

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE

CENTRO DE EDUCAÇÃO E SAÚDE

UNIDADE ACADÊMICA DE SAÚDE

CURSO DE BACHARELADO EM NUTRIÇÃO

ALDEIR SABINO DOS SANTOS

**ANÁLISE DOS EFEITOS INIBITÓRIOS DE GERANIOL
SOBRE O CRESCIMENTO DE FUNGOS CONTAMINANTES
DO GÊNERO *Cladosporium* spp.**

CUITÉ/PB

2016

ALDEIR SABINO DOS SANTOS

**ANÁLISE DOS EFEITOS INIBITÓRIOS DE GERANIOL SOBRE O
CRESCIMENTO DE FUNGOS CONTAMINANTES DO GÊNERO *Cladosporium* spp.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado a Unidade Acadêmica de Saúde da Universidade Federal de Campina Grande, como requisito obrigatório para obtenção de título de Bacharel em Nutrição, com linha específica em micologia aplicada a alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Fillipe de Oliveira Pereira.

Cuité/PB

2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA NA FONTE
Responsabilidade Msc. Jesiel Ferreira Gomes – CRB 15 – 256

S237a

Santos, Aldeir Sabino dos.

Análise dos efeitos inibitórios de geraniol sobre o crescimento de fungos contaminantes do gênero *Cladosporium spp.* / Aldeir Sabino dos Santos. – Cuité: CES, 2016.

43 fl.

Monografia (Curso de Graduação em Nutrição) – Centro de Educação e Saúde / UFCG, 2016.

Orientador: Fillipe de Oliveira Pereira.

1. Contaminantes de alimentos. 2. *Cladosporium spp.* 3. Antifúngicos. I. Título.

Biblioteca do CES

CDU 582.28

ALDEIR SABINO DOS SANTOS

**ANÁLISE DOS EFEITOS INIBITÓRIOS DE GERANIOL SOBRE O
CRESCIMENTO DE FUNGOS CONTAMINANTES DO GÊNERO**
Cladosporium spp

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado a
Unidade Acadêmica de Saúde da Universidade Federal
de Campina Grande, como requisito obrigatório para
obtenção de título de Bacharel em Nutrição, com linha
específica em micologia aplicada a alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Fillipe de Oliveira Pereira.

Aprovado em ____ de _____ de _____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Fillipe de Oliveira Pereira Universidade Federal de Campina Grande
Orientador

Profa. Dra. Maria Elieidy Gomes de Oliveira Universidade Federal de Campina Grande
Examinadora

Profa. Ms. Heloísa Maria Ângelo Jerônimo Universidade Federal de Campina Grande
Examinadora

Cuité/PB

2015

**À minha família e amigos,
Dedico.**

AGRADECIMENTOS

A Deus, antes de tudo, por me conceder a oportunidade de viver e conhecer tantas pessoas que se tornaram tão importantes para mim. À minha mãe, Maria Lúcia Salustino dos Santos, essa mulher guerreira que nunca me deixa desistir, que sempre me dar o apoio necessário para seguir em frente, e que mesmo em meio as dificuldades, sempre me ensina como proceder com seu exemplo, não apenas com palavras. Agradeço também, de forma saudosa, a minha querida avó Rita Salustino dos Santos, minha querida “Rita Bujari”, que infelizmente não verá a primeira pessoa de sua família concluir um curso superior, mas que entrou junto comigo nessa caminhada, e me fez entender desde cedo, que não se conquista nada sem muito esforço, e provou isso através de suas mãos calejadas e seus traços fortes, marcados do sol que enfrentou dia após dia, para construir essa família. Ao meu pai, Antônio Sabino de Oliveira Neto, que mesmo na distância torce por mim e comemora com grande alegria todas as minhas conquistas.

Aos meus irmãos, José Marcos dos Santos Macêdo e Liliane Sabino dos Santos, por todo apoio e torcida e companheirismo nesta caminhada. Desta forma, também, agradeço a toda minha família, tios, primos e primas, por toda torcida e por estar junto comigo nesse momento tão especial.

Ao meu professor orientador, Dr. Fillipe de Oliveira Pereira, por toda a confiança depositada em mim, e por ter enxergado em mim algum potencial. Com certeza mais que um professor orientador você é um grande amigo e como resultado dessa parceria, além de um TCC, tenho algo mais precioso, que é essa amizade que vem sendo construída desde meus primeiros meses de faculdade. Com isso, quero agradecer por toda orientação pessoal e profissional, por todos os conselhos, pelo companheirismo, por toda paciência e ajuda, muito obrigado.

À Maria Elieidy Gomes de Oliveira e Heloísa Maria Ângelo Jerônimo, por terem aceitado de bom grado participar da banca. Agradeço também a todos os meus colegas de laboratório, especialmente meu conterrâneo Gezaildo Santos Silva, por todo companheirismo nesta empreitada, bem como aos meus colegas de turma, de projeto e de monitoria, como Anne Kelly, minha parceira nas disciplinas. Por fim, agradeço a Universidade Federal de Campina Grande – Campus Cuité, por todo apoio, e ao CNPq pelo financiamento do trabalho.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Micélio aéreo de <i>Cladosporium cladosporioides</i>	15
Figura 2 – Microscopia óptica de hifas e conídios de <i>Cladosporium cladosporioides</i>	16
Figura 3 – Estrutura química do geraniol.....	20
Figura 4 – Percentual de massa micelial seca de <i>Cladosporium</i> spp. na ausência (controle) e na presença de geraniol 1/2CIM (256 µg/mL), CIM (512 µg/mL) e 2xCIM (1024 µg/mL).....	30
Figura 5 – Número de conídios/mL de <i>Cladosporium</i> spp. na ausência (controle) e na presença de geraniol 1/2CIM (256 µg/mL), CIM (512 µg/mL) e 2xCIM (1024 µg/mL).....	32
Figura 6 – Percentual de conídios germinados de <i>Cladosporium</i> spp. na ausência (controle) e na presença de geraniol 1/2CIM (256 µg/mL), CIM (512 µg/mL) e 2xCIM (1024 µg/mL).....	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) sobre as cepas de <i>Cladosporium</i> spp.....	31
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AB	Ágar Batata Dextrose
ASD	Ágar Sabouraud Dextrose
CSD	Caldo Sabouraud Dextrose
CFM	Concentração Fungicida Mínima
CIM	Concentração Inibitória Mínima
DMSO	Dimetilsulfóxido
D.P.	Desvio Padrão
HMG-CoA	3-Hidróxi-3-Metilglutaril-CoA
IPP	Isopentenil-Pirofosfato
NaCl	Cloreto de Sódio
CES	Centro de Educação e Saúde
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
UAS	Unidade Acadêmica de Saúde
UFMG	Universidade Federal de Campina Grande
°C	Grau Célsius
mL	Mililitro
µL	Microlitros
µg/mL	Micrograma por Mililitro
Mm	Micrômetro
%	Percentual
DNA	Ácido desoxirribonucleico

SANTOS, A. S. **Análise dos efeitos inibitórios de geraniol sobre o crescimento de fungos contaminantes do gênero *Cladosporium* spp.** 2016. 43 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Nutrição) - Universidade Federal de Campina Grande, Cuité, 2016.

RESUMO

Cladosporium spp. são fungos filamentosos negros ou dematiáceos. São contaminantes importantes de alimentos, ocasionando perdas de produtos na indústria de alimentos e problemas de saúde. Com isso, vários estudos buscam formas de controle do crescimento de tais organismos, e com isso, estudos acerca da ação de produtos naturais com atividade antifúngica vêm se destacando cada vez mais, dada as fragilidades da utilização de produtos sintéticos. Dentre os produtos naturais, o uso de terpenos ganha destaque, pois são compostos largamente distribuídos na natureza e dotados de potencial atividade antifúngica. Por isso, no presente estudo investigou-se o possível potencial antifúngico de geraniol frente às cepas de *C. carrioni* LM 227 e URM 5109, *C. oxysporum* URM 5234 e URM 5412, *C. cladosporioides* URM 5737 e URM 6246. Para isto, foram determinadas a concentração inibitória mínima (CIM) e fungicida mínima (CFM) do geraniol, por microdiluição em RPMI 1640. Após isto, foram analisados os efeitos de diferentes concentrações do geraniol (1/2CIM, CIM e 2xCIM) sobre o crescimento micelial, produção e germinação de conídios. Os resultados de CIM obtidos foram de 256 µg/mL para a cepa de *C. carrioni* URM 5109 e de 512 µg/mL para as demais cepas. Os resultados da CFM se mostraram iguais ou maiores que a CIM em todas as cepas ensaiadas. Nos experimentos realizados para a avaliação das interferências do geraniol no crescimento micelial, na produção e germinação de conídios fúngicos, foi possível observar que o geraniol inibiu de forma significativa ($p < 0,05$) a produção de massa micelial seca e a conidiogênese das cepas *C. cladosporioides* URM 5737, *C. carrioni* LM 227 e *C. oxysporum* URM 5234, nas concentrações de CIM e 2xCIM. Todas as cepas testadas tiveram a germinação de conídios inibida significativamente ($p < 0,05$) nas concentrações testadas (1/2CIM, CIM e 2xCIM). Com isso, o monoterpene geraniol apresentou ação antifúngica satisfatória frente as cepas de *Cladosporium* spp., logo, se destaca como uma promissora alternativa natural na aplicação em alimentos nas indústrias.

Palavras-chave: Contaminantes de alimentos. *Cladosporium* spp.. antifúngicos. terpenos. geraniol.

SANTOS, A. S. **Analysis of the inhibitory effects of geraniol on the growth of contaminating fungi of the genre *Cladosporium* spp.** 2016. 43 f. Work of Conclusion of Course (Graduation in Nutrition) - Federal University of Campina Grande, Cuité, 2016.

ABSTRACT

Cladosporium spp. filamentous fungi are black or dematiaceous. They are important food contaminants, causing product loss in the food industry and health problems. Thus, several studies look for ways to control the growth of such organisms, and thus, studies on the action of natural products with antifungal activity has been increasing more and more, given the weaknesses of the use of synthetics. Among the natural products, the use of terpenes is highlighted, as they are widely distributed compounds in nature and endowed with potential antifungal activity. Therefore, this study investigated the possible potential antifungal geraniol a monoterpene alcohol type, compared to strains of *C. carrioni* LM 227 and URM 5109, *C. oxysporum* URM 5234 and URM 5412, *C. cladosporioides* URM 5737 and URM 6246. To this, it was determined the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum fungicidal (MFC) of geraniol by microdilution in RPMI 1640. After this, the effects of different concentrations of geraniol were analyzed (1/2MIC and 2xMIC) of the mycelial growth, production and conidial germination. The MIC results obtained were 256µg/ml for the strain of *C. carrioni* URM 5109 and 512 µg/ml for the others strains. The results are shown MFC equal to or greater than the MIC in all strains esaiadas. In the experiments for the evaluation of geraniol interference in mycelial growth, production and germination of fungal conidia, it was observed that geraniol inhibited significantly ($p < 0.05$) dry mycelial mass production and spore production of the strains *C. cladosporioides* URM 5737, *C. carrioni* LM 227 and *C. oxysporum* URM 5234, the concentrations of MIC and 2xMIC. All tested strains had conidia germination significantly inhibited ($p < 0.05$) at different concentrations (1/2MIC, MIC and 2xMIC). Thus, the monoterpene geraniol showed satisfactory antifungal front strains of *Cladosporium* spp., right, stands out as a promising natural alternative for use in food in industries.

