

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE ALIMENTOS
CURSO SUPERIOR DE TECNOLOGIA EM ALIMENTOS
CAMPUS DE CAMPO MOURÃO

THAIS RIBEIRO MORAES

AVALIAÇÃO DA ESPORULAÇÃO E VIABILIDADE DE ESPOROS POR EXTRATO
DE ROMÃ SOBRE FUNGOS DETERIORANTES DO PÃO

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

CAMPO MOURÃO

2017

THAIS RIBEIRO MORAES

AVALIAÇÃO DA ESPORULAÇÃO E VIABILIDADE DE ESPOROS POR EXTRATO
DE ROMÃ SOBRE FUNGOS DETERIORANTES DO PÃO

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação, apresentado à disciplina de Trabalho de Diplomação, do Curso Superior de Tecnologia em Alimentos do Departamento Acadêmico de Alimentos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná–UTFPR, como requisito parcial para obtenção do título de Tecnólogo.

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Regina Ferreira Geraldo Perdoncini.

Co-orientadora: Lívia Benossi Marchi

CAMPO MOURÃO

2017



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA
FEDERAL DO PARANÁ
Campus Campo Mourão
Departamento Acadêmico de Alimentos



TERMO DE APROVAÇÃO

AVALIAÇÃO DA ESPORULAÇÃO E VIABILIDADE DE ESPOROS POR EXTRATO DE ROMÃ SOBRE FUNGOS DETERIORANTES DO PÃO

por

THAIS RIBEIRO MORAES

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi apresentado em 21 de junho de 2017 como requisito parcial para obtenção do título de Tecnólogo de Alimentos. A candidata foi arguida pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

Profa. Dra. Márcia Regina Ferreira Geraldo Perdoncini.
Orientador

Profa. Dra. Mirela Vanin dos Santos Lima
Membro da banca

Profa. Dra. Fernanda Vitória Leimann
Membro da banca

Nota: O documento original e assinado pela Banca Examinadora encontra-se no Departamento Acadêmico de Alimentos da UTFPR Campus Campo Mourão.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me dado saúde, inteligência e força para superar todas as dificuldades e conseguir chegar até aqui, me permitindo viver esse momento, trazendo alegria aos meus pais e a todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

A minha orientadora Prof^a. Dr^a. Márcia Regina Ferreira Geraldo Perdoncini por toda sua atenção, dedicação, paciência, disposição e esforço, dividindo o seu tempo e conhecimento comigo, para que eu pudesse ter confiança e segurança na efetuação deste trabalho.

Aos meus pais Alice Ribeiro e Idario Moraes (in memoriam) pelo amor, pelos bons exemplos, pela dedicação, pela doação de vida, pelo incentivo, pelos puxões de orelha, pelo afeto, pela confiança. Minha eterna gratidão e amor aos meus irmãos Andreia Ribeiro, Marlene Moraes, Marcos Moraes (in memoriam) Fernanda dos Anjos e Rodrigo Moraes pelas alegrias, pelas brigas, pelo amor, abraços e momentos de felicidade. Aos meus sobrinhos Richard, Sophia, Rafael e Otavio por simplesmente existirem.

A colega e amiga Dayani, por ter me acompanhado e auxiliado desde o início dos experimentos. Ao meu namorado e amigo Jhony por me corrigir quando foi necessário. E a todos os colegas da UTFPR que fizeram parte dessa minha jornada.

A minha co-orientadora Livia Benossi Marchi pelas contribuições, a técnica de laboratório Adrielle Rodrigues pela prestatividade, e ao Professor Diogo Heron Macowski pelo interesse em ajudar na estatística.

As professoras membros da banca, pelos ensinamentos e também pelas correções e sugestões apresentadas. E a todos os professores que tive a oportunidade de conhecer durante as disciplinas, que compartilharam de seus conhecimentos, contribuindo não apenas com meu crescimento profissional, mas também com meu crescimento pessoal.

Por fim, agradeço a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para minha formação pessoal e profissional.

RESUMO

MORAES, T. R. **Avaliação da esporulação e viabilidade de esporos por extrato de Romã sobre fungos deteriorantes do pão.** 40 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Tecnologia de Alimentos) - Universidade Tecnológica Federal Do Paraná (UTFPR). Campo Mourão, 2017.

A deterioração tem sido uma das grandes preocupações, uma das causas de perdas de alimentos e de danos à saúde. O uso de aditivos sintéticos tem sido efetivo, porém é conhecido o efeito tóxico de alguns destes, tornando necessário a substituição, nos alimentos, por substâncias naturais com a mesma eficácia e valor biológico benéfico, ou seja a biopreservação que explora o potencial antimicrobiano de diferentes origens naturais. O objetivo deste trabalho foi determinar a CIM, através do método de microdiluição em caldo de acordo com os padrões do IPCL; determinar a CMF, através da inoculação das concentrações que apresentaram efeito inibitório em placas com ASD a 35° C por 24 h; avaliar a capacidade de inibição de esporulação, realizando contagem dos esporos em microscópio com câmara de Neubauer, após inoculação dos fungos em meio controle e em meio com o extrato em estudo; e avaliar a germinação dos esporos através da contagem dos germinados após crescimento em duas etapas, de fungos isolados de pães por extrato hidroalcoólico de cascas de romã. Observou-se resultados significativos de CIM e CMF para *Penicillium panemum*, *Penicillium citrinum* e *Aspergillus chevalieri*, e redução da germinação a partir da concentração de 1% de ER para os fungos *Penicillium citrinum* e *Aspergillus chevalieri* na etapa I e redução na germinação de todos os isolados da etapa II, com destaque para o *Aspergillus chevalieri*, que foi totalmente inibido na concentração de 1% de ER. São vários os mecanismos de resistência microbiana frente à condições desfavoráveis ao seu desenvolvimento, o que pode explicar o fato de não ter havido diminuição de esporulação em nenhuma das cepas estudadas. O ER pode ser um potencial agente inibidor do crescimento fúngico, sendo necessários estudos posteriores para determinar dosagens antifúngicas efetivas, compostos responsáveis pela inibição microbiana, sua toxicidade e testes em alimentos para confirmar sua eficácia.

Palavras-chave: Extrato de Romã. Fungos. Antifungicos Naturais. Concentração inibitória mínima.

ABSTRACT

MORAES, T. R. **Evaluation of sporulation and viability of spores by Pomegranate extract on deteriorating fungi of bread.** 40 p. Completion of course work (Food Technology) - Federal Technological University Of Paraná (UTFPR). Campo Mourão, 2017.

Deterioration has been a major concern, one of the causes of food losses and health damage. The use of synthetic additives has been effective, but the toxic effect of some of these is known, necessitating the substitution in foods for natural substances with the same effectiveness and beneficial biological value, that is the biopreservation that explores the antimicrobial potential of different natural origins. The objective of this work was to determine the MIC, using the broth microdilution method according to IPCL standards; to determine the CMF by inoculating the concentrations that showed inhibitory effect on plates with ASD at 35 ° C for 24 h; to evaluate the sporulation inhibition capacity, counting the spores under a microscope with a Neubauer chamber, after inoculation of the leaks in control medium and in the medium with the ER under study; and to evaluate the germination of the spores through the counting of the germinates after growth in two stages, of isolated fungi of loaves by hydroalcoholic extract of pomegranate peels. Significant results of MIC and CMF were observed for *Penicillium panemum*, *Penicillium citrinum* and *Aspergillus chevalieri*, and reduction of germination from the concentration of 1% ER for the fungi *Penicillium citrinum* and *Aspergillus chevalieri* in stage I and reduction in the germination of all the isolates of stage II, especially *Aspergillus chevalieri*, which was totally inhibited at the concentration of 1% ER. There are several mechanisms of microbial resistance against unfavorable conditions to its development, which may explain the fact that there was no decrease in sporulation in any of the strains studied. ER may be a potential fungal growth inhibitor, and further studies are needed to determine effective antifungal dosages, compounds responsible for microbial inhibition, toxicity, and food testing to confirm their efficacy.

Key-words: Pomegranate extract. Fungi. Natural Antifungals. Minimum inhibitory concentration

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Concentração mínima inibitória (CIM) e concentração mínima fungicida (CMF) do extrato de romã sobre fungos.	27
Tabela 2- Contagem de esporos em meio BDA.....	28
Tabela 3- Germinação dos esporos nas diferentes etapas (I e II)	30

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1- Apresentação gráfica da contagem dos esporos.....	29
Gráfico 2- Comparação gráfica da germinação na etapa I.....	31
Gráfico 3- Comparação gráfica da germinação na etapa II.....	31

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 OBJETIVOS	13
2.1 OBJETIVO GERAL	13
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
3.1 ANTIFUNGICOS NATURAIS	14
3.2 FUNGOS	15
3.3 PRODUTOS PANIFICÁVEIS	18
3.4 ROMÃ.....	19
4 MATERIAL E MÉTODOS	21
4.1 LOCAL DE REALIZAÇÃO DO TRABALHO	21
4.2 MEIOS DE CULTURA E REAGENTES.....	21
4.3 MATERIAL VEGETAL E PREPARO DO EXTRATO	21
4.4 ISOLADOS FUNGICOS	22
4.5 TESTES DE CONCENTRAÇÕES MÍNIMA INIBITÓRIA E MÍNIMA FUNGICÍDA ..	24
4.6 TESTES DE INIBIÇÃO DE ESPORULAÇÃO E VIABILIDADE DE ESPORO	24
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	27
6 CONCLUSÃO	33
7 REFERÊNCIAS	34

1 INTRODUÇÃO

A deterioração tem sido uma das grandes preocupações e uma das maiores causas de perdas de alimentos, diminuição da produtividade e de danos à saúde do homem. O uso de aditivos tem sido efetivo na prevenção da deterioração de alimentos. Entretanto, existe uma tendência cada vez maior de utilizar aditivos naturais devido à conscientização sobre os efeitos tóxicos de alguns aditivos sintéticos. Além disto, novos patógenos veiculados por alimentos têm surgido e tem-se observado o desenvolvimento de resistência de vários deles, aos biocidas usuais. Assim, pesquisas são necessárias para descobrir substâncias naturais capazes de substituir os aditivos tradicionais de maneira eficaz e segura (ALMEIDA et al, 2008).

