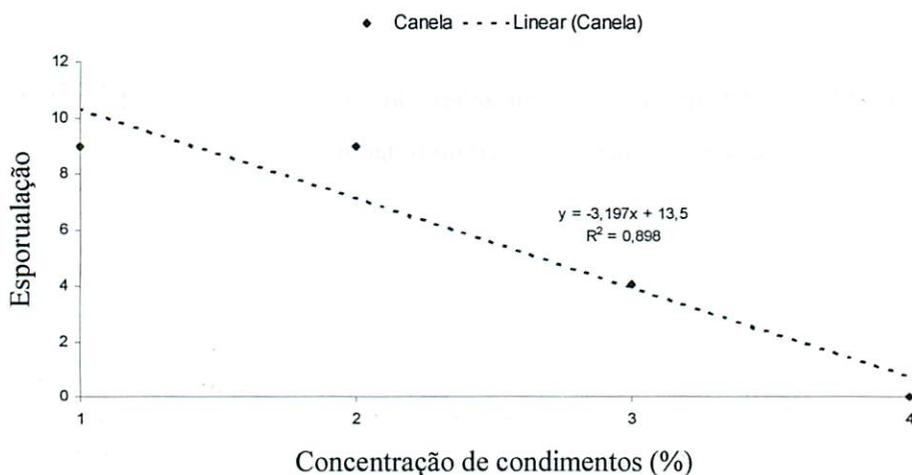


FIGURA 15 Efeito das concentrações do condimento canela em pó sobre a esporulação do fungo *Rhizopus* sp.

O contraste das médias dos tratamentos com condimentos, conservante químico e testemunha (Figura 16), demonstrou uma superioridade do conservante químico sobre os condimentos, no controle da esporulação do fungo *Rhizopus* sp. o conservante químico apresentou um comportamento superior à testemunha. Comparando-se as diferentes concentrações do conservante químico, observou-se que não apresentaram diferenças significativas entre si no controle da esporulação do fungo *Rhizopus* sp.

Como ocorreu com o fungo *Eurotium repens*, os condimentos foram mais eficientes que os conservantes em manter o diâmetro da colônia reduzido, mas a esporulação foi melhor inibida pelos conservantes.

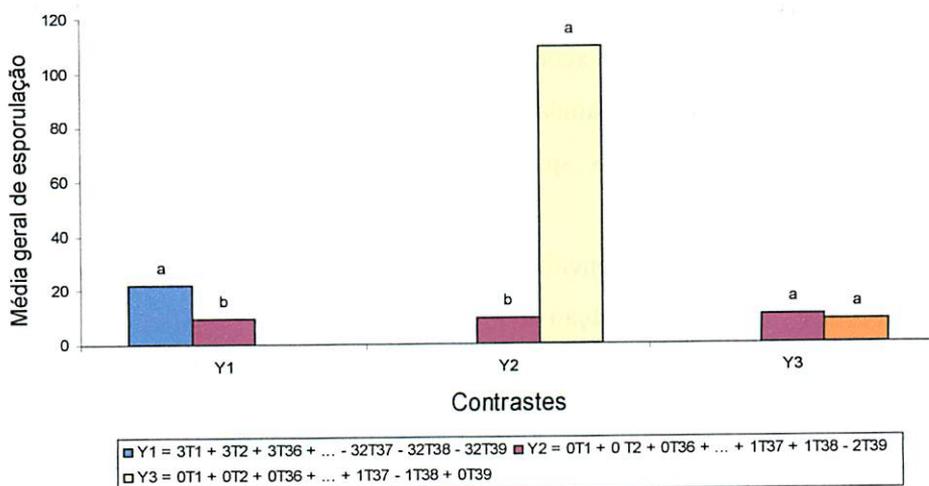


FIGURA 16 Contraste das médias de controle do fungo *Rhizopus* sp. expresso em média geral de esporos quando submetidos aos tratamentos: condimentos, propionato de cálcio 0,15% e 0,30% e testemunha (sem controle), Y1= Contraste (Condimento vs propionato); Y2 = (propionato vs testemunha) e Y3 = (propionato de cálcio 0,15% vs propionato de cálcio 0,30%).

O presente estudo possibilitou a confirmação do potencial de alguns condimentos na inibição do desenvolvimento micelial dos fungos *Aspergillus niger*, *Eurotium repens*, *Penicillium* spp. e *Rhizopus* sp., sendo que o cravo (*Caryophyllus aromaticus*), apresentou um controle total (100%) do desenvolvimento micelial de todos os fungos, em todas concentrações testadas motivo pelo qual não foi incluído nas análises de regressão, cuja representação gráfica para os demais condimentos encontra-se apresentada no texto, e a canela apresentou uma inibição total do desenvolvimento micelial do fungo *A. niger* e inibição proporcional ao aumento das concentrações do desenvolvimento micelial em relação aos fungos *Eurotium repens*, *Penicillium* spp. e *Rhizopus* sp. e da esporulação *E. repens* e *Rhizopus* sp.

O tomilho e o alho apresentaram níveis crescentes de inibição do desenvolvimento micelial de acordo com o aumento de suas concentrações, sendo que o tomilho reduziu ainda a esporulação dos fungos *Aspergillus niger*, *Eurotium repens* e *Rhizopus* sp. e o alho reduziu a esporulação do fungo *Aspergillus niger*.

A menta inibiu o desenvolvimento micelial do *A. niger*, *Eurotium repens* e *Penicillium* spp. e a esporulação do *Aspergillus niger*.

O manjerição, embora não tenha inibido o desenvolvimento micelial dos fungos, inibiu o processo de esporulação dos fungos *Aspergillus niger* e *Penicillium* spp.

O orégano inibiu o desenvolvimento micelial do *Penicillium* spp. e a esporulação dos fungos *Aspergillus niger* e *Eurotium repens*.

A cebola inibiu apenas o desenvolvimento micelial do *Eurotium repens*.

O louro e a erva-doce não apresentaram efeitos sobre o desenvolvimento micelial e a esporulação dos fungos estudados.

De uma maneira geral, a dose mínima do propionato de cálcio (0,15%), foi suficiente para a inibição do desenvolvimento micelial e da esporulação dos

fungos testados, sugerindo a necessidade de se rever a recomendação quanto a concentração deste aditivo químico.

3.2 Efeito da adição de óleos essenciais sobre o desenvolvimento de fungos associados a produtos de panificação

Conforme representado na Tabela 2 e pelas Figuras 17, 18, 19 e 20, observa-se que, de uma maneira geral, os óleos essenciais obtidos dos condimentos selecionados com base nos resultados obtidos na primeira etapa do presente trabalho apresentaram um elevado índice de inibição do desenvolvimento micelial dos fungos estudados, quando comparados com a testemunha não tratada.

Com relação ao cravo, conforme representado na Tabela 2 e na Figura 17, as concentrações testadas foram mais reduzidas que as dos demais condimentos, baseando-se na elevada eficiência apresentada pelo condimento quando testado na forma de pó e com base em resultados anteriores (Bullerman, Liew e Seier, 1977). Observa-se que a partir de 600 ppm todos os fungos estudados tiveram, com exceção do *Penicillium* spp., o desenvolvimento micelial inibido. Os resultados concordam com aqueles obtidos anteriormente (Hitokoto et al., 1980; Azzous e Bullerman, 1982; Shelef, 1983), em que se evidencia o elevado poder antimicrobiano do cravo.

TABELA 2 Eficiência de várias concentrações de óleos essenciais sobre o desenvolvimento micelial de fungos associados a produtos de panificação após sete dias de incubação.

TRATAMENTOS	DESENVOLVIMENTO MICELIAL (%)			
	A. niger	Rhizopus sp.	E. repens	Penicillium spp.
Tomilho 500 ppm	3.5	0.0	0.0	17.1
Tomilho 1000 ppm	3.5	0.0	0.0	0.0
Tomilho 1500 ppm	1.7	0.0	0.0	0.0
Tomilho 2000 ppm	1,7	0.0	0.0	0.0
Canela 500ppm	0.0	0.0	0.0	0.0
Canela 1000ppm	0.0	0.0	0.0	0.0
Canela 1500ppm	0.0	0.0	0.0	0.0
Canela 2000ppm	0.0	0.0	0.0	0.0
Alho 500ppm	0.0	100	0.0	44,1
Alho 1000ppm	6,9	100	0.0	16,2
Alho 1500ppm	0.0	100	0.0	0.0
Alho 2000ppm	0.0	0.0	0.0	0.0
Cravo 200ppm	100	100	28	63,1
Cravo 400ppm	25	36,7	0.0	20,7
Cravo 600ppm	0.0	0.0	0.0	15,3
Cravo 800ppm	0.0	0.0	0.0	5,5
Testemunha	100	100	100	100

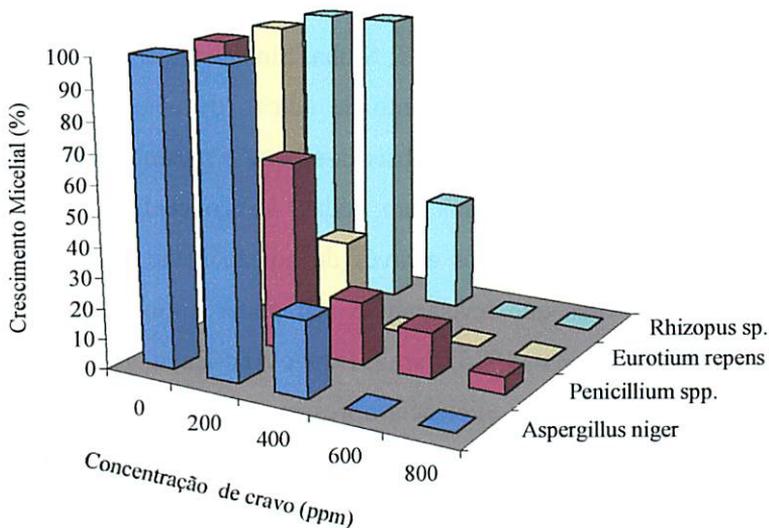


FIGURA 17 Efeito do óleo essencial de cravo sobre o desenvolvimento micelial dos fungos associados aos produtos de panificação após sete dias de incubação.

Os resultados referentes à adição do óleo essencial de alho, conforme representado na Figura 18, demonstraram que este controlou o desenvolvimento micelial de todos os fungos, exceto o do *Rhizopus* sp. que foi controlado apenas na maior dosagem testada, concordando com os resultados obtidos quando se adicionou este condimento ao meio de cultura na forma de pó. Vários outros estudos que comprovaram as propriedades antimicrobianas e medicinais deste condimento (Cavallito e Bailey, 1944; Cavallito, Bayley e Buck, 1945).

Através da Figura 19 pode-se observar que o óleo essencial de canela apresentou um controle total (100%) do desenvolvimento micelial de todos os fungos testados a partir da concentração de 500ppm, confirmando dados anteriores sobre a eficiência deste condimento, quando adicionado sob a forma

de pó e óleo essencial (Bullerman, Liew e Seier, 1977; Tiwari, Dikshit e Chandan, 1983; Patkar et al., 1993; Sinha, Sinha e Gajendra, 1993).

Com relação ao tratamento de adição de óleo essencial de tomilho à cultura de fungos (Figura 20), observa-se que o mesmo apresentou um elevado controle dos fungos testados em todas as concentrações, resultados estes concordantes com os obtidos através da adição deste condimento em pó e de pesquisas anteriores que revelaram o seu poder antimicrobiano (Maruzzella e Liguori, 1958; Beuchat, 1976; Farag, Daw e Abo-Raya, 1989).

À semelhança da eficiência apresentada pelos condimentos aplicados em pó, a eficiência apresentada pelos condimentos adicionados sob a forma de óleos essenciais do cravo, canela, tomilho e alho sobre a inibição do desenvolvimento micelial de fungos associados a produtos de panificação confirmam o fato de que grande parte dos princípios ativos desses condimentos encontra-se concentrada nesta fração (Parry, 1962; Hitokoto et al., 1980; Pruthi, 1980; Farag, Daw e Abo-Raya, 1989; Koketsu e Gonçalves, 1991).

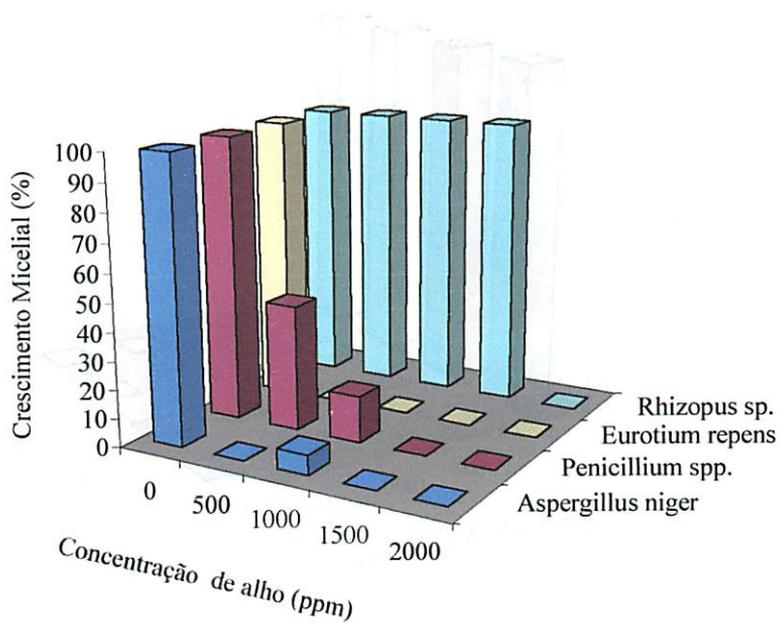


FIGURA 18 Efeito do óleo essencial de alho sobre o desenvolvimento micelial dos fungos associados aos produtos de panificação.

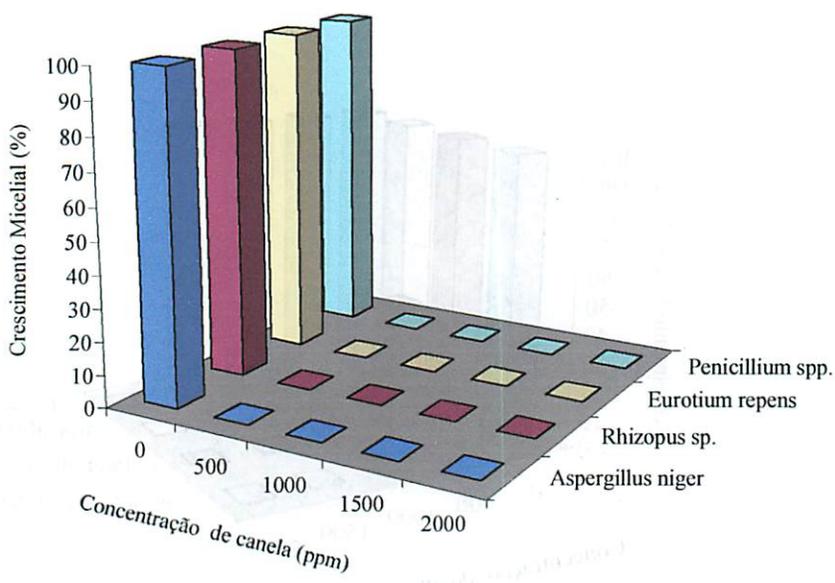


FIGURA 19 Efeito do óleo essencial de canela sobre o desenvolvimento micelial dos fungos associados aos produtos de panificação.

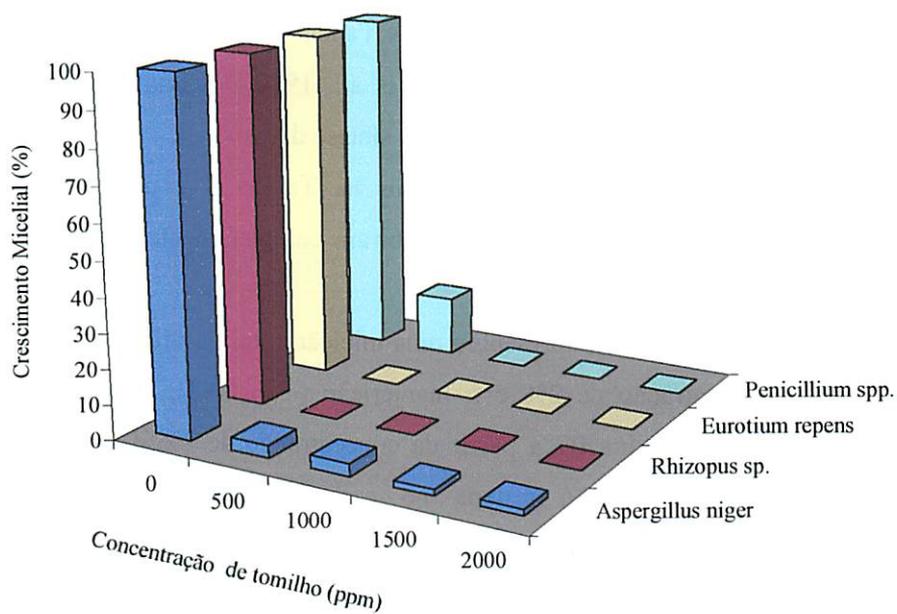


FIGURA 20 Efeito do óleo essencial de tomilho sobre o desenvolvimento micelial dos fungos associados aos produtos de panificação.

3.3 Efeito da adição de condimentos em pó e cafeína sobre a produção de aflatoxina e ocratoxina A de fungos isolados de grãos de café (*Coffea arabica* L).

O desenvolvimento dos fungos toxigênicos foi totalmente inibido pelo cravo, motivo pelo qual não foi incluído nas Tabelas 3 e 4, o que comprova os resultados obtidos anteriormente (Hitokoto et al., 1980; Azzous e Bullerman, 1982), sobre os efeitos do cravo impedindo a síntese das toxinas.

Através dos resultados apresentados na Tabela 3 e pela Figura 21, observa-se que a canela e a erva-doce inibiram completamente a produção de aflatoxina B1 e B2.

O louro (Figura 21), apresentou uma inibição total da aflatoxina B1 e B2 a partir da concentração de 2% e o manjericão (Tabela 3), apresentou uma inibição total da aflatoxina B2 a partir da concentração de 2% e a inibição foi proporcional à concentração testada no caso da aflatoxina B1, inibida completamente a partir da concentração de 3%.

Com relação ao tomilho observou-se uma inibição total da aflatoxina B2, enquanto que, para a aflatoxina B1, verificou-se uma inibição pelo condimento apenas na menor concentração testada.

O alho (Figura 21), e a menta apresentaram um comportamento semelhante a produção da aflatoxina B1 não observando-se uma correlação entre concentrações testadas e inibição da toxina. Em relação a aflatoxina B2 (Tabela 3), o alho inibiu completamente esta síntese.

No caso da cebola, observou-se que em todas as concentrações ocorreu a síntese da toxina, embora em menor intensidade nas concentrações menores (1%) e intermediárias (3%).

A aflatoxina B1 e B2 só foi inibida pelo orégano na maior concentração testada (4%), sendo que nas menores concentrações (1%;2% e 3%) apresentou

fluorescência mais intensa, semelhante ao padrão, indicando a máxima produção da toxina.

Nas diferentes concentrações da cafeína, observou-se que a aflatoxina B1 e B2 foi totalmente inibida.

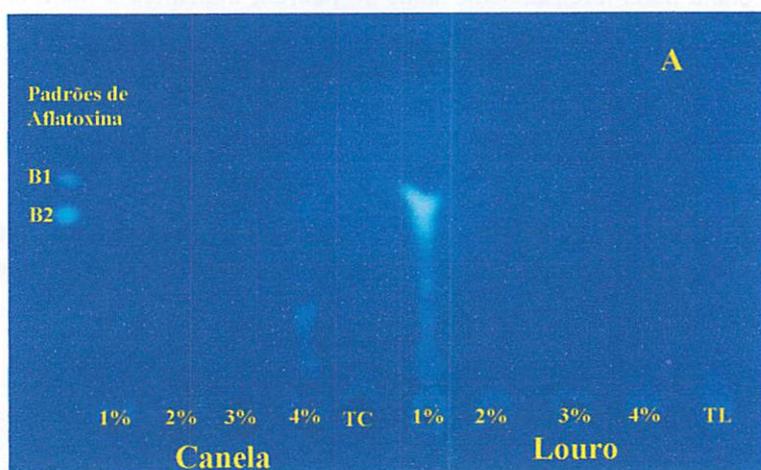
TABELA 3 Resultados da adição de condimentos em meio de cultura YES, visando a inibição da produção de aflatoxina pela técnica de Plug Agar.

TRATAMENTOS										
Doses	Tomilho		Alho		Canela		Orégano		Louro	
	B1	B2	B1	B2	B1	B2	B1	B2	B1	B2
1%	ND	ND	+	ND	ND	ND	+++	+++	+++	+++
2%	+++	ND	ND	ND	ND	ND	+++	+++	ND	ND
3%	+++	ND	+	ND	ND	ND	+++	+++	ND	ND
4%	+++	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
TC*	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CONTINUAÇÃO										
Doses	Manjeriçã		Menta		Erva-Doce		Cebola		Cafeína**	
	B1	B2	B1	B2	B1	B2	B1	B2	B1	B2
1%	++	++	++	++	ND	ND	+	+	ND	ND
2%	+	ND	+++	+++	ND	ND	+++	+++	ND	ND
3%	ND	ND	ND	ND	ND	ND	+	+	ND	ND
4%	ND	ND	+++	+++	ND	ND	+++	+++	ND	ND
TC*	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

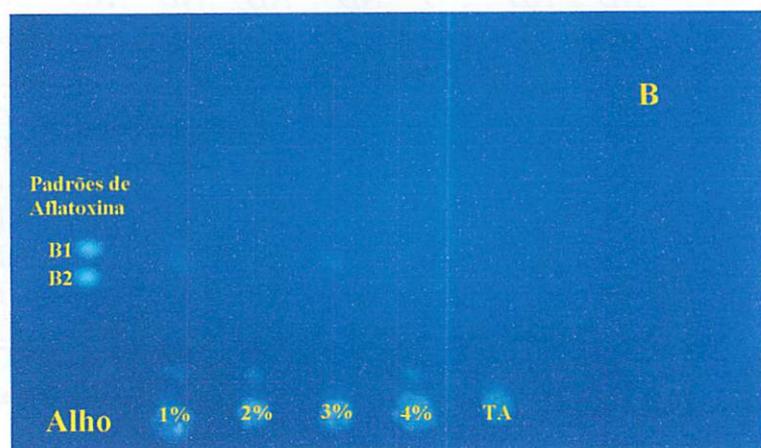
* Placa contendo apenas meio de cultura e condimento

** Cafeína testada nas seguintes concentrações 0,5%,0,8%,1,0% e 2,0%

ND – Não Detectada



TC – Testemunha contendo apenas o condimento canela
 TL – Testemunha contendo apenas o condimento louro



TA – Testemunha contendo apenas o condimento alho

FIGURA 21 Resultados da produção de aflatoxina pela técnica de Plug Agar em meio contendo Canela (1%;2%;3%;4% e TC) e Louro (1%;2%;3%;4% e TL) (A) e Alho (1%;2%;3%;4% e TA) (B).

Conforme resultados apresentados na Tabela 4, observou-se que o alho e o louro (Figura 22), apresentaram uma inibição total da formação da ocratoxina A, enquanto que a canela e a erva-doce exibiram um grau de inibição proporcional às concentrações testadas, mostrando uma inibição total a partir da concentração de 3%.

O tomilho apresentou, a exemplo do ocorrido com a aflatoxina B1, uma inibição total apenas na menor concentração, apresentando as maiores intensidades de formação da toxina nas concentrações de 2% e 4%, enquanto que os tratamentos com orégano e menta (Figura 22), manjerição e cebola, não apresentaram correlação entre as concentrações testadas e inibição das toxinas.

A análise dos efeitos dos condimentos sobre a produção das micotoxinas aflatoxina B1 e B2 e ocratoxina A demonstrou um efeito inibidor mais intenso dos condimentos canela, erva-doce e louro. Considerando-se a possibilidade da atuação desses condimentos sobre as toxinas estudadas que podem ocorrer no café, apenas o cravo, a canela e a erva-doce são viáveis de associação direta com o produto, podendo ser aliados às propriedades antimicrobianas e antitoxigênicas do café, e aumentar ainda mais a suas características de segurança para o consumidor, além de melhorar as características organolépticas desta bebida.

Com relação à inibição das toxinas pela cafeína, os resultados confirmam afirmativas de outros autores, segundo os quais a composição química do café é adversa à síntese de micotoxinas (Buchanan e Fletcher, 1978; Buchanan, Harry e Gealt, 1983; Buchanan, Hoover e Jones, 1983; Chalfoun, Pereira e Angélico, 2000), permitindo classificá-lo como uma fonte marginal destas toxinas na dieta.

Embora as atividades antifúngica e antitoxigênica dos condimentos sejam características comprovadas, os resultados obtidos através do presente trabalho concordam com resultados anteriores, nos quais a atividade

antimicrobiana e antitoxigênica pode ser estimulada em concentrações crescentes de condimentos (Salmeron, Jordano e Pozo, 1990).

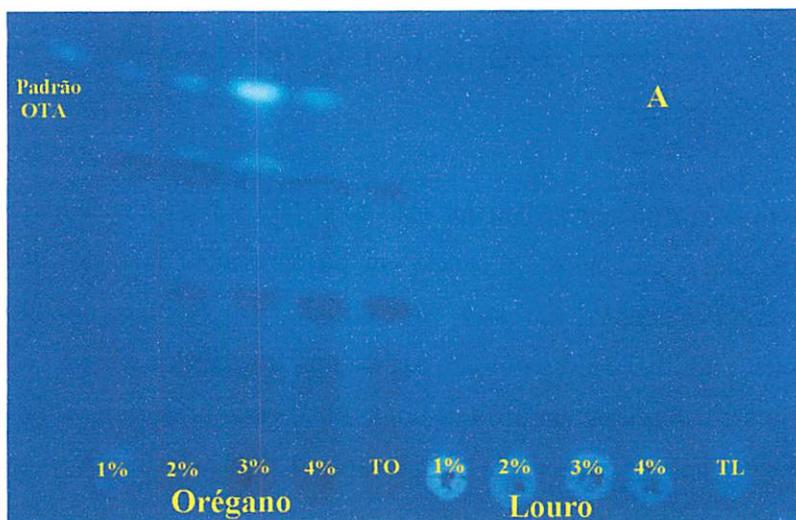
TABELA 4 Resultados da adição de condimentos em meio de cultura YES, visando a inibição da produção de ocratoxina A pela técnica de Plug Agar.

TRATAMENTOS					
Doses	Tomilho	Alho	Canela	Orégano	Louro
1%	ND	ND	+	+	ND
2%	+++	ND	+	++	ND
3%	+	ND	ND	+++	ND
4%	+++	ND	ND	++	ND
TC*	ND	ND	ND	ND	ND
CONTINUAÇÃO					
Doses	Manjeriçã	Menta	Erva-Doce	Cebola	Cafeína**
1%	+++	ND	+++	ND	ND
2%	+	+++	+	+++	ND
3%	+	++	ND	++	ND
4%	+++	ND	ND	+	ND
TC*	ND	ND	ND	ND	ND

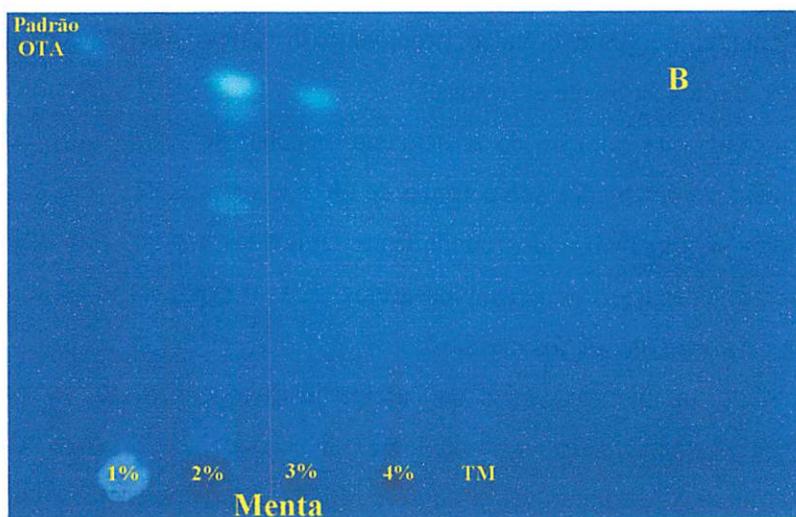
* Placa contendo apenas meio de cultura e condimento

** Cafeína testada nas seguintes concentrações 0,5%,0,8%,1,0% e 2,0%

ND – Não Detectada



TO – Testemunha contendo apenas o condimento orégano
 TL – Testemunha contendo apenas o condimento louro



TM – Testemunha contendo apenas o condimento menta

FIGURA 22 Resultado da produção de ocratoxina A pela técnica de Plug Agar em meio contendo Orégano (1%;2%;3%;4% e TO) e Louro (1%;2%;3%;4% e TL) (A) e Menta (1%;2%;3%;4% e TM) (B).

4 CONCLUSÕES

O cravo em pó apresentou inibição total (100%) do desenvolvimento micelial dos fungos estudados. A canela em pó apresentou inibição total do fungo *Aspergillus niger* e, para os demais fungos, controlaram o desenvolvimento micelial e a esporulação nas maiores concentrações.

Outros condimentos em pó, tais como alho, erva-doce, menta, tomilho, cebola, orégano, louro e manjerição apresentaram redução do desenvolvimento micelial e da esporulação em concentrações crescentes.

De maneira geral, os tratamentos com condimentos em pó equipararam quanto à inibição do desenvolvimento micelial e a esporulação dos fungos ao tratamento com conservante químico propionato de cálcio nas concentrações 0,15 e 0,30%, tradicionalmente utilizadas.

A eficiência da inibição do crescimento micelial de fungos apresentada pelos condimentos adicionados sob a forma de óleos essenciais de cravo, canela, tomilho e alho, à semelhança dos condimentos aplicados em pó, confirmam o fato de que grande parte dos princípios ativos de tais produtos encontram-se concentrada na fração oleosa dos mesmos.

O efeito antimicotoxigênico da cafeína justifica, em parte, os baixos níveis de micotoxinas detectados no café, indicando ser a sua própria composição química desfavorável a síntese das toxinas, potencializando as condições de segurança das misturas de café com alguns condimentos.

Os condimentos testados encontravam-se livres de contaminação de aflatoxina B1 e B2 e por ocratoxina A, indicando não serem os próprios condimentos fontes das toxinas, o que justifica-se através do elevado padrão de qualidade dos produtos utilizados.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARUN SHARMA, G.M.; TEWARI,A.J.;SHRIKHANDE, S.R.; PADWAL-DESAL, BANDYOPADHYAY, C. Inibition of aflatoxin-producing fungi by onion extracts. **Journal of Food Science**, Chicago, v.44, p.1545-1547, 1979.
- AZZOUS, M.A.; BULLERMAN, L.R. Comparative antimycotic effects of selected herbs, spices, planta components and commercial anti-fungal agents. **Jouranl of Food Protection**, Ames, v.45, n.14, p.1298-1301, 1982.
- BACHAMANN, F.M. The inhibiting action of certain spices on the growth of microorganisms. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, Easton, n.8, p.620-623, 1916.
- BARA, M.T.F. **Avaliação do efeito inibidor de condimentos no desenvolvimento de Yersinia enterocolitica**. Viçosa: UFV, 1992. 73p. (Dissertação - Microbiologia Agrícola).
- BEUCHAT, L.R. Sensitivity of *Vibrio parahemolyticus* to spices and organic acids. **Journal of Food Science**, Chicago, v.41, n.4, p.899-902, July/Aug. 1976.
- BUCHANAN, R.L.; FLETCHER, A.M. Methylxanthine inhibition of aflatoxin production. **Journal Food of Science**, Chicago, v.43, p.654-655, 1978.
- BUCHANAN, R.L.; HARRY, M.A.; GEALT, M.A. Caffeine inhibition of steigmatcystin, citrinin and patulin production. **Journal of Food Science**, Chicago, v.48, n.4, p.1226-1228, July/Aug. 1983a.
- BUCHANAN, R.L.; HOOVER, D.G.; JONES, S.B. Caffeine inhibition of aflatoxin production: Mode of action. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v.46, n.5, p.1193-1200, Nov. 1983b.
- BULLERMAN, L.B. Inhibition of aflatoxin production by cinamon. **Journal of Food Science**, Chicago, v.39, n.6, p.1163-1165, Nov./Dec. 1974.
- BULLERMAN, L.B.; LIEW, F.Y.; SEIER S.A.. Inhibition of growth and aflatoxin production by cinamon and clove oils, cinnamic aldehyde and

eugenol. **Journal of Food Science**, Chicago, n.42, n.6, p.1107-1109, Nov./Dec. 1977.

CAVALLITO, J.C.; BAYLEY, J.H. Allicin, the antibacterial principle of *Allium sativum*. (i) isolation, physical properties and antibacterial action. **Journal of the American Chemical Society**, Easton, v.66, p.1950-1951, 1944.

CAVALLITO, J.C.; BAYLEY, J.H.; BUCK, J.S. The anti-bacterial principle of *Allium sativum*. 3. Its precursor and "essential oil of garlic." **Journal of the American Chemical Society**, Easton, v.67, p.1032, 1945.

CHALFOUN, S.M.; PEREIRA, M.C.; ANGÉLICO, C.L. Efeito da cafeína (1, 3, 7 - trimethylxantina) sobre o desenvolvimento micelial de fungos associados ao café. **Revista Brasileira de Armazenamento**, Viçosa, n.1, p.50-53, 2000. Edição Especial.

DEWIT, J.C.; NOTERMANS, S.; GORIN, N.; KAMPELMACHER, E.H. Effects of garlic and onion oil on toxin production by *C. botulinum* in meat slurry. **Journal of Food Protection**, Ames, v.42, p.222-224, 1979.

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**, Chicago, v.54, n.1, p.54-74, Jan./Feb. 1989.

FARAG, R.S.; KHALIL, F.A.; TAHA, R.A.; ABOUL-ENIEN, A. Chemical studies on the unsaponifiable matter of the cottonseed and peanut oils infected by *Aspergillus flavus*. **Grasas Y Aceites**, Seville, v.32, p.87, 1981.

FARAG, R.S.; LEITHY, M.A.; BASYONY, A.E.; DAW, Z.Y. Effect of varied substrates on aflatoxin production by *A.parasiticus*. **Journal of the American Oils Chemical Society**, v.63, p.1024, 1986.

FERREIRA, D.F. Análise estatística por meio do Sisvar para Windows versão 4.0 In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Paulo. **Anais...** São Paulo, SP: SIB, 2000. p.255-258.

FILTENBORG, O.; FRISVAD, J.C. A simple screening – method for toxigenic moulds in pure cultures. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, London, v.13, p.128-130, 1980.

- HITOKOTO, H.; MOROZUMI, S.; WAUKE, T.; SAKAI, S.; KURATA, H. Inhibitory effects of spices on growth and toxin production of toxigenic fungi. Tokyo. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.39, n.4, p.818-822, Apr. 1980.
- KOKETSU, M.; GONÇALVES, S.L. **Óleos essenciais e sua extração por arraste a vapor**. Rio de Janeiro: EMBRAPA-CTAA, 1991. 24p. (EMBRAPA-CTAA. Documentos, 8).
- LEVI, C.P. Mycotoxins contamination. **Journal of Association Official Analytical Chemistry**, Arlington, v.63, p.1282-1285, 1980.
- LEVI, C.P.; BOKER, E. Survey of green coffee for potential aflatoxins contamination. **Journal of Association Official Analytical Chemistry**, Arlington, v.51, p.600-602, 1968.
- LLEWELLYN, G.C.; BURKETT, M.L.; EADIE, T. Potential mold growth, aflatoxin production and antimycotic activity of selected natural spices and herbs. **Journal of Association official Analytical Chemistry**, Arlington, v.64, n.4, p.955-960, 1981.
- MARTINELLI FILHO, A. **Microbiologia de alimentos I**. Piracicaba: ESALQ/USP, 1987b. 248p.
- MARUZZELLA, J.C.; LIGUORI, L. The in vitro antifungal activity of essential oils. **Journal of the American Pharmaceutical Association**, Washington, v.47, p.250. 1958.
- MAURY, A.E.; RUDDER, C.D. **Enciclopédia compacta da cura pela plantas medicinais**. São Paulo: Rideel, 1988. 480p.
- NARTOWICZ, V.B.; BUCHANAN, R.L.; SEGAL, S. Aflatoxin production in regular and decaffeinated coffee beans. **Journal of Food Science**, Chicago, v.44, n.2, p.446-448, Mar./Apr. 1979.
- PARRY, J.W. **Spices: morphology, histology, chemistry**. New York: Chemical Publishing Company, 1962. v.2, p.183.
- PATKAR, K.L.; USHA, C.M.; SHETTY, H.S.; PASTER, N.; LACEY, J. Effect of spice essential oils on growth and aflatoxin B1 production by *Aspergillus flavus*. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.17, n.2, p.49-51, Aug. 1993.

- PRUTHI, J.S. **Spices and condiments: chemistry, microbiology, technology.** New York: Academic Press, 1980. p.449.
- SALMERON, J.; JORDANO, R.; POZO, R. Influencia del pimenton (*Capsicum annum* L.) en el desenvolvimiento y production de aflatoxinas de *Aspergillus parasiticus* y *Aspergillus flavus*. **Alimentaria**, Bogota, n.9, p.43-46, 1990.
- SAMSON, R.A.; HOEKSTRA, E.S.; FRISVAD, J.C.; FILTENBORG, O. **Introduction to food-borne fungi.** 4.ed. Centraalbureau Voor Schimmelcultures Baarn Delft, 1995. p.322
- SHARMA, A.; PADWALL-DESAI, S.R.; TEWARI, G.W. BANDYOPADHYAY, C. Factors affecting antifungal activity of onion extratives against aflatoxin producing fungi. v.46, n.3, p.741-744. 1981.
- SHELEF, L.A. Antimicrobial effects os spices. **Journal of Food Safety**, Connecticut, v.6, n.1, p.29-44, Aug. 1983.
- SIMÃO, A.M. **Aditivos para alimentos sob aspecto toxicológico.** São Paulo: NOBEL, 1985. 274p.
- SINHA, K.K.; SINHA, A.K.; GAJENDRA, P. The effect and cinnamon oils on growth of and aflatoxin production by *Aspergillus flavus*. **Lettes Applied Microbiology**, Oxford, v.16, n.3, p.114-117, Mar. 1993.
- TIWARI, R.; DIKSHIT, R.P.; CHANDAN, N. Inhibition of growth and aflatoxin B1 production of *Aspergillus parasiticus* by spice. **Journal of Food Science**, Chicago, v.20, p.131-132, 1983.

CAPÍTULO 3

CONSERVAÇÃO DE PRODUTOS DE PANIFICAÇÃO ATRAVÉS DA ADIÇÃO DE CONDIMENTOS EM PÓ.

RESUMO

PEREIRA, Marcelo Cláudio. Conservação de produtos de panificação através da adição de condimentos em pó. Lavras: UFLA, 2001. 104p. (Dissertação – Mestrado em Ciência dos Alimentos)*.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito dos condimentos em pó sobre a conservação dos produtos de panificação. Os condimentos selecionados para estes testes foram: cravo, canela e alho, selecionados por se enquadrarem melhor aos produtos de panificação, e pelo seu efeito antifúngico observado nos testes "in vitro". Os condimentos foram testados nas concentrações de 0,5%, 1,0%, 1,5% e 2,0%. Os produtos de panificação selecionados para os testes foram, rosca de maçã, pão de centeio e pão integral por serem de fácil perecibilidade. Os condimentos cravo e canela foram adicionados à massa dos produtos rosca de maçã e pão de centeio. O alho foi adicionado a massa do pão integral. O conservante químico utilizado como padrão foi propionato de cálcio nas concentrações de 0,15% e 0,30%. Os condimentos utilizados neste trabalho foram eficazes em diminuir o número de colônias nas primeiras leituras e aumentaram a vida de prateleira por um dia ou mais nas maiores concentrações. O conservante químico utilizado na menor concentração não diferiu da maior concentração do conservante que aumentaram em dois ou mais dias o período de conservação em relação à testemunha ou mesmo aos condimentos.

*Comitê orientador: Dra. Sára Maria Chalfoun de Souza – EPAMIG (Orientadora), Dra. Vânia Déa de Carvalho – UFLA (Co-orientadora).

ABSTRACT

PEREIRA, Marcelo Cláudio. Conservation of bread-making products through the addition of powdered spices. Lavras: UFLA, 2001. 104p. (Dissertation of Master's degree in Food Science)

The objective of the present work was to evaluate the effect of powdered spices on the conservation of bread-making products. The spices selected for these tests were : clove, cinnamon and garlic, because of their relationship with bread-making products and for their fungistatic effect observed in tests "in vitro ". The spices were tested in concentrations of 0.5%, 1.0%, 1.5% and 2.0%. The bread-making products selected for the tests were, apple strudel , rye bread and wholewheat bread because they are considered perishable. The spices clove and cinnamon were added to the dough of the apple strudel and rye bread . The garlic was added to the wholewheat bread. The chemical preservative used as a pattern was of calcium in concentrations of 0.15% and 0.30%. The spices used in this work had an effective way of reducing the number of colonies in the first readings and increasing the shelf life for one day or more in higher concentrations. The chemical preservative used in the lower concentration had the same effect on the spices than higher concentration of preservative and increased the period of conservation by two or more days in relation to the witness of the same spices.

* Guidance Committee: Dra. Sára Maria Chalfoun de Souza – EPAMIG (Major Professor), Dra. Vânia Déa de Carvalho – UFLA (Co-adviser).

1 INTRODUÇÃO

Os produtos de panificação têm presença constante na vida das pessoas, apresentando várias formas de uso na alimentação, desde um pãozinho com margarina até as sobremesas requintadas.

Diversos trabalhos citam que os cereais e alimentos deles derivados são pouco sujeitos à deterioração microbiana, se preparados e armazenados em condições adequadas. A umidade é fator preponderante, uma pequena umidade favorecerá o desenvolvimento de fungos e um aumento da mesma abrirá uma porta de entrada para bactérias e leveduras (Martinelli Filho 1987a; Smith e White, 1988).

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.

Dentre os métodos de conservação, na área de panificação, os mais usados são a adição de conservantes químicos à massa e a preservação dos produtos a baixas temperaturas. Apesar de serem mais indicados, os inibidores possuem efeitos colaterais eventualmente tóxicos. O Comitê Misto FAO/OMS, reunido em 1976, reconheceu a preocupação dos países industrializados ou em processo de industrialização com os contaminantes carcinogênicos, mutagênicos e teratogênicos e compartilha com as autoridades sanitárias dos países em desenvolvimento, da inquietação com os riscos especiais a que estão expostos os grupos vulneráveis da população. Esse Comitê reconheceu que a cooperação dos especialistas em alimentos nestes países em desenvolvimento seria extremamente importante para seu trabalho em matéria de aditivos alimentares e contaminantes dos alimentos (Comitê Misto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios, 1975; 1976).

Existe um interesse renovado nos processos de produção e conservação de alimentos que mantenham suas características físico-químicas, organolépticas e nutricionais, proporcionando o máximo de vida de prateleira e evitando quaisquer alterações indesejáveis.

O uso de condimentos como conservante de alimentos é de grande interesse para os consumidores, pois os mesmos não apresentam risco a saúde, mesmo quando empregados em quantidades relativamente altas.

Embora os condimentos apresentem propriedades antimicrobianas, antioxidantes e medicinais, eles são normalmente utilizados com o propósito principal de realçar o sabor dos alimentos.

O objetivo deste trabalho foi verificar o efeito de condimentos sobre a conservação de produtos de panificação.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido na Panificadora P&C, localizada no município de Lavras-MG. O experimento constou de três tipos diferentes de condimentos que foram selecionados de acordo com os dados obtidos nos testes “in vitro”, alho (*Allium sativum*), canela (*Cinnamomum burmannil*) e cravo (*Caryophyllus aromaticus*), (Serrano, 2000a,c e d). O conservante químico comumente utilizado pelas panificadoras (propionato de cálcio) foi utilizado como conservante padrão.

Os produtos de panificação escolhidos para os testes foram: pão integral, pão de centeio e rosca de maçã por serem de fácil perecibilidade.

Os condimentos cravo e canela foram testados na confecção de dois produtos (pão de centeio e rosca de maçã) e o alho na confecção do (pão integral). As dosagens dos condimentos em pó variaram de 0 a 2% e o conservante foi usado nas concentrações de 0,15 e 0,30% indicadas por (Martinelli Filho, 1987b).

Foram utilizados para embalagem, filmes de polietileno de baixa densidade por serem os mais indicados para embalar pães, conforme descrito por Garcia et al. (1989).

A vida de prateleira foi avaliada observando-se diariamente as amostras, até a constatação do desenvolvimento visível a olho nu de microrganismos contaminantes, de acordo com o número de colônias e/ou diâmetro micelial do fungo contaminante.

A partir desta constatação foi dada uma nota que variou de acordo com o número de colônias na superfície dos pães ou do diâmetro do micélio dos fungos:

- 1 – pouco atacada;
- 2 – medianamente atacado;
- 3 - muito atacado.

O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados com três repetições no tempo e onze tratamentos para os produtos de panificação rosca de maçã e pão de centeio e três repetições e sete tratamentos para o pão integral.

Os dados foram analisados utilizando-se pacote estatístico Sistema de Análise de Variância para Dados Balanceados - Sisvar, segundo Ferreira (2000) e as médias foram comparadas pelo teste de Scott e Knott (1974).

Os fluxogramas referentes à fabricação da rosca de maçã, pão de centeio e pão integral encontram-se representados nas figuras 1,2 e 3.



FIGURA 1 Fluxograma referente à fabricação da rosca de maçã.

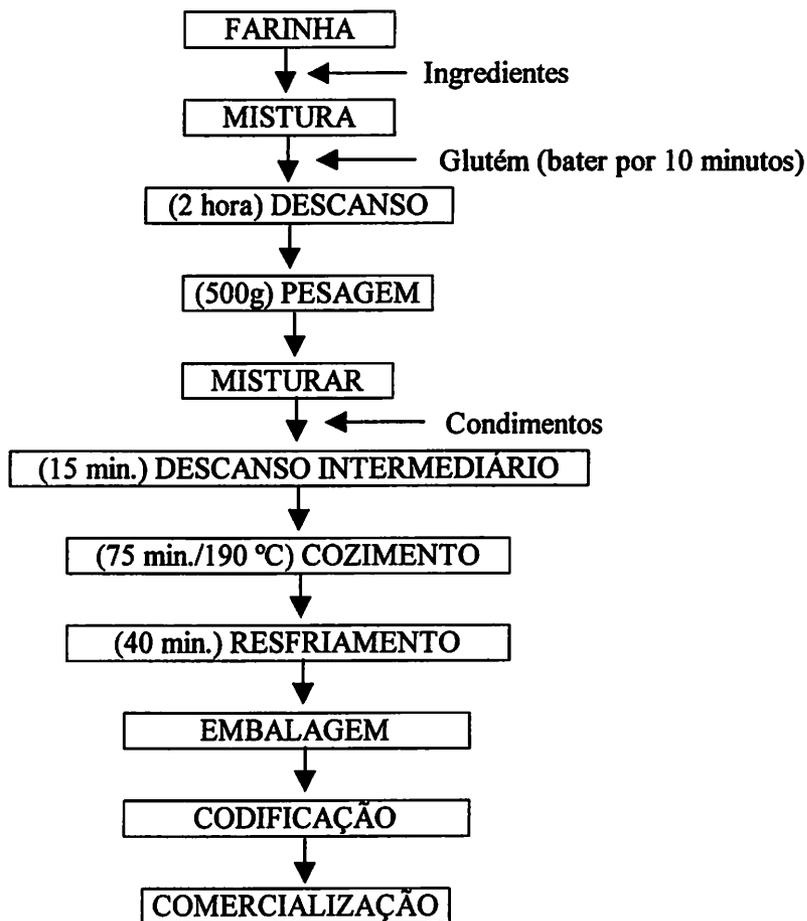


FIGURA 2 Fluxograma referente à fabricação de pão de centeio

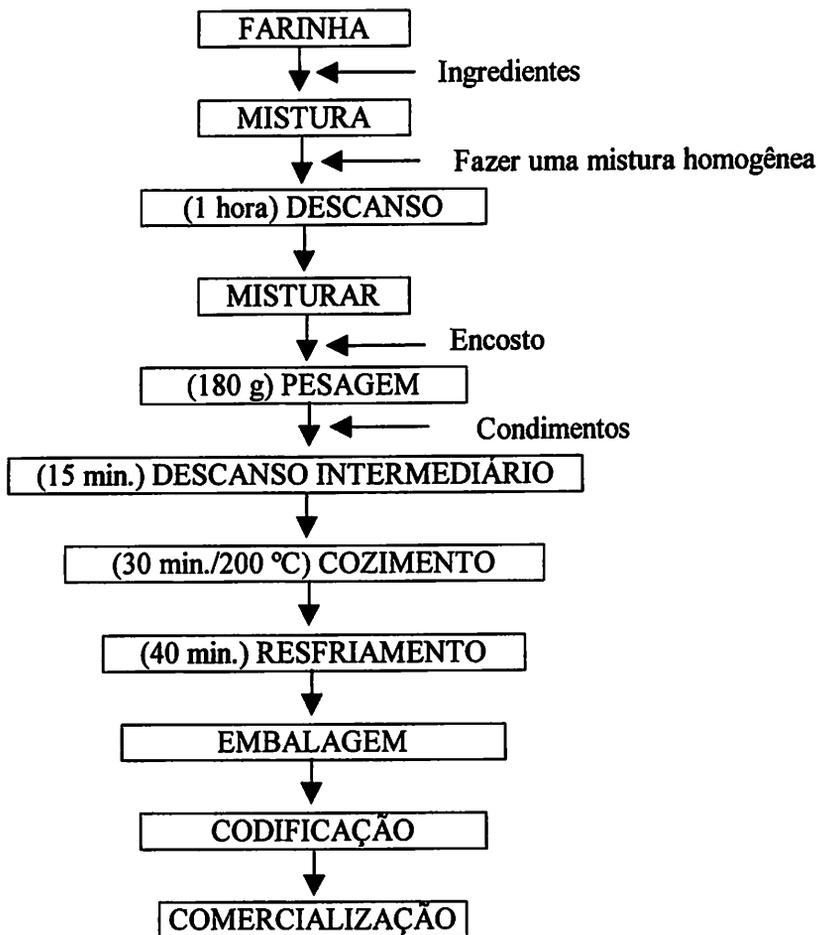


FIGURA 3 Fluxograma referente a fabricação do pão integral

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados correspondentes às avaliações em roscas de maçã estão representados na Tabela 1 e nas Figura 1 e 2, demonstram que no primeiro dia de observação (2º dia após a instalação do ensaio), a testemunha já apresentou um desenvolvimento de fungos e na segunda observação (3º dia) houve desenvolvimento correspondeu a nota máxima atribuída às roscas muito atacadas pelos fungos (nota 3).

Com relação aos condimentos testados, verifica-se que o cravo adicionado nas concentrações de 0,5% e 1,0% manteve níveis classificados como de pouco a medianamente atacados até a 3ª leitura (4º dia), apresentando nas quarta e quinta leituras notas máximas correspondentes a muito atacados. Nas concentrações de 1,5% e 2,0% observou-se a manutenção de níveis próximos ao pouco atacado (nota 1) e medianamente atacado até a 4ª leitura (5º dia) e apenas na 5ª leitura (6º dia) atingiram a nota máxima de ataque (nota 3),

Os resultados referentes à adição de canela nas mesmas dosagens que o cravo demonstraram um efeito sobre a conservação da rosca de maçã em níveis variáveis de pouco atacado (nota 1) a medianamente atacado, até o 3º dia de leitura (4º dia) para a concentração inferior testada (0,5%), até a 4ª leitura (5º dia) para concentração 1%; até a 3ª leitura (4º dia) para a concentração 1,5% e até a 4ª leitura (5º dia) para a concentração 2%.

O propionato de cálcio na menor concentração testada (0,15%) manteve os níveis entre pouco atacado até a 4ª leitura (5º dia) e medianamente atacado na 5ª leitura (6º dia) e na maior concentração manteve níveis considerados pouco atacado até a 5ª leitura (6º dia).

Observa-se, portanto, 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 o qual apresentou desvantagens já abordadas anteriormente (Simão, 1985; Martinelli Filho, 1987b).

A ligeira superioridade das concentrações de 1,5 e 2% sobre a inibição dos fungos que ocorrem associados ao produto concordam com Shlef (1983), segundo o qual as concentrações normalmente empregadas para realçar o aroma e o sabor que variam de 0,5 a 1% não inibem o desenvolvimento microbiano que depende de concentrações superiores a 1%.

TABELA 1 Médias gerais do efeito dos tratamentos cravo e canela (0,5 a 2%), propionato de cálcio (0,15 e 0,30%) e testemunha (sem adição de conservante e condimento), sobre a conservação (dias) do produto rosca de maçã.

Tratamentos	Dias*				
	1	2	3	4	5
1. Cravo 0,5%	0.0 a	1.3 b	2.3 c	3.0 d	3.0 d
2. Cravo 1,0%	0.0 a	1.0 b	2.3 c	3.0 d	3.0 d
3. Cravo 1,5%	0.0 a	0.70 b	1.6 c	2.3 c	3.0 e
4. Cravo 2,0%	0.0 a	0.70 b	1.0 c	1.6 d	3.0 e
5. Canela 0,5%	0.0 a	1.6 b	2.6 c	3.0 c	3.0 c
6. Canela 1,0%	0.0 a	1.0 b	2.0 c	2.6 d	3.0 d
7. Canela 1,5%	0.0 a	1.3 b	2.3 c	3.0 d	3.0 d
8. Canela 2,0%	0.0 a	0.70 a	2.0 b	2.6 c	3.0 c
9. P. cálcio 0,15%	0.0 a	0.40 a	0.70 a	1.0 b	2.0 c
10. P. cálcio 0,30%	0.0 a	0.0 a	0.0 a	0.40 a	0.40 a
11. Testemunha	1.3 a	3.0 b	3.0 b	3.0 b	3.0 b
CV%	35,55				

* Médias seguidas pela mesma letra nas linhas não diferem estatisticamente através da aplicação do Teste Scott & Knott, ao nível de 5% de probabilidade.

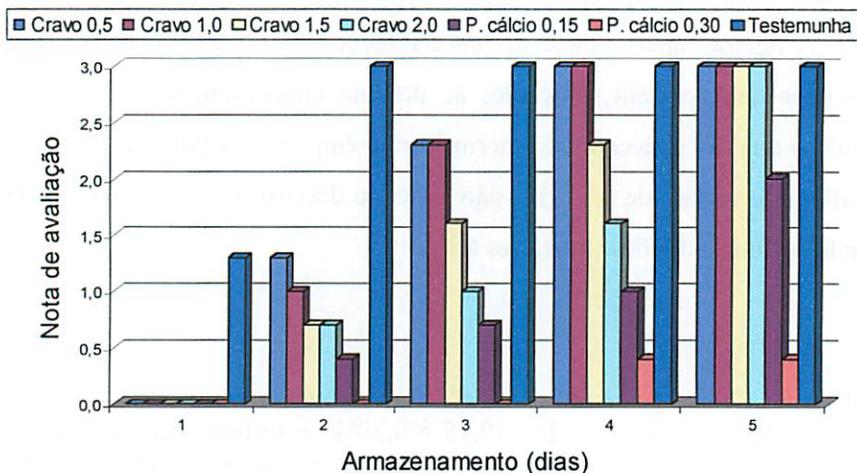


FIGURA 1 Efeito do condimento em pó cravo e conservante químico sobre a vida de prateleira (dias) da rosca de maçã.

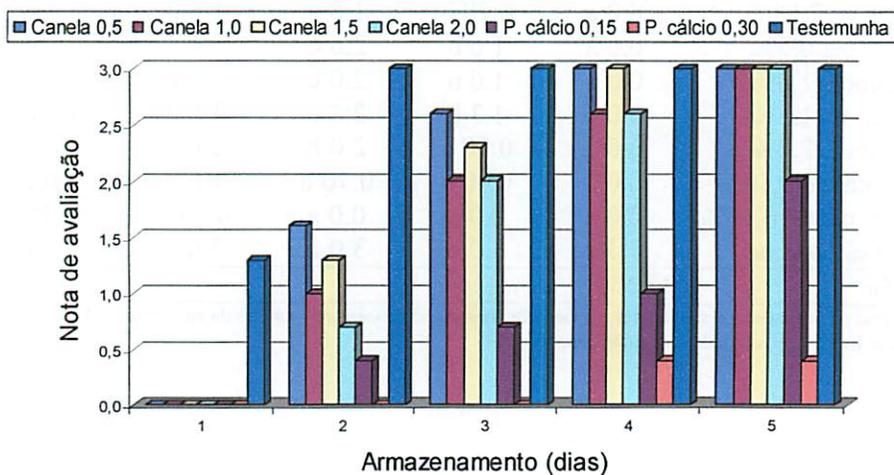


FIGURA 2 Efeito do condimento em pó canela e conservante químico sobre a vida de prateleira (dias) da rosca de maçã.

Os resultados referentes à adição dos condimentos cravo e canela nas concentrações 0,5 e 1,0%, 1,5 e 2% e propionato de cálcio 0,15 e 0,30%, encontram-se representados na Tabela 2 e nas Figuras 3 e 4. Observa-se que a testemunha, já a partir da 1ª leitura (2º dia), apresentava um nível intermediário entre medianamente atacado e altamente atacado. O tratamento com cravo na menor concentração (0,5%) apresentou uma inibição semelhante a testemunha, enquanto que na dosagem de 1%, inibiu o desenvolvimento dos fungos até a 3ª leitura (4º dia); na dosagem de 1,5%, até a 5ª leitura (6º dia) cravo a 2%, até a 6ª leitura (7º dia).

Com relação à canela, observou-se que a concentração de 0,5%, apresentou comportamento semelhante à testemunha enquanto que as doses de 1% e 1,5% apresentaram inibição até a 2ª leitura (3º dia); a 2%, apresentou uma inibição mais elevada (notas médias próximas a 1) até a 2ª leitura (3º dia) e intermediárias (notas médias próximas a 2), da 3ª leitura (4º dia) até a 6ª leitura (7º dia).

O propionato de cálcio na menor concentração testada apresentou uma inibição dos fungos até a 4ª leitura (5º dia) e na maior concentração manteve níveis próximos ao mínimo (nota 1) até a 6ª leitura.

Conclui-se, portanto, ser o produto pão de centeio, a exemplo de outros produtos de panificação frescos (Pence, 1968), altamente susceptível ao desenvolvimento de microrganismos, exigindo concentrações relativas aos condimentos testados mais elevadas.

TABELA 2 Médias gerais do efeito dos tratamentos cravo e canela (0,5 a 2%), propionato de cálcio (0,15 e 0,30%) e testemunha (sem adição de conservante e condimento), sobre a conservação (dias) do produto pão de centeio.

Tratamentos	Dias*					
	1	2	3	4	5	6
1. Cravo 0,5%	1.7 a	3.0 b				
2. Cravo 1,0%	1.0 a	1.0 a	2.6 b	3.0 b	3.0 b	3.0 b
3. Cravo 1,5%	0.40 a	1.0 b	2.0 c	2.3 c	2.3 c	3.0 d
4. Cravo 2,0%	0.40 a	1.0 b	2.0 c	2.0 c	2.6 d	3.0 d
5. Canela 0,5%	2.0 a	3.0 b				
6. Canela 1,0%	1.0 a	2.6 b	3.0 b	3.0 b	3.0 b	3.0 b
7. Canela 1,5%	1.3 a	3.0 b				
8. Canela 2,0%	1.0 a	1.6 b	2.3 c	2.6 c	2.6 c	2.6 c
9. P. cálcio 0,15%	0.0 a	1.0 b	1.3 b	2.0 c	3.0 d	3.0 d
10. P. cálcio 0,30%	0.0 a	0.0 a	0.0 a	1.3 b	1.3 b	1.6 b
11. Testemunha	2.6 a	3.0 a	3.0 a	3.0 a	3.0 a	3.0 a
CV%	7,40					

* Médias seguidas pela mesma letra nas linhas não diferem estatisticamente através da aplicação do Teste Scott & Knott, ao nível de 5% de probabilidade.

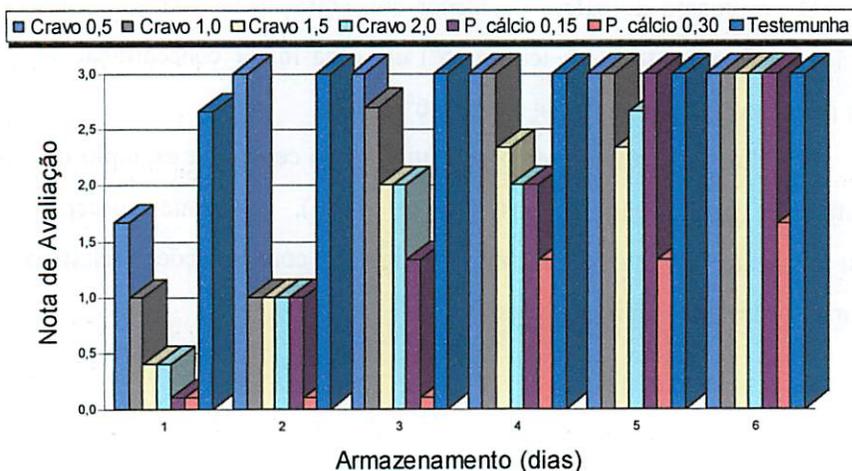


FIGURA 3 Efeito do condimento em pó cravo e conservante químico sobre o tempo de prateleira (dias) do pão de centeio.

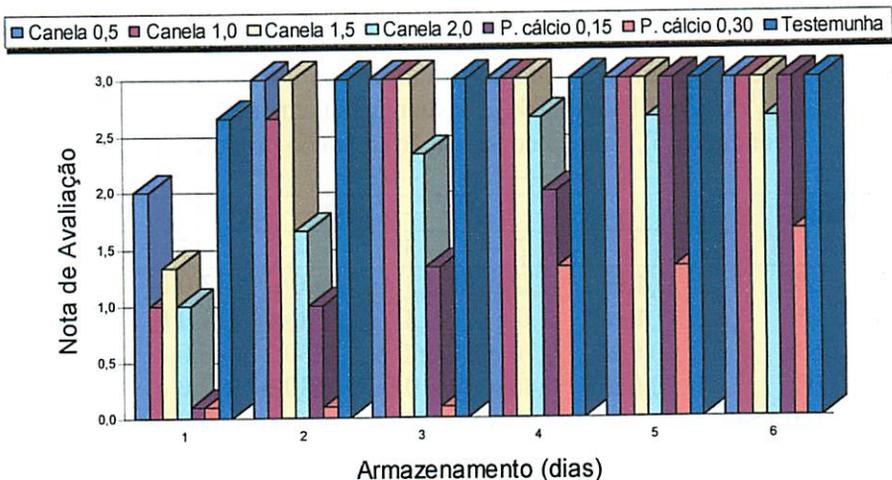


FIGURA 4 Efeito do condimento em pó canela e conservante químico sobre o tempo de prateleira (dias) do pão de centeio.

Na Tabela 3 e na Figura 5, encontram-se representados os resultados referentes a adição do alho nas concentrações de 0,5%; 1,0%; 1,5% e 2,0% e do propionato de cálcio nas concentrações de 0,15% e 0,30% ao pão integral. Observa-se que, nas concentrações mais baixas (0,5% e 1,0%) do alho, os tratamentos foram semelhante à testemunha, enquanto que com as concentrações mais elevadas (1,5% e 2,0%), ocorreu uma inibição até 3ª leitura (4º dia) e 5ª leitura (6º dia), respectivamente.

O propionato de cálcio na menor concentração apresentou uma inibição em grau mais elevado até a 2ª leitura (3º dia) e intermediária até a 6ª leitura (7º dia) e na maior dosagem apresentou uma inibição mais elevada até a 3ª leitura (4º dia) e intermediária até a 6ª leitura (7º dia).

O produto mostrou-se, portanto, susceptível ao controle dos microrganismos através da adição do alho a partir da maior concentração testada deste condimento.

TABELA 3 Médias gerais do efeito dos tratamentos alho (0,5 a 2%), propionato de cálcio (0,15 e 0,30%) e testemunha (sem adição de conservante e condimento), sobre a conservação (dias) do produto pão integral.

Tratamentos	Dias*					
	1	2	3	4	5	6
1. Alho 0,5%	0,40 a	1,0 a	2,3 b	3,0 b	3,0 b	3,0 b
2. Alho 1,0%	0,40 a	1,0 a	2,3 b	3,0 b	3,0 b	3,0 b
3. Alho 1,5%	0,0 a	0,70 a	1,60 b	2,60 c	3,0 c	3,0 c
4. Alho 2,0%	0,0 a	0,40 a	1,0 b	1,30 b	2,0 c	3,0 d
5. P. cálcio 0,15%	0,40 a	1,0 a	1,70 b	2,0 b	2,0 b	2,0 b
6. P. cálcio 0,30%	0,0 a	0,40 a	1,0 a	1,70 b	2,3 b	2,3 b
7. Testemunha	1,0 a	1,6 a	3,0 b	3,0 b	3,0 b	3,0 b
CV%	26,38					

* Médias seguidas pela mesma letra nas linhas não diferem estatisticamente através da aplicação do Teste Scott & Knott, ao nível de 5% de probabilidade.

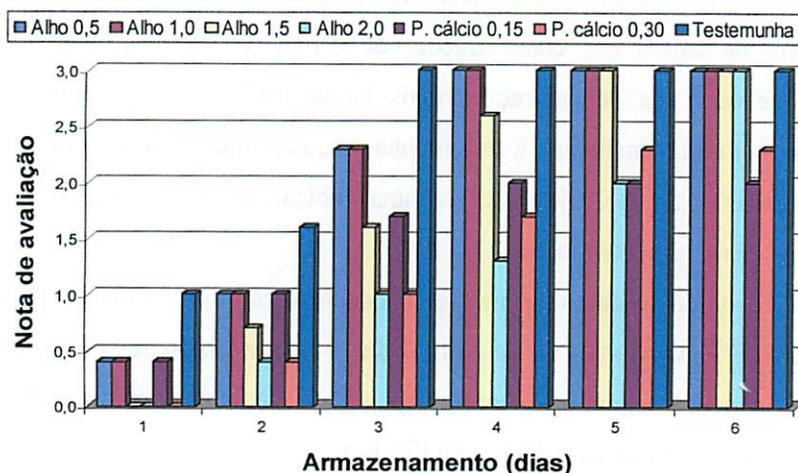


FIGURA 5 Efeito do condimento em pó alho e conservante químico sobre o tempo de prateleira (dias) do pão integral.

4 CONCLUSÕES

A adição de condimentos cravo e canela aos produtos de panificação rosca de maçã e pão de centeio e adição de alho ao pão integral possibilitaram a inibição do desenvolvimento de microrganismos associados a esses produtos.

O resultado inferior apresentado pela adição dos condimentos aos produtos de panificação em relação aos testes realizados “in vitro” justificaram-se, uma vez que nos produtos ocorre uma atuação conjunta dos vários microrganismos, proporcionando a interação dos mesmos, que promovem alterações no produto, entre eles a absorção de umidade (Martinelli Filho, 1987 b), que potencializa a atuação dos microrganismos, dificultando a ação dos tratamentos.

Os efeitos benéficos obtidos através da adição de condimentos aos produtos de panificação devem ser aliadas 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 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS - ICMSF. Toxigenic fungi: *Aspergillus*. In *Microorganisms in foods, 5. Characteristics of Food Pathogens*. London: Blakie Academic and Professional, 1996a. p.374-381.
- INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS - ICMSF. Toxigenic fungi: *Aspergillus*. In *Microorganisms in foods, 5. Characteristics of Food Pathogens*. London: Blakie Academic and Professional, 1996b. p.397-413.
- GARCIA, E.E.C.; PÁDUA, M.; SARANTÓPOULOS, C.I.G.L. **Embalagens plásticas; propriedades de barreira**. Campinas: ITAL/CETEA, 1989. 44p.
- MARTINELLI FILHO, A. **Microbiologia de alimentos I**. Piracicaba: ESALQ/USP, 1987a. 72p.
- MARTINELLI FILHO, A. **Microbiologia de alimentos I**. Piracicaba: ESALQ/USP, 1987b. 248p.
- FERREIRA, D.F. Análise estatística por meio do Sisvar para Windows versão 4.0 In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000. **Anais...** São Paulo, SP. SIB, 2000. p.255-258.
- PENCE, J.W. Bread and rools. In: TRESSCER, D.K.; VAN ARSDEL, W.B.; COPLEY, M.J. **The freezing preservation of foods**. Westpot, AVI. 1986. p.386-406.
- SERRANO, A.M.O. **Laudo técnico e identificativo: alho (*Allium sativum*)** São Paulo: Santos Flora Ervas Medicinais e Aromáticas, 2000a (Validade – 07/1999 – 07/2002).
- SERRANO, A.M.O. **Laudo técnico e identificativo: canela (*Cinnamomum burmannil* Meissn)** São Paulo: Santos Flora Ervas Medicinais e Aromáticas, 2000c. (Validade – 11/1999 – 11/2002).

SERRANO, A.M.O. **Laudo técnico e identificativo: cravo da Índia** (*Caryophyllus aromaticus* L.) São Paulo: Santos Flora Ervas Medicinais e Aromáticas, 2000d. (Validade – 09/1999 – 09/2002).

SHELEF, L.A. Antimicrobial effects os spices. **Journal of Food Safety**, Connecticut, v.6, n.1, p.29-44, Aug. 1983.

SIMÃO, A.M. **Aditivos para alimentos sob aspecto toxicológico**. São Paulo: NOBEL, 1985. 274p.

SMITH, D.R.; WHITE, D.G. Disease of corn. In: SPRAGUE, G.F.; DUDLEY, J.W. **Corn and corn improvement**. 3.ed. Madison: ASA/CSSH/SSSH, 1988. p.687-766.

ANEXOS

	Paginas	
TABELA 1	Resumo do quadro de análise de variância de sobre a inibição micelial com <i>Aspergillus niger</i> com adição de condimentos em quatro concentrações diferentes.....	96
TABELA 2	Resumo do quadro de análise de variância sobre a inibição de esporos com <i>Aspergillus niger</i> com adição de condimentos em quatro concentrações diferentes.....	96
TABELA 3	Resumo do quadro de análise de variância de sobre a inibição micelial com <i>Eurotium repens</i> com adição de condimentos em quatro concentrações diferentes.....	96
TABELA 4	Resumo do quadro de análise de variância sobre a inibição de esporos com <i>Eurotium repens</i> com adição de condimentos em quatro concentrações diferentes.....	97
TABELA 5	Resumo do quadro de análise de variância de sobre a inibição micelial com <i>Penicillium</i> spp. com adição de condimentos em quatro concentrações diferentes.....	97
TABELA 6	Resumo do quadro de análise de variância sobre a inibição de esporos com <i>Penicillium</i> spp. com adição de condimentos em quatro concentrações diferentes.....	97
TABELA 7	Resumo do quadro de análise de variância de sobre a inibição micelial com <i>Rhizopus</i> sp. com adição de condimentos em quatro concentrações diferentes.....	98
TABELA 8	Resumo do quadro de análise de variância sobre a inibição de esporos com <i>Rhizopus</i> sp. com adição de condimentos em quatro concentrações diferentes.....	98
TABELA 9	Resumo do quadro de análise de variância dos contrastes dos tratamentos condimento, propionato de cálcio 0,15 e 0,30% e testemunha sobre a esporulação do fungo <i>Aspergillus niger</i>	99
TABELA 10	Resumo do quadro de análise de variância dos contrastes dos tratamentos condimento, propionato de cálcio 0,15 e 0,30% e testemunha sobre o desenvolvimento micelial do fungo <i>Aspergillus niger</i>	99
TABELA 11	Resumo do quadro de análise de variância dos contrastes dos tratamentos condimento, propionato de cálcio 0,15 e 0,30% e testemunha sobre o desenvolvimento micelial do fungo <i>Eurotium repens</i>	100

TABELA 12	Resumo do quadro de análise de variância dos contrastes dos tratamentos condimento, propionato de cálcio 0,15 e 0,30% e testemunha sobre a esporulação do fungo <i>Eurotium repens</i>	100
TABELA 13	Resumo do quadro de análise de variância dos contrastes dos tratamentos condimento, propionato de cálcio 0,15 e 0,30% e testemunha sobre o desenvolvimento micelial do fungo <i>Penicillium spp</i>	101
TABELA 14	Resumo do quadro de análise de variância dos contrastes dos tratamentos condimento, propionato de cálcio 0,15 e 0,30% e testemunha sobre a esporulação do fungo <i>Penicillium spp</i>	101
TABELA 15	Resumo do quadro de análise de variância dos contrastes dos tratamentos condimento, propionato de cálcio 0,15 e 0,30% e testemunha sobre o desenvolvimento micelial do fungo <i>Rhizopus sp</i>	102
TABELA 16	Resumo do quadro de análise de variância dos contrastes dos tratamentos condimento, propionato de cálcio 0,15 e 0,30% e testemunha sobre a esporulação do fungo <i>Rhizopus sp</i>	102
TABELA 17	Resumo do quadro de análise de variância sobre o tempo de armazenamento da rosca de maçã com a adição de condimentos em pó e conservante químico.....	103
TABELA 18	Resumo do quadro de análise de variância sobre o tempo de armazenamento do pão de centeio com a adição de condimentos em pó e conservante químico.....	103
TABELA 19	Resumo do quadro de análise de variância sobre o tempo de armazenamento do pão integral com a adição de condimentos em pó e conservante químico.....	104

TABELA 1 Resumo do quadro de análise de variância de sobre a inibição micelial com *Aspergillus niger* com adição de condimentos em quatro concentrações diferentes.

FV	GL	SQ	QM
Cond (D)	7	369,8645	52,8378**
Conc (C)	3	26,6754	8,8919**
DxC	21	119,1529	5,6739**
Resíduo	64	47,4600	0,6780
Total	95	563,1529	
CV%	11.60		

** Significativo a 1%

TABELA 2 Resumo do quadro de análise de variância sobre a inibição de esporos com *Aspergillus niger* com adição de condimentos em quatro concentrações diferentes.

FV	GL	SQ	QM
Cond (D)	7	8065,1249	1152,1607**
Conc (C)	3	1712,2211	570,7403**
DxC	21	2954,9596	140,7123ns
Resíduo	64	6979,6400	99,7091
Total	95	19711,9457	
CV%	56.77		

** Significativo a 1%

ns- não significativo

TABELA 3 Resumo do quadro de análise de variância de sobre a inibição micelial com *Eurotium repens* com adição de condimentos em quatro concentrações diferentes.

FV	GL	SQ	QM
Cond (D)	8	180,4840	22,5605**
Conc (C)	3	34,5633	11,5211**
DxC	24	48,3566	2,0148**
Resíduo	72	19,3000	0,2474
Total	107	282,7040	
CV%	16.80		

** Significativo a 1%

FV	GL	SQ	QM
Cond (D)	8	22413,0700	2801,6337**
Conc (C)	3	2121,2847	707,0949**
DxC	24	9951,4011	414,6417**
Resíduo	72	9891,1866	126,8100
Total	107	44376,9425	
CV%			56.30

** Significativo a 1%

TABELA 6 Resumo do quadro de análise de variância sobre a inibição de esporos com *Penicillium* spp. com adição de condimentos em quatro concentrações diferentes.

FV	GL	SQ	QM
Cond (D)	8	81,5779	10,1972**
Conc (C)	3	16,6921	5,5640**
DxC	24	23,6220	0,9842**
Resíduo	72	15,7000	0,2012
Total	107	137,5921	
CV%			15.50

** Significativo a 1%

TABELA 5 Resumo do quadro de análise de variância de sobre a inibição micelial com *Penicillium* spp. com adição de condimentos em quatro concentrações diferentes.

FV	GL	SQ	QM
Cond (D)	8	2753,2966	344,1620**
Conc (C)	3	128,3000	42,7666*
DxC	24	703,5566	29,3148**
Resíduo	72	871,4533	11,1724
Total	107	4456,6066	
CV%			54.60

** Significativo a 1%

* Significativo a 5%

TABELA 4 Resumo do quadro de análise de variância sobre a inibição de esporos com *Eurotium repens* com adição de condimentos em quatro concentrações diferentes.

TABELA 7 Resumo do quadro de análise de variância de sobre a inibição micelial com *Rhizopus* sp. com adição de condimentos em quatro concentrações diferentes.

FV	GL	SQ	QM
Cond (D)	8	285,3663	35,6707**
Conc (C)	3	63,3025	21,1008**
DxC	24	348,2566	14,5106**
Resíduo	72	27,2666	0,3495
Total	107	724,1921	
CV%	10.50		

** Significativo a 1%

TABELA 8 Resumo do quadro de análise de variância sobre a inibição de esporos com *Rhizopus* sp. com adição de condimentos em quatro concentrações diferentes.

FV	GL	SQ	QM
Cond (D)	8	18618,8546	2327,3568**
Conc (C)	3	1232,9165	410,9721ns
DxC	24	8270,8409	344,6183*
Resíduo	72	14425,5866	184,9434
Total	107	42548,1988	
CV%	63.40		

** Significativo a 1%

* Significativo a 5%

ns- não significativo

TABELA 9 Resumo do quadro de análise de variância dos contrastes dos tratamentos condimento, propionato de cálcio 0,15 e 0,30% e testemunha sobre o desenvolvimento micelial do fungo *Aspergillus niger*.

FV	GL	QM
Contraste 1 ^(a)	1	1.8403ns
Contraste 2 ^(b)	1	20.4800**
Contraste 3 ^(c)	1	2.4066ns
Resíduo	70	0.6780
CV%	11.28	

** Significativo a 1%

ns- não significativo

^(a) Condimento vs Propionato de cálcio

^(b) Propionato de cálcio vs testemunha

^(c) Propionato de cálcio 0,15% vs 0,30%

TABELA 10 Resumo do quadro de análise de variância dos contrastes dos tratamentos condimento, propionato de cálcio 0,15 e 0,30% e testemunha sobre a esporulação do fungo *Aspergillus niger*.

FV	GL	QM
Contraste 1 ^(a)	1	533.9222*
Contraste 2 ^(b)	1	1740.5000**
Contraste 3 ^(c)	1	2.4066ns
Resíduo	70	99.7091
CV%	53.01	

** Significativo a 1%

* Significativo a 5%

ns- não significativo

^(a) Condimento vs Propionato de cálcio

^(b) Propionato de cálcio vs testemunha

^(c) Propionato de cálcio 0,15% vs 0,30%

TABELA 11 Resumo do quadro de análise de variância dos contrastes dos tratamentos condimento, propionato de cálcio 0,15 e 0,30% e testemunha sobre o desenvolvimento micelial do fungo *Eurotium repens*.

FV	GL	QM
Contraste 1 ^(a)	1	36.3971**
Contraste 2 ^(b)	1	27.1338**
Contraste 3 ^(c)	1	2.8016**
Resíduo	78	0.2474
CV%	15.89	

** Significativo a 1%

^(a) Condimento vs Propionato de cálcio

^(b) Propionato de cálcio vs testemunha

^(c) Propionato de cálcio 0,15% vs 0,30%

TABELA 12 Resumo do quadro de análise de variância dos contrastes dos tratamentos condimento, propionato de cálcio 0,15 e 0,30% e testemunha sobre a esporulação do fungo *Eurotium repens*.

FV	GL	QM
Contraste 1 ^(a)	1	187.2469**
Contraste 2 ^(b)	1	677.1200**
Contraste 3 ^(c)	1	0.1066ns
Resíduo	78	11.1724
CV%	50.31	

** Significativo a 1%

ns- não significativo

^(a) Condimento vs Propionato de cálcio

^(b) Propionato de cálcio vs testemunha

^(c) Propionato de cálcio 0,15% vs 0,30%

TABELA 13 Resumo do quadro de análise de variância dos contrastes dos tratamentos condimento, propionato de cálcio 0,15 e 0,30% e testemunha sobre o desenvolvimento micelial do fungo *Penicillium* spp..

FV	GL	QM
Contraste 1 ^(a)	1	0.0658ns
Contraste 2 ^(b)	1	6.0088**
Contraste 3 ^(c)	1	0.0600ns
Resíduo	78	0.2012
CV%	15.03	

** Significativo a 1%

ns- não significativo

^(a) Condimento vs Propionato de cálcio

^(b) Propionato de cálcio vs testemunha

^(c) Propionato de cálcio 0,15% vs 0,30%

TABELA 14 Resumo do quadro de análise de variância dos contrastes dos tratamentos condimento, propionato de cálcio 0,15 e 0,30% e testemunha sobre a esporulação do fungo *Penicillium* spp.

FV	GL	QM
Contraste 1 ^(a)	1	230.3276ns
Contraste 2 ^(b)	1	8307.6050**
Contraste 3 ^(c)	1	4.0016ns
Resíduo	78	126.8100
CV%	33.39	

** Significativo a 1%

ns- não significativo

^(a) Condimento vs Propionato de cálcio

^(b) Propionato de cálcio vs testemunha

^(c) Propionato de cálcio 0,15% vs 0,30%

TABELA 15 Resumo do quadro de análise de variância dos contrastes dos tratamentos condimento, propionato de cálcio 0,15 e 0,30% e testemunha sobre o desenvolvimento micelial do fungo *Rhizopus* sp.

FV	GL	QM
Contraste 1 ^(a)	1	5.3059**
Contraste 2 ^(b)	1	0.0000ns
Contraste 3 ^(c)	1	0.0000ns
Resíduo	78	0.3495
CV%	7.34	

** Significativo a 1%

ns- não significativo

^(a) Condimento vs Propionato de cálcio

^(b) Propionato de cálcio vs testemunha

^(c) Propionato de cálcio 0,15% vs 0,30%

TABELA 16 Resumo do quadro de análise de variância dos contrastes dos tratamentos condimento, propionato de cálcio 0,15 e 0,30% e testemunha sobre a esporulação do fungo *Rhizopus* sp.

FV	GL	QM
Contraste 1 ^(a)	1	3293.2205**
Contraste 2 ^(b)	1	19880.1800**
Contraste 3 ^(c)	1	518.9400ns
Resíduo	78	184.9434
CV%	57.54	

** Significativo a 1%

ns- não significativo

^(a) Condimento vs Propionato de cálcio

^(b) Propionato de cálcio vs testemunha

^(c) Propionato de cálcio 0,15% vs 0,30%

TABELA 17 Resumo do quadro de análise de variância sobre o tempo de armazenamento da rosca de maçã com a adição de condimentos em pó e conservante químico.

FV	GL	SQ	QM
Blocos	2	0.8033	0.4016
Tratamentos	10	64.6570	6.4657**
Resíduo 1	20	4.9832	0.2491
Dias	4	129.9602	32.4900**
Resíduo 2	8	2.6790	0.3348
Trat x Dias	40	26.2144	0.6553**
Resíduo 3	80	9.9143	0.1239
Total	164	239.2117	
CV 1%	30.66		
CV 2%	35.55		
CV 3%	21.63		

** Significativo a 1%

TABELA 18 Resumo do quadro de análise de variância sobre o tempo de armazenamento do pão de centeio com a adição de condimentos em pó e conservante químico.

FV	GL	SQ	QM
Blocos	2	0.1903	0.09515
Tratamentos	10	76.1748	7.6174**
Resíduo 1	20	4.5230	0.2261
Dias	5	74.6551	14.9310**
Resíduo 2	10	0.2727	0.0272
Trat x Dias	50	28.0148	0.5602**
Resíduo 3	100	7.4272	0.0742
Total	197	191.2581	
CV 1%	21.32		
CV 2%	7.40		
CV 3%	12.22		

** Significativo a 1%

TABELA 19 Resumo do quadro de análise de variância sobre o tempo de armazenamento do pão integral com a adição de condimentos em pó e conservante químico.

FV	GL	SQ	QM
Blocos	2	3.2157	1.6078
Tratamentos	6	20.8711	3.4785ns
Resíduo 1	12	30.6931	2.5577
Dias	5	102.6607	20.5321**
Resíduo 2	10	1.5471	0.1547
Trat x Dias	30	9.6898	0.3229ns
Resíduo 3	60	13.7773	0.2296
Total	125	182.4550	
CV 1%	88.03		
CV 2%	21.65		
CV 3%	26.38		

** Significativo a 1%

ns- não significativo