

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE

CENTRO DE EDUCAÇÃO E SAÚDE

UNIDADE ACADÊMICA DE SAÚDE

CURSO DE BACHARELADO EM NUTRIÇÃO

GEZAILDO SANTOS SILVA

**ANÁLISE DOS EFEITOS INIBITÓRIOS DE CITRONELOL
SOBRE O CRESCIMENTO DE FUNGOS CONTAMINANTES**

DO GÊNERO *Cladosporium*

Cuité/PB

2015

GEZAILDO SANTOS SILVA

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

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à 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

2015

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA NA FONTE

S586a Silva, Gezaildo Santos.

Análise dos efeitos inibitórios de citronelol sobre o crescimento de fungos contaminantes do gênero *Cladosporium*. / Gezaildo Santos Silva – Cuité: CES, 2015.

61 fl.

Monografia (Curso de Graduação em Nutrição) – Centro de Educação e Saúde / UFCG, 2015.

Orientador: Fillipe de Oliveira Pereira.

1. Citronelol. 2. Citronelol – fungos – inibição. 3. *Cladosporium*.
I. Título.

Biblioteca do CES – UFCG

CDU 612.3

Responsabilidade Rosana Amâncio Pereira – CRB 15 – 791

GEZAILDO SANTOS SILVA

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

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à 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.

Aprovado em ____ de _____ de _____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Fillipe de Oliveira Pereira

Universidade Federal de Campina Grande

Orientador

Prof. Dr. Wylly Araújo de Oliveira

Universidade Federal de Campina Grande

Examinador

Prof. Dra. Igara Oliveira Lima

Universidade Federal de Campina Grande

Examinador

Cuité/PB

2015

**À Deus, que me deu o dom e a força necessária para
que eu sempre pudesse seguir adiante.**

Aos meus pais, por todo amor, apoio e motivação.

Ao meu orientador, por toda a sua dedicação a mim,

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, porque foi através de sua bondade ao me conceder o dom da vida, a saúde e a perseverança, que eu pude caminhar e buscar com sucesso os meus objetivos durante todo esse período de curso. Também agradeço-o porque todas as vezes que eu falhei, errei e desacreditei, ele nunca desistiu de mim, e assim, me reergueu e me fez seguir adiante.

Dedico meus agradecimentos de forma infinita a minha mãe Regina, pois ela foi todo esse tempo minha base, minha segurança, a fortaleza onde pude me resguardar para me acalmar perante meus medos. Foi quem caminhou todo esse tempo ao meu lado, quem suportou minhas noites mal dormidas, meus choros incontidos e minhas aflições. Foi quem segurou a minha mão e nunca me deixou cair, quem compartilhou todas as minhas tristezas. Foi quem me deu todas as palavras de conforto que eu precisava ouvir. Agradeço também de forma grandiosa, pois todas as vezes em que eu pude comemorar minhas conquistas e vitórias, ou que eu pude cantar minhas felicidades, ela estava ao meu lado para sorrir comigo, e chorar de tanta emoção. Com você tudo foi sempre mais fácil, TE AMO MÃE.

Agradeço ao meu pai Lucemar, que sempre orou por mim na distância, e me ofereceu o conforto e o ombro amigo diante da sua presença. Agradeço por todo o apoio e as orientações para que eu pudesse escolher os melhores caminhos a seguir.

Agradeço de forma especial as minhas irmãs Rejane e Izailda, ao meu cunhado Jairo, e meu sobrinho Ariedson, que me deram suporte e confiança sempre que precisei, me ajudando para que eu pudesse cumprir com minhas demandas e tarefas do dia a dia com sucesso.

Agradeço a Gerusa e a Ceyfa, minha mãe e irmã de coração, que sempre me alegraram com suas palavras de incentivo e positividade, e com o acalento quando me senti desanimado.

Agradeço a minha companheira Jessica Samara, que me apoiou em todas as minhas decisões todo esse tempo, e jamais saiu do meu lado a cada desafio surgido, ou por cada momento que eu tive que me afastar por ter tantas tarefas a cumprir.

Agradeço a toda a minha família, que de forma direta e indireta, pois muitos estiveram longe durante estes anos de curso, sempre me incentivaram e me deram forças através de mensagens, ligações e palavras amigas, para que eu reunisse sempre forças e conseguisse seguir trilhando o caminho que escolhi para ser bem sucedido no futuro.

Agradeço de forma mais que especial ao meu orientador, mestre e acima de tudo amigo Fillipe Pereira, que me concedeu tantas oportunidades importantes dentro da universidade, com intuito de sempre me ver crescer. Que me repassou de forma sempre serena e humilde seus

conhecimentos, e que estive a minha disposição sempre que precisei. Agradeço por toda sua paciência, por sua forma sabia de falar, e por sua vontade de me ensinar o que era mais correto quando eu não atendi as suas expectativas para determinadas tarefas que me foram designadas. E agradeço ainda de forma grandiosa por todo seu apoio e confiança, pois por sempre acreditar em minha capacidade me concedeu a chance de ser seu monitor, o que fiz com orgulho e com prazer por 2 anos, e conduzir este projeto de pesquisa, o qual me dediquei para realiza-lo com o melhor desempenho possível.

Dedico meus agradecimentos com muito carinho a Maria Elieidy, que durante todos esses anos de graduação, me deu sua mão e me acompanhou de perto para que eu não me perdesse nesta longa caminhada. Sou muito grato também porque além de ótima professora ela se tornou uma amiga muito admirada, e uma mãe para mim, que jamais hesitou em me escutar nas horas que precisei dispor de seus conhecimentos, e por muitas vezes que me aconselhou como amiga, quando percebeu minhas aflições. Espero que nossa amizade seja eternizada, e que eu possa a perder apenas de vista, mas nunca do coração.