Keywords: Contaminants food. *Cladosporium* spp.. antifungals. Terpenes. geraniol.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 OBJETIVOS	13
2.1 OBJETIVO GERAL.....	13
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	14
3.1 FUNGOS CONTAMINANTES.....	14
3.2 <i>Cladosporium</i> spp.....	15
3.3 CONTROLE DO CRESCIMENTO MICROBIANO	17
3.4 GERANIOL.....	18
4 METODOLOGIA	21
4.1 LOCAL DE TRABALHO.....	21
4.2 GERANIOL.....	21
4.3 CEPAS FÚNGICAS.....	21
4.4 MEIOS DE CULTURA	21
4.5 INÓCULO	22
4.6 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM).....	22
4.7 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO FUNGICIDA MÍNIMA (CFM).....	23
4.8 EFEITOS SOBRE O CRESCIMENTO MICELIAL	23
4.9 EFEITOS SOBRE A CONIDIOGÊNESE	23
4.10 EFEITOS SOBRE A GERMINAÇÃO DOS CONÍDIOS	24
4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	24
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
6 CONCLUSÕES	35
REFERÊNCIAS	36

1 INTRODUÇÃO

Os fungos são seres eucarióticos e heterotróficos, uma vez que possuem membrana nuclear e não possuem pigmentos fotossintéticos, logo aproveitam a energia contida nas ligações químicas de vários nutrientes (SINDRIM; ROCHA, 2010). Os fungos podem ser encontrados em vegetais, na água, no homem, em detritos e no solo, e sua dispersão é feita por várias vias como, animais, homem, insetos, água e, principalmente pelo ar (GOMPERTZ et al., 2008). São estudados devido ao seu envolvimento no surgimento de doenças em humanos, bem como seus efeitos econômicos na indústria de alimentos, estando envolvido tanto na produção como na contaminação e deterioração de alimentos (TORTORA; FUNK; CASE, 2012).

Os estudos com fungos apresentam-se de grande relevância na área de alimentos, uma vez que tais micro-organismos podem causar a contaminação e deterioração de alimentos podendo ocasionar alergia e intoxicação alimentar, pois são seres produtores de toxinas importantes (OGÓREK et al., 2012). Com relação à contaminação de alimentos por fungos, isto resulta em prejuízos econômicos aos produtores de alimentos e para os consumidores, tendo em vista os riscos que tais micro-organismos oferecem a saúde humana.

O gênero *Cladosporium* spp. é formado por micro-organismos dematiáceos ou negros. São organismos cosmopolitas, comumente encontrados em várias partes do mundo. Geralmente, são isolados a partir de áreas de uso residencial, pública e de áreas de armazenamento de produtos alimentares. São considerados agentes decompositores, deteriorantes ou contaminantes de alimentos ou produtos industriais, causam alergias ou mesmo infecções em plantas e animais (BENSCH et al., 2012; OGÓREK et al., 2012). Logo, é um gênero de grande interesse para investigadores em uma ampla variedade de áreas de estudos, principalmente naqueles que visam à busca de drogas que possam ter aplicabilidade no controle de crescimento fúngico.

Com base nessa problemática, vários estudos de atividade antifúngica *in vitro* estão sendo realizados com produtos naturais (AOUDOU, et al., 2010; KIM; PARK, 2012; FARDIN; YOUNG, 2015; MENEZES et al., 2015; SOUZA et al., 2015; RUIZ et al., 2016).

. Dentre eles, o uso de terpenos ganha destaque, pois são compostos largamente distribuídos na natureza, constituindo uma ampla variedade de compostos vegetais, principalmente óleos essenciais, dotados de potencial atividade antifúngica contra fungos patogênicos e contaminantes (BAKKALI et al., 2008). Com isso, o presente projeto de pesquisa se propõe a investigar os efeitos inibitórios de geraniol, um monoterpene tipo álcool, frente a cepas do gênero *Cladosporium* spp., importante na contaminação de alimentos. Apesar de

existirem relatos sobre a atividade antifúngica de geraniol frente a micro-organismos na literatura, contra as cepas do gênero *Cladosporium* spp. não há evidências. Logo, achados que interferem em diferentes etapas do desenvolvimento fungico são importantes como contribuição dos estudos nesta área

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a atividade antifúngica *in vitro* de geraniol frente a cepas de *Cladosporium* spp.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a concentração inibitória mínima e concentração fungicida mínima de geraniol;
- Avaliar o efeito de diferentes concentrações de geraniol sobre a conidiogênese, germinação de conídios e crescimento micelial das cepas ensaiadas.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 FUNGOS CONTAMINANTES

Os fungos são seres vivos que possuem organização celular e DNA delimitado (eucarióticos), geralmente aeróbios, necessitando então de O₂ para sobreviverem. Variam quanto ao tamanho, estrutura e morfologia, se diferenciam dos vegetais por serem desprovidos de clorofila, logo não realizam fotossíntese, porém são capazes de absorver nutrientes, com uma nutrição heterotrófica por absorção e armazenamento de glicogênio (LACAZ et al., 2002; PELCZAR; CHAN; KRIEG, 2012). São organismos ubíquos, podendo ser encontrados em vegetais, na água, em animais, no homem, em detritos e no solo, de forma abundante, uma vez que podem viver na matéria orgânica morta ou em decomposição. Tais organismos constituem um grande grupo, formado por leveduras, fungos filamentosos e cogumelos (BURTON; ENGELKIRK, 2005; GOMPERTZ et al., 2008). A importância do estudo de tais organismos se dá, principalmente pela capacidade de muitos desses seres causar doenças em plantas, animais e em humanos, com manifestações clínicas das mais variadas. Na indústria de alimentos a importância dos fungos se dá pela sua capacidade de deterioração de alimentos, bem como a produção de toxinas importantes.

Fungos denominados “contaminantes” são fungos que possuem como via de dispersão principal o ar atmosférico, onde sua veiculação se dá principalmente através do vento, mas também através de outras vias como água, insetos, homem e animais. Logo, seus propágulos (esporos) podem ser encontrados em altas concentrações nos mais variados ambientes (LACAZ et al., 2002; MEZZARI, 2002).

Com isso os alimentos e produtos alimentícios são frequentemente contaminados por infestações fúngicas, micotoxinas produzidas por fungos e formação de radicais livres que levam ao estresse oxidativo. Isso ocorre geralmente durante a pós-colheita, transporte e armazenamento. O que resulta em perdas na quantidade, qualidade e no valor nutricional dos alimentos (PRAKASH et al., 2014).

Os principais micro-organismos responsáveis por esse tipo de contaminação são os fungos contaminantes, que são amplamente encontrados na natureza. Estes fungos podem causar a deterioração, levando à modificação das características organolépticas de alimentos e produtos alimentares, levando a perdas comerciais importantes, bem como causar

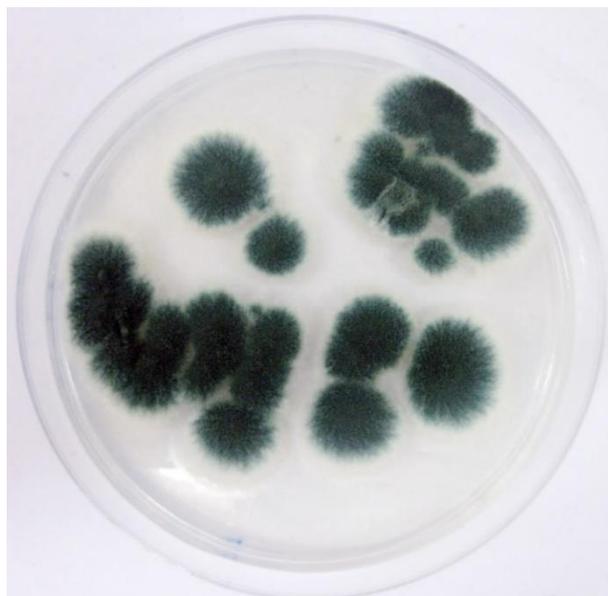
micotoxicoses e provocar reações e hipersensibilidade (LACAZ et al., 2002; MEZZARI, 2002 TORTORA; FUNK; CASE, 2012).

3.2 *Cladosporium* spp.

Dentre os fungos contaminantes, destacam-se os do gênero *Cladosporium* spp., conhecidos como fungos negros ou escuros. O gênero *Cladosporium* spp. é composto por fungos contaminantes e oportunistas dematiáceos, considerados saprófitas por serem encontrados no solo e em materiais em decomposição, como em restos vegetais. Possuem crescimento lento, necessitando de um ambiente com baixas temperaturas e alta umidade para crescer de forma vigorosa. São fungos caracterizados por produzir colônias com textura aveludada e plana (Figura 1), que possuem tonalidades que variam do verde oliva ao marrom enegrecido (BENSCH et al., 2012; OGÓREK, et al. 2012).

A unidade básica de crescimento de um fungo filamentososo, como é o caso do gênero *Cladosporium* spp., é a hifa, estruturas em forma de tubo com uma região apical hemisférica ou heme elipsoide, pois produzem corpos reprodutivos chamados de conídios (Figura 2). Os conídios destes fungos podem ser encontrados no ar, solo e água, podendo causar doenças em plantas, alimentos e produtos alimentares. A forma dos conídios produzidos por estes fungos é muito variável, podendo se apresentar de forma semiglobular, ovóide, elipsóide, fusiforme, limoniforme a semicilíndrica ou cilíndrica (BENSCH et al., 2012; RIQUELME, 2013).

Figura 1- Micélio aéreo de *Cladosporium cladosporioides*.



Fonte: Próprio autor

São micro-organismos cosmopolitas amplamente encontrados da natureza, geralmente são isolados a partir de áreas de uso residencial e público e em áreas de armazenamento de produtos alimentícios, principalmente em regiões de clima temperado. Geralmente estão associados a perdas econômicas importantes, uma vez que podem causar a deterioração de produtos alimentares, comuns em vegetais e frutas, além de poder causar alterações em carnes, manteiga e margarina (FRANCO; LANDGRAF, 2008; ZOPPAS; BARRERA; GONZÁLES, 2011; OGÓREK, et al. 2012).

