

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

DAYANI CARDOSO RIBEIRO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO EXTRATO DE CASCA DE
ROMÃ SOBRE FUNGOS DETERIORANTES DO PÃO**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

CAMPO MOURÃO

2017

DAYANI CARDOSO RIBEIRO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO EXTRATO DE CASCA 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.

CAMPO MOURÃO

2017



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



TERMO DE APROVAÇÃO

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO EXTRATO DE CASCA DE ROMÃ SOBRE FUNGOS DETERIORANTES DO PÃO

por

DAYANI CARDOSO RIBEIRO

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. Eliane Sloboda Rigobello
Membro da banca

Prof. Dr. Manuel Salvador Vicente Plata-Oviedo
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

Primeiramente a Deus, que possibilitou essa oportunidade e foi meu guia nas horas de dúvida.

À professora, orientadora Dra. Márcia Regina Ferreira Geraldo Perdoncini pela enorme contribuição, paciência e dedicação ao longo dessa orientação que não mediu esforços para o desenvolvimento deste trabalho, e por sempre estar disponível para ajudar.

A meus pais, Mathusalém Ribeiro e Lúcia Cardoso Ribeiro que não mediram esforços nesta minha longa caminhada, que iluminaram os caminhos obscuros com afeto e dedicação, muitas vezes renunciando seus sonhos para que o meu pudesse se tornar realidade. Não bastaria um muito obrigado.

Um muito obrigado a Livia Benossi pelo suporte no pouco tempo que lhe coube, pelas suas correções e incentivos.

Estendo meu agradecimento a colaboradora do laboratório Adriele Rodrigues Dos Santos pela prontidão e ensinamentos.

A amiga e companheira de análise Thais Ribeiro Moraes onde compartilhamos juntas as análises que deram e não deram certas, obrigada pela troca de aprendizado e os inúmeros momentos de amizade e companheirismo.

A grande amiga Dayse por ser sempre presente, a todos os professores que tive o prazer de conhecer.

E por fim a todos que porventura não mencionei, mas que transmitiram algo a mim durante esta longa caminhada.

RESUMO

RIBEIRO, C.D. **Avaliação da atividade antifúngica do extrato de casca de romã sobre fungos deteriorantes do pão.** Trabalho de Conclusão de Curso (Tecnologia de Alimentos) - Universidade Tecnológica Federal Do Paraná (UTFPR). Campo Mourão, 2017.

Punica granatum L. (Romã) é um arbusto lenhoso, ramificado, da família *Punicaceae*. A romã é rica em compostos fenólicos que exibem forte atividade antioxidante e antimicrobiana. Todos os produtos de panificação com elevada atividade de água podem ser colonizados por fungos. O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de inibição do crescimento de cinco espécies fúngicas isoladas de pães de forma na presença do extrato alcoólico de cascas de romã. Foram analisados o diâmetro micelial da colônia, o peso seco da colônia e a porcentagem de inibição fúngica do peso seco e do diâmetro do micélio de cinco espécies fúngicas, sendo elas *Penicillium panemun*, *Penicillium citrinum*, *Cladosporium oxysporum*, *Cladosporium sublifforme* e *Aspergillus chevalieri*. As análises foram realizadas em duplicata e todas as concentrações testadas do extrato de *Punica granatum* L. apresentaram inibição fúngica. A análise da concentração Inibitória Mínima apresentou uma capacidade de inibição do crescimento fúngico, com valores significativos para *Penicillium paneum*, *Penicillium citrinum* e *Aspergillus chevalieri*.

Palavras-chave: Extrato de romã, fungos, inibição fúngica, concentração inibitória mínima.

ABSTRACT

RIBEIRO, C.D. **Evaluation of the antifungal activity of the pomegranate peel extract on deteriorating fungi of the bread.** Completion work (Food Technology) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). Campo Mourão, 2017.

Punica granatum L. (Pomegranate) is a woody, branched shrub of the Punicacea. Pomegranate is rich in phenolic compounds that exhibit strong antioxidant and antimicrobial activity. All baking products with high water activity can be colonized by fungi. The objective of this work was to evaluate the potential of inhibition of growth of five fungal species isolated from breads of form in the presence of the alcoholic extract of pomegranate peels. The mycelial diameter of the colony, the dry weight of the colony and the percentage of fungal inhibition of the dry weight and mycelial diameter of five fungal species were analyzed, being *Penicillium panemun*, *Penicillium citrinum*, *Cladosporium oxysporum*, *Cladosporium sublifforme* and *Aspergillus chevalieri*. The analyzes were performed in duplicate and all tested concentrations of the extract from *Punica Granatum L.* showed fungal inhibition. The Minimum Inhibitory Concentration showed a capacity for inhibition of fungal growth, with significant values for *Penicillium paneum*, *Penicillium citrinum* and *Aspergillus chevalieri*.