Agradeço aos professores Wylly Araújo e Igara Oliveira, que aceitaram com entusiasmo participar da minha banca de defesa de trabalho, pelos ensinamentos, conversas e pela amizade construída durante a graduação.

Com imensa felicidade, agradeço aos meus companheiros de laboratório Aldeir Sabino, Ana Camila, Gustavo Nunes, Islaine Lima, Kaltz Victor, Mara Rúbia, Valeska Sousa e Yamma Klívia, por toda a ajuda e parceria durante a execução dos trabalhos para a conclusão desta pesquisa.

De forma muito especial dedico meus agradecimentos a Viviane Priscila Barros, porque além de ser parceira de laboratório, dividindo a bancada, e de curso dividindo conhecimentos, nos tornamos amigos de verdade, dividindo cumplicidade, segredos, confiança, sorrisos e muitos momentos especiais de alegrias e também de tristezas. Espero que essa nossa amizade se expanda para muito além da universidade, e que ela dure para sempre.

Jamais poderia deixar de agradecer a Maria Josélia, que iniciou esta caminhada ao meu lado, me apoiando, acreditando no meu potencial, e que seguiu sempre torcendo por mim, mesmo depois dos nossos desencontros ocasionados pelos deveres acadêmicos.

Com muita alegria agradeço a Thaila Miranda, que na maior parte deste curso viveu histórias magníficas ao meu lado. Foram momentos muitas vezes tensos que passamos juntos, muitas lágrimas derramadas, mas também muitas alegrias festejadas, gargalhadas incontidas, e confiança exacerbada, o que nos uniu muito nesses últimos anos.

Também agradeço de forma particular e especial a Miniamy Nobrega, Rita de Cássia, Ryan David, Louise Iara, Allane Costa, Nuclécia Caetano, Carine Gomes, Janaína Costa, Izadora Souza, Rosimary Nogueira e Silvana Medeiros, pela ajuda, parceria e cumplicidade total nas práticas e estágios. Aprendi muito com todos vocês. Na presença de cada um, foi tudo mais fácil e divertido de ser realizado.

Agradeço de forma especial a todos os meus colegas de curso, pois foi pelo convívio diário, a confiança que depositaram em mim quando fui solicitado, e pelo apoio quando precisei, que todas as dificuldades encontradas nesse período de graduação foram mais fáceis de enfrentar.

Agradeço a todos os amigos de infância e de faculdade por toda a ajuda nos momentos mais difíceis desta longa caminhada, e por estarem na torcida por mim até hoje. Agradeço também aqueles que mesmo estando distantes continuam sempre a me passar sua torcida e energia positiva. Espero contar sempre com este apoio de todos.

Agradeço a todos os professores que fazem, ou já fizeram parte do corpo docente do curso de nutrição durante a minha graduação, pois todos contribuíram de forma muito efetiva e diferenciada para meu amadurecimento como pessoa e, para a construção do meu futuro como profissional.

Agradeço imensamente a Universidade Federal de Campina Grande – Campus Cuité, por me receber de forma calorosa, permitindo-me realizar um curso brilhante, e também meus trabalhos através da utilização de suas repartições físicas.

Agradeço ao diretor da UFCG – Cuité, Ramilton Marinho e ao vice diretor José Justino Filho, por toda atenção prestada no dia a dia, e suporte quando solicitado.

Em particular, faço agradecimentos as nutricionistas Gabriela de Lucena, Thaís Guilherme, Verônica Lima, Luana Kelle, Vitória Ramalho, Shirley Sales, Maria Emília, Kennya Christina, Sandra Regina, Amanda Gonsalves, Ana Cabral, Janilda, Clenise e Jaquelânia, por abrirem as portas de seus estabelecimentos de trabalho para que eu pudesse realizar minhas práticas e estágios. Meus dias de trabalhos nestes locais foram de grande valor e de grande construção de conhecimentos, o que me fizeram agregar muita experiência para que eu possa atuar de forma mais segura futuramente.

Muito obrigado a todos!

Viva!

Bom mesmo é ir à luta com determinação,

Abraçar a vida com paixão,

Perder com classe e vencer com ousadia,

Porque o mundo pertence a quem se atreve,

E a vida é “muito” para ser insignificante.

Charles Chaplin

RESUMO

SILVA, G. S. **Análise dos efeitos inibitórios de citrionelol sobre o crescimento de fungos contaminantes do gênero *Cladosporium***. 2015. 61 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Nutrição) - Universidade Federal de Campina Grande, Cuité, 2015.