Os alimentos de origem animal ou vegetal, frescos ou processados, incluindo a água, podem veicular diversos micro-organismos, dentre eles micro-organismos deteriorantes e patogênicos. Micro-organismos deteriorantes são aqueles presentes nos alimentos e causam alterações químicas e físicas. A deterioração resulta na alteração de cor, odor, sabor, textura e aspecto do alimento. Bactérias, bolores e leveduras são os micro-organismos de maior destaque como agentes potenciais de deterioração. Os micro-organismos patogênicos, por sua vez, podem causar diversas perturbações fisiológicas nas pessoas que os consomem, uma vez que eles próprios ou seus metabólitos podem alcançar os fluidos ou os tecidos do hospedeiro, podendo causar doenças leves ou graves (COSTA, 2010).

Os fungos são micro-organismos eucarióticos quimiorganotróficos. Reproduzem se, naturalmente, por meio de esporos, com poucas exceções. Além disso, a maioria das partes de um fungo é potencialmente capaz de crescimento; um minúsculo fragmento é suficiente para originar um novo indivíduo. Quando um esporo fúngico "cai" num substrato apropriado o esporo germina e começa a crescer (BOSSOLAN, 2002).

Entre os prejuízos causados pelos fungos estão emboloramento visível, a descoloração, o odor desagradável, a perda de matéria seca, o aquecimento, as mudanças químicas e nutricionais, além da produção de compostos tóxicos, as micotoxinas. Essa contaminação pode fazer com que os alimentos se tornem impróprios para o consumo humano e animal, resultando em grandes perdas econômicas (BENTO et al., 2012).

Os fungos são capazes de crescer em uma ampla escala de atividade de água (aw), pH e temperatura e pode utilizar uma grande diversidade de substratos como carboidratos, ácidos orgânicos, proteínas e lipídios (HUIS IN'T VELD, 1996). Particularmente, os fungos crescem em alimentos com teor de umidade intermediário, como pães e produtos de panificação, onde outros micro-organismos como as bactérias, não conseguem. A deterioração de produtos de panificação por fungos geram grandes perdas, estimadas globalmente em 3% do volume total de produção (MALKKI e RAVHA, 1978, DAGNAS et al., 2017).

O uso de óleos essenciais com ação antifúngica tem sido uma prioridade para o desenvolvimento sustentável, por serem rapidamente degradáveis e de baixa toxicidade. São facilmente obtidos a partir de materiais de plantas, como flor, sementes, folhas, casca, galhos, madeira, frutos e raízes por hidrodestilação. São usados principalmente, como aromas alimentares ou componentes funcionais em produtos farmacêuticos (NYCHAS et al., 2003; CORBO et al., 2009; NEGI, 2012).

A romã (*Punica granatum* L.) é uma fruta originária do Oriente Médio, pertencente à família *Punicaceae* (MENEZES et al., 2008). É rica em compostos fenólicos que exibem forte atividade antioxidante (NEGI e JAYPRAKASHA, 2003).

As pequenas árvores produtoras de romã, *Punica granatum* Linn, são de origem mediterrânea (NEGI e JAYPRAKASHA, 2003), no entanto, podem ser encontradas no sudoeste asiático, nas Américas e em outras partes do mundo (BRAGA et al., 2005).

Numerosos estudos vem demonstrando que cascas de romã contém vários compostos biologicamente ativos, incluindo antioxidantes naturais como flavonoides e ácidos fenólicos (LI et al., 2006; SINGH et al., 2002) e quantidades significativas de polifenóis, como elagitaninos, ácido elágico e ácido gálico (NASR et al., 1996, ARA e RAOFI, 2016).

Junto com o crescente interesse em antimicrobianos naturais e antioxidantes derivados de frutas, legumes e a maioria das plantas comestíveis, devido ao seu uso em benefício da preservação de alimentos, a investigação de romã também tem sido um campo científico interessante, atividades antimicrobianas de romã tem sido estudada por alguns pesquisadores (AHMAD e BEG, 2001; PRASHANT et al., 2001; PANICHAYUPAKARANANT et al., 2010).

Este vegetal além de apresentar atividade antimicrobiana contra diversas espécies de micro-organismos, também teve descrita sua ação antioxidante, anti-tumoral e anti-inflamatória (JURENKA, 2008).

Desta forma, devido à atividade antimicrobiana apresentada, é de interesse o estudo do extrato de romã contra fungos deteriorantes de pão, para possíveis aplicações nestes alimentos, visando uso como conservante para o controle desses micro-organismos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito do extrato hidroalcoólico de cascas de romã sobre a inibição da esporulação e viabilidade de esporos em fungos isolados de pães.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparo de meios de cultivo com diferentes concentrações de extrato hidroalcoólico de casca de romã;
- Avaliar a concentração inibitória mínima do extrato hidroalcoólico de casca de romã sobre os fungos isolados;
- Avaliar a concentração fungicida mínima do extrato hidroalcoólico de casca de romã sobre os fungos isolados;
- Avaliar a atividade do extrato hidroalcoólico de casca de romã sobre a esporulação dos fungos isolados;
- Avaliar a atividade do extrato hidroalcoólico de casca de romã sobre a viabilidade dos esporos dos fungos isolados;

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 ANTIFUNGICOS NATURAIS

A globalização dos mercados alimentares, a introdução de alimentos, os novos processos de fabricação e a crescente demanda para minimamente processados, fresco-cortado e produtos prontos para o consumo podem exigir um aumento na cadeia de processamento, aumentando o risco de contaminação microbiológica. Portanto, novas e complementares tecnologias de preservação de alimentos que atendam a essas demandas de "fazenda a mesa" são constantemente procuradas. Dentre às tecnologias de preservação alternativa de alimentos, foi dada especial atenção à biopreservação, para prolongar a vida de prateleira e melhorar a qualidade higiênica, minimizando o impacto sobre a nutrição e propriedades organolépticas de produtos perecíveis. A biopreservação explora racionalmente o potencial antimicrobiano de diferentes origens naturais (GARCIA et al., 2010).

Os extratos de plantas são geralmente misturas de compostos ativos e inativos e suas atividades antimicrobianas, antiinflamatórias e antioxidantes devem ser interpretados com critérios. Vale ressaltar que o local, período e tipos de solventes utilizados na extração dos princípios ativos podem interferir na atividade biológica do extrato (MELO et al., 2012).

Extratos vegetais têm sido utilizados como métodos alternativos para inibir o desenvolvimento de fungos, como o extrato aquoso de melão-de-são-caetano (*Momordica charantia* L.) (MARTINS et al., 2009), e alamanda (*Allamanda blanchetti* A. DC.) (GOMES, 2011).

A atividade antimicrobiana de macerado de tecido de *Momordica charantia* foi observada, em condições *in vitro*, sobre *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella* sp., *Staphylococcus aureus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Rhodotorula glutinis*, *Candida* sp., *Rhizopus* sp., *Mucorra cemosus*, *Penicillium* sp., *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus oryzae* e *Trichoderma* sp. (HE, 1998). Já Torres et al. (2002) comprovaram que no extrato de uma ou mais partes da planta de *Momordica charantia* (sementes, folhas, haste, raízes ou frutos) foram encontradas substâncias bioativas como alcaloides,

flavonoides, saponinas, glicosídeos, açúcares redutores, resinas, constituintes fenólicos, óleo fixado e ácidos livres, justificando sua atividade antifúngica e antibacteriana.

3.2 FUNGOS

Os micro-organismos podem desempenhar papéis muito importantes nos alimentos, sendo possível classifica-los em três grupos distintos: os deteriorantes, responsáveis por alterações químicas e físicas indesejáveis; os patogênicos, que representam um risco a saúde e os benéficos que alteram as características originais transformando em um novo alimento (FRANCO, 2002).

Os fungos são organismos eucarióticos que possuem grande capacidade de adaptação e crescimento sob condições de umidade e temperatura extremamente variáveis. Por não exigir uma quantidade de nutrientes elevada, conseguem crescer em quase todo tipo de alimento. Os fungos podem ser divididos em pluricelulares ou filamentosos (bolores ou mofos) e os unicelulares (leveduras). Nos bolores, a unidade fundamental é a hifa e o conjunto desses elementos é denominado micélio, que exerce função de assimilação, nutrição e fixação, podendo diferenciar-se em estruturas de frutificação, que servem à sua propagação (CORREA, 1995).

O micélio dos bolores é responsável pelo aspecto característico das colônias que formam. Estas podem ter um aspecto cotonoso, seco, úmidas, compactas, aveludadas, gelatinosas, com variadas colorações. É oportuno lembrar que os bolores são, em sua absoluta maioria, aeróbios, razão pela qual seu crescimento nos alimentos limita-se à superfície em contato com o ar (FRANCO, 2002).

São bastante variadas as formas e o mecanismo de multiplicação dos mofos, dentro dos quais se distinguem dois tipos de reprodução: assexuada, considerada o tipo mais importante para multiplicação da espécie, pela razão de produzir numerosos indivíduos, e comumente se efetua através de esporos, que quando encontram condições favoráveis se separam das hifas e germinando dão origem a novas hifas; e sexuada que ocorre como em outros organismos, com a união de dois núcleos (EVANGELISTA, 2008).

As micotoxinas são metabólitos secundários tóxicos produzidos por fungos filamentosos, que, quando ingeridos, são prejudiciais à saúde humana e animal,

além de apresentarem elevada atividade mutagênica, carcinogênica e teratogênica (SILVEIRA, 1981).

Em condições favoráveis, várias espécies fúngicas podem produzir micotoxicoses, ao homem e aos animais, quando as sementes contaminadas são destinadas à alimentação (ROSSETO et al., 2015). Os piores efeitos das micotoxinas no homem tendem a ser os crônicos, de difícil associação com o consumo de alimentos contaminados. Os principais efeitos registrados são indução de câncer, lesão renal e depressão do sistema imune (PRADO et al., 1991).

O gênero *Penicillium* sp. possui a maior quantidade de espécies e pode ser encontrado em quase todos os substratos. A maioria das espécies habita o solo e sua ocorrência em alimentos pode se dar de forma acidental. Algumas têm alto poder de causar patologias graves e destrutivas em frutos e cereais. Crescem em baixas temperaturas e presença de oxigênio, sendo capazes de causar deterioração alimentar em produtos mantidos sobre refrigeração (MEIRELES e SREBERNICH, 2008), algumas espécies causam apodrecimento e outras deteriorações.

Penicillium sp. apresenta micélio vegetativo que penetra no substrato, produzindo hifas aéreas, nas quais se desenvolvem conidióforos. Estes podem ser ramificados e apresentam cabeças em escova, que carregam os esporos. Agrupamento de estigmas, usualmente numa posição, se formam a partir de cada uma das cadeias de conídeos. A coloração das colônias maduras é útil na identificação das espécies que crescem melhor em temperatura de 15-30°C (PELCZAR et al., 1996).

Dentro do gênero *Penicillium* sp. encontra-se a espécie *P. citrinum* que possui colônias aveludadas com alta esporulação e coloração azul intenso, cinza ou verde na superfície, e coloração amarela alaranjada no reverso da colônia. Quando cultivadas no meio MEA (*Malte Extract Agar*) apresentam crescimento rápido e são menos densas, com diâmetro de 24-41 mm após 7 dias. Não crescem em temperaturas acima de 37°C e produzem a micotoxina citrinina. O *P. citrinum* é comum em regiões temperadas, atinge diversos tipos de alimentos e é muito comum no solo e no ar (SAMSON et al., 2010).

Ainda segundo Samson et al., (2010) outra espécie importante é *P. panemun*, essa produz colônias verde e azul com uma superfície aveludada, o inverso da colônia possui coloração creme, amarelo ou rosa pálido, apresentando rápido crescimento e uma diâmetro de 52-71 mm após 7 dias. É responsável pela produção

da patulina uma micotoxina altamente tóxica. É encontrado principalmente em pães e cresce bem em temperaturas baixas, tolerando níveis de pH ácidos além de baixa concentração de O₂ e altas concentrações de CO₂. Suporta níveis elevados de acetato de etila, ácido acético, ácido propiônico e ácido láctico.

O fungo *Aspergillus* sp. é encontrado na microflora do ar, com grande frequência contaminante. Tem capacidade de crescer em alta concentração de açúcar e sal, e é capaz de extrair a água dos substratos relativamente secos (PELUQUE, 2014).

Sob o ponto de vista morfológico, *Aspergillus* sp. apresenta micélios septados e ramificados, com as porções vegetativas submersas no nutriente. Os conidióforos ou hifas férteis surgem de células podais, também submersas podendo ser septadas ou não. No ápice o conidióforo incha para formar uma vesícula que dá origem ao esterigma, o esterigma dá origem aos conídeos que são expostos formando os esporos. Os conídeos apresentam diferentes cores que são caracterizadas de acordo com a espécie (PELCZAR et al., 1996).

A espécie *Aspergillus chevalieri* cresce lentamente a 37°C formando colônias numerosas esporuladas com diâmetro de 10-18 mm depois de 7 dias, possuem cor variada de acordo com o meio de cultura utilizado podendo ser de um marrom amarelado até um verde acinzentado na superfície e no inverso apresentar uma coloração incolor a verde pálido. É mais comum em regiões tropicais e subtropicais, sendo bastante encontrado no ar, poeira doméstica, cereais, frutas, arroz, alimentos secos incluindo ervas e salame. Essa espécie não possui crescimento elevado em habitat com elevada atividade de água (SAMSON et al., 2010).

Os membros do gênero *Cladosporium* sp. ocorrem em produtos de vegetais em decomposição e também no solo. Como contaminantes dos meios de cultura, formam colônias discretas, com o desenvolvimento espesso e aveludado de micélios verde-oliva escuros. Os conídeos são produzidos por gemulação, sendo as mais jovens e menores localizadas nas extremidades. Os conídeos gemulantes são formadas por uma única célula, quando jovens, podendo conter duas células quando mais velhas. Sendo possível a formação de mais de uma gêmula, encontra-se cadeia de conídeos ramificadas (PELCZAR et al., 1996).

As espécies desse gênero apresentam colônias grandes com crescimento demorado, é encontrado em todo o mundo, as maiores das espécies são patogênicas frequentemente encontrados em alimentos, geralmente crescem em uma temperatura de 22-25°C em torno de 7 dias (SAMSON et al., 2010).

3.3 PRODUTOS PANIFICÁVEIS

Todos os produtos de panificação com elevada atividade de água podem ser colonizados por fungos. Deste modo, pães, bolos e panetões estão amplamente expostos a contaminações (FREIRE, 2011). Os agentes microbianos que afetam estes produtos são: os bolores, as leveduras e algumas bactérias. Os bolores são os micro-organismos de deterioração mais comuns nos produtos de panificação, sendo em muitos casos o principal fator que determina o tempo de vida de prateleira do produto (GUTIÉRREZ et al., 2009).

Os mofo e as leveduras são mais tolerantes a baixas atividades de água e pH ácido do que as bactérias. Por essa razão deterioram vegetais e produtos de panificação. O pão é deteriorado por diversos gêneros de fungos filamentosos dentre eles, *Rhizopus nigricans* (mofo de pão, manchas pretas), *Penicillium* sp. (mofo verde), *Aspergillus* sp. (mofo verde e negro) e *Neurospora sitophila* (pão avermelhado) (FORSYTHE, 2013).

A deterioração de panificados geralmente inicia-se com contaminação pós processo e termina com a formação de micélios visíveis durante o armazenamento nas lojas ou locais de consumo (DAGNAS e MEMBRÉ, 2013; HORNER e ANAGNOSTOPOULOS, 1973; DAGNAS et al., 2017). Até o momento, os gêneros de fungos mais comumente encontrados em produtos de panificação têm sido: *Aspergillus*, *Chrysonilia*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Eurotium*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Rhizopus* e *Mucor*. Espécies de *Aspergillus*, *Cladosporium* e *Penicillium* ocorrem com maior frequência (FREIRE, 2011).

Muitos ingredientes oferecem riscos de contaminação aos produtos de panificação, tais como coberturas, além de especiarias e amêndoas. Entretanto, é a farinha um dos principais veículos de introdução de esporos fúngicos no ambiente industrial, especialmente em pequenos estabelecimentos, onde os diferentes

processos de fabricação são conduzidos em ambientes bastante próximos (FREIRE, 2011).

3.4 ROMÃ

A *Punica granatum* L. é uma erva da família Punicaceae, popularmente conhecida no Brasil como “romã”. É um arbusto ou árvore, da região do Mediterrâneo, que atinge de quatro a seis metros de altura. Tem folhas simples e flores isoladas, de cor vermelha alaranjada e cálices esverdeados, duros e coriáceos. Fruto tipo baga, redondo, de casca coriácea, amarela ou avermelhada contendo inúmeras sementes envolvidas por um arilo polposo, róseo-avermelhado. Sabor doce, levemente acidulado. Tem sido usada como adstringente, hemostática, antidiabética, anti-helmíntica e antidiarréica. Seus frutos são usados no tratamento de infecções de garganta, rouquidão e febre. Pode também ser utilizada como anti-séptico e antiviral em processos inflamatórios da mucosa oral e contra herpes genital. Além disso, a casca do caule é também usada como vermífugo. (MENEZES et al., 2008).

Segundo Shan et al., (2007) produtos como especiarias, ervas e condimentos são adicionados aos alimentos há muito tempo devido às suas propriedades aromáticas, medicinais e também antimicrobianas, sendo então utilizados como agentes conservantes naturais nos mais variados tipos de alimentos.

Em plantas, seus constituintes como polifenóis, taninos e flavonoides estão recebendo cada vez mais atenção devida suas diversas funções biológicas, assim como suas atividades antimicrobianas (MACHADO et al., 2003).

A romã (*Punica granatum*) mostrou uma explosão de interesse durante a última década e ganhou uma enorme popularidade, devido aos seus inúmeros efeitos na saúde. Na verdade, os consumidores tem tomado consciência sobre os benefícios dos produtos naturais na saúde e no bem-estar e continuam a impulsionar novas tendências de consumo de “super-frutas”, particularmente aqueles com altos teores de polifenóis. Vários estudos científicos confirmaram a sua atividade biológica e efeitos medicinais de suas diferentes partes (arilos, cascas, folhas e flores) e produtos (sucos frescos e fermentados, extratos enriquecidos e óleo de sementes)

(AVIRAM e ROSENBLAT, 2012; LANSKY e NEWMAN, 2007; HASNAOUI et al., 2014).

A composição química do suco da fruta é constituída de compostos fenólicos como antocianinas, delphinidina, cianidina, pelorgodina, quercetina e ácidos fenólico, cafeíco, catequínico, clorogênico, orto e para cumárico, elágico, gálico e taninos (punicalagina) (MARTINS, 1995; JARDINI e FILHO, 2007).

Os taninos são compostos fenólicos encontrados em diversas plantas e no pericarpo de frutas. A Romã (*Punica granatum* L.) é rica em taninos, sendo uma das principais substâncias presentes no fruto e possuem notável atividade antimicrobiana (MACHADO et al., 2003).

As cascas da romã são subprodutos da indústria de alimentos, sendo utilizadas na alimentação de animais em países desenvolvidos como os Estados Unidos. A atividade antimicrobiana de cascas já foi comprovada com êxito contra bactérias patogênicas (AHMAD e BEG, 2001). Suas cascas, constituem até 40% do fruto inteiro que permanecem como subproduto após a produção de suco de romã. Estudos relatam suas propriedades antibacterianas, anti-inflamatórias, e atividades anti-alérgicas (PANICHAYUPAKARANANT et al., 2010). Atividades antimicrobianas de romã foram comprovados contra *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* e *Yersinia enterocolitica* (AL-ZOREKY, 2009).

Extratos hidroalcoólicos de cascas de romã mostraram atividades anti-diabéticas reduzindo significativamente níveis de glicose de ratos normais e diabéticos (GAUTAM e SHARMA, 2012; NAJAFZADEH et al., 2011). Esses resultados indicam que os compostos fenólicos da casca podem ser ingredientes bioativos multiuso (ÇAM et al., 2014).