Key words: Pomegranate extract, fungi, fungal inhibition, minimal inhibitory concentration.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Tabela 1- Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração mínima fungicida (CMF) do extrato de romã sobre fungos.	20
Tabela 2- Diâmetro e porcentagem de inibição micelial em diferentes concentrações de ER.	21
Gráfico 1- Comparação gráfica do diâmetro do micélio dos isolados no meio controle e teste.....	22
Gráfico 2- Comparação gráfica do peso seco dos isolados no meio controle e teste.	23

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
2 OBJETIVOS.....	10
2.1 OBJETIVO GERAL	10
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	10
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
3.1 ROMÃ (<i>Punica granatum</i> L.)	11
3.2 FUNGOS FILAMENTOSOS	12
4 MATERIAL E MÉTODOS	15
4.1 LOCAIS DE REALIZAÇÃO DO TRABALHO	15
4.2 MATERIAL VEGETAL E PREPARO DO EXTRATO DE ROMÃ (ER).....	15
4.3 MICRO - ORGANISMOS.....	16
4.3.1 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DOS FUNGOS BASEADO NO SEQUENCIAMENTO DA REGIÃO ITS1-5.8S-ITS2	16
4.4 MATERIAIS E PREPARO DO MEIO DE CULTURA.....	17
4.7 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM).....	18
4.7.1 PREPARO DA SUSPENSÃO DO EXTRATO DE ROMÃ (ER) PARA O TESTE DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA	18
4.8 VERIFICAÇÃO DO CRESCIMENTO MICELIAL E DO PESO SECO	19
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
6 CONCLUSÃO	24
7 REFERÊNCIAS	25

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 destes. 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; NAGHETINI ; NUNAN et al, 2008).

Segundo a ANVISA (1997), o emprego de aditivos justifica-se por razões tecnológicas, nutricionais ou sensoriais. A necessidade tecnológica do uso de um aditivo deve ser justificada sempre que proporcionar vantagens de ordem tecnológica e não quando estas possam ser alcançadas por operações de fabricação mais adequadas ou por maiores precauções de ordem higiênica ou operacional. O uso dos aditivos deve ser limitado a alimentos específicos, em condições específicas e ao menor nível para alcançar o efeito desejado em concentrações tais que sua ingestão diária não supere os valores de ingestão diária aceitável (IDA) recomendados. O processo de fabricação de alimentos deve seguir as Boas Práticas de Fabricação (BPFs) que são um conjunto de regras, normas e atitudes aplicadas ao manuseio de alimentos, para assegurar condições necessárias para atendimento do que diz a legislação em vigor. Um aditivo é considerado BPF quando possuir uma IDA “não especificada”, o que significa que o uso está em quantidade suficiente para obter o efeito tecnológico necessário.

Os fungos são conhecidos popularmente como mofos e bolores. Com seu aspecto algodoento, por vezes pigmentados, considerando-se tais alimentos não próprios para consumo. No entanto, embora grande parte dos bolores intervenha na contaminação de muitos alimentos, algumas espécies são úteis na transformação benéfica de alguns alimentos ou de seus componentes (FREITAS, 2000).

Todos os produtos de panificação com elevada atividade de água podem ser colonizados por fungos. Deste modo, pães, bolos e panetones estão amplamente expostos a contaminações. As informações acerca das perdas provocadas por fungos em produtos de panificação no Brasil são praticamente inexistentes. Observações preliminares indicam, contudo, que são semelhantes às perdas já avaliadas em outros países. Em um dos primeiros estudos conduzidos na Alemanha e nos EUA, as perdas foram estimadas em pouco mais de 1%. Até o momento, os gêneros de fungos mais comumente encontrados têm sido: *Aspergillus*, *Chrysonilia*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Eurotium*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Rhizopus* e *Mucor*. Espécies de *Aspergillus*, *Cladosporium* e *Penicillium* ocorrem com maior frequência. (FREIRE, 2011).

Algumas plantas contêm múltiplos fitoquímicos potentes, os quais tem sido tradicionalmente utilizados como fungicidas naturais para controle de fungos fitopatogênicos. Neste propósito, plantas aromáticas, medicinais e especiarias tem sido estudadas como potencial fonte de agentes antimicrobianos (EFSTRATIOU et al., 2012; HUSSAIN et al., 2011). As plantas produzem metabólitos como compostos fenólicos, alcaloides, saponinas, glicosídeos, esteroides, terpenos e flavonoides os quais possuem múltiplos atributos biológicos, como capacidade antioxidante, antimicrobiana e pesticida e seus extratos com compostos bioativos podem ser aplicados no armazenamento e conservação de alimentos (NASEER et al, 2014).

Desta forma o objetivo deste trabalho foi analisar o potencial de inibição do crescimento de cinco espécies fúngicas isoladas de pães de forma na presença do extrato alcoólico de cascas de romã.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito do extrato de romã sobre a inibição do crescimento fúngico em fungos isolados de pães.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar a concentração inibitória mínima do extrato de casca de romã sobre os isolados fúngicos.
- Preparar o meio de cultivo com diferentes concentrações de extrato de casca de romã.
- Avaliar a atividade do extrato de casca de romã sobre o crescimento micelial dos fungos isolados, através do diâmetro da colônia.
- Avaliar a atividade do extrato de casca de romã sobre o peso seco dos fungos isolados.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 ROMÃ (*Punica granatum* L.)