O gênero *Cladosporium* spp. é constituído por um grupo de fungos filamentosos caracteristicamente escuros. São agentes contaminantes importantes para as indústrias produtoras de alimentos, as quais sofrem com as perdas de seus produtos por colonização destes fungos. O fato de serem potenciais contaminantes os tornam relevantes para investigadores que atuam em estudos que buscam drogas para o controle do crescimento fúngico. Dentro desta temática, o estudo acerca da ação de produtos naturais com atividade antifúngica vem crescendo cada vez mais. E dentre os produtos naturais com este potencial, os monoterpenos recebem importante foco por ter ação antifúngica comprovada. Por isso, no presente trabalho foi investigada a ação antifúngica do monoterpeno citrionelol frente a cepas de *Cladosporium oxysporum* URM 5412 e 5234 e *Cladosporium cladosporioides* URM 5737 e 6246. Para este fim, foram determinadas as concentrações inibitórias mínimas (CIM) e fungicida mínimas (CFM) do citrionelol, e quais os efeitos de diversas concentrações (1/2CIM, CIM e 2xCIM) sobre as características morfológicas de crescimento micelial e germinação dos conídios fúngicos. Os resultados obtidos na CIM foram de 256 µg/mL para a cepa *C. cladosporioides* URM 5737 e 512 µg/mL para as cepas *C. oxysporum* URM 5234, *C. oxysporum* URM 5412 e *C. cladosporioides* URM 6246. Os resultados da CFM se mostraram maiores que a CIM, sendo 512 µg/mL para a cepa *C. cladosporioides* URM 5737, 1024 µg/mL para as cepas *C. oxysporum* URM 5412 e *C. cladosporioides* URM 6246 e 2048 µg/mL para a cepa *C. oxysporum* URM 5234. Nos ensaios realizados para avaliar a ação do citrionelol frente ao crescimento micelial e a germinação de conídios das cepas *C. oxysporum* URM 5234 e *C. cladosporioides* URM 5737, foi possível observar que ambas as cepas tiveram suas características morfológicas inibidos pelas diferentes concentrações testadas ($p < 0,05$). O citrionelol demonstrou ação antifúngica significativa sobre as cepas de *Cladosporium* spp, e desta maneira, desponta como um promissor constituinte ativo para sanitizantes de aplicação em alimentos nas indústrias. Porém, antes de sua utilização, são necessários outros estudos mais específicos para amenizar o seu acentuado aroma, que pode alterar as características sensoriais dos alimentos.

Palavras chave: *Cladosporium* spp.; monoterpeno; citrionelol; alimentos.

ABSTRACT

SILVA, G. S. **Analysis of the inhibitory effects of citronellol on the growth of contaminating fungi of the genre *Cladosporium***. 2015. 61 f. Work of Conclusion of Course (Graduation in Nutrition) - Federal University of Campina Grande, Cuité, 2015.

The genre *Cladosporium* spp. is comprises of a group of filamentous fungi characteristically dark. They are important contaminating agents for food producers industries, which suffer with the loss of its products by colonization of these fungi. The facts that they are potential contaminants make them relevant to researchers that work in studies that look for drugs to control fungal growth. Within this theme, the study of the action of natural products with antifungal activity is growing more and more. And among the natural products with this potential, the monoterpenes receive important focus for its proven antifungal action. Therefore, in this study it was investigated the antifungal activity of the monoterpene citronellol against strains of *Cladosporium oxysporum* URM 5412 and 5234 and *Cladosporium cladosporioides* URM 5737 and 6246. For this purpose, were determined the minimum inhibitory concentrations (MIC) and minimum fungicidal (MFC) of citronellol, and what effects of various concentrations (1/2 MIC, MIC and 2xMIC) on the morphological characteristics of mycelial growth and germination of fungal conidia. The results of the MIC were 256 µg/mL for the strain *C. cladosporioides* URM 5737 and 512 µg/mL for strains *C. oxysporum* URM 5234, *C. oxysporum* URM 5412 and *C. cladosporioides* URM 6246. The results of MFC were higher than MIC, being 512 µg/mL for strain *C. cladosporioides* URM 5737, 1024 µg/mL for strains *C. oxysporum* URM 5412 and *C. cladosporioides* URM 6246 and 2048 µg/mL for strain *C. oxysporum* URM 5234. In trials conducted to evaluate the effects of citronellol against the mycelial growth and spore germination of strains *C. oxysporum* URM 5234 and *C. cladosporioides* URM 5737, it was observed that both strains had their morphological characteristics inhibited by the different concentrations tested ($p < 0,05$). Citronellol showed significant antifungal activity on the strains of *Cladosporium* spp, and thereby, emerging as a promising active constituent for the application of sanitizers in food in industries. However, before its utilization, are necessary others specific studies to soften its sharp aroma, which can alter the sensory characteristics.

Keywords: *Cladosporium* spp.; monoterpene; citronellol; food.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Microscopia óptica de hifas e conídios de <i>Cladosporium</i> spp.....	18
Figura 2 – Micélio aéreo de colônia de fungo do gênero <i>Cladosporium</i> spp.....	19
Figura 3 – Estrutura química do citronelol.....	25
Figura 4 – Percentual de massa micelial seca produzido por <i>Cladosporium oxysporum</i> URM 5234 na ausência (controle) e na presença de citronelol 1/2CIM (256 µg/mL), CIM (512 µg/mL) e 2xCIM (1024 µg/mL).....	35
Figura 5 – Percentual de massa micelial seca produzido por <i>Cladosporium cladosporioides</i> URM 5737 na ausência (controle) e na presença de citronelol 1/2CIM (128 µg/mL), CIM (256 µg/mL) e 2xCIM (512 µg/mL).....	35
Figura 6 – Percentual de conídios germinados de <i>Cladosporium oxysporum</i> URM 5234 na ausência (controle) e na presença de citronelol 1/2CIM (256 µg/mL), CIM (512 µg/mL) e 2xCIM (1024µg/mL).....	37
Figura 7 – Percentual de conídios germinados de <i>Cladosporium cladosporioides</i> URM 5737 na ausência (controle) e na presença de citronelol 1/2CIM (128 µg/mL), CIM (256 µg/mL) e 2xCIM (512 µg/mL).....	37