Devido à atividade antimicrobiana apresentada, é de interesse o estudo do extrato de romã contra fungos deteriorantes de pão, para possíveis aplicações nesses alimentos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 LOCAL DE REALIZAÇÃO DO TRABALHO

Este trabalho foi desenvolvido nos laboratórios de Engenharia e Tecnologia de Alimentos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Campo Mourão-PR, Brasil, Laboratório Nucleo de Produtos Naturais (NEPRON), Laboratório de Biotecnologia Microbiana (LBIOMIC) e Complexo de Centrais de Apoio à Pesquisa (COMCAP) da Universidade Estadual de Maringá, Campus Sede, em Maringá-PR.

4.2 MEIOS DE CULTURA E REAGENTES

Os meios de cultura ágar batata dextrose (BDA) (KASVI), agar sabouraud dextrose (ASD) (BIOMARK), ágar-água, ágar extrato de malte (MEA) (KASVI) e caldo batata dextrose (BD) (KASVI) foram preparados conforme instruções do fabricante, esterilizados em autoclave (PHOENIX) e vertido em placas de Petri estéreis. Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico. Utilizou-se também RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute, Gibco) com L-glutamina (sem bicarbonato de sódio) e morfolinopropanosulfônico 0,65 M 3-N (pH 7,2) como tampão (Sigma), suplementado com glucose a 2%.

4.3 MATERIAL VEGETAL E PREPARO DO EXTRATO

As romãs (cultivar Califórnia) foram coletadas diretamente na unidade produtora, localizada no município de Nova Esperança, noroeste do Estado do Paraná em dezembro de 2015 e encaminhadas ao Laboratório Nucleo de Produtos Naturais (NEPRON) na UEM. Os frutos foram devidamente padronizadas quanto ao grau de maturação e sanidade e higienizados com hipoclorito de sódio a 20 ppm. De forma manual, procedeu-se a separação das cascas, cortando-as em pedaços de aproximadamente 2 centímetros, lavadas em água deionizada para retirada do resíduo da polpa do fruto e deixadas ao ambiente para evaporação do excesso de água. Posteriormente, as cascas foram secas em estufa desidratadora (Pardal

Tecnologia para Agro Indústria) por 48 horas à temperatura de 50°C. Após este período, as cascas foram trituradas em moinho de facas (MARCONI) até obtenção de uma farinha de cascas, com granulometria de 60 Mesh e conservada à vácuo à temperatura de -18°C.

O extrato das cascas de romã (ER) foi obtido através da técnica de maceração, homogeneizando a farinha de cascas e solução hidroalcoólica a 70% na proporção 1:10 (m/v), permanecendo a mistura em repouso por um período de 24 horas, ao abrigo da luz e em temperatura ambiente. O sobrenadante de coloração amarela foi recolhido em frasco âmbar e armazenado em geladeira e ao resíduo de maceração, novo volume de solução hidroalcoólica foi adicionado, repetindo a extração por mais 24 horas. Este procedimento foi realizado por 5 vezes. O volume total de sobrenadante foi centrifugado (Centribio) a 3500 rpm por 15 minutos e em seguida filtrado a vácuo, em funil de Büchner e filtro 0,5µm (Zeta Plus). O filtrado foi rotaevaporado (Büchi RE 120) a 50°C, até secagem e armazenado em frasco âmbar sob congelamento a -20°C.

4.4 ISOLADOS FUNGICOS

Os fungos - *Penicillium panemum*, *Penicillium citrinum*, *Cladosporium oxysporum*, *Cladoporium sublifforme* e *Aspergillus chevalieri* - utilizados neste trabalho foram isolados a partir de pães de forma tradicional e integral, gentilmente cedidos pela indústria de pães congelados e assados, Empresa Brasileira de Comercialização- EBC Alimentos, localizada em Maringá-PR. Os fungos foram cultivados em meio BDA, isolados e purificados por método monospórico em ágar-água. As cepas isoladas foram encaminhadas ao Laboratório de Biotecnologia Microbiana para identificação molecular.

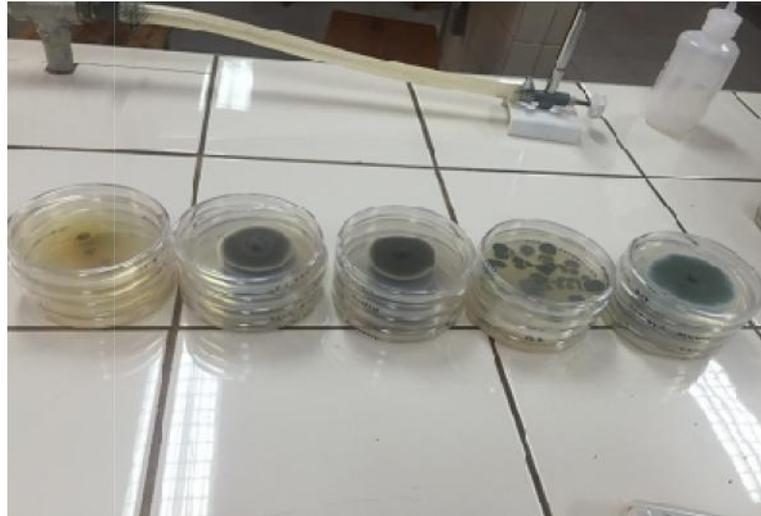


Figura 1 - *Aspergillus chevalieri*, *Cladoporium sublifforme*, *Cladosporium oxyporum*, *Penicillium citrinum* e *Penicillium panemum* respectivamente

4.4.1 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DOS FUNGOS BASEADO NO SEQUENCIAMENTO DA REGIÃO ITS1-5.8S-ITS2

O DNA genômico dos fungos foi extraído utilizando o kit de extração “Power Soil DNA Isolation kit” (MoBio Laboratories, Inc.) seguindo as instruções da fabricante, com exceção da fase inicial, onde os fungos foram crescidos em caldo BD (Batata-dextrose) e utilizado cerca de 200 mg de micélio para extração. A integridade do DNA foi verificada em gel de agarose 1%.

Para amplificação da região de rRNA ITS1-5.8S-ITS2 foi realizada a reação da polimerase em cadeia (PCR) utilizando os primers ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCCGCTTATTGATATGC-3') (WHITE et al., 1990) de acordo com metodologia descrita previamente por Rhoden et al. (2012).

Os produtos de PCR foram purificados utilizando as enzimas shrimp alkaline phosphatase e exonuclease I (Sigma-aldrich). O sequenciamento foi realizado na plataforma de sequenciamento ABI-Prism 3500 Genetic Analyser (Applied Biosystems). Os resultados foram analisados utilizando o software BioEdit 7.2.5. As sequencias nucleotídeos foram então comparados com outras disponíveis no banco de dados do “National Center for Biotechnology Information” (NCBI) utilizando a ferramenta nBLAST, com filtragem para “type strains”. As sequencias mais similares foram então resgatadas e alinhadas utilizando o software MEGA v.6.05 com o

método “neighbor-joining”, com “p-distance” para nucleotídeos, com a opção “pairwise gap deletion” e bootstrap com 10.000 repetições para a construção filogenética. Os generos isolados foram os seguintes: *Penicillium panemum*, *Penicillium citrinum*, *Cladosporium oxysporum*, *Cladosporium sublifforme* e *Aspergillus chevalieri*.

4.5 TESTES DE CONCENTRAÇÕES MÍNIMA INIBITÓRIA E MÍNIMA FUNGICÍDA

Para os testes de concentração mínima inibitória (CIM), utilizou-se o método de microdiluição em caldo de acordo com os padrões do Instituto de Padrões Clínicos e de Laboratório (M38 A), com algumas modificações para produtos naturais (DALBEN-DOTA et al., 2010; CAPOCI et al., 2015). A densidade celular de cada isolado fúngico foi ajustada para 5×10^4 unidades formadoras de colônias (UFC)/mL em meio RPMI. O teste de microdiluição seriada foi realizada, adicionando-se aos tubos de ensaio estéreis, quantidades de 500µL da suspensão fúngica ajustada juntamente com 500µL de extrato de cascas de romã nas concentrações 10%, 5%, 2,5%, 1,25%, 0,6%, 0,3%, 0,1%, 0,05% e 0,02%. Tubos controle contendo 500µL de inóculo e 500µL de meio RPMI e tubo contendo somente 500µL de meio RPMI também foram adicionados aos testes. Todos os tubos (microdiluição e controles) foram incubados em estufa bacteriológica a 35°C durante 48 horas. As leituras foram realizadas visualmente com auxílio de uma lupa. A CIM foi considerada a menor concentração em que nenhum crescimento fúngico foi evidente. A concentração fungicida mínima (MFC) também foi determinada inoculando cada concentração do teste de CIM em placas que continham ASD. As placas foram então incubadas a 35°C durante 24 h. O MFC foi definido como a menor concentração de extrato de cascas de romã que impediu o crescimento fúngico.

4.6 TESTES DE INIBIÇÃO DE ESPORULAÇÃO E VIABILIDADE DE ESPORO

A capacidade de inibição fúngica do ER foi avaliada pelos testes de inibição da esporulação e viabilidade de esporos das cepas isoladas de pães, segundo técnica descrita por Marques et al., (2004) com modificações. Os isolados fúngicos foram inoculados em BDA e incubados por quatro dias a 25°C em estufa (ACB LABOR). A partir destas colônias, foram retirados plugs de micélio, de 5 mm de diâmetro e inoculados em triplicata em placas de Petri com BDA controle (sem adição de ER) e BDA 1 e BDA 5, com adição de 1% e 5% de ER, respectivamente e incubadas a 28°C por 7 dias. A partir destes cultivos foram realizados os ensaios de esporulação e viabilidade de esporos.

4.6.1 AVALIAÇÃO DA ESPORULAÇÃO

Após o período de incubação, foi adicionado sobre o micélio de todos os testes (BDA controle, BDA 1 e BDA 5), 10 mL de solução salina estéril (NaCl (0,89%, p/v) e Tween 80®(0,1%, v/v) na proporção 1:1 (v/v). Com o auxílio de uma alça de platina, foi realizada uma leve raspagem do micélio, para remoção dos esporos, e o conteúdo líquido foi transferido para tubos de ensaio estéreis, devidamente identificados. A partir desta suspensão fúngica, foi realizada a contagem de esporos em microscópio luminoso com câmara de Neubauer, utilizando-se diluição da suspensão com a solução salina quando necessário.