Figura 2 – Microscopia óptica de hifas e conídios de *Cladosporium cladosporioides*.



Fonte: Bensch (2012)

Estudos de ar atmosférico de várias regiões da Europa mostram que os conídios de *Cladosporium* spp. dominar em 80% de todos os conídios capturados (OGÓREK et al., 2012). Um estudo realizado na microrregião do Curimataú paraibano, no nordeste brasileiro (MEDEIROS et al., 2015), também mostrou que fungos do gênero *Cladosporium* spp. apresentou maior incidência de isolamento em uma empresa de produção de polpa de fruta, com a presença acima de 70% em relação a outros micro-organismos presentes, demonstrando

a importância de se controlar o crescimento desse microrganismo, pois sua presença está associada a deterioração de alimentos e produtos alimentares.

3.3 CONTROLE DO CRESCIMENTO MICROBIANO

O desenvolvimento de micro-organismos em alimentos pode causar alterações em suas propriedades físicas, químicas e estruturais. A maioria dos casos de deterioração de alimentos ocorre na produção agrícola, onde os fungos se destacam como um dos principais causadores, acarretando perdas econômicas significativas, além do risco alguns deles podem oferecer aos consumidores, uma vez que podem ser fungos potencialmente patogênicos (FRANCO; LANDGRAF, 2008). Dentre as principais fontes de contaminação microbiológica estão os alimentos, os manipuladores, os vetores e pragas urbanas que incluem animais e insetos, além de equipamentos, utensílios e componentes estruturais do prédio, quando mal higienizados (SILVA JR, 2008).

Nas indústrias de alimentos, a higienização é dividida em duas etapas muito bem definidas: limpeza e sanitização. A limpeza tem como objetivo a remoção de resíduos orgânicos e inorgânicos aderidos às superfícies. Após a limpeza, a sanitização se faz necessária, pois visa a destruição dos micro-organismos patogênicos e a redução dos deteriorantes, uma vez que o número de micro-organismos ainda é alto. Logo, a limpeza e desinfecção são considerados procedimentos de extrema importância, uma vez que podem remover a maioria dos micro-organismos que podem contaminar equipamentos e alimentos (OLIVEIRA; BRUGNETRA; PICCOLI, 2010; BELTRAME et al., 2012; ARAÚJO et al., 2015).

Segundo a ANVISA, na Portaria nº15 de 23 de agosto de 1988, sanitizantes ou desinfetantes são formulações que têm na sua composição substâncias microbicidas e apresentam efeito letal para micro-organismos não esporulados. A desinfecção pode ser realizada por meios físicos e químicos, sendo a última a mais comum, principalmente por razões econômicas (GERMANO et al., 2011).

Dentre os sanitizantes mais usados na indústria de alimentos se destacam os compostos citados a seguir:

- Compostos clorados: O cloro é o mais usado, possui sua atividade germicida da combinação com radicais oxidáveis. São classificados ainda em orgânico e inorgânicos e as hipóteses de seu mecanismo de ação sugerem que a ação ocorre por meio da interferência na síntese proteica dos micro-organismos (GERMANO et al., 2011).

- Compostos quaternários de amônio: São compostos tensoativos catiónicos utilizados como conservantes e desinfetantes ambientais, com boa atividade germicida, porém possuindo atuação limitada na presença de matéria orgânica. (BUFFET-BATAILLON et al., 2011)
- Compostos iodados: São aplicados a mais de um século de várias formas, dentre elas tintura de iodo e solução de iodo alcoólico. Possuem baixa solubilidade em água. O iodo é eficiente contra células bacterianas, e moderadamente eficiente sobre vírus, leveduras e fungos (GERMANO et al., 2011).

No entanto, a redução da eficiência microbiológica aliada à toxicidade potencial dos subprodutos da cloração, vem tornando este processo cada vez menos atrativo (BERBARI et al., 2001; ARAÚJO et al., 2015; COELHO et al., 2015).

Com base nesses fatores, vários pesquisadores buscam novas alternativas que possam evitar o crescimento microbiano, além dos produtos sintéticos, uma vez que tais produtos vêm demonstrando propriedades que causam problemas ambientais e de saúde. Sabendo disso, tanto os consumidores como os produtores de alimentos e produtos alimentares, exigem mais conservantes que são biodegradáveis e possam demonstrar uma maior segurança para os seres humanos e para o ambiente. Com isso, vários produtos vegetais têm sido reconhecidos e utilizados para inativação microbiana nas indústrias de alimentos devido de suas propriedades antimicrobianas e sua origem natural, e aparentemente sustentável (TIAN et al., 2011; COELHO et al., 2015).

3.4 GERANIOL

Os produtos naturais são importantes instrumentos no desenvolvimento de novas ferramentas terapêuticas, onde as plantas medicinais e os produtos derivados delas são reconhecidamente importantes para a pesquisa farmacológica e o desenvolvimento de drogas (BRASIL, 2006; NEWMAN; CRAGG, 2007). As plantas são fontes importantes de moléculas biologicamente ativas que podem ser utilizadas não apenas como modelo para a síntese e obtenção de novos fármacos. Na área de agentes antimicrobianos, é notável o número de drogas derivadas de produtos naturais para uso clínico ou como agente saneante de ambientes (NEWMAN; CRAGG, 2007; BRAZ FILHO, 2010).

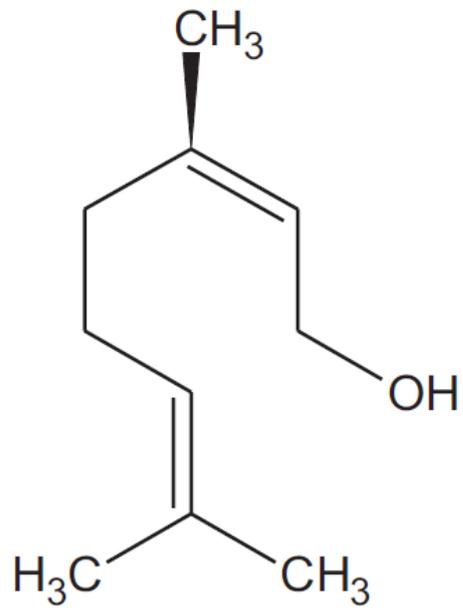
Dentre tais produtos ganham destaque os óleos essenciais e seus componentes. Os óleos essenciais são compostos voláteis produzidos diferentes partes da planta, encontrados em suas folhas, resinas, frutos, flores, troncos e outras partes. Possuem características importantes como

a usa alta viscosidade e odor forte, devido aos seus compostos aromáticos voláteis. São conhecidos por terem várias funções, dentre elas estão propriedades fungicida, formicida, acaricida, bactericida, entre outras (TZORTZAKIS; ECONOMAKIS, 2007; SANTOS, 2011). Esses óleos são fitocomplexos que podem ser constituídos por até mais de 60 componentes individuais, entre fenilpropanoides e terpenos (SIMÕES; SPITZER, 2007).

Os terpenos são compostos largamente distribuídos na natureza, constituindo uma ampla variedade de compostos vegetais. São compostos derivados do metabolismo secundário de plantas, formados a partir do isopentenil difosfato, um derivado do acetilCOA. Os terpenos são compostos orgânicos hidrogenados de cadeias carbônicas cíclicas ou alifáticas, com diferentes grupos funcionais. Os terpenos são classificados de acordo com suas unidades de átomos de carbono em hemiterpenos (C_5), monoterpenos (C_{10}), sesquiterpenos (C_{15}), diterpenos (C_{20}), triterpenos (C_{30}) e tetraterpenos (C_{40}) (SIMÕES; SPITZER, 2007; BAKKALI et al., 2008). Algumas atividades biológicas são descritas para drogas do tipo terpenos, entre elas pode-se destacar a atividade antibacteriana, antifúngica, repelente, inseticida, antineoplásica, antioxidante e larvicida (PADUCH et al., 2007; EDRIS, 2007; BAKKALI et al., 2008).

Neste estudo, foi utilizado geraniol, um fitoconstituente volátil classificado como um monoterpeno acíclico, com estrutura química $C_{10}H_{18}O$, possuindo um grupo hidroxila, e função álcool (Figura 3), encontrado principalmente nas frutas cítricas, e óleos de ervas aromáticas, como *Monarda fistulosa*, *Cymbopogon citratus* e *Cymbopogon flexuosus* (CHEN; VILJOEN, 2010). O geraniol puro é um líquido oleoso, com perfil predominantemente hidrofóbico (MADANKUMAR et al., 2013; DEVAKI; MADANKUMAR, 2015). Pesquisadores têm mostrado que o geraniol é um agente com proeminente ação repelente (BARNARD; XUE, 2004; REIS et al., 2016), inseticida (JEON et al., 2009; REIS et al., 2016), antimicrobiano (MARUYAMA et al., 2008) e antineoplásica (WISEMAN et al., 2007; MADANKUMAR et al., 2013). Mais recentemente, encontram-se na literatura relatos que confirmam o potencial antifúngico de geraniol frente a cepas de *Aspergillus* spp, *Fusarium oxysporum* e *Penicillium digitatum* (AOUDOU et al., 2010; KIM; PARK, 2012) e *Candida* spp. (VAN ZYL et al., 2006).

Figura 3 - Estrutura química do geraniol.



geraniol

Fonte: Paduch (2007)

4 METODOLOGIA

4.1 LOCAL DE TRABALHO

Trata-se de uma pesquisa laboratorial, realizada no Laboratório de Bioquímica e no Laboratório de Microbiologia, ambos da Unidade Acadêmica de Saúde (UAS) do Centro de Educação e Saúde (CES), da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG).

4.2 GERANIOL

O monoterpeno geraniol foi adquirido da Sigma-Aldrich® (Brasil). As emulsões foram preparadas no momento de execução dos testes, dissolvendo-os primeiramente em 100 µL dimetilsulfóxido (DMSO) a 100% e utilizando água destilada esterilizada em quantidade suficiente para obter a concentração inicial de 1024 µg/mL. A partir desta concentração, foram feitas diluições seriadas em razão de dois até alcançar a concentração de 1 µg/mL utilizando o próprio meio RPMI 1640.

4.3 CEPAS FÚNGICAS

Para os ensaios de atividade antifúngica, utilizou-se as cepas de *C. carrioni*, *C. oxysporum* e *C. cladosporioides* obtidas da coleção de culturas do Laboratório de Micologia do Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba (código LM) ou obtidas da coleção de culturas da Micoteca do Departamento de Micologia, Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (código URM). Todas as cepas foram mantidas em tubos de ensaio contendo ágar batata dextrose inclinado sob refrigeração (8 °C), no Laboratório de Bioquímica.