A romãzeira, *Punica granatum* L. (*P. granatum*), é um arbusto lenhoso, ramificado, da família *Punicaceae*, nativa da região que abrange desde o Irã até o Himalaia, a noroeste da Índia. Tem sido cultivada há muito tempo por toda a região Mediterrânea da Ásia, América, África e Europa. Apresenta folhas pequenas, rijas, brilhantes e membranáceas, flores vermelho-alaranjada dispostas nas extremidades dos ramos, originando frutos esféricos, com muitas sementes em camadas as quais se acham envolvidas em arilo polposo (LORENZI ; SOUZA, 2001).

A romã (*Punica granatum* L.) é rica em compostos fenólicos que exibem forte atividade antioxidante in vitro (SAXENA et al, 2004). São popularmente consumidas nas formas *in natura*, sucos, alimentos como doces e geléias e extratos, os quais são utilizados como ingredientes botânicos na medicina natural e suplementos alimentares (MOHAGHEGHI et al; 2011). A romã é composta de três partes: cascas, sementes e suco.

A árvore cresce em regiões áridas e a produção do fruto se dá no período de setembro a fevereiro (MARTINS, 1995). O suco da romã apresenta em sua composição compostos fenólicos como: antocianinas (delfinidina, cianidina e pelargonidina), quercetina, ácidos fenólicos (caféico, catequínico, clorogênico, orto e paracumárico, elágico, gálico e quínico) e taninos (punicalagina) (ARTIK, MURAKAMI, MORI, 1998; NODA et al., 2002; POYRAZOGLU; GÖKMEN; ARTIK, 2002).

As cascas de romã são consideradas partes não comestíveis ou subproduto, obtido durante o processamento do suco. É caracterizado pela presença significativa de polifenóis como elagitaninos, ácido elágico e ácido gálico (NEGI et al, 2003; FARIA, 2010) e de flavonóides, os quais estão associados a propriedades biológicas, como agente antioxidante e antimicrobiano (DOYMAZ, 2011).

O seu cultivo é realizado em mais de 100 países do mundo. Dos países do Mediterrâneo, atravessou o Atlântico e chegou ao Brasil, onde encontrou condições favoráveis para um crescimento vegetativo, florescimento, frutificação e produção de

frutos de primeira qualidade. O seu maior interesse no mundo está no seu cultivo para o consumo como fruta fresca (MANICA, 2007).

Os maiores produtores mundiais de romã são Índia, China e Irã, países que consomem a maior parte de sua produção, seguidos da Turquia, Espanha, Tunísia e do Azerbaijão. Nas últimas décadas, surgiram novos mercados de produção e comercialização: Estados Unidos, Israel, África do Sul, Peru, Chile e Argentina (CAMBICI, 2011).

3.2 FUNGOS FILAMENTOSOS

Os fungos são importantes microrganismos com benefícios biotecnológicos, como a produção de antibióticos, enzimas, alimentos e bebidas. Também desempenham importantes funções de biodegradação de matéria orgânica (LI ; YANG, 2004).

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 mofo) 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).

Os fungos podem crescer em uma grande variedade de substratos e ampla faixa de pH, atividade da água (a_w) e temperatura. São capazes de crescer de maneira rápida e invasiva no tecido, além de desenvolverem mecanismos de detecção do ambiente, permitindo-lhes condições ambientais por acidificação e alcalinização, para melhor instalar seu arsenal ofensivo (PRUSKY ; YAKOBY, 2003). Fungos são capazes de crescimento invasivo rápido em tecido, enquanto as bactérias não são. Assim sendo, deterioração microbiana de frutas e produtos de frutas é sempre iniciada por fungos (PITT ; HOCKING, 2009).

A maior parte dos alimentos de origem vegetal ou animal se deteriora com facilidade, perdendo a qualidade com conseqüente diminuição na vida de prateleira.

Essa perda é dependente de vários fatores, dentre eles o tipo, a composição, formulação, embalagem e condição de estocagem do alimento (MELO; SOARES; GONÇALVES, 2005).

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

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 elevada atividade de água (SAMSON et al.,2010).

O 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; REID ; CHAN, 1996).

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 patogenias 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 ; SREBERNICH, 2008).

Penicillium citrinum apresentam colônias que crescem de forma restrita em ágar Czapeck Yeast (CYA) em 25°C, com diâmetro de 25-33 mm após 7 dias. Possuem conidióforos densos, aveludado ou às vezes coriáceo, as colônias são sulcadas com esporulação moderada a forte e conídios verdes ou cinzas a azuis. As

colônias em meio ágar extrato de malte (MEA) normalmente crescem mais rápido e são menos densas, embora a esporulação seja mais forte e as colônias são verdes ou cor cinzento a azul. O reverso da colônia possui coloração amarela (SAMSON et al.,2010).

Penicillium citrinum podem contaminar diferentes alimentos, ocorrendo especialmente em cereais tropicais, especiarias e amido de sagú. Podem estar presentes no ar de interiores sendo comum em regiões subtropicais temperadas e principalmente tropicais (SAMSON et al.,2010).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 LOCAIS DE REALIZAÇÃO DO TRABALHO

As análises foram realizadas no laboratório de Engenharia e Tecnologia de Alimentos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Campo Mourão-PR, Laboratório Nucleo de Produtos Naturais (NEPRON) Maringá, Laboratório de Biotecnologia Microbiana (LBIOMIC) Maringá e Complexo de Centrais de Apoio à Pesquisa (COMCAP) da Universidade Estadual de Maringá, Campus Sede, em Maringá-PR.