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

ABS	Ágar Batata Dextrose
ASD	Ágar Sabouraud Dextrose
aw	Atividade De Água
CFM	Concentração Fungicida Mínima
CIM	Concentração Inibitória Mínima
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMAPP	Dimetilalilpirofosfato
e.p.	Erro Padrão
GRAS	Geralmente Considerados Como Seguros
HMG-CoA	3-Hidróxi-3-Metilglutaril-CoA
IPP	Isopentenil-Pirofosfato
NaCl	Cloreto de Sódio
pH	Potencial Hidrogeniônico
CES	Centro de Educação e Saúde
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
EUA	Estados Unidos Da América
FDA	<i>United State Food and Drug Administration</i>
UAS	Unidade Acadêmica de Saúde
UFCG	Universidade Federal de Campina Grande
°C	Grau Célsius
mL	Mililitro
µL	Microlitros
µg/mL	Micrograma por Mililitro
µm	Micrômetro
%	Percentual

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	16
2.1 OBJETIVO GERAL	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	17
3.1 FUNGOS CONTAMINANTES	17
3.2 <i>Cladosporium</i> spp.	18
3.3 DETERIORAÇÃO DE ALIMENTOS POR FUNGOS	20
3.4 CONTROLE DO CRESCIMENTO MICROBIANO EM INDÚSTRIAS DE ALIMENTOS	21
3.5 CONSIDERAÇÕES SOBRE CITRONELOL	23
4 MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1 LOCAL DE TRABALHO	26
4.2 CITRONELOL	26
4.3 CEPAS FÚNGICAS	26
4.4 MEIOS DE CULTURA	26
4.5 INÓCULO	27
4.6 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)	27
4.7 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO FUNGICIDA MÍNIMA (CFM)	28
4.8 EFEITOS SOBRE O CRESCIMENTO MICELIAL	28
4.9 EFEITOS SOBRE A GERMINAÇÃO DOS CONÍDIOS	28
4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA	29
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
6 CONCLUSÕES	42
REFERÊNCIAS	43
APÊNDICE	56

1 INTRODUÇÃO

Os fungos pertencem ao reino *Fungi*, constituído de organismos unicelulares conhecidos por leveduras e seres pluricelulares chamados de fungos filamentosos (MINAMI, 2003). Os fungos são seres ubíquos e se dispersam na natureza através do ar atmosférico ou por outras vias como água, insetos, homem e animais. Eles são estudados como agentes etiológicos de doenças em humanos, animais e nas plantas, bem como quanto ao seu papel como contaminantes ou deteriorantes de alimentos (ENGELKIRK; DUBEN-ENGELKIRK, 2012; GOMPERTZ et al., 2008).

Os fungos contaminantes apresentam-se de grande relevância para estudos na área de alimentos bem como na área clínica, visto que esses fungos podem causar quadros de infecção oportunistas por vezes fatais, em indivíduos imunocomprometidos (CURTIS et al., 2005). No tocante à contaminação de alimentos por fungos, isto resulta em perdas para o produtor de alimentos e para o consumidor, pois estes micro-organismos também podem produzir toxinas.

Dentre os diversos grupos de fungos contaminantes existe o gênero *Cladosporium* spp., constituído por fungos demácios, dematiáceos ou negros. Os fungos escuros são formados por grupos heterogêneos com pigmentação melanogênica na parede das hifas. Esses fungos são geralmente oportunistas ou contaminantes, isolados do solo e da matéria orgânica e alguns são fitopatógenos (LACAZ et al., 2002). Devido a muitas das espécies de *Cladosporium* serem cosmopolitas, são considerados agentes contaminantes, decompositores ou deteriorantes de alimentos ou produtos industriais, causam alergias ou mesmo infecções em plantas e animais (BENSCH et al., 2012). Portanto, é um gênero de grande interesse para os investigadores em uma ampla variedade de áreas de estudos, dando-se ênfase principalmente aqueles que visam à busca de drogas com aplicabilidade no controle de crescimento fúngico.

É dentro desse contexto que muitos estudos de atividade antifúngica *in vitro* têm sido realizados com produtos naturais, a exemplo dos terpenos. Os terpenos são compostos largamente distribuídos na natureza, constituindo uma ampla variedade de compostos vegetais e dotados de potencial atividade antifúngica contra fungos patogênicos e contaminantes (BAKKALI et al., 2008).

Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi investigar até quanto do monoterpene citronelol, uma substância natural encontrada em óleos essenciais de plantas, seria necessário para inibir o crescimento de cepas do gênero *Cladosporium* spp., e qual a influência de suas diversas concentrações sobre o crescimento micelial e a germinação de conídios.

Embora o potencial antifúngico de citrionelol seja relatado na literatura, não há registros de sua atividade frente a *Cladosporium* spp. Fatores relevantes como estes supracitados que em conjunto com uma possível contribuição para as áreas de pesquisas no âmbito alimentício, impulsionando para a realização deste estudo.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

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

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

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

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 FUNGOS CONTAMINANTES

Os fungos são micro-organismos que possuem organização celular e DNA delimitado por dupla membrana, parede celular rígida formada de polímeros de amino-açúcares (LACAZ et al., 2002; MINAMI, 2003). São organismos que constituem um grupo bem diversificado, formado de leveduras, fungos filamentosos e cogumelos, os últimos conhecidos como macrofungos, de menor importância clínica. São seres estudados como agentes causadores de doenças em humanos, animais e nas plantas, bem como quanto ao seu papel na indústria de alimentos e medicamentos como contaminantes ou produtores de substâncias tóxicas (ENGELKIRK; DUBEN-ENGELKIRK, 2012; GOMPERTZ et al., 2008).