4.4 MEIOS DE CULTURA

Os meios de cultura que foram utilizados foram os meios sólidos ágar Sabouraud dextrose (ASD) e ágar batata (AB), os quais foram solubilizados com água destilada e esterilizados em autoclave, a 121° C por 15 minutos, conforme normas do fabricante (Difco®). O meio líquido

RPMI 1640 com glutamina e sem bicarbonato também foi utilizado e preparado de acordo o documento M38-A do CLSI (2002).

4.5 INÓCULO

Para induzir a formação de conídios, as cepas fúngicas foram cultivadas em AB a 28°C por 7 dias. As recentes colônias fúngicas foram cobertas com de solução salina estéril (NaCl 0,9 %), e as suspensões feitas com auxílio de uma pipeta de transferência. A mistura resultante de conídios e fragmentos de hifas foi transferida para tubos de ensaio esterilizados. Após agitação de 15 segundos, cada suspensão ficou em repouso por 3-5 minutos, tempo para que os fragmentos de hifas (partículas mais pesadas) se depositassem no fundo, e o sobrenadante fosse recolhido em tubos de ensaio estéreis. Após agitação, os conídios foram contados utilizando-se hemocitômetro e ajustados com solução salina para fornecer um inóculo de, aproximadamente, 10^6 conídios/mL (RASOOLI; ABYANEH, 2004; MOTA et al., 2012).

4.6 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

A determinação da CIM de geraniol foi realizada através da técnica de microdiluição, utilizando placas de microtitulação contendo 96 cavidades com fundo chato, conforme adaptação do documento M38-A do CLSI (2002). Em cada linha da placa, foram adicionados 100 µL de geraniol duplamente concentradas e diluídas em RPMI 1640 com o objetivo de atingir diversas concentrações. Em cada cavidade da placa, foram adicionados 100 µL do inóculo previamente preparado, diluído em RPMI 1640 na proporção 1:50. Um controle fúngico foi realizado substituindo geraniol por solução salina esterilizada (controle de crescimento). Um controle de esterilidade também foi realizado, colocando-se apenas o meio de cultura, sem o inóculo. Para verificar a ausência de interferência nos resultados pelo DMSO utilizado na preparação das soluções, foi realizado um controle com DMSO na concentração usada para a solubilização das drogas acrescido do inóculo e do meio de cultura. As placas foram seladas e incubadas a 28 °C por até 7 dias para a realização da leitura. Os valores de CIM foram determinados pela análise visual da inibição do crescimento em cada cavidade, comparando os testes com o controle de crescimento (ausência de drogas). A CIM é definida como a menor concentração das drogas (produto natural ou droga-padrão) capaz de inibir 100% o crescimento fúngico observado nas cavidades. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

4.7 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO FUNGICIDA MÍNIMA (CFM)

Uma alíquota de 10 µL de cada cavidade onde não houve crescimento fúngico foi semeada em uma placa com ASD, a qual foi incubada a 28 °C por 7 dias. A CFM foi considerada a menor concentração semeada em ASD em que houve crescimento menor que 3 unidades formadoras de colônias. Os valores de CIM foram expressos como média geométrica (KLEPSEK et al., 1998; ERNST et al., 1999).

4.8 EFEITOS SOBRE O CRESCIMENTO MICELIAL

A análise da interferência de geraniol sobre o crescimento micelial foi realizada pela determinação da massa micelial seca (SHARMA; TRIPATHI, 2008; PEREIRA et al., 2011). Em um tubo de ensaio esterilizado foram adicionados 4,5 mL do RMPI 1640, previamente acrescido da solução das drogas-teste nas respectivas 1/2CIM, CIM e 2xCIM. Em seguida, foram adicionados 0,5 mL do inóculo de *C. carrioni* LM 227, *C. oxysporum* URM 5234 e *C. cladosporioides* URM 5737 em cada tubo. No tubo controle correspondente, o inóculo foi adicionado em RMPI 1640 sem adição das drogas testadas. Todo o sistema foi incubado a 28 °C por até 7 dias para leitura, onde foi determinado o peso da massa micelial seca. Para isso, as culturas foram filtradas utilizando papel de filtro esterilizado (porosidade: 11 µm) e lavadas com água destilada esterilizada. O micélio retido no papel de filtro foi submetido à secagem em estufa a 60 °C por 10 minutos. Ao término, o papel de filtro contendo o micélio seco foi pesado e o percentual de massa micelial seca produzida calculado, considerando o experimento controle como 100% de produção micelial.

4.9 EFEITOS SOBRE A CONIDIOGÊNESE

Os efeitos de geraniol sobre a produção de conídios pelas cepas fúngicas foram analisados após cultivo das cepas em ASD na ausência e presença de diferentes concentrações de geraniol, conforme Tzortzakis e Economakis (2007). Em tubos de ensaio estéreis, foram vertidos 5 mL de ASD fundido e ajustado na temperatura de 35°C em banho-maria. Em seguida, foi adicionada a droga com o objetivo de alcançar diferentes concentrações (1/2CIM, CIM e 2xCIM). Um experimento controle sem adição dos produtos ao ASD fundido também foi realizado. As cepas de *C. carrioni* LM 227, *C. oxysporum* URM 5234 e *C. cladosporioides* URM 5737 foram cultivados na superfície do meio e as placas incubadas a 28 °C por 7 dias.

Após período de incubação, os conídios foram coletados adicionando 5 mL de solução salina estéril sobre a superfície das colônias fúngicas, e após suaves agitações com auxílio de uma pipeta de transferência. A suspensão foi coletada e analisada em um hemocitômetro para contagem do número de conídios em cada grupo testado.

4.10 EFEITOS SOBRE A GERMINAÇÃO DOS CONÍDIOS

Em tubos de ensaio estéreis, 500 μ L do CSD acrescido de geraniol em diversas concentrações (1/2CIM, CIM, e 2xCIM). foram homogeneamente misturadas com 500 μ L da suspensão dos conídios fúngicos das cepas de *C. carrioni* LM 227, *C. oxysporum* URM 5234 e *C. cladosporioides* URM 5737 e imediatamente incubados a temperatura de 28 °C. Amostras dessa mistura foram tomadas após 24 h para análise. O número de conídios germinados e não germinados foi determinado em cada grupo experimental, utilizando um hemocitômetro. O percentual de conídios germinados foi calculado para cada grupo experimental. Um controle com ausência de geraniol foi utilizado. Todo o experimento foi feito em triplicata (LIU et al., 2008; PEREIRA et al., 2011).

4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os valores de CIM foram expressos pela média geométrica dos resultados. Os resultados dos ensaios que avaliaram os efeitos de geraniol sobre o crescimento micelial, a conidiogênese e a germinação dos conídios, foram expressos como média \pm desvio padrão (d.p.). A avaliação estatística destes resultados foi realizada empregando-se o teste t não pareado para determinar diferenças significantes, quando um valor de $p < 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A CIM do Geraniol foi determinada pelo método de microdiluição em caldo. Os respectivos valores são apresentados na Tabela 1. Geraniol conseguiu inibir o crescimento de 100% das cepas testadas na concentração de 512 µg/mL. A cepa *C. carrioni* URM 5109 se mostrou mais sensível ao monoterpreno, uma vez que teve seu crescimento inibido quando exposta a 256 µg/mL de Geraniol. Os controles realizados mostraram ausência de inibição do crescimento fúngico por DMSO, confirmando que o impedimento do crescimento foi devido à presença geraniol. O crescimento foi detectado quando todas as cepas foram cultivadas na ausência de drogas, o que confirmou a viabilidade do inoculo fúngico.

A CFM do Geraniol foi determinada pelo método de semeadura em placa. A atividade antifúngica de um produto é caracterizada pela sua capacidade de impedir o crescimento de um fungo, de tal modo que ele seja incapaz de ser cultivado quando uma amostra do mesmo seja transferida para um meio de cultura adequado para seu crescimento (SMITH-PALMER et al., 1998). Nesse teste, foi observado que a concentração de 512 µg/mL foi capaz de causar a morte de aproximadamente 70% das cepas avaliadas (Tabela 1). A cepa mais resistente foi a *C. oxysporum* URM 5234, onde foi necessário 2048 µg/mL de Geraniol para ocasionar a sua morte.

Tabela 1 – Valores de concentração inibitória mínima (CIM) e fungicida mínima (CFM) de geraniol sobre cepas do gênero *Cladosporium* spp.

Cepas	CIM (µg/mL)*	CFM (µg/mL)*
<i>C. carrioni</i> LM 227	512	512
<i>C. carrioni</i> URM 5109	256	512
<i>C. cladosporioides</i> URM 5737	512	512
<i>C. cladosporioides</i> URM 6246	512	512
<i>C. oxysporum</i> URM 5234	512	2048
<i>C. oxysporum</i> URM 5412	512	1024

*Média geométrica de três experimentos.

Existem na literatura vários métodos que visam a verificação da atividade antifúngica de compostos ou substâncias de origem vegetal, e cada método pode influenciar de forma significativa os resultados dos experimentos (JIANG et al., 2012).

Para a determinação da CIM e posterior CFM utilizou-se do método de microdiluição em caldo adaptado aos padrões da norma de referência do documento M38-A da *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2002), que é um dos métodos mais utilizados em laboratórios, em ensaios de atividade antimicrobiana de compostos ou moléculas isoladas. O teste de microdiluição gera uma economia de espaço de materiais e reagentes, que possibilita a determinação quantitativa da CIM, sendo sensível, reprodutível e pode ser facilmente padronizado além de ser possível a realização de várias repetições do experimento com concentrações uniformes da droga estudada (JIANG et al., 2012; DE BONA et al. 2014).

Para a avaliação da atividade antimicrobiana, Sartoratto et al. (2004) elencaram critérios para categorizar o poder antimicrobiano de óleos essenciais com base no valor da CIM, onde óleos com $CIM \leq 500 \mu\text{g/mL}$ são considerados com forte atividade antimicrobiana, com $500 \mu\text{g/mL} < CIM \leq 1500 \mu\text{g/mL}$ possuem moderada atividade e $CIM > 1500 \mu\text{g/mL}$ é considerado com fraca atividade. Diante desse referencial, nesse estudo pode-se considerar que Geraniol apresentou forte atividade antifúngica frente a *C.carrioni* URM 5109, e moderada atividade antifúngica sobre as demais cepas.

Na análise dos resultados obtidos, é possível perceber que os valores de CFM são iguais ou maiores aos valores das concentrações da CIM, o que é considerado normal, pois os valores fungicidas de agentes antimicrobianos comumente ensaiados geralmente são mais elevados em relação aos respectivos valores de CIM (AOUDOU et al., 2010).

O potencial antimicrobiano do geraniol já é referido em vários trabalhos contra cepas de *Aspergillus spp*, *Fusarium oxysporum*, e *Penicillium digitatum* (AOUDOU, et al., 2010; KIM; PARK, 2012), *Candida spp*. (VAN ZYL, et al., 2006). No estudo realizado por Pereira et al. (2015), os autores avaliaram o potencial antifúngico do geraniol através da técnica de microdiluição em caldo contra cepas de *Trichophyton rubrum*, fungos comumente causadores de dermatofitoses em humanos, obtendo resultados de CIM variando entre 16 e 256 $\mu\text{g/mL}$, valores que se assemelham aos encontrados nesse estudo, sendo que o presente estudo encontrou valores de CIM mais altos para cepas de *Cladosporium spp.*, o que pode ser explicado devido as características próprias do gênero.

Na literatura, o mecanismo de ação dos monoterpenos não é totalmente compreendido, porém algumas hipóteses são relatadas. Sugere-se que o mecanismo de ação antimicrobiana dos terpenos está associado com suas propriedades lipofílicas. Eles podem influenciar, preferencialmente, nas estruturas de membrana ou na síntese dessas estruturas, alterando a permeabilidade e fluidez da membrana (PADUCH et al., 2007; DI PASQUA et al., 2007; BAKKALI et al., 2008).

No caso do geraniol, além de sua característica lipofílica, ele possui estrutura química muito semelhante ao geranyl-pirofosfato, um intermediário essencial para a biossíntese do ergosterol, um esterol encontrado nas membranas celulares de leveduras e fungos filamentosos e funciona como um regulador importante da fluidez da membrana. Logo, esta semelhança sugere que a ação do geraniol esteja associada com inibição de enzimas envolvidas no processo de biossíntese do ergosterol, causando assim alterações dinâmicas da membrana celular de micro-organismos, como os fungos (BARD et al., 1988; PEREIRA et al., 2015).

Pinto et al. (2013) investigaram a atividade antifúngica do óleo essencial de *Thymus villosus* subsp. *lusitanicus*, geranyl acetato, terpinen-4-ol, linalool e geraniol, contra *Candida*, *Cryptococcus*, *Aspergillus* e espécies de dermatófitos, utilizando também o método de microdiluição em caldo, onde o geraniol apresentou a maior atividade fungicida contra os isolados testados, com valores de CIM variando entre 0,8 e 64 µg/mL, mostrando que o geraniol possui forte atividade antifúngica.

Os estudos com relação à atividade anti-*Cladosporium* de geraniol ainda são considerados escassos na literatura, e seu potencial inibitório frente cepas de *Cladosporium* spp., ainda não é relatado. Porém, fungos desse gênero já foram testados frente a outros produtos de origem natural, como óleos essenciais de *Piper cernuum*, *Piper diospyrifolium*, *Piper crassinervium*, e *Piper solmsianum umbelata* (MORANDIM et al., 2010), *Avicennia schaueriana* (FARDIN; YOUNG, 2015).

Menezes et al. (2015) também investigaram a atividade antifúngica do óleo essencial de *Melissa officinalis*, contra cepas de *Cladosporium carrioni*, uma importante espécie do gênero que também foi testada no presente estudo. Seus resultados revelaram que o óleo essencial inibiu de forma significativa ($p < 0.05$) o crescimento micelial radial e a germinação de conídios em todas as concentrações.

A partir do exposto, fica claro a relevância deste estudo, por ser o primeiro que avalia a ação antifúngica do geraniol frente aos fungos do gênero *Cladosporium* spp., promovendo destaque na área de produtos naturais, principalmente na área de produção de alimentos, uma vez que se enxerga a possibilidade do mesmo futuramente ser utilizado nas indústrias para o controle do crescimento de fungos filamentosos do gênero estudado.

A partir dos resultados obtidos através dos testes de CIM e CFM, avaliou-se a ação do geraniol em outras fases desenvolvimento fúngico como o crescimento micelial, produção e germinação de conídios, uma vez que são fases muito importantes para o crescimento e desenvolvimento do fungo. Além de estarem relacionadas diretamente com sua virulência

fúngica no alimento, sua interferência pode prejudicar a capacidade de fungos do gênero *Cladosporium* spp. causarem deterioração em alimentos e/ou produtos alimentares.

Para estudar a interferência do geraniol no crescimento micelial, conidiogênese e germinação de conídios, as cepas *C. cladosporioides* URM 5737, *C. carrioni* LM 227 e *C. oxysporum* URM 5234 foram escolhidas, todas com valores de CIM e CFM de 512 µg/mL. A análise da interferência de geraniol sobre o crescimento micelial foi realizada pela determinação da massa micelial seca, onde o inóculo fúngico foi exposto ao meio de cultura RMPI 1640 acrescido do geraniol em diferentes concentrações (1/2CIM, CIM, e 2xCIM).

Todas as concentrações de geraniol testadas inibiram de forma significativa ($p < 0.05$) o crescimento micelial das cepas de *C. cladosporioides* URM 5737 e *C. oxysporum* URM 5234 em comparação com o controle (100% de rendimento micelial); a cepa *C. carrioni* LM 227, apresentou sensibilidade semelhante. Porém, observou-se que a cepa *C. carrioni* LM 227 teve seu crescimento micelial inibido de forma significativa ($p < 0.05$) nas concentrações de CIM e 2xCIM da droga (Figura 4). Logo, a cepa *C. cladosporioides* URM 5737 demonstrou sensibilidade a droga, porém o geraniol inibiu o crescimento micelial das cepas de *C. carrioni* LM 227 e *C. oxysporum* URM 5234 de forma mais eficaz nas concentrações de CIM e 2xCIM.

O gênero *Cladosporium* spp. é conhecido por causar manchas em plantas e frutas, geralmente tais manchas são ocasionadas pela produção micelial do fungo (OGÓREK et al., 2012), o que é muito importante na contaminação de alimentos, pois esse processo causa a deterioração e perda dos alimentos contaminados. Portanto, a massa micelial seca reflete a produção de material celular pelo fungo, embora não reflita o número total de células vivas.

Esses resultados são de grande importância nesse estudo, pois ao interferir na formação do micélio fúngico, o geraniol pode diminuir os estragos que podem ser causados em produtos alimentícios pelos estes fungos, numa possível aplicação no controle do crescimento desses fungos na indústria de alimentos.

Não há na literatura relatos da interferência do geraniol no crescimento micelial de fungos do gênero *Cladosporium* spp.. No entanto, para comprovar a eficácia deste teste, foram encontrados outros trabalhos na literatura que analisaram o poder de interferência de agentes naturais sobre o crescimento micelial de outras espécies de fungos filamentosos, através da mesma metodologia utilizada neste estudo. A partir disso, Pereira et al. (2011a), que analisaram os efeitos do óleo essencial de *Cymbopogon winterianus* frente a cepas de *Trichophyton mentagrophytes*, em diversas concentrações, ao fazer uso a mesma metodologia utilizada neste estudo, constataram que o óleo inibiu o crescimento micelial do fungo em 100%.

Também através do método de determinação da massa micelial seca Pereira et al. (2011b), avaliaram o poder antifúngico do óleo essencial de *Cymbopogon winterianus* em diversas concentrações sobre o crescimento micelial de uma cepa de *Trichophyton rubrum*, e obtiveram resultado de inibição de 100% da produção de seu micélio.

De Souza et al. (2015) realizaram uma análise dos efeitos de quitosana e carvacrol no crescimento micelial de cepas de *Aspergillus flavus*, onde as drogas testadas apresentaram inibição eficaz do crescimento micelial das cepas testadas. Recentemente, Pereira et al. (2015) também analisou a inibição do crescimento micelial *T. rubrum* ocasionada pelo monoterpeno geraniol, isto através do mesmo método utilizado neste estudo, onde obtiveram resultados satisfatórios, semelhantes aos apresentados neste trabalho, uma vez que o geraniol conseguiu inibir de significativamente o crescimento micelial das cepas testadas.

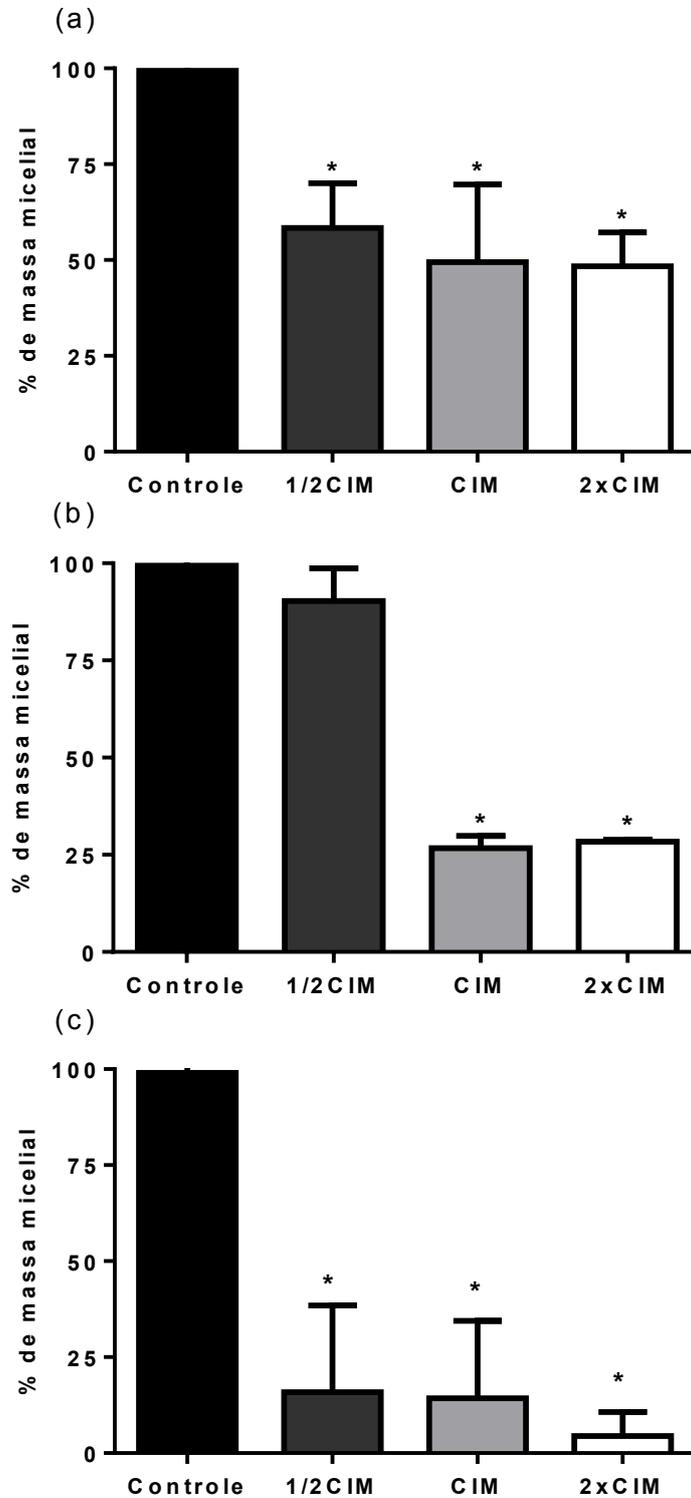
A diminuição da massa micelial seca das cepas de *Cladosporium* spp. observada na presença do geraniol sugere que etapas necessárias para a formação do micélio foram interferidas pela presença da droga, uma vez que é necessário que haja a formação dos conídios, e que eles germinem para que, em seguida, o micélio seja formado (LIU et al., 2007). Com base nisso, o presente estudo analisou também a interferência da presença do monoterpeno geraniol na conidiogênese e na germinação de conídios.

Os efeitos do geraniol sobre a produção de conídios das cepas fúngicas de *Cladosporium* spp. foram analisados após cultivo das cepas em ASD na ausência e presença de diferentes concentrações de geraniol (1/2CIM, CIM e 2xCIM). Os valores da produção de conídios por mL, na ausência (controle) e na presença do geraniol estão expressos na Figura 5

Os conídios são estruturas responsáveis pela reprodução assexuada dos fungos filamentosos, como é no caso do *Cladosporium* spp (SIDRIM; ROCHA, 2010). A conidiogênese consiste na formação assexuada do conídio, que possibilita a reprodução de células fúngicas (KERN; BLEVINS, 1999). Logo, para que ocorra a contaminação de um alimento ou produto alimentício pelo fungo é necessário que esse alimento entre em contato com fragmentos de hifas ou com os próprios conídios, que são facilmente encontrados no ar e na água (GOMPertz et al., 2008).

Para isto, outra etapa se faz necessária, que é a germinação dos conídios, processo que possibilita o crescimento apical e formação das hifas fúngicas, estruturas em forma de tubo com uma região apical hemisférica ou hemi-elipsoide. Logo, este é um processo importante para a instalação e crescimento do fungo, uma vez que o crescimento das hifas facilita a penetração as camadas internas do alimento, por exemplo, enquanto o crescimento de lateral pode agravar o dano (RIQUELME, 2013; MENEZES et al., 2015). Com isso, a inibição dessas etapas implicará

Figura 4 – Percentual de massa micelial seca de *Cladosporium* spp. na ausência (controle) e na presença de geraniol 1/2CIM (256 µg/mL), CIM (512 µg/mL) e 2xCIM (1024 µg/mL)



(a) *C. cladosporioides* URM 5737; (b) *C. carrioni* LM 227, (c) *C. oxysporum* URM 5234. * $p < 0,05$ quando comparado ao controle (teste t não pareado).

em consequências que dificultarão crescimento fúngico, e assim evitarão a contaminação e, consequentemente a deterioração dos alimentos pelo fungo.

O teste de análise da interferência do geraniol na germinação de conídios foi realizado através da homogeneização da suspensão de conídios com o meio de cultura RPMI 1640 acrescido de geraniol em diferentes concentrações, 1/2CIM, CIM e 2xCIM, e analisado após 24 horas. A porcentagem de conídios germinados de *C. cladosporioides* URM 5737, *C. carrioni* LM 227 e *C. oxysporum* URM 5234 podem ser observados na Figura 6. O geraniol inibiu significativamente ($p < 0,05$) a germinação de conídios em todas as concentrações nas cepas testadas, quando comparadas com o controle.

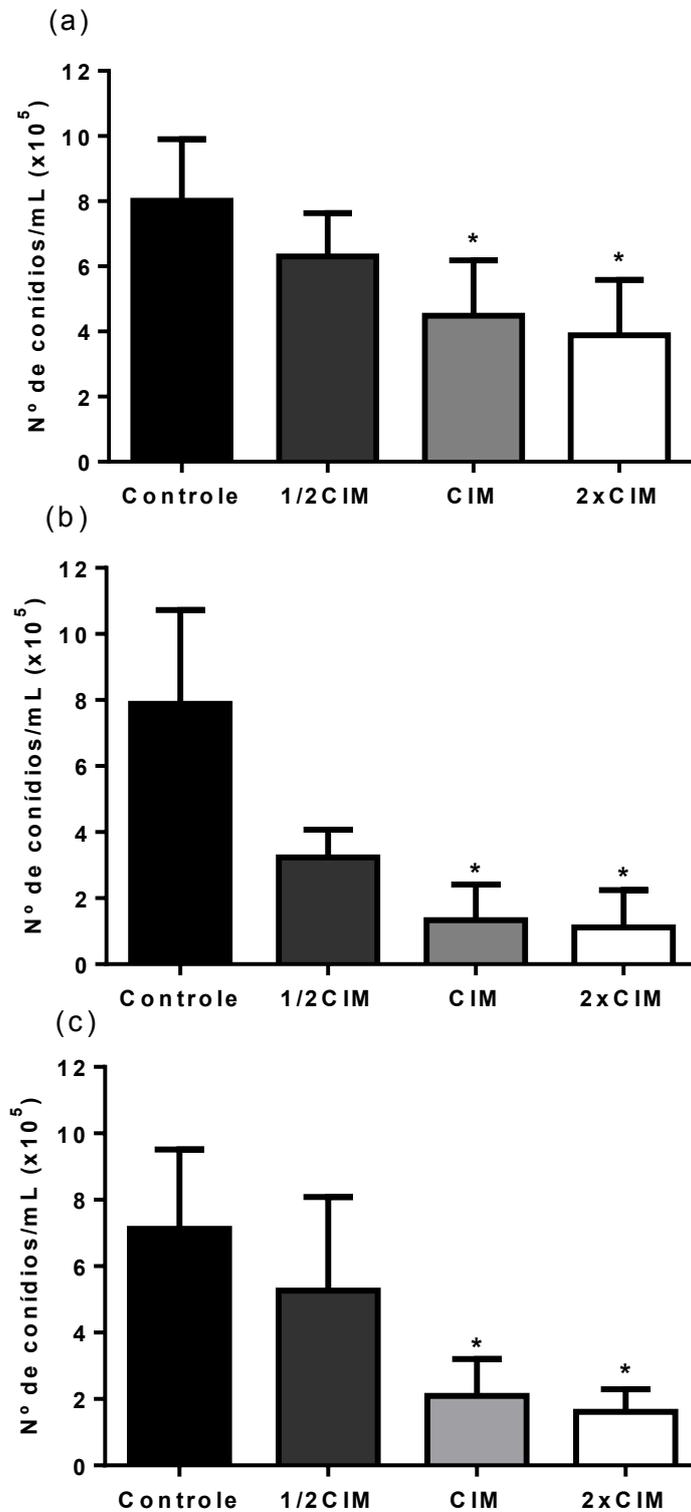
Ao comparar os resultados obtidos das cepas entre si, observa-se que as concentrações relacionadas ao teste da cepa *C. cladosporioides* URM 5737, obtiveram ação inibitória semelhante no desenvolvimento dos conídios ($p > 0,05$), no entanto, as concentrações do teste realizado com as cepas *C. carrioni* LM 227 e *C. oxysporum* URM 5234, obtiveram semelhança quando comparadas CIM e 2xCIM ($p > 0,05$), diferindo da ação da 1/2CIM, que demonstrou menor poder de inibição da germinação do fungo dentre as concentrações testadas, sugerindo que a inibição da produção e germinação de conídios é proporcional ao aumento da concentração da droga.

Ainda não existem na literatura relatos da ação do geraniol na germinação de conídios de fungos do gênero *Cladosporium* spp.. Mesmo não sendo possível comparar de forma direta os resultados obtidos com outros estudos, pode-se dizer que os resultados obtidos foram satisfatórios. Para comprovar o presente trabalho, é possível observar e apontar trabalhos que analisaram os efeitos antifúngicos de outros produtos naturais frente cepas de fungos filamentosos de outras espécies através desta mesma metodologia.

Ruiz et al. (2016) ao analisarem os efeitos do extrato etanólico de *Parastrephia lepidophylla* na germinação de conídios de *Penicillium digitatum* e *Geotrichum citri-aurantii*, através do mesmo método utilizado neste estudo, e perceberam que o mesmo inibiu de forma significativa o desenvolvimento dessas estruturas, com valores percentuais de inibição que chegaram a 100% na concentração de 400 $\mu\text{g/mL}$, resultados semelhantes aos apresentados neste estudo.

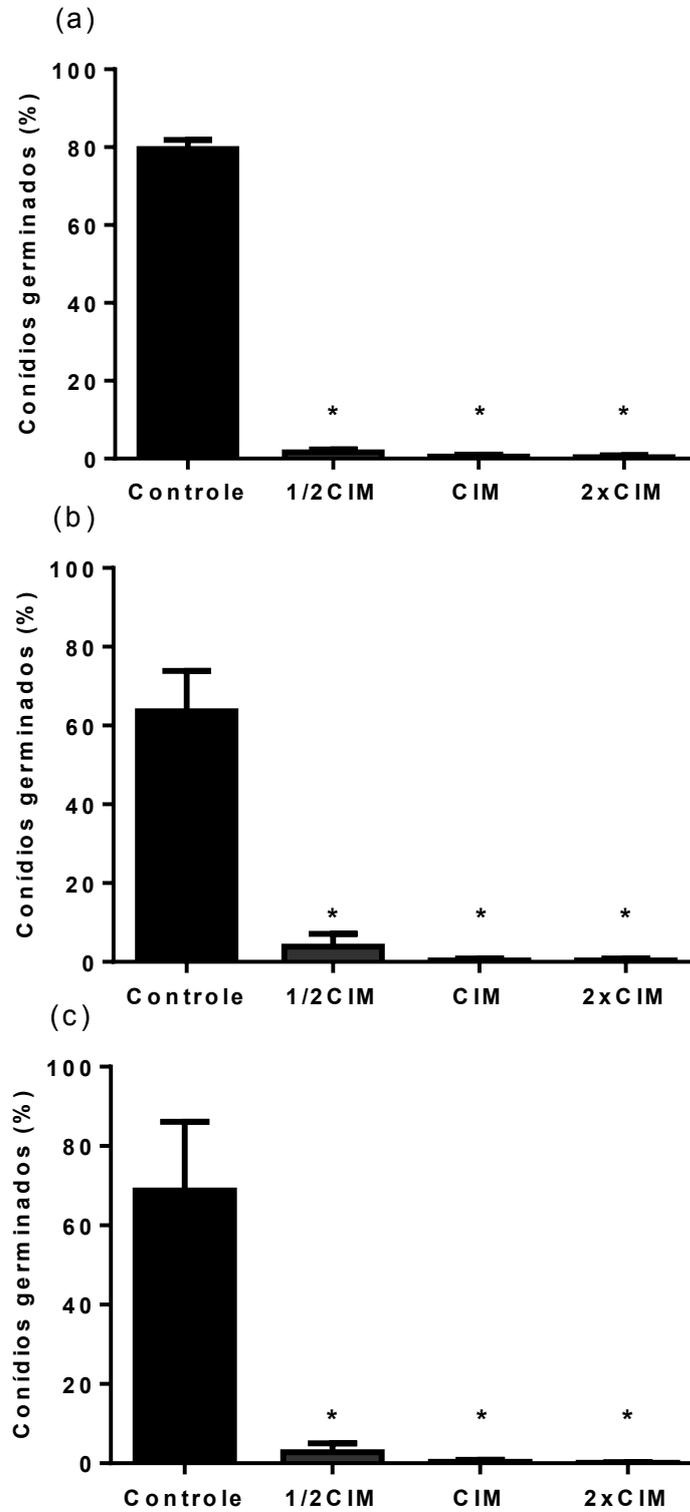
Da mesma forma, Pereira et al. (2014) avaliaram os efeitos antifúngicos de geraniol sob a germinação de conídios de cepas de *T. rubrum*, e verificaram que os mesmos tiveram a germinação de conídios inibida de forma efetiva nas concentrações de CIM e 2xCIM da droga, o que também corrobora com os resultados encontrados no presente estudo.

Figura 5 – Número de conídios/mL de *Cladosporium* spp. na ausência (controle) e na presença de geraniol 1/2CIM (256 µg/mL), CIM (512 µg/mL) e 2xCIM (1024 µg/mL)



(a) *C. cladosporioides* URM 5737; (b) *C. carrioni* LM 227 (c) *C. oxysporum* URM 5234. * $p < 0,05$ quando comparado ao controle (teste t não pareado).

Figura 6 – Percentual de conídios germinados de *Cladosporium* spp. na ausência (controle) e na presença de geraniol 1/2CIM (256 µg/mL), CIM (512 µg/mL) e 2xCIM (1024 µg/mL)



(a) *C. cladosporioides* URM 5737; (b) *C. carrioni* LM 227 (c) *C. oxysporum* URM 5234. * $p < 0,05$ quando comparado ao controle (teste t não pareado).

Com o objetivo de analisar os efeitos do extrato de *Punica granatum* na germinação de conídios de cepas de *B. cinerea*, *P. digitatum* and *P. expansum*, Nicosia et al. (2016), obtiveram resultados satisfatórios, com inibições que variaram de 82,7% e 100% dos conídios germinados, em comparação ao controle. De Souza, et al. (2015) avaliaram os efeitos antifúngicos de quitosana e carvacrol sob a germinação de conídios de cepas de *Aspergillus flavus*, e constataram que as drogas mostraram inibição da germinação de conídios maior ou igual a 85%, quando comparadas ao controle. Elsherbiny et al. (2016) analisaram a eficiência do metanol na inibição da germinação de conídios de cepas de *Fusarium* e observaram que o mesmo inibiu fortemente a germinação das cepas testadas, resultados semelhantes aos encontrados neste trabalho.

Óleos essenciais são potencialmente úteis como agentes antimicrobianos, estas propriedades são atribuídas a seus fitoconstituintes, como os terpenos. Assim, utilização de óleos essenciais, bem como dos terpenos, tanto na desinfecção como na conservação de alimentos, tem ganhado cada vez mais visibilidade, devido as suas propriedades antimicrobianas e sua origem vegetal (KEDIA et al., 2014). Dentre os terpenos, o monoterpene geraniol ganha destaque a partir dos resultados obtidos neste estudo, se apresentando como um potencial antifúngico, uma vez que se mostrou eficiente na inibição do crescimento, desenvolvimento micelial, formação e germinação de conídios das cepas dos fungos estudados. Com isso, o geraniol desponta na classe de produtos naturais que poderão ser utilizados como princípio ativo de desinfetantes de alimentos ou equipamentos, ou até mesmo como um conservante natural de alimentos.

Contudo, a utilização do geraniol como um conservante natural ou sanitizante, requer uma certa atenção, pois há a necessidades de outros estudos que avaliem as suas interferências nas características sensoriais dos alimentos e produtos alimentares. Pois, sabe-se que tanto os óleos essenciais, como seus constituintes, possuem característica volátil, e com isso apresentam um aroma intenso, podendo interferir de nas características organolépticas dos alimentos (BURT, 2004). A partir disso, novos estudos são necessários para a atenuação dessas características, para que futuramente o geraniol possa ser usado como desinfetantes de alimentos ou equipamentos, ou até mesmo como um conservante natural de alimentos, diminuindo assim os riscos aos consumidores, o desperdício de alimentos, e aumentando a vida de prateleira de alimentos e produtos alimentares.

6 CONCLUSÕES

O estudo realizado pode ser considerado de grande importância para o meio científico, uma vez que é a primeira investigação acerca da atividade antifúngica do geraniol frente a cepas de fungos do gênero *Cladosporium* spp.

A relevância do presente estudo fica ainda mais evidenciada com os resultados obtidos através da realização dos ensaios, que permitem afirmar que o geraniol apresenta atividade antifúngica eficaz sobre os fungos testados, considerados importantes contaminantes ambientais de indústrias de alimentos. Uma vez que o geraniol inibiu de forma significativa o crescimento, desenvolvimento micelial, produção e germinação de conídios das cepas de *Cladosporium* spp., fatores que são essenciais para proliferação e, conseqüentemente, a contaminação destes micro-organismos.

Logo, estes resultados apresentam grande importância, uma vez que sugerem que o geraniol pode ser visto como um promissor constituinte ativo de sanitizantes para aplicação em alimentos e equipamentos nas indústrias. Porém, mesmo com a atividade antifúngica do geraniol comprovada frente fungos do gênero *Cladosporium* spp., se faz necessário outros estudos que tratem da sua utilização *in vivo*, da toxicidade do geraniol, das alterações sensoriais que podem ser causadas pelo geraniol nos alimentos ou produtos alimentares, como por exemplo alterações no odor dos alimentos, já que o geraniol por ser volátil possui um forte cheiro, o que pode ser uma limitação na sua aplicação em alimentos, além de estudos que investiguem as suas possíveis formas de aplicação.

REFERÊNCIAS

AOUDOU, Y.; LÉOPOLD, T. N.; MICHEL, J. D. P.; XAVIER, E. F.; MOSES, M. C. Antifungal properties of essential oils and some constituents to reduce foodborne pathogen. **Journal of Yeast and Fungal Research**, v. 1, n. 1, p. 001-008, 2010.

ARAÚJO, E. A.; PASSOS, F. R.; RIBEIRO, L.; PEREIRA, A. A.; JÚNIOR, J. F. Q. F. Nanopartículas de prata: método alternativo de sanitização para couve minimamente processada. **Pesquisa Agropecuária Tropical (Agricultural Research in the Tropics)**, v. 1, n. 1, p. 138-145, 2015.

ARAÚJO, E. A.; RIBEIRO, L.; BERNARDES, P. C.; DAS DORES, M. T.; JÚNIOR, J. F. Q. F. Sanitização de cenoura minimamente processada com nanopartículas de prata. **Ciência Rural**, v. 45, n. 9, p. 1681-1687, 2015.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – a review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008.

BARD, M.; ALBRECHT, M. R.; GUPTA, N.; GUYNN, C. J.; STILLWELL, W. Geraniol interferes with membrane functions in strains of *Candida* and *Saccharomyces*. **Lipids**, v. 23, n. 6, p. 534-538, 1988.

BARNARD, D. R.; XUE, R. Laboratory evaluation of mosquito repellents against *Aedes albopictus*, *Culex nigripalpus*, and *Ochlerotatus triseriatus* (Diptera: Culicidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 41, n. 4, p. 726–730, 2004

BELTRAME, C. A.; KUBIAK, G. B.; LERIN, L. A.; ROTTAVA, I.; MOSSI, A. J.; OLIVEIRA, D. D.; TONIAZZO, G. Influence of different sanitizers on food contaminant bacteria: effect of exposure temperature, contact time, and product concentration. **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 32, n. 2, p. 228-232, 2012.

BENSCH, K.; BRAUN, U.; GROENEWALD, J. Z. CROUS, P. W. The genus *Cladosporium*. **Studies in Mycology**, v. 72, p. 1–401, 2012.

BERBARI, S. A. G.; PASCHOALINO, J. E.; SILVEIRA, N. F. A. Efeito do Cloro na Água de Lavagem para Desinfecção de Alface Minimamente Processada. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 21, n. 2, p. 197-201, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica. **Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos**. Brasília, DF, 2006.

BRAZ FILHO, R. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 229-239, 2010.

BUFFET-BATAILLON, S. B.; BRANGER B.; CORMIER, M. M.; MALLET B.; GOUGEON, A. J. Effect of higher minimum inhibitory concentrations of quaternary ammonium compounds in clinical *E. coli* isolates on antibiotic susceptibilities and clinical outcomes. **Journal of Hospital Infection**, v. 79, n. 2, p. 141–146, 2011.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. **International journal of food microbiology**, v. 94, n. 3, p. 223-253, 2004.

BURTON, G. R. W.; ENGELKIRK, P. G. **Microbiologia para as Ciências da Saúde**. 7. ed. p. 95-106, 2005.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Approved standard M38-A**. v. 22, n. 16, Clinical and Laboratory Standards Institute, Pennsylvania, United States of America, 2002.

COELHO, C. C. S.; SILVA, O. F.; CAMPOS, R. S.; BEZERRA, V. S.; CABRAL, L. M. C. Ozonização como tecnologia pós-colheita na conservação de frutas e hortaliças: Uma revisão. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 19, n. 4, p. 369-375, 2015.

DE BONA, E. DA SILVA PINTO, F. G.; FRUET, T. K.; JORGE, T. C. M.; DE MOURA, A. C. Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (cim) de extratos vegetais aquosos e etanólicos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 81, n. 3, p. 218-225, 2014.

DE SOUZA, E. L.; SALES, C. V.; DE OLIVEIRA, C. E.; LOPES, L. A.; DA CONCEIÇÃO, M. L.; BERGER, L. R.; STAMFORD, T. C. Efficacy of a coating composed of chitosan from *Mucor circinelloides* and carvacrol to control *Aspergillus flavus* and the quality of cherry tomato fruits. **Frontiers in microbiology**, v. 6, 2015.

DEVAKI, T.; MADANKUMAR, A. Geraniol, a component of plant essential oils—a review of its pharmacological activities. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 7, n. 4, 2015.

DI PASQUA, R.; BETTS, G.; HOSKINS, N.; EDWARDS, M.; ERCOLINI, D.; MAURIELLO, G. Membrane toxicity of antimicrobial compounds from essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 12, p. 4863-4870, 2007.

EDRIS, A. E. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. **Phytotherapy Research**, v. 21, n. 4 p. 308-323, 2007.

ELSHARBINY, E. A.; AMIN, B. H.; BAKA, Z. A. 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.

FARDIN, K. M.; YOUNG, M. C. M. Antifungal potential of *Avicennia schaueriana* Stapf & Leech. (Acanthaceae) against *Cladosporium* and *Colletotrichum* species. **Letters in applied microbiology**, v. 61, n. 1, p. 50-57, 2015.

FRANCO, B. D. G. M, LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Editora Atheneu, 2008. 182 p.

GOMPERTZ, O. F.; GAMBALE, W.; PAULA, C. R.; CORREA, B. Biologia dos fungos. In: JEON, J. H.; LEE, C. H.; LEE, H. S. Food protective effect of geraniol and its congeners against stored food mites. **Journal of Food Protection**, v. 72, n. 7, p. 1468–1471, 2009.

JIANG, L.; WANG, F.; HAN, F.; PRINYAWIWATKUL, W.; NO, H. K.; GE, B. Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antimicrobial activity of water-soluble chitosan derivatives. **Journal of applied microbiology**, v. 114, n. 4, p. 956-963, 2013.

KEDIA, A.; PRAKASH, B.; MISHRA, P. K.; DUBEY, N. K. Antifungal and antiaflatoxigenic properties of *Cuminum cyminum* (L.) seed essential oil and its efficacy as a preservative in stored commodities. **International journal of food microbiology**, v. 168, p. 1-7, 2014

KIM, E.; PARK, II-K. Fumigant Antifungal activity of Myrtaceae essential oils and constituents from *Leptospermum petersonii* against three *Aspergillus* species. **Molecules**. v. 17, n. 9, p. 10459-10469, 2012.

KLEPSEK, M. E.; ERNST, E. J.; ERNST, M. E.; MESSER, S. A.; PFALLER, M. A. Evaluation of endpoints for antifungal susceptibility determinations with LY303366. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, n. 6, p. 1387-1391, 1998.

LIU, T.; ZHANG, Q.; WANG, L.; YU, L.; LENG, W.; YANG, J.; CHEN, L.; PENG, J. et al. The use of global transcriptional analysis to reveal the biological and cellular events involved in distinct development phases of *Trichophyton rubrum* conidial germination. **BMC genomics**, v. 8, n. 100, p 1-14, 2007.

MADANKUMAR, A.; JAYAKUMAR, S.; GOKULADHAS, K.; RAJAN, B.; RAGHUNANDHAKUMAR, S.; ASOKKUMAR, S.; DEVAKI, T. Geraniol modulates tongue and hepatic phase I and phase II conjugation activities and may contribute directly to the chemopreventive activity against experimental oral carcinogenesis. **European journal of pharmacology**, v. 705, n. 1, p. 148-155, 2013.

MARUYAMA, N.; TAKIZAWA, T.; ISHIBASHI, H.; HISAJIMA, T.; INOUE, S.; YAMAGUCHI, H.; ABE, S. Protective activity of geranium oil and its component, geraniol, in combination with vaginal washing against vaginal candidiasis in mice. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 31, n. 8, p. 1501–1506, 2008.

MEDEIROS, V. P. B. **Microbiota fúngica anemófila em indústria de polpa de frutas: importância do controle higiênico sanitário**. 2015. 100f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Nutrição) - Universidade Federal de Campina Grande, Cuité, 2015

MEZZARI, A. **Fungos anemófilos em Porto Alegre, RS**. 2002. 75 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2002.

MORANDIM, A. A.; PIN, A. R.; PIETRO, N. A. S.; ALECIO, A. C.; KATO, M. J.; YOUNG, C. M.; OLIVERIRA, J. E.; FURLAN, M. Composition and screening of antifungal activity against *Cladosporium sphaerospermum* and *Cladosporium cladosporioides* of essential oils of leaves and fruits of Piper species. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 37, p. 6135-6139, 2010

MOTA, K. S. L.; PEREIRA, F. O.; OLIVEIRA, W. A.; LIMA, I. O.; LIMA, E. O. Antifungal Activity of *Thymus vulgaris* L. Essential Oil and Its Constituent Phytochemicals against *Rhizopus oryzae*: Interaction with Ergosterol. **Molecules**, v. 17, n. 12, p. 14418-14433, 2012.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of Natural Products**, v. 70, n. 3, p. 461-77, 2007.

NICOSIA, M. G. L. D.; PANGALLO, S.; RAPHAEL, G.; ROMEO, F. V.; STRANO, M. C.; RAPISARDA, P.; 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.

OGÓREK, R.; LEJMAN A.; PUSZ1, W; MIŁUCH, A.; MIODYŃSKA, P. Characteristics and taxonomy of *Cladosporium* fungi. **Mikologia lekarska**, v. 19, n. 2, p. 80-85, 2012.

OLIVEIRA, M. M. M. D.; BRUGNETRA, D. F.; PICCOLI, R. H. Biofilmes microbianos na indústria de alimentos: uma revisão. **Rev. Inst. Adolfo Lutz** (Impr.), São Paulo, v. 69, n. 3, p. 277-284, 2010.

PADUCH, R.; KANDEFER-SZERSZEŃ, M.; TRYTEK, M.; FIEDUREK, J. Terpenes: substances useful in human healthcare. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis (Warsz)**, v. 55, n. 5, p. 315-327, 2007.

PELCZAR, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia: Conceitos e Aplicações**-[Reimpressão]-São Paulo: Pearson Education, 2012.

PEREIRA, F. D. O.; MENDES, J. M.; LIMA, I. O.; MOTA, K. S. D. L.; OLIVEIRA, W. A. D.; LIMA, E. D. O. Antifungal activity of geraniol and citronellol, two monoterpenes alcohols, against *Trichophyton rubrum* involves inhibition of ergosterol biosynthesis. **Pharmaceutical biology**, v. 53, n. 2, p. 228-234, 2015.

PEREIRA, F. D. O.; WANDERLEY, P. A.; VIANA, F. A. C.; LIMA, R. B. D.; SOUSA, F. B. D.; SANTOS, S. G. D.; LIMA, E. D. O. Effects of *Cymbopogon winterianus* Jowitt ex Bor essential oil on the growth and morphogenesis of *Trichophyton mentagrophytes*. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 47, n. 1, p. 145-153, 2011a.

PEREIRA, F. O.; WANDERLEY, P. A.; VIANA, F. A. C.; LIMA, R. B.; SOUSA, F. B.; LIMA, E. O. Growth inhibition and morphological alterations of *Trichophyton rubrum* induced by essential oil from *Cymbopogon winterianus* Jowitt ex Bor. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 1, p. 233-242, 2011b.

PINTO, E.; GONÇALVES, M. J.; HRIMPENG, K.; PINTO, J.; VAZ, S.; VALE-SILVA, L. A.; SALGUEIRO, L. Antifungal activity of the essential oil of *Thymus villosus* subsp. lusitanicus against *Candida*, *Cryptococcus*, *Aspergillus* and dermatophyte species. **Industrial Crops and Products**, v. 51, p. 93-99, 2013.

QUARENTEI, S. S.; AQUINO, S; GERMANO, M. I. S.; GERMANO, P. M. L. Princípios gerais de higienização. In: GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos: qualidade das matérias-primas, doenças transmitidas por alimentos, treinamento de recursos humanos**. 4ª ed. Barueri, SP. Manole, 2011. Cap. 29. P.631-664.

RASOOLI, I., ABYANEH, M.R. Inhibitory effect of thyme oils on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. **Food Control**, v. 15, p. 79–483, 2004.

REIS, S. L.; MANTELLO, A. G.; MACEDO, J. M.; GELFUSO, E. A.; DA SILVA, C. P.; FACHIN, A. L.; BELEBONI, R. O. Typical Monoterpenes as Insecticides and Repellents against Stored Grain Pests. **Molecules**, v. 21, n. 3, p. 258, 2016.

RIQUELME, M. Tip growth in filamentous fungi: a road trip to the apex. **Annual review of microbiology**, v. 67, p. 587-609, 2013.

RUIZ, M. D. P.; ORDÓÑEZ, R. M.; ISLA, M. I.; SAYAGO, J. E. Activity and mode of action of *Parastrephia lepidophylla* ethanolic extracts on phytopathogenic fungus strains of lemon fruit from Argentine Northwest. **Postharvest Biology and Technology**, v. 114, p. 62-68, 2016.

SANTOS; A. S. **Óleos essenciais: uma abordagem econômica e industrial** - Rio de Janeiro: Interciência, 2011.

SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**- Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010. 388 p.

SILVA JR, E. A. **Manual de Controle Higiênico-Sanitário em Serviços de Alimentação**. 6. ed. São Paulo: Livraria Varela, 2008. p. 41-50

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER. Óleos voláteis. In: **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2007. 475p

TIAN, J.; HUANG, B.; LUO, X.; ZENG, H.; BAN, X.; HE, J.; WANG, Y. The control of *Aspergillus flavus* with *Cinnamomum jensenianum* Hand.-Mazz essential oil and its potential use as a food preservative. **Food Chemistry**, v. 130, n. 3, p. 520-527, 2012.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. Artmed, p. 335-347, 2012.
TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 8. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2008 cap. 65. P 479-491.

TZORTZAKIS, N. G.; ECONOMAKIS, C. D. Antifungal activity of lemongrass (*Cymbopogon citratus* L.) essential oil against key postharvest pathogens. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 8, n. 2, p. 253-258, 2007.

VAN ZYL, R. L.; SEATLHOLO, S. T.; VAN VUUREN, S. F.; VILJOEN, A. M. The biological activities of 20 nature identical essential oil constituents. **Journal of Essential Oil Research**, v. 18, p. 129-33, 2006.

WISEMAN, D. A.; WERNER, S. R.; CROWELL, P. L. Cell cycle arrest by the isoprenoids perillyl alcohol, geraniol, and farnesol is mediated by p21Cip1 and p27Kip1 in human pancreatic adenocarcinoma cells. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 320, n. 3, p. 1163–1170, 2007.

ZOPPAS, A.C.B.; BARRERA, V. M. R.; GONZÁLES, F. D. Distribuição de esporos de *Cladosporium* spp no ar atmosférico de Caxias do Sul, RS, Brasil, durante dois anos de estudo. **Revista brasileira de alergia e imunopatologia**, v. 2, n. 34, p. 55-59 2011.