4.2 MATERIAL VEGETAL E PREPARO DO EXTRATO DE ROMÃ (ER)

O preparo do extrato foi gentilmente preparado e cedido pela aluna de doutorado Lívia Benossi.

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). Os frutos foram devidamente padronizadas quanto ao grau de maturação e sanidade e higienizados com hipoclorito de sódio a 20ppm. 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 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.

4.3 MICRO - ORGANISMOS

Foram utilizados cinco espécies de fungos isolados de pães deteriorados: *Penicillium panemun*, *Penicillium citrinum*, *Cladosporium oxysporum*, *Cladosporium sublifforme* e *Aspergillus chevalieri*. Os fungos 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 em Maringá para identificação molecular.

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

A identificação molecular dos fungos foram realizadas na Universidade Estadual de Maringá.

O DNA genômico dos fungos foram extraídos 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 200mg 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 sequências nucleotídeos foram então comparados com outras disponíveis no banco de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) utilizando a ferramenta nBLAST, com filtragem para “type strains”. As sequências 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.

4.4 MATERIAIS E PREPARO DO MEIO DE CULTURA

Os materiais utilizados foram câmara de fluxo laminar (marca Bio Seg), autoclave vertical (marca Phoenix), balança analítica (marca Bioprecisa FA2104N), estufa de cultura (marca Fanem LTDA), erlenmeyer, espátulas, placas de Petri descartáveis e demais instrumentais utilizados em técnicas microbiológicas.

Os meios de cultura ágar batata dextrose (BDA), agar sabouraud dextrose (ASD), ágar-água, ágar extrato de malte (MEA) e caldo batata dextrose (BD) foram preparados conforme instruções do fabricante, esterilizados em autoclave 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%.

O meio de cultura MEA possui a seguinte composição: 20g de extrato de malte, 1g de peptona, 20g de glicose e 20g de ágar. Para o seu preparo cada componente foi pesado e dissolvido em água, por aquecimento sob agitação. O meio foi esterilizado em autoclave a uma temperatura de 121° C por 20 minutos e vertidos em placas de Petri estéreis.

Para a realização do experimento foram preparados os meios controle (MEA sem adição de ER) e testes (com adição de 1% e 5 % de ER).

Os demais meios foram preparados conforme instruções do fabricante, esterilizados e armazenados sob refrigeração antes do uso.

4.7 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

4.7.1 PREPARO DA SUSPENSÃO DO EXTRATO DE ROMÃ (ER) PARA O TESTE DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA

Para a realização dos ensaios de concentração inibitória mínima, foi utilizada uma suspensão de ER, a qual foi preparada a 20% em uma solução estéril de Tween 80 (0,1%).

4.7.2 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA

A CIM foi determinada de acordo com o documento da CLSI, norma M38 A preconizada pela National Committee for Clinical Laboratory Standart (NCCLS, 2002), que traz o Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica dos Fungos Filamentosos, com adaptações para macrodiluição em caldo para fungos filamentosos. Para a realização do CIM foram utilizados 12 tubos testes contendo o meio RPMI.

Os fungos foram inoculados em BDA por 7 dias à 25°C para o crescimento e produção dos esporos. Após, Uma solução estéril de tween 80 a 0,1%, foi vertida sobre o micélio e feita a raspagem da colônia para liberação dos esporos, os quais foram contados em Câmara de Neubauer. O inóculo foi diluído para uma concentração final de 10^4 esporos/mL, o qual foi utilizado para a determinação da CIM. Esse procedimento foi realizado para cada um dos isolados.

Para a análise da CIM, foram utilizados 12 tubos por fungo, 10 como tubos testes contendo o meio RPMI e a suspensão de ER, e os demais como controle positivo (apenas o meio e o inóculo - tubo 11) e controle negativo (apenas o meio - tubo 12). Nesta bateria de tubos, foi adicionado 500 µL do meio RPMI nos tubos 2 ao 10 e 1000 µL no tubo controle negativo. Nos tubos 1 e 2 foi adicionado 500 µL do ER a 200 mg/mL. A partir do tubo 2 foi realizada uma diluição seriada do ER 1:2 até o tubo 10, transferindo-se 500 µL para cada tubo teste e ao final desprezando 500 µL do tubo 10. Adicionou-se 500µL da suspensão do fungo 10^4 esporos/mL nos tubos testes (tubos 1 ao 10) e controle positivo (tubo 11), reduzindo a concentração

do ER em cada tubo pela metade. Os tubos foram agitados levemente para homogeneização do conteúdo, e incubados em estufa a 35 °C por 48 h. Após este período foi verificado o crescimento através da turvação do meio e confirmação em microscópio estereoscópio. Foi considerada CIM, a menor concentração em que o ER impediu o crescimento do inóculo em teste. A concentração fungicida mínima (CFM) 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.

4.8 VERIFICAÇÃO DO CRESCIMENTO MICELIAL E DO PESO SECO

Cada isolado fúngico foi inoculado em MEA por 4 dias a 25°C. A partir destas colônias foram retirados plugs de 5 mm de diâmetro e inoculado em placas de Petri com os meios controle e testes e incubados a 25°C por 7 dias.

Para a determinação do crescimento micelial e peso seco utilizou-se a técnica descrita por Marques et al, (2004) com modificações.

Após os sete dias determinou-se o diâmetro das colônias através de medidas em milímetros, de cada colônia.

A porcentagem de inibição foi obtida através da fórmula de Albuquerque et al, (2006) modificada por Tian et al, (2011).

$$\frac{D_c - D_t}{D_c} \times 100 \quad \text{em que: } D_c = \text{diâmetro do controle e } D_t = \text{diâmetro do teste}$$

Para o peso seco, o cultivo foi liquefeito através de aquecimento do meio e o micélio retirado e transferido para papéis de filtro previamente pesados. Os papéis com o micélio foram levados à estufa a 70°C e após 72 horas foram pesados diariamente até atingirem peso constante. O peso seco foi determinado pela diferença entre o peso final e o peso do papel de filtro.

A porcentagem de inibição do peso foi obtida através da fórmula Albuquerque et al, (2006) modificada por Tian et al, (2011), adaptada para peso seco. Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores de CIM (concentração inibitória mínima) (ação fungistática) e CMF (ação fungicida) do extrato hidroalcoólico de cascas de romã estão apresentados na Tabela 1. O ER apresentou capacidade de inibição do crescimento fúngico, com valores significativos para *Penicillium panemum*, *Penicillium citrinum* e *Aspergillus chevalieri*. *Cladosporium oxysporum*, *Cladoporium sublifforme* não foram inibidos pelo extrato nas doses testadas.

A atividade antifúngica do óleo essencial de *C. winterianus* sobre fungos filamentosos das espécies *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Penicillium* e *Fusarium* foi investigada por Souza et al. (2005), sendo verificada a ação antifúngica apenas na concentração pura. Sobre bactérias Gram negativas e Gram positivas, o óleo essencial de *C. winterianus* apresentou CIM entre as concentrações de 20% e 5%.

Shukla et al., (2008) verificou a eficácia antifúngica no extrato aquoso de *Adenocalymma alliaceum* contra isolados de fungos que causam deterioração, foi observado que a CIM *Aspergillus flavus* foi de 15,0 mg/mL e 20,0 mg/mL e *Aspergillus niger* 17,5 mg/mL e 20,0 mg/mL.

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

Isolados	CIM(%)	CMF(%)
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 encontrados na verificação do diâmetro do micélio, peso seco, porcentagem de inibição micelial e porcentagem de inibição do peso seco dos fungos estão descritos na Tabela 2. Observa-se que todos os isolados inoculados em meio teste obtiveram diferença no tamanho do micélio quando comparados os isolados do meio controle.

Tabela 2- Diâmetro e porcentagem de inibição micelial em diferentes concentrações de ER.

F	CD*		C 1%				C 5%			
	(mm)	(g)	D	%D	P	%P	D	%D	P	%P
Pp	5,48 ^a	0,064 ^a	2 ^b	63,51	0,086 ^b	-	2,17 ^b	60,41	0,043 ^c	67,18
Pc	1,64 ^a	0,0551 ^a	1,7 ^a	-	0,003 ^b	94,55	0,82 ^b	50,0	0,002 ^b	96,37
Co	4,7 ^a	0,1863 ^a	2,9 ^{ac}	38,30	0,029 ^b	84,43	1,38 ^{bc}	70,64	0,062 ^c	66,73
Cs	3,9 ^a	0,1371 ^a	1,68 ^b	56,92	0,065 ^b	52,58	1,56 ^b	60,0	0,098 ^b	28,58
Ac	1,91 ^a	0,0233 ^a	1,1 ^b	42,41	0,016 ^{ac}	31,33	1,86 ^a	-	0,012 ^{bc}	48,5

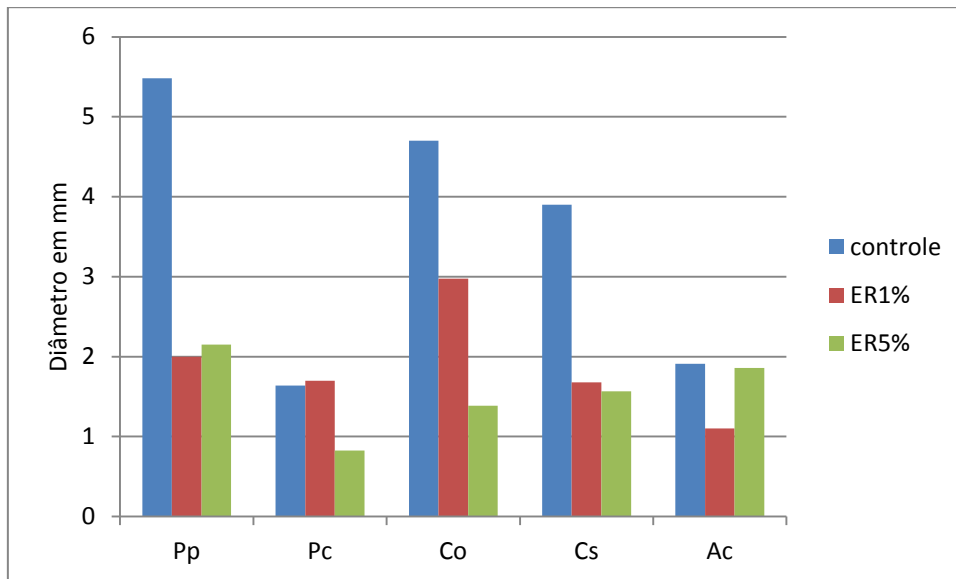
ER: Extrato de romã; F: Fungos; CD*: controle do diâmetro; CP*: controle do peso seco, D: média do diâmetro da colônia em mm após 7 dias de incubação em BDA controle e testes; %D: porcentagem de inibição micelial; (-): não houve porcentagem de inibição; P: peso seco em gramas da colônia em mm após 7 dias de incubação em MEA controle e testes; %P: porcentagem de inibição do peso seco; Meio de cultura controle sem a adição (*) ER a 1% e 5%; C: concentração. Pp: *Penicillium panemun*, Pc: *Penicillium citrinum*, Co: *Cladosporium oxysporum*, Cs: *Cladosporium sublifforme* e Ac: *Aspergillus chevalieri*. ^{a,b} Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa (p<5%) pelo teste t-Student.

Deste modo observa-se que o crescimento micelial diminui à medida que a concentração do extrato aumenta (Gráfico 1).

Frias; Kozusny, 2009 verificou que os extratos das onze espécies vegetais avaliadas somente os extratos de citronela, romã e eucalipto foram eficientes no controle de *T. mentagrophytes*.

Em um estudo realizado por Almeida et al., (1999) para explorar o efeito dos óleos voláteis de *Eucalyptus citriodora* e seu principal constituinte o citrionelol contra dois conhecidos patógenos *Rhizoctonia solani* e *Helminthosporium oryzae*, mostrou que o peso seco de ambos os fungos foram drasticamente reduzidos em resposta aos voláteis dos óleos, e uma completa inibição de *R. solani* e *H. oryzae* foi observada em 10 e 20 ppm, respectivamente, e o citrionelol sozinho foi mais eficaz do que os óleos de eucalipto.

Gráfico 1- Comparação gráfica do diâmetro do micélio dos isolados no meio controle e teste.



Pp: *Penicillium panemun*, Pc: *Penicillium citrinum*, Co: *Cladosporium oxysporum*, Cs: *Cladosporium sublinforme* e Ac: *Aspergillus chevalieri*.

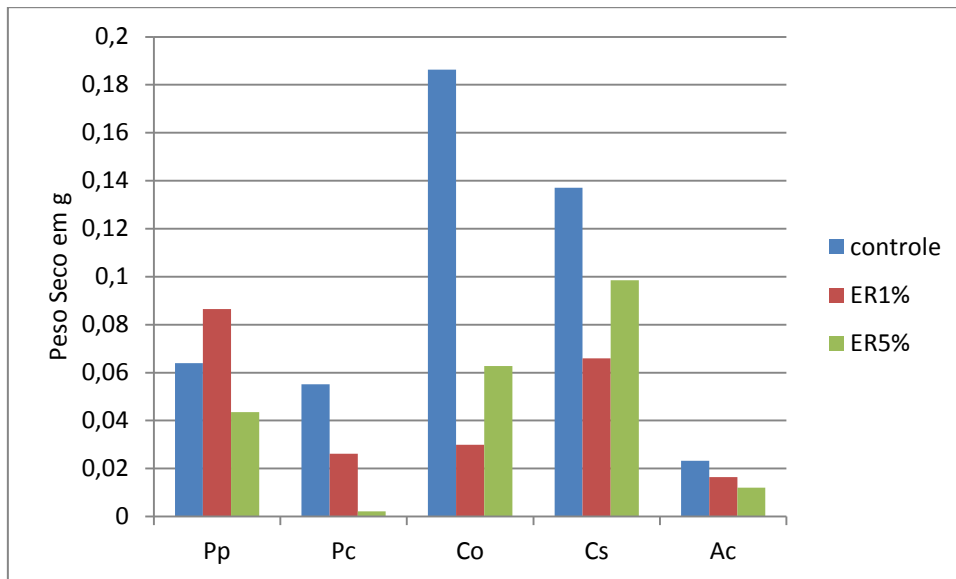
Catão et al. (2006), evidenciaram sensibilidade de todas as 17 cepas de *S. aureus* submetidas ao extrato etanólico de romã a 10%. Registraram que a eficácia diminuía à medida que se aumentava a diluição do extrato.

Recentemente observou-se que a punicalagina, um tanino elágico derivado do fruto da romanzeira, é provavelmente um dos principais constituintes antimicrobianos desta fruta (MACHADO et al., 2003).

Anesini ; Perez (1993), avaliando 132 extratos de plantas usadas na medicina popular na Argentina em atividades antimicrobianas, observaram que o pericarpo do fruto de *P. granatum* produziu extratos ativos que inibiram o crescimento de *Aspergillus niger*.

Vários estudos têm comprovado o efeito de compostos isolados extraídos de óleos essenciais de plantas que atuam como fungicidas naturais inibindo a atividade fúngica e, um número significativo destes constituintes tem se mostrado eficaz (CHAO ; YOUNG, 2000).

Gráfico 2- Comparação gráfica do peso seco dos isolados no meio controle e teste.



Pp: *Penicillium panemun*, Pc: *Penicillium citrinum*, Co: *Cladosporium oxysporum*, Cs: *Cladosporium sublifforme* e Ac: *Aspergillus chevalieri*.

Pela análise de peso seco (Tabela 1) nota-se que os fungos isolados no meio teste com a adição do ER dependendo da concentração testada, apresentaram diferença significativa em comparação aos isolados inoculados no meio controle, sem a adição do ER.

Através do Gráfico 2 é possível perceber que o isolado *Penicillium citrinum* foi o fungo que apresentou maior diminuição do peso seco, apresentando aproximadamente 94,55% de inibição fúngica.

Velluti et al., (2004) observaram redução do desenvolvimento micelial do fungo *Aspergillus niger* que foi obtida a partir da concentração de 1000 mg/ml, evidenciando o poder antimicrobiano do orégano.

Rosal et al., (2009) verificaram que o extrato aquoso de *Sálvia officinalis* pode ser usado como alternativa para o controle de *Penicillium sp.* causador do mofo azul em maçã pós-colheita, sendo que, este estudo apontou que a medida em que foi aumentada a concentração da solução aplicada, maior foi a eficácia sobre o controle do patógeno.

6 CONCLUSÃO

Conclui-se com este trabalho que, as concentrações 1% e 5% do extrato de *Punica granatum L.* mostraram inibição fúngica diminuindo significativamente o crescimento das espécies de *Penicillium panemum*, *Penicillium citrinum*, *Cladosporium oxysporum*, *Cladosporium sublifforme* e *Aspergillus chevalieri*. Em nenhuma das concentrações testadas houve inibição total do crescimento micelial e peso seco dos fungos testados. Estudos futuros podem ser realizados em diferentes meios e concentrações e diretamente nos alimentos, para verificar a capacidade de inibição do extrato sobre os fungos. Desta forma, torna-se promissor o uso da *Punica granatum L.* como um possível agente antifungico a ser aplicado aos alimentos.

7 REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, C. C. *et al.* **Antimicrobial action of the essential oil of lippia gracis schauer.** Brazilian archives and technology, 2006.

ALMEIDA, L. P. NAGHETINI, C. C.; NUNAN, E. 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.

ALMEIDA, F. A.C.; GOLDFARB, A.C.; GOUVEIA, J.P.G. **Avaliação de extratos vegetais.** Campina Grande: Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais, 1999.
ARAÚJO, C.A.C.; ALEGRIO, L.V.; CASTRO, D.; LIMA, M.E.F.; GOMES, L.; LEON, L.L. Studies on the effectiveness of diarylheptanoids derivatives against *Leishmania amazonensis*. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 1999.

ANESINI, C.; PEREZ, C. Screening of plants used in Argentine folk medicine for antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v.39, p.119-28, 1993.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária, **Portaria 540**. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/>>

ARTIK, N.; MURAKAMI, H.; MORI, T. Determination of phenolic compounds in pomegranate juice by using HPLC. **Fruit Process, Oberhonnefeld- Gierend**, v. 12, p. 492- 499, 1998.

CAMBICI (CÂMARA BRASIL-ISRAEL DE COMÉRCIO E INDÚSTRIA). **Anuário 2011: Agronegócio.** 2011. <Disponível em: <<http://www.cambici.org.br>>

CATÃO, R. M. R.; ANTUNES, R. M. P; ARRUDA, T. A.; PEREIRA, M. S.V; HIGINO, J. S.; ALVES, J. A.; PASSOS, M. G. V. M.; SANTOS, V. L. Atividade antimicrobiana “in vitro” do extrato etanólico de *Punica granatum* Linn. (romã) sobre isolados ambulatoriais de *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, Rio de Janeiro, v. 38, n. 2, p. 111-114, abr-jun. 2006.

CORRÊA, B. Fungos toxigênicos em grãos e rações: biologia, ocorrência e controle. In: **SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE MICOTOXINAS E MICOTOXICOSES EM AVES**, Campinas: FACTA, 1995.

CHAO, S. C.; YOUNG, D. G. Screening for inhibitory activity of essential oils ou selected bacteria, fungi and viruses. **Journal Essential Oil Research**, [S.l.], v. 12, p. 630-649, 2000.

Doymaz, I. **Experimental Study on Drying Characteristics of Pomegranate Peels.** **Food Sci. Biotechnol.** 2011, 20(4), 965-970.

EFSTRATIOU, E.; HUSSAIN, A. I.; NIGAM, P. S. et al. Antimicrobial activity of *Calendula officinalis* petal extracts against fungi, as well as Gram-negative and Gram-positive clinical pathogens. **Complementary Therapies in Clinical Practices**, v. 18, p. 173-176, 2012.

FARIA, A.; Calhau, C. **Pomegranate in human health: An overview. Bioactive Foods in Promoting Health: Fruits and Vegetables.** Watson RR, Preedy VR (eds). Academic Press, Amsterdam, Netherlands . 2010, 551-563.

FREIRE, O. C. F.; **A deterioração fúngica de produtos de panificação no Brasil.** Fortaleza, CE; 2011. Disponível em: < <http://ainfo.cnptia.embrapa.br>>

FREITAS, Costa Ana; FIGUEIREDO, Paulo. **Conservação de alimentos.** Lisboa 2000.

FRIAS, D.F.R.; Kozusny-Andreani, D.I. Avaliação *in vitro* da atividade antifúngica de extratos de plantas e óleo de eucalipto sobre *Trichophyton mentagrophytes*. **Rev. bras. plantas medicinais.** vol.11 n.º.2 Botucatu 2009.

HUSSAIN, S.S.; ALI, M.; AHMAD, M.; SIDDIQUE, K.H.M. **Polyamines: natural and engineered abiotic and biotic stress tolerance in plants.** Biotechnology Advances, v.29, p.300311, 2011. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2011.01.003.

LI D-W, YANG CS. **Fungal contamination as a major contributor to sick building syndrome.** In: Straus D, editor. Sick Building Syndrome. San Diego: Elsevier-Academic Press; 2004. pp. 31,112.

LORENZI, H.; SOUZA, H.M. **Plantas ornamentais no Brasil – arbustivas, herbáceas e trepadeiras.** 3.ed. Nova Odessa: Plantarum, 2001. 1088p

MACHADO, T.B. et al. 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.279-84, 2003.

MANICA, I. Romã. Porto Alegre: Cinco Continentes; 2007; 90p. (**Frutas Nativas e Exóticas 4**).

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, 2004.

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

MELO, N.R.; SOARES, N. F. S.; GONÇALVES, M. P. J.C. **Nisina: um conservante natural para alimentos**. Viçosa: Revista Ceres, 2005.

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.

MOHAGHEGHI, M.; REZAEI, K; LABBAFI, M.; Mousavi, S. M. E. Pomegranate seed oil as a functional ingredient in beverages. **European Journal of Lipid Science and Technology**, 2011, 113, 730–736.

NASEER, R.; Bushra Sultana, M.Z. Khan, D. Poonam Nigam. 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.

NCCLS. **Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica dos Fungos Filamentosos**: Norma Aprovada. M38-A, Vol. 22, No. 16. 2002.

NEGI, S. P.; JAYAPRAKASHA, K. G.; JENA, S. B. **Antioxidant and antimutagenic activities of pomegranate peel extracts**. Food Chemistry, 2003, 80,393–397.

NODA, Y.; KANEYUKI, T.; MORI, A.; PACKER, L. **Antioxidant activities of pomegranate fruit extract and its anthocyanidins: delphinidin, cyaniding and pelargonidin**. **J. Agric. Food Chem.**, Washington, v.50, n.1, p. 166-171, 2002.

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.

PELCZAR, M.; REID, R.; CHAN, E. C. S. **Microbiologia**. São Paulo: Mcgraw-hill 1996.

PITT, J I, HOCKING A, D. **Fungi and Food Spoilage**. 3 ed. Springer. Dordrecht. 2009.

POYRAZOGLU, E.; GÖKMEN, V.; ARTIK, N. **Organic acids and phenolic compounds in pomegranates (*Punica granatum*, L.) grown in Turkey.** J. Food Comp. Anal., Kidlington, v. 15, n.5, p. 567- 575, 2002.

PRUSKY, D. & YAKOBY, N. **Pathogenic fungi: leading or led by ambient pH.** Mol Plant Pathol 4: 509–516. 2003.

ROSAL,L.F.; LEITE,C.D. Eficiência do uso de extrato aquoso de Sálvia em diferentes concentrações sobre o crescimento micelial de *Penicillium sp.* **Rev.Bras. De Agroecologia**,v.4,p.1666-1669,2009.

RHODEN, S. A.; Garcia, A.; Rubin Filho, C. J.; Azevedo, J. L.; & 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.

SAXENA, A.; VIKRAM, N. K. Role of selected Indian plants in management of type 2 diabetes: A review. **Journal of Alternative and Complementary Medicine**, 2004,10, 369–378.

SAMSON, R. A.; HOUBRAKEN, J.; THRANE, U.; FRISVAD, J. C.; ANDERSEN, B. **Food And Indoor Fungi.** Utrecht: CBS, 2010.

SOUZA, EL.; Lima EO, Freire KRL, Sousa CP. **Inhibitory Action of Some Essential Oils and Phytochemicals on the Growth of Various Moulds Isolated From Foods.** Braz Arch Biol Technol. 2005; 48(2):245-50.

SHUKLA, R.; KUMAR A.; PRASAD C.S.; SRIVASTAVA B.; DUBEY N.K. **Antimycotic and antiaflatoxigenic potency of *Adenocalym mailliaceum* Miers. on fungi causing biodeterioration of food commodities and raw herbal drugs.** New York: International Biodeterioration & Biodegradation, 2008.

TIAN, J. *et al.* **In vitro and in vivo activity of essential oil from dill (*anethum geaneolensi*) against fungal spoilage of cherry tomatoes.** Food microbiology, 2011.

VELLUTI, A.; MARIN, S.; GONZALEZ, P.; RAMOS, A. J.; SANCHIS, V. Initial screening for inhibitory activity of essential oils on growth of *Fusarium verticillioides*,

F. proliferatum and *F. graminearum* on maize-based agar media. **Food Microbiology, Lleida**, v. 21, p. 649-656, Aug. 2004.