A denominação “fungos contaminantes” é aplicada aos diversos gêneros fúngicos que colonizam o ambiente, cujas estruturas fúngicas podem ser veiculadas através do ar atmosférico ou por outras vias como água, insetos, homem e animais. Estes fungos podem causar a deterioração de materiais e alimentos, alergias, intoxicações e infecções (MEZZARI et al., 2002; SIDRIM; ROCHA, 2012).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, uma doença de origem alimentar é uma doença, geralmente de natureza infecciosa ou tóxica, provocada por agentes que entram no organismo por meio da ingestão de alimentos ou de água (WHO, 2002). Neste caso em especial, os alimentos podem funcionar como veículos para muitos micro-organismos causadores de doenças de origem alimentar, os quais podem chegar a um novo hospedeiro com condições adequadas para colonização (NEWELL et al., 2010).

A contaminação dos alimentos pode ter seu início durante a produção de matéria-prima a ser utilizada nas indústrias de alimentos e passar por etapas importantes como de transporte, recepção e armazenamento. Durante a manipulação, pode haver contaminação por condições inadequadas de higiene de manipuladores, equipamentos, utensílios, ambiente e condições inapropriadas de armazenamento dos produtos prontos para consumo. Após as etapas de preparação e industrialização, os alimentos podem ainda ser contaminados por serem expostos em grandes centros de distribuição, supermercados, restaurantes, nas mercearias e residências (ALMEIDA; COSTA; GUINÉ, 2010).

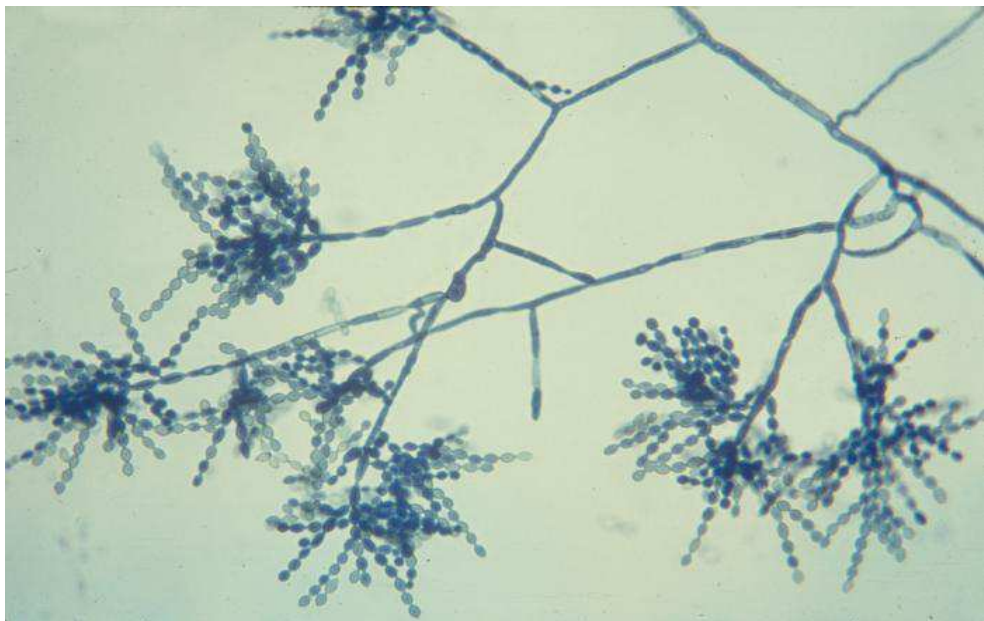
Entre as principais fontes de contaminação dos alimentos estão o meio ambiente, os manipuladores, os vetores e pragas urbanas que incluem animais e insetos, além de

equipamentos, utensílios e componentes estruturais de prédios mal higienizados. Assim, a contaminação microbiológica varia com o tipo de contaminante e de produto que foi contaminado. (SILVA JR, 1999; VENERANDA, 2004).

3.2 *Cladosporium* spp.

Entre os grupos de fungos contaminantes, merecem destaque aqueles conhecidos por fungos escuros, negros ou dematiáceos. Os fungos dematiáceos constituem um grupo de fungos encontrados na natureza e que possuem como característica a presença de melanina, responsável pela pigmentação escurecida de seus conídios e hifas (Fig. 1) e que parece se comportar como um fator de virulência. Mais de 100 espécies e 60 gêneros destes fungos estão implicados em um amplo espectro de infecções humanas (REVANCAR et al, 2002), como por exemplo, *Piedrae hortae*, *Hortae werneckii*, *Hendersonula toruloidea*, *Curvularia* spp, e *Alternaria* spp. (MOREIRA et al., 2007).

Figura 1 – Microscopia óptica de hifas e conídios de *Cladosporium* spp.



Fonte: Alvo (2015).

O gênero *Cladosporium* (Fig. 2), é considerado um dos mais cosmopolitas e de maior concentração na atmosfera, particularmente em regiões temperadas, e que colonizam os mais

diversos ambientes e substratos (ZOPPAS; BARRERA; GONZÁLES, 2011). Criado por Link, em 1815 é um dos maiores e mais heterogêneos gêneros fúngicos e, abrange muitas espécies de fungos contaminantes e oportunistas dematiáceos que são encontrados como saprófitas no solo e em materiais em decomposição. São fungos de crescimento lento, atingindo a maturidade dentro de 21 dias. Caracterizam-se pela produção de colônias aveludadas, planas ou ocasionalmente puntiformes, com tonalidade que vai do verde oliva ao marrom escuro e reverso preto (BENSCH et al., 2012; TAMSIKAR; NAIDU; SINGH, 2006).

Figura 2 – Micélio aéreo de colônia de fungo do gênero *Cladosporium* spp.