4.6.2 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DOS ESPOROS

Para este teste, foram preparados inóculos fúngicos a partir do cultivo de todas as cepas isoladas em BDA contendo 1% e 5% de ER (BDA1 e BDA5) e BDA sem adição de ER (BDAC) por 4 dias a 25°C.

Etapa 1: Membranas de celofane de dimensões 2 cm x 2 cm foram esterilizadas em frascos erlemeyer contendo água destilada. Essas membranas foram distribuídas, de modo asséptico, em placas de Petri contendo BDA1 e BDA5 e

a estas membranas adicionados 0,1mL de suspensão de esporos produzidos a partir de cultivos em BDAC, de cada cepa isolada.

Etapa 2: Membranas de celofane estéreis com dimensões 2 cm x 2 cm foram esterilizadas em frascos erlemneyer contendo água destilada. Essas membranas foram distribuídas, de modo asséptico, em placas de Petri contendo BDAC e a estas membranas adicionados 0,1mL de suspensão de esporos BDA1 e BDA5 de cada cepa isolada.

Todas as placas (etapa 1 e 2) foram incubadas a 25°C, em ausência de luz, por um período de 15 horas. Após este período, foram adicionadas 2 gotas de corante lactofenol azul-de-algodão para deter a germinação e facilitar a visualização do esporo em microscópio. A contagem de esporos foi realizada pela observação de 150 esporos em cada área da lâmina, utilizando-se microscópio com 400 aumentos, onde foram contados os esporos germinados e não germinados, estabelecendo-se depois a porcentagem de germinação.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

O extrato hidroalcoólico de cascas de romã apresentou uma capacidade de inibição do crescimento fúngico, com valores significativos de CIM (ação fungistática) e CMF (ação fungicida) *in vitro* para *Penicillium panemum*, *Penicillium citrinum* e *Aspergillus chevalieri* (Tabela 1). Resultados semelhantes foram verificados por Elsherbiny et al., (2016) para *Fusarium sambucinum*, com CIM de 2% de extrato de cascas de romã, valor inferior e CMF de 12%, valor superior ao encontrado neste estudo. Valores inferiores de CIM foi encontrado por Naseer et al., (2014), com inibição de *Aspergillus flavus* a 0,01% de extrato alcoólico de cascas de romã. Óleos essenciais de canela (*Cinnamomum zeylanicum*), capim-limão (*Cymbopogon flexuosus*), eucalipto (*Eucalyptus globu-lus*), cravo (*Eugenia caryophyllus*) e alecrim inibiram o crescimento de *Alternaria alternata* nas concentrações de 0,1%, 0,1% 0,05%, 0,1%, 0,025% e 0,025% respectivamente (CASTRO et al., 2017). *Cladosporium oxysporum*, *Cladoporium sublifforme* não foram inibidos pelo extrato nas doses testadas neste trabalho.

Tabela 1- Concentração mínima inibitória (CIM) e concentração mínima fungicida (CMF) do extrato de romã sobre fungos.

Isolados	CIM(%)	CFM(%)
1- Pp	2,5 ^a	2,5 ^a
2- Pc	1,25 ^a	2,5 ^a
3- Co	ND	ND
4- Cs	ND	ND
5- Ac	5 ^b	5 ^b

^{a,b,c} Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa (p<5%) pelo teste t-Student. ND: Não foi verificada ação inibitória e fungicida. Pp: *Penicillium panemum*. Pc: *Penicillium citrinum*. Co: *Cladosporium oxysporum*. Cs: *Cladosporium sublifforme*. Ac: *Aspergillus chevalieri*.

Os resultados obtidos da contagem de esporos das cepas isoladas de pães, cultivadas em meio BDA com a adição do ER estão apresentados na Tabela 2. Observa-se que houve um estímulo na esporulação dos fungos utilizados, com exceção do isolado 3 que não sofreu alteração significativa à adição do ER. O isolado 2 apresentou um aumento na esporulação a partir da concentração de 1%, e maior em 5%. Os isolados 1, 4 e 5 apresentaram um estímulo maior na concentração de 5% de extrato.

Tabela 2- Contagem de esporos em meio BDA

Isolados	C* (e/mL)****	E.R. 1% **(e/mL)	E.R. 5% *** (e/mL)
1- Pp	5,2 x 10 ^a	5,8 x 10 ^a	7,96 x 10 ^b
2- Pc	2,5 x 10 ^a	2,61 x 10 ^b	8,702 x 10 ^c
3- Co	6,0 x 10 ^a	1,2 x 10 ^a	3,23 x 10 ^a
4- Cs	3,0 x 10 ^a	3,0 x 10 ^a	1,82 x 10 ^b
5- Ac	1,5 x 10 ^a	1,3 x 10 ^{ac}	6,3 x 10 ^{bc}

^{a,b,c} Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($p < 5\%$) pelo teste t-Student. *C: meio controle (sem adição de extrato de romã - E.R.); **E.R. 1%: meio com adição de 1% E.R.; ***E.R. 5%: meio com adição de 5% E.R.; ****e/mL: esporos por mililitros. Pp: *Penicillium panemum*. Pc: *Penicillium citrinum*. Co: *Cladosporium oxysporum*. Cs: *Cladosporium sublíforme*. Ac: *Aspergillus chevalieri*.

Rodrigues et al., (2006) ao avaliar a fungitoxicidade dos extratos brutos aquosos (EBA) de gengibre (*Zingiber officinalis*) e eucalipto (*Corymbia citriodora*), sobre o fungo *Helminthosporium* sp, verificou que, *Z. officinalis* estimulou um discreto aumento na produção de esporos à medida que se aumentava a concentração do EBA. Já, para *C. citriodora*, o comportamento obtido foi linear, verificando-se decréscimos na esporulação quando foram utilizadas maiores concentrações do EBA.

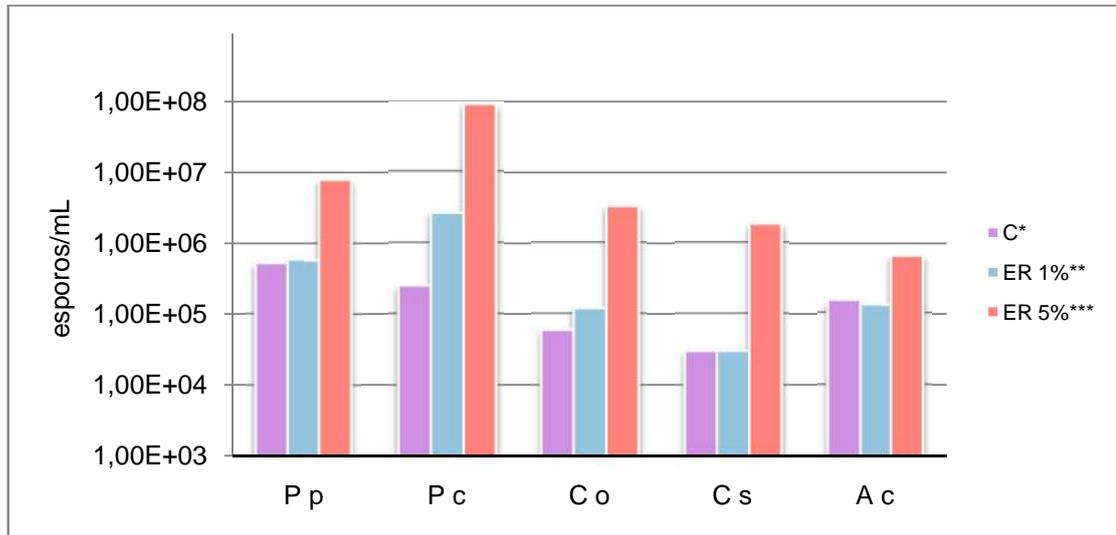
Itako et al., (2008) verificaram que os EBAs de *Achillea millefolium* (mil-folhas), *Artemisia camphorata* (cânfora), *Cymbopogon citratus* (capim-limão) e *Rosmarinus officinalis* (alecrim) não inibiram o crescimento micelial de *Alternaria solani*, mas tiveram efeitos significativos na redução da esporulação e da germinação de esporos, principalmente os EBAs de *A. camphorate*, *C. citrates* e *R. officinalis*, a partir da concentração de 20% .

Costa et al., (2009), verificaram que o óleo de Neem em concentrações acima de 0,5% também estimulou a esporulação em *Aspergillus flavus*.

O gráfico 1 compara os resultados das diferentes concentrações do extrato e o meio controle sobre os isolados fúngicos testados mostrando o aumento da quantidade de esporos a medida que a concentração do ER se eleva. Moino e Alves (1998) argumentam que o micro-organismo, num mecanismo de resistência fisiológica, pode metabolizar os componentes do ingrediente ativo, utilizando as moléculas resultantes desse processo, liberadas no meio de cultura, como nutrientes secundários, promovendo seu crescimento vegetativo e a conidiogênese. Por outro lado, os resultados apresentados por Ferreira et al., (2013) mostrou redução

significativa de esporulação de *Aspergillus flavus* na presença de óleo essencial de *Curcuma longa* a uma concentração de 0,50%.

Gráfico 1- Apresentação gráfica da contagem dos esporos



*C: meio controle (sem adição de extrato de romã - E.R.); **E.R. 1%: meio com adição de 1% E.R.; ***E.R. 5%: meio com adição de 5% E.R. Pp: *Penicilium panemum*. Pc: *Penicilium citrinum*. Co: *Cladosporium oxysporum*. Cs: *Cladosporium sublifforme*. Ac: *Aspergillus chevalieri*.

Os antimicrobianos representam uma das muitas tensões que um patógeno microbiano pode sentir e responder para sobreviver em condições ambientais severas. Os mecanismos microbianos de resistência podem, em grande parte, ser classificados em duas grandes categorias. A primeira categoria inclui mecanismos para contornar os efeitos do antimicrobiano sobre a célula, que incluem alterações no alvo do antimicrobiano. A segunda categoria inclui mecanismos que permitem à célula lidar com o estresse induzido por drogas, como por exemplo, alterações metabólicas que minimizam a toxicidade do antimicrobiano. Alterações na resistência podem refletir em uma adaptação fisiológica frente à uma droga, alterações epigenéticas ou alterações genéticas estáveis, dependendo da natureza da droga, da duração da exposição e do organismo (COWEN e STEINBACH, 2008).

Os resultados obtidos no teste de germinação dos fungos estão apresentados em porcentagens, na Tabela 3. A redução de germinação foi observada a partir da concentração de 1% de ER para os isolados 2 e 5 do grupo de germinação da etapa I e todos os isolados do grupo de germinação da etapa II, com destaque para o isolado 5, que foi totalmente inibido em qualquer uma das concentrações de ER

utilizadas.

Tabela 3- Germinação dos esporos nas diferentes etapas (I e II)

ISOLADOS	I*			II*		
	C**	ER 1%***	ER 5%****	C**	ER 1%***	ER 5%****
1 Pp	3 ^a	1 ^a	1 ^a	3 ^a	2 ^a	2 ^a
2 Pc	60 ^a	3 ^b	3 ^b	60 ^a	3 ^b	2 ^b
3 Co	99 ^a	97 ^a	16 ^b	99 ^a	39 ^b	37 ^b
4 Cs	97 ^a	97 ^a	10 ^b	97 ^a	53 ^b	26 ^c
5 As	15 ^a	2 ^b	1 ^b	15 ^a	0 ^b	0 ^b

^{abc} Letras diferentes indicam diferença significativa (p<5%) pelo teste de t-Student.; *I e II*: etapas de germinação I (germinação de esporos produzidos em BDA controle e germinados em ER1% e ER 5%) e II (germinação de esporos produzidos em ER1% e ER 5% e germinados em BDA controle) conforme descrito em métodos; **C: meio controle (sem adição de extrato de romã - E.R.); ***E.R. 1%: meio com adição de 1% E.R.; ****E.R. 5%: meio com adição de 5% E.R.; Pp: *Penicillium panemum*. Pc: *Penicillium citrinum*. Co: *Cladosporium oxysporum*. Cs: *Cladosporium subuliforme*. Ac: *Aspergillus chevalieri*. Valores em porcentagem.

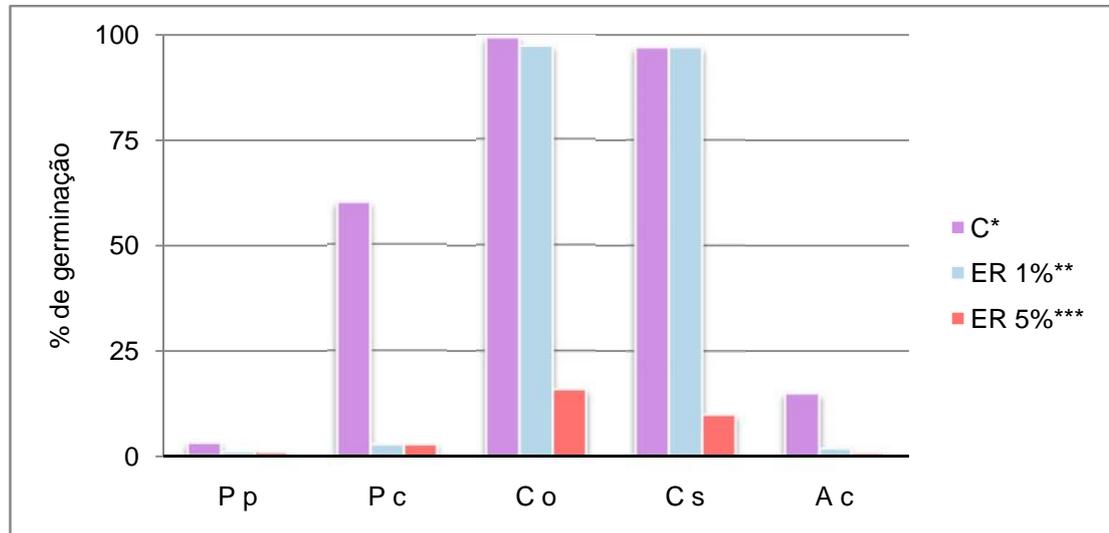
Nicosia et al., (2016) verificou em estudo “*in vitro*” uma atividade antifúngica significativa para extrato aquoso de cascas de romã. A germinação de esporos cultivados em ágar batata dextrose contendo 1,2% do extrato, comparado ao grupo controle foi de 100, 91,0 e 82,7% para *Botrytis cinerea*, *Penicillium digitatum* e *Penicillium expansum*, respectivamente. Na concentração de 0,12% de extrato, a germinação foi reduzida para 49,1,82 e 25%, respectivamente.

A punicalagina, um tanino elágico derivado do fruto da romanzeira, é provavelmente um dos principais constituintes antimicrobianos desta fruta (MACHADO et al., 2003). Os taninos têm efeito inibitório sobre bactérias e fungos. Existem três hipóteses para o mecanismo de ação antimicrobiana. A primeira pressupõe a inibição das enzimas de bactérias e fungos e/ou a complexação dos substratos as enzimas; a segunda seria a ação dos taninos sobre as membranas celulares dos micro-organismos, modificando o seu metabolismo. Por último, a terceira menciona a complexação dos taninos com íons metálicos, diminuindo, a disponibilidade destes elementos essenciais para o metabolismo dos micro-organismos (MELLO e SANTOS, 2002).

Nos gráficos 2 e 3 observa-se a ação inibitória do ER sobre a viabilidade dos esporos dos isolados fúngicos nas duas etapas de germinação realizadas neste trabalho. Em ambos os casos a germinação foi alterada em todos os isolados em

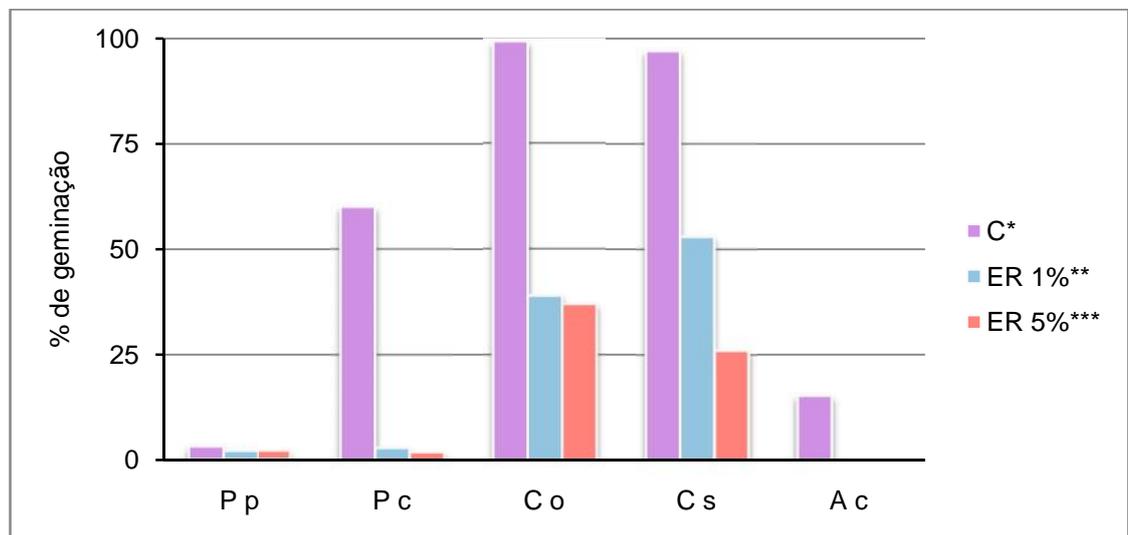
alguma das concentrações, com ênfase no isolado 5 onde a germinação foi totalmente inibida.

Gráfico 2- Comparação gráfica da germinação na etapa I



*C: meio controle (sem adição de extrato de romã - E.R.); **E.R. 1%: meio com adição de 1% E.R.; ***E.R. 5%: meio com adição de 5% E.R. Pp: *Penicilium panemum*. Pc: *Penicilium citrinum*. Co: *Cladosporium oxysporum*. Cs: *Cladosporium subliforme*. Ac: *Aspergillus chevalieri*.

Gráfico 3- Comparação gráfica da germinação na etapa II



*C: meio controle (sem adição de extrato de romã- E.R.); **E.R. 1%: meio com adição de 1% E.R.; ***E.R. 5%: meio com adição de 5% E.R. Pp: *Penicilium panemum*. Pc: *Penicilium citrinum*. Co: *Cladosporium oxysporum*. Cs: *Cladosporium subliforme*. Ac: *Aspergillus chevalieri*.

Os resultados encontrados neste trabalho mostram que apesar de ter havido um estímulo na esporulação na maioria dos isolados, houve diminuição na germinação, indicando que o ER pode tornar os esporos menos viáveis.

Elsherbiny et al., (2016) mostrou em seus estudos que extrato metanólico de cascas de romã inibiu 75,5% do crescimento micelial de *Fusarium sambucinum* e completa inibição da germinação de esporos a uma concentração de 2,0 mg/mL de extrato. Ferreira et al., (2013), obteve redução de crescimento de *Aspergillus flavus* por óleo essencial de *Cúrcuma longa* na concentração de 0,10% e a viabilidade dos esporos reduzidas na presença do óleo essencial a 0,10%.

No experimento de avaliação do efeito dos óleos essenciais sobre *P. euvitis in vitro* foi constatado uma porcentagem de inibição dos esporos de 26 a 100% e as inibições aumentaram com o aumento das concentrações dos óleos essenciais (FIALHO et al.,2015).

Costa et al., (2011) observou, através da avaliação microscópica dos micélios dos fungos, por ele isolado, diversas alterações morfológicas, como a presença de vacúolos, desorganização dos conteúdos celulares, diminuição na nitidez da parede celular, intensa fragmentação e menor turgência das hifas após aplicar o óleo essencial de cravo na concentração de 0,15%.

6 CONCLUSÃO

Os resultados de CIM e CFM encontrados foram 2,5% e 2,5% para *Penicillium panemum*, 1,25% e 2,5% para *Penicillium citrinum* e 5% e 5% para *Aspergillus chevalieri*, nas doses testadas não houve inibição para *Cladosporium sublifforme* e *Cladosporium oxysporum*

O extrato etanólico de cascas de romã (ER) nas concentrações de 1% (ER1%) e de 5% (ER5%) aumentaram a esporulação nos isolados *Penicillium panemum*, *Penicillium citrinum*, *Cladosporium sublifforme* e *Aspergillus chevalieri* e não alterou no isolado *Cladosporium oxysporum*.

A germinação dos esporos produzidos em meio controle (sem extrato de romã) e germinados em meio com 1% e 5% de extrato de romã foi diminuída em quatro dos isolados, no *Penicillium citrinum* e *Aspergillus chevalieri*, a partir da concentração de 1%, no *Cladosporium sublifforme* e *Cladosporium oxysporum* a partir da concentração de 5%, exceto no isolado *Penicillium panemum*.

A germinação dos esporos produzidos em meio com 1% e 5% de extrato de romã e germinados em meio controle (sem ER) foi diminuída em quatro dos isolados, *Penicillium citrinum*, *Cladosporium sublifforme*, *Aspergillus chevalieri* e *Cladosporium oxysporum*, na concentração de 1% ER, já no isolado *Penicillium panemum* não houve nenhum efeito.

Esses resultados indicam que o extrato etanólico de cascas de romã pode ser um potencial agente inibidor de isolados fúngicos deteriorantes de pães, pois diminuiu a viabilidade dos esporos. Assim sendo, estudos futuros são necessários para confirmar a eficácia deste extrato diretamente no alimento, bem como sobre outras espécies de fungos deteriorantes.

7 REFERÊNCIAS

- AHMAD, I.; BEG, A.Z. Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian medicinal plants against multi-drug resistant human pathogens. **Journal of Ethnopharmacology** 74, 113–133, 2001.
- ALMEIDA, L. P.; NAGHETINI, C. D. C.; NUNAN, E. D. A.; JUNQUEIRA, R. G., e GLÓRIA, M. B. A.. Atividade antimicrobiana in vitro do rizoma em pó, dos pigmentos curcuminóides dos óleos e dos essenciais da cúrcuma longa L. **Ciência e agrotecnologia**, Lavras, 2008.
- ARA, M. K.; RAOFIE, F. Application of response surface methodology for the optimization of supercritical fluid extraction of essential oil from pomegranate (*Punica granatum* L.) peel. **Journal of food science and technology**, v. 53, n. 7, p. 3113-3121, 2016.
- AVIRAM, M.; ROSENBLAT, M. **Pomegranate protection against cardiovascular diseases**. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1155/2012/382763>> Acesso em: 20 abr 2017.
- AL-ZOREKY, N. S. Antimicrobial activity of pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit peels. **International journal of food microbiology**, v. 134, n. 3, p. 244-248, 2009.
- BENTO, L. F.; CANEPPELE, M. A. B.; ALBUQUERQUE, M.C.F.; KOBAYASTI, L.; CANEPPELE, C.; ANDRADE, P.J. Ocorrência de fungos e aflatoxinas em grãos de milho. **Revista do Instituto Adolfo Lutz (Impresso)**, v. 71, n. 1, p. 44-49, 2012.
- BOSSOLAN, N. S. **Introdução a Microbiologia**. USP, São Carlos, 2002.
- BRAGA, L. C.; SHUPP, J. W.; CUMMINGS, C.; JETT, M.; TAKAHASHI, J. A.; CARMO, L. S.; CHARTONE-SOUZA, E. ; NASCIMENTO, A. M. A. Pomegranate extract inhibits *Staphylococcus aureus* growth and subsequent enterotoxin production. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 96, n. 1, p. 335-339, 2005.
- ÇAM M.; İÇYER, N. C. e ERDO AN, F. Pomegranate peel phenolics: microencapsulation, storage stability and potential ingredient for functional food development. **LWT-Food Science and Technology**, v. 55, n. 1, p. 117-123, 2014.
- CAPOCI, I. R. G.; MENDONÇA, P. D. S. B.; ARITA, G. S.; PEREIRA, R. R. D. A.; CONSOLARO, M. E. L.; BRUSCHI, M. L.; SVIDZINSKI, T. I. E. **Propolis is an efficient fungicide and inhibitor of biofilm production by vaginal *Candida albicans***. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2015. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/ecam/2015/287693/>>. Acesso em: 10 abr 2017.
- CASTRO, J. C.; ENDO, E. H.; SOUZA, M. R.; ZANQUETA, E. B.; POLONIO, J. C.; PAMPHILE, J. A.; NAKAMURA T. U.; NAKAMURA V. C.; FILHO, D. P.B.; FILHO, A. A. B. Bioactivity of essential oils in the control of *Alternaria alternata* in dragon fruit (*Hylocereus undatus* Haw.). **Industrial Crops and Products**, v. 97, p. 101-109, 2017.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast; approved standard- third edition**. CLSI document M27-A3, (ISBN 1-56238-666-2) Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2008.

CORBO, M.R.; BEVILACQUA, A.; CAMPANIELLO, D.; D' AMATO, D.; SPERANZA, B.; SINIGAGLIA, M. Prolonging microbial shelf life of foods through the use of natural compounds and non-thermal approaches—a review. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 44, n. 2, p. 223-241, 2009.

CORRÊA, B. Fungos toxigênicos em grãos e rações: biologia, ocorrência e controle. **SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE MICOTOXINAS E MICOTOXICOSES EM AVES**, p. 15-20, 1995.

COSTA, A. L. S. **Microbiologia de Alimentos e a Importância dos Microrganismos Úteis, Deteriorantes e Patogênicos**. Microbiologia e Higiene Alimentar. Universidade Anhembi, Morumbi, 2010.

COSTA, A. T.; BARA, M. T.; TRESVENZOL, L. M.; FIUZA, T. S.; PAULA, J. A.; MARTINS, P. M.; PAULA, J. R. **Ação do óleo essencial de *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & LM Perry sobre as hifas de alguns fungos fitopatogênicos**. Rev. bras. plantas med., p. 240-245, 2011. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S151605722011000200018&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 02 mai 2017.

COSTA, C.L. de; ARROTÉIA, C.G.; KEMMELMEIER, C. **Efeitos do óleo de Nim [*Azadirachta indica* A. Juss (Meliaceae)] sobre crescimento, esporulação, viabilidade de esporos, morfologia e produção de aflatoxinas B1 e B2 em *Aspergillus flavus***. Maringá, 2009.

COWEN, L. E.; STEINBACH, W. J. Stress, drugs, and evolution: the role of cellular signaling in fungal drug resistance. **Eukaryotic cell**, v. 7, n. 5, p. 747-764, 2008.

DAGNAS, S.; GOUGOULI, M.; ONNO, B.; KOUTSOUMANIS, P. K.; MEMBRÉ, J.M. Quantifying the effect of water activity and storage temperature on single spore lag times of three moulds isolated from spoiled bakery products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 240, p. 75-84, 2017.

DAGNAS, S.; MEMBRÉ, J.M. Predicting and preventing mold spoilage of food products. **Journal of food protection**, v. 76, n. 3, p. 538-551, 2013.

DALBEN-DOTA, K. F., FARIA, M. G., BRUSCHI, M. L., PELLOSO, S. M., LOPES-CONSOLARO, M. E., e SVIDZINSKI, T. I. Antifungal activity of propolis extract against yeasts isolated from vaginal exudates. **The Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v. 16, n. 3, p. 285-290, 2010.

ELSHARBINY A. E.; AMIN, H. B.; BAKA, A. Z. Efficiency of pomegranate (*Punica granatum* L.) peels extract as a high potential natural tool towards *Fusarium* dry rot on potato tubers. **Postharvest Biology and Technology**, v. 111, p. 256-263, 2016.

EVANGELISTA, J. **Tecnologia de alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2008.

FERREIRA, F. D.; KEMMELMEIER, C. ; ARROTÉIA, C. C. ; DA COSTA, C. L. ; MALLMANN, C. A. ; JANEIRO, V.; MACHINSKI, M. Inhibitory effect of the essential oil of *Curcuma longa* L. and curcumin on aflatoxin production by *Aspergillus flavus* Link. **Food Chemistry**, v. 136, n. 2, p. 789-793, 2013.

FIALHO, R. de O.; PAPA, M. de F. S.; PEREIRA, D. A. dos S. **Efeito fungitóxico de óleos essenciais sobre *Phakopsora euvtis*, agente causal da ferrugem da videira**. Arquivos do Instituto Biológico, v. 82, p. 01-07, 2015. Disponível em: <<http://189.126.110.61/arqib/article/view/29139>>. Acesso em: 11 maio 2017.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança dos alimentos**. Porto Alegre: Artmed, 2013.

FRANCO, B. D. G.; LANDGRAF. M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2002.

FREIRE, F. A deterioração fúngica de produtos de panificação no Brasil. **Comunicado Técnico/Embrapa Agroindústria Tropical**, 2011.

GARCIA, P.; RODRIGUEZ, L.; RODRIGUEZ, A. e MARTINEZ, B. Food biopreservation: promising strategies using bacteriocins, bacteriophages and endolysins. **Trends in Food Science & Technology**, v. 21, n. 8, p. 373-382, 2010.

GAUTAM, R. e SHARMA, S. C. Effect of *Punica granatum* Linn.(peel) on blood glucose level in normal and alloxan-induced diabetic rats. **Research Journal of Pharmacy and Technology**, v. 5, n. 2, p. 226-227, 2012.

GOMES, E. C. S. Extrato de *allamanda blanchetti* na indução de fitoalexinas em sorgo e resistência em videira 'superior seedless' contra *uncinula necator*. **Areia: Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Paraíba**, 2011.

GUTIÉRREZ, L.; SÁNCHEZ, C.; BATLLE, R. e NERÍN, C. New antimicrobial active package for bakery products. **Trends in Food Science & Technology**, v. 20, n. 2, p. 92-99, 2009.

HASNAOUI, N.; WATHELET, B. e JIMÉNEZ-ARAUJO, ANA. Valorization of pomegranate peel from 12 cultivars: Dietary fibre composition, antioxidant capacity and functional properties. **Food chemistry**, v. 160, p. 196-203, 2014.

HE, Y.B. Antimicrobial activity of *Momordica charantia*. **Food Science**, Campinas, v. 19, n. 3, p. 34-36, 1998.

HORNER, K.J.; ANAGNOSTOPOULOS, G.D. Combined effects of water activity, pH and temperature on the growth and spoilage potential of fungi. **Journal of Applied Microbiology**, v. 36, n. 3, p. 427-436, 1973.

IN'T VELD, J. H. H. Microbial and biochemical spoilage of foods: an overview. **International Journal of Food Microbiology**, v. 33, n. 1, p. 1-18, 1996.

ITAKO, A. T; SCHWAN-ESTRADA, K. R.; JÚNIOR, J. B. T.; STANGARLIN, J. R. e CRUZ, M. E. S. Atividade antifúngica e proteção do tomateiro por extratos de plantas medicinais. **Tropical Plant Pathology**, v. 33, n. 3, p. 241-244, 2008.

JARDINI, F. A. e FILHO, J. M. Avaliação da atividade antioxidante em diferentes extratos da polpa e sementes da romã (*Punica granatum*, L.). **Rev Bras Ciênc Farm**, v. 43, n. 1, 2007.

JURENKA, J. Therapeutic applications of pomegranate (*Punica granatum* L.): a review. **Alternative medicine review**, v. 13, n. 2, p. 128, 2008.

LANSKY, E. P., e NEWMAN, R. A. *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. **Journal of ethnopharmacology**, v. 109, n. 2, p. 177-206, 2007.

LI, Y.; GUO, C.; YANG, J.; WEI, J.; XU, J. e CHENG, S. Evaluation of antioxidant properties of pomegranate peel extract in comparison with pomegranate pulp extract. **Food chemistry**, v. 96, n. 2, p. 254-260, 2006.

MACHADO, T. B.; PINTO, A. V.; PINTO, M. C. F. R.; LEAL, I. C. R.; SILVA, M. G.; AMARAL, A. C. F.; e SANTOS, K. R. N. In vitro activity of Brazilian medicinal plants, naturally occurring naphthoquinones and their analogues, against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **International journal of antimicrobial agents**, v. 21, n. 3, p. 279-284, 2003.

MALKKI, Y.; e RAVHA, O. Mold inhibition by aerosols. **Bakers Digest**, v. 52, n. 1, p. 47-50, 1978.

MENEZES, S. M. S.; PINTO, D. M.; CORDEIRO, L. N. Atividades biológicas in vitro e in vivo de *Punica granatum* L.(romã). **Revista Brasileira de medicina. São Paulo**, v. 65, n. 11, p. 388-391, 2008.

MARQUES, R. P.; MONTEIRO, A. C.; PEREIRA, G. T. Crescimento, esporulação e viabilidade de fungos entomopatogênicos em meios contendo diferentes concentrações do óleo de Nim (*Azadirachta indica*). **Ciência Rural**, v. 34, n. 6, p. 1675-1680, 2004.

MARTINS, E. **Plantas medicinais**. Viçosa: UFV, p. 162-163, 1995.

MARTINS, M. T. C. S.; NASCIMENTO, L. C.; ARAÚJO, E. R.; RÊGO, E. R.; BRUNO, R. D. L. A.; e FÉLIX, L. P. Atividade antifúngica de extrato de melão-de-são-caetano em sementes de maniçoba. **Horticultura Brasileira**, v. 27, n. 3, p. S1246-1253, 2009.
Disponível em:
<http://www.abhorticultura.com.br/eventosx/trabalhos/ev_3/A1953_T3415_Comp.pdf>
> acesso em: 30 abr 2017.

MELLO, C.P.; SANTOS, S.C. **Taninos**. In: **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Organizado por Cláudia Maria Oliveira Simões et al. 4 ed. Porto Alegre /Florianópolis: Editora Universitária / UFRGS/Ed. da UFSC. pp. 950,2002.

MELO, M. S. F.; ROCHA, C. Q.; SANTOS, M. H.; CHAVASCO, J. M.; CHAVASCO, J. K. Pesquisa de bioativos com atividade antimicrobiana nos extratos hidroetanólicos do fruto, folha e casca de caule do *Zizyphus joazeiro* Mart. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v.10, n.2, p.43-51, 2012.

MEIRELES, F.; SREBERNICH, S.M. **Barra de cereal diet – controle microbiológico das melhores formulações obtidas através da metodologia de superfície de resposta.** Campinas: In XIII Encontro de Iniciação Científica da PUC, 2008.

MOINO JUNIOR, A.; ALVES, S. B. Efeito de imidacloprid e fipronil sobre *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. e no comportamento de limpeza de *Heterotermes tenuis* (Hagen). **Anais Sociedade Entomologia Brasileira, Londrina**, v. 27, n. 4, p. 611-619, 1998.

NAJAFZADEH, H.; AGHEL, N.; HEMMATI, A. A.; e OULAPOUR, S. Effect of hydro alcoholic extract of peel of *Punica granatum* on experimental diabetes mellitus by streptozotocin in rats. **Pharm. Sci**, v. 16, p. 239-248, 2011.

NASEER, R.; SULTANA, B.; KHAN, M. Z.; NASEER, D.; e NIGAM, P. Utilization of waste fruit-peels to inhibit aflatoxins synthesis by *Aspergillus flavus*: a biotreatment of rice for safer storage. **Bioresource technology**, v. 172, p. 423-428, 2014. Disponível em: <http://ac-els-cdn-com.ez48.periodicos.capes.gov.br/S0960852414012681/1-s2.0-S0960852414012681-main.pdf?_tid=1b22b462-4ed8-11e7-8ac200000aacb362&acdnat=1497207753_c0bb82d956f9f8fa0e8e3e851b6301a9> Acesso em: 15 abr 2017.

NASR B. C., AYED N, METCHE M: Quantitative determination of the polyphenolic content of pomegranate peel. **Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und-Forschung A**, v. 203, n. 4, p. 374-378, 1996.

NEGI, P. S.; JAYAPRAKASHA, G. K. Antioxidant and antibacterial activities of *Punica granatum* peel extracts. **Journal of food science**, v. 68, n. 4, p. 1473-1477, 2003.

NEGI, P.S. Plant extracts for the control of bacterial growth: Efficacy, stability and safety issues for food application. **International Journal of Food Microbiology**, v. 156, n. 1, p. 7-17, 2012.

NICOSIA, D.L.G.M.; PANGALLOA, S.; RAPHAEL B.; FLORA V.; ROMEO, V. F.; STRANO, C. M.; RAPISARDA, P.; DROBY, S.; SCHENA, L. Control of postharvest fungal rots on citrus fruit and sweet cherries using a pomegranate peel extract. **Postharvest Biology and Technology**, v. 114, p. 54-61, 2016.

NYCHAS, G.J.E.; SKANDAMIS, P.N.; TASSOU, C.C. Antimicrobials from herbs and spices. In: Roller, S. (Ed.), **Natural Antimicrobials for the Minimal Processing of Foods**. CRC Press, Washington DC, p. 177–199, 2003.

PANICHAYUPAKARANANT, P.; TEWTRAKUL, S.; YUENYONGSAWAD, S. Antibacterial, anti-inflammatory and anti-allergic activities of standardised pomegranate rind extract. **Food Chemistry**, v. 123, n. 2, p. 400-403, 2010.

- PELCZAR, M.; REID, R.; CHAN, E. C. S. **Microbiologia**. São Paulo: Mcgraw-hill 1996.
- PELUQUE, E. **Isolamento, identificação molecular e potencial toxigênico de fungos e ocorrência de micotoxina em misturas de cereais comercializados no Brasil**. Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos. Faculdade Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga: 2014.
- PRADO, G.; MATTOS, S. V. M.; PEREIRA, E. C. Efeito da umidade relativa na contaminação microbiana e produção de aflatoxinas em amendoim em grão. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 11, n. 2, p. 264-273, 1991.
- PRASHANTH, D.; ASHA, M. K.; AMIT, A. Antibacterial activity of Punica granatum. **Fitoterapia**, v. 72, n. 2, p. 171-173, 2001.
- RHODEN, S. A.; GARCIA, A.; RUBIN FILHO, C. J.; AZEVEDO, J. L.; e PAMPHILE, J. A. Phylogenetic diversity of endophytic leaf fungus isolates from the medicinal tree *Trichilia elegans* (Meliaceae). **Genet Mol Res**, v. 11, n. 3, p. 2513-2522, 2012.
- RODRIGUES, E.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; STANGARLIN, J.R.; CRUZ, M.E.S.; TUTIDA-FIORI, A.C.G. Avaliação da atividade antifúngica de extratos de gengibre e eucalipto in vitro e em fibras de bananeira infectadas com *Helminthosporium* sp. **Acta Science Agronomy, Maringá**, v. 28, n. 1, p. 123-127, 2006.
- ROSSETO, V. A. C.; SILVA, F. O.; ARAUJO, S. E. A Influência da calagem, da época de colheita e da secagem na incidência de fungos e aflatoxinas em grãos de amendoim armazenados. **Ciência Rural**, v. 35, n. 2, p. 309-315, 2005.
- SAMSON, R. A.; HOUBRAKEN, J.; THRANE, U.; FRISVAD, J. C.; ANDERSEN, B. **Food And Indoor Fungi**. Utrecht: CBS, 2010
- SILVEIRA, V.D. **Micologia**. 5.ed. Rio de Janeiro : Âmbito Cultural, p.332 1981.
- SHAN, B.; CAI, Y.Z.; BROOKS, J.; CORKE, H. The in vitro antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. **International Journal of food microbiology**, v. 117, n. 1, p. 112-119, 2007.
- SINGH, R. P.; CHIDAMBARA MURTHY, K. N.; JAYAPRAKASHA, G. K. Studies on the antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel and seed extracts using in vitro models. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 50, n. 1, p. 81-86, 2002.
- TORRES, L. D.; ORTINERO, C. V.; MONSERATE, J. J. Crop wastes as potential sources of natural medicine/cosmetic products, pesticides/insecticides, and paper products. **PCARRD Highlights 2001 (Philippines)**, 2002.
- WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S. J. W. T.; e TAYLOR, J. W. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. **PCR protocols: a guide to methods and applications**, v. 18, n. 1, p. 315-322, 1990.