Fonte: Atlas de Micologia (2015).

Esses fungos normalmente podem ser disseminados pelo ar, e quanto maior for esse fluxo e menor a umidade, maior será sua concentração no ambiente (ZOPPAS; BARRERA; GONZÁLES, 2011). As espécies mais isoladas são *Cladosporium elatum*, *C. herbarum*, *C. sphaerospermum*, *C. cladosporioides*, *C. carrionii* e *C. oxysporum* (TASIC; TASIC, 2007). Embora não seja relatado que espécies de *Cladosporium* produzem micotoxinas de grande preocupação, é válido ressaltar que são fungos produtores de compostos orgânicos voláteis associados com odores que deterioram alimentos (RIVAS; THOMAS, 2005).

3.3 DETERIORAÇÃO DE ALIMENTOS POR FUNGOS

A importância dos fungos para os alimentos foi evidenciada a partir do surgimento de produtos preparados, os quais começaram a ser relacionados a doenças por sua contaminação e também por sua deterioração devido a métodos de conservação inapropriados (CARVALHO, 2010).

Conforme Silva (2008):

Os fungos são micro-organismos largamente distribuídos no meio ambiente, incluindo o ar, a água, o solo e o pó. Como consequência os alimentos podem tornar-se contaminados com uma ampla variedade de espécies fúngicas originárias de fontes ambientais e que sob condições favoráveis podem multiplicar-se nos alimentos e provocar deterioração.

Todos os fungos conhecidos, com poucas exceções, são disseminados por esporos ou conídios (MORAES; PAES; HOLANDA, 2010), estruturas que além de servirem como órgãos de reprodução, são responsáveis pela fácil disseminação dos fungos pelo ambiente, o que pode culminar na contaminação e deterioração dos alimentos. Estes fatores são de importância para as indústrias, principalmente porque os fungos apresentam facilidade para crescer em diversos tipos de substratos que possuem fatores intrínsecos como baixa atividade de água (a_w), pH reduzido (3,0 e abaixo), e em ampla faixa de temperatura ($< 0^\circ\text{C}$ a 40°C), que muitas vezes são inviáveis para o crescimento de outros micro-organismos (SILVA, 2008).

Os fungos são seres heterotróficos de nutrição absorptiva. Desta forma, para obterem energia para seu desenvolvimento e realização dos processos biológicos, atuam como biodegradadores naturais de macromoléculas orgânicas disponíveis no meio (polissacarídeos, proteínas, ácidos nucleicos, lignina e lipídios). Para absorverem os nutrientes constituintes dessas moléculas na forma de monômeros, é necessário a secreção de enzimas que atuem na hidrólise e decomposição daqueles polímeros, pois é assim que os nutrientes podem atravessar a parede celular e a membrana plasmática (MORAIS, 2014).

O crescimento fúngico sobre os alimentos provoca efeitos de descoloração, odor desagradável, perda de matéria orgânica, mudanças químicas e nutricionais e perda de sua qualidade. Fatos como estes fazem com que os alimentos sejam rejeitados tanto pelas indústrias como pelos consumidores (HERMANN, 2006; SILVA, 2008).

Além de alterar as características organolépticas, os fungos ainda podem produzir sobre os alimentos compostos tóxicos chamados de micotoxinas (HERMANN, 2006). Estes são metabólitos secundários produzidos por fungos filamentosos e que possuem efeitos tóxicos,

carcinogênicos e teratogênicos, tanto para humanos como para animais, através do consumo de alimentos contaminados (SANTOS, 2014).

Dentro deste contexto, é importante destacar que a qualidade dos produtos contaminados pode ser afetada, e que estes micro-organismos além de causarem alterações nos alimentos podem ser patogênicos para os seres humanos. Ao mesmo tempo, é importante salientar que estas não são apenas consequências para o consumidor, mas também para a integridade econômica das indústrias envolvidas no seu fornecimento (GONZÁLEZ et al., 2010).

Dentre os principais fungos considerados contaminantes de alimentos, principalmente de sementes e grãos, estão os gêneros *Aspergillus* spp., *Cladosporium* spp., *Fusarium* spp., *Penicillium* spp., e *Rhizopus* spp (BONIFÁCIO et al., 2015). O desenvolvimento destes em grãos e subprodutos, tem como resultado a redução do seu valor nutritivo, pois os nutrientes disponíveis são metabolizados e utilizados por esses micro-organismos (SILVA, 2008).

No caso de frutos, os fungos filamentosos causam alterações que contribuem para o amolecimento dos mesmos, consequentemente aumentando a fragilidade do tecido vegetal dando a possibilidade posterior de penetração e contaminação por outros tipos de micro-organismos (ALMEIDA; COSTA; GUINÉ, 2010).

Dessa forma, os alimentos deteriorados são um problema sério para as indústrias, pois além de as mesmas elaborarem produtos pouco aceitáveis para o consumo na produção em larga escala, essa deterioração pode trazer ainda outras grandes consequências, principalmente se a matéria prima utilizada possuir elevado valor econômico (PEREIRA, 2011). Assim, as contaminações citadas podem fazer com que os alimentos tornem-se impróprios para o consumo humano, resultando em grandes perdas econômicas (HERMANNNS, 2006).

3.4 CONTROLE DO CRESCIMENTO MICROBIANO EM INDÚSTRIAS DE ALIMENTOS

Atualmente uma das maiores preocupações das indústrias produtoras de alimentos é a manutenção da qualidade de seus produtos após sua fabricação. Por isso, há muito tempo são utilizados vários métodos que inibem ou eliminam possíveis transformações químicas, bioquímicas e biológicas nos alimentos durante sua produção. Por isso, além da higienização dos alimentos, é importante a preocupação com a limpeza dos equipamentos utilizados no processamento dos alimentos, evitando sobre os mesmos a proliferação de micro-organismos e contaminação por resíduos de processos anteriores (GORMEZANO, 2007). Portanto, esses

procedimentos para controle de crescimento de micro-organismos são de fundamental importância para evitar ao homem, doenças alimentares, e aos produtos, diminuição da vida de prateleira, recolhimento dos pontos de venda, e conseqüentemente sua destruição (NASCIMENTO; DELGADO; BARBARIC, 2010).

Para Jaculi (2009), “A qualidade do alimento depende do controle exercido sobre os perigos químicos, físicos e biológicos, que permeiam todas as etapas da cadeia alimentar, iniciada na produção primária e finalizada no consumo”. Desta forma, a aplicação de programas de higienização dentro das indústrias alimentícias é de grande importância.

Normalmente, sanitizantes químicos são utilizados para remoção de sujidades nos alimentos, nos equipamentos, superfícies, sobre seus operadores, e também para tratabilidade dos efluentes industriais que são gerados (NASCIMENTO; DELGADO; BARBARIC, 2010).

Conforme Telles (2011), “Sanitizante é um agente normalmente químico que mata formas vegetais, mas não necessariamente as formas esporuladas de micro-organismo patogênicos”. Esses agentes são normalmente empregados no processo de sanitização que é a última etapa do procedimento de higienização, visando eliminar micro-organismos patogênicos e reduzir deteriorantes até níveis seguros, de modo a obter um produto alimentício de boa qualidade higiênico-sanitária (COLLA et al., 2012).

A sanitização pode ser realizada através de métodos físicos e químicos, sendo que a última opção é um meio bastante empregado em indústrias de alimentos, existindo assim, diversos tipos de sanitizantes que variam em composição e espectro de atividade antimicrobiana (GORMEZANO, 2007). Dentre os agentes químicos mais utilizados em indústrias para sanitização de alimentos e equipamentos, podem ser citados os seguintes:

- Ácido Peracético – Resulta da reação entre peróxido de hidrogênio e ácido acético, ou pela oxidação do acetaldeído. É uma mistura de odor forte e um pH baixo (2,8), sendo normalmente produzido em concentrações entre 5 e 15% (SREY; JAHID; HA, 2013). O ácido peracético possui amplo espectro de atividade antimicrobiana, e por possuir ação fungicida, bactericida, e esporicida seu uso ganha destaque nas indústrias de alimentos, principalmente por ser efetivo mesmo na presença de matéria orgânica (SOUZA; DANIEL, 2005).
- Compostos Clorados – São compostos amplamente utilizados, podendo ser utilizados na forma de gás cloro, hipoclorito de cálcio ou sódio, ou produtos que liberam cloro como dicloroisocianurato de sódio ou potássio. Agem destruindo estruturas microbianas, como as cápsulas bacterianas, que as protegem contra mecanismos de

oxidação, alterando dessa forma sua fluidez celular, impedindo sua re-estruturação enzimática. Reagem com matéria orgânica, podendo irritar a pele, mucosa e vias respiratórias dos manipuladores (TELLES, 2011).

- Iodóforos – São substâncias que contêm iodo conjugado a um surfactante ou povidona, sendo uma das mais utilizadas nas indústrias. Possui efeito rápido, e um espectro de ação bom contra fungos, bactérias gram-positivas e gram-negativas, esporos e protozoários. Sua ação consiste em penetrar na parede das células dos microorganismos, oxidando e substituindo o conteúdo microbiano por iodo livre levando a morte celular (FIGUEIREDO, 2013).
- Compostos Quaternários de Amônio – São agentes tensoativos catiônicos com boa atividade germicida, porém possuindo atuação limitada na presença de matéria orgânica. Os compostos Quaternário de amônio causam desnaturação e precipitação de proteínas da membrana celular e do citoplasma dos micro-organismos, liberando constituintes celulares, e conseqüentemente causando sua morte (REDU, 2014).

Os compostos sanitizantes devem ser utilizados de acordo com sua especificação, sempre após o procedimento de limpeza dos equipamentos, bancadas e dos alimentos, visando a redução ou eliminação dos micro-organismos que possivelmente ainda estarão presentes após o primeiro procedimento citado. Caso essa fase de higienização (sanitização) não seja realizada de forma adequada, os resíduos que permanecerem, por exemplo, sobre a superfície de um equipamento, poderão permitir o desenvolvimento dos micro-organismos, e ao serem reutilizados, os equipamentos contaminarão os alimentos que serão processados (GORMEZANO, 2007).

3.5 CONSIDERAÇÕES SOBRE CITRONELOL

A busca de novas ferramentas para assegurar a produção de alimentos isentos de perigos microbiológicos é de interesse relevante. Neste contexto, destaca-se a utilização de compostos naturais biologicamente ativos ou constituintes isolados de plantas como agentes antifúngicos (ARAÚJO et al., 2009; OKIGBO; OGBONNAYA, 2006).

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 (BRAZ FILHO, 2010; NEWMAN; CRAGG, 2007).

Dentre os produtos provenientes das plantas com destacável aplicabilidade antifúngica, destacam-se os óleos essenciais e seus componentes. Os óleos essenciais são complexos de compostos voláteis caracterizados pelo odor forte e são formados pelas plantas como metabólitos secundários, encontrados em suas folhas, resinas, frutos, flores, troncos e outras partes (BURT, 2004). Esses óleos são fitocomplexos que podem ser constituídos por até mais de 60 componentes individuais, entre fenilpropanoides e terpenos (SIMÕES; SPITZER, 2007), sendo que os últimos predominam com aproximadamente 90% da constituição (LIMA, 2006).

Os terpenos são compostos largamente distribuídos na natureza, constituindo uma ampla variedade de compostos vegetais, pois são compostos derivados do metabolismo secundário de plantas. São compostos hidrogenados de cadeias carbônicas cíclicas ou alifáticas, largamente distribuídos na natureza. 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}) (BAKKALI et al., 2008; SIMÕES; SPITZER, 2007). Os terpenos possuem duas ou mais moléculas de isopreno e frequentemente tem os monoterpenos e os sesquiterpenos como compostos em maior abundância nos óleos essenciais (LIMA, 2006).

Segundo Lima (2006):

Os terpenóides são sintetizados via mevalonato no citoplasma, o qual é formado por condensação de uma unidade da acetoacetil-CoA com a acetil-CoA, seguida de uma hidrólise, formando o 3-hidróxi-3-metilglutaril-CoA (HMGCoA). Em seguida, o HMG-CoA é reduzido por um processo que depende de NADPH e é catalisado pela HMGCoA-redutase a mevalonato que, por sua vez, é convertido em isopentenil-pirofosfato (IPP) e seu isômero dimetilalilpirofosfato (DMAPP). O IPP e o DMAPP condensam-se formando o transgeranilpirofosfato, que dará origem aos monoterpenos e sesquiterpenos. Com a polimerização, são formadas cadeias crescentes de cinco em cinco átomos de carbono.

Algumas atividades biológicas são descritas para drogas do tipo terpenos, entre elas podem-se destacar a atividade sobre o sistema nervoso central, antibacteriano, antifúngico, repelente, inseticida, antineoplásica, antioxidante e larvicida (BAKKALI et al., 2008; EDRIS, 2007; PADUCH et al., 2007).

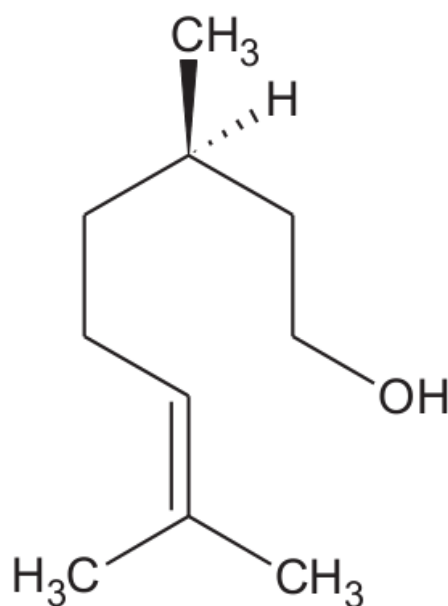
Neste estudo, foi utilizado o citronelol (Fig. 3), um monoterpeno acíclico natural que possui em sua estrutura química um grupamento álcool e uma dupla ligação entre carbonos. É prevalente de óleos essenciais extraídos de várias plantas aromáticas como *Cymbopogon*

citratum, *Cymbopogon winterianus* e *Lippia alba* (BRITO et al, 2012; RODRIGUEZ-LINARES et al., 2009).

É um produto natural derivado de unidades de isopreno (C₅), e que ocorre de forma natural como dois isômeros ópticos. O isômero R-(+), que é um constituinte mais comum do óleo essencial de plantas, especialmente da família *Rutaceae*; e o S-(-), que é um isômero menos comum que está presente em óleos de *geranium* e *citronella* (DE SOUSA et al., 2006).

Possui conhecidos efeitos cardioprotetores. É utilizado na medicina popular como droga anti-hipertensiva (BASTOS et al, 2009), possui outras propriedades biológicas tais como antibacteriano, antifúngico, antiespasmódico, ansiolítico e atividade anticonvulsivante que são descritos na literatura (BASTOS et al, 2009; BRITO et al, 2012; DE SOUSA et al., 2006), é utilizado nas indústrias de cosméticos, perfumes, e também utilizado como repelente de insetos (RODRIGUEZ-LINARES et al., 2009).

Figura 3 – Estrutura química do citronelol.



Fonte: Paduch et al., (2007).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 LOCAL DE TRABALHO

O trabalho foi realizado no Laboratório de Bioquímica (J8) e no Laboratório de Microbiologia (J11), ambos da Unidade Acadêmica de Saúde (UAS) do Centro de Educação e Saúde (CES), da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG).

4.2 CITRONELOL

O monoterpeno citronelol foi adquirido da Sigma-Aldrich® (Brasil). As emulsões foram preparadas no momento de execução dos testes, dissolvendo-as primeiramente em 500 µL dimetilsulfóxido (DMSO) a 100% e utilizando água destilada esterilizada em quantidade suficiente para obter a concentração inicial de 2048 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, utilizaram-se as cepas *Cladosporium oxysporum* URM – 5412 (isolada de água), *C. oxysporum* URM – 5234 (isolada de solo), *C. cladosporioides* URM – 5737 (isolada de água) e *C. cladosporioides* URM – 6246 (isolada de solo), obtidas da coleção de culturas da Micoteca do Departamento de Micologia, Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco. Todas as cepas foram mantidas em tubos de ensaio contendo ágar batata (ABS) dextrose inclinado sob refrigeração (8°C), no Laboratório de bioquímica (J8) do CES (UFCG).

4.4 MEIOS DE CULTURA

Os meios de cultura 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 solução salina estéril (NaCl 0,9%), e as suspensões feitas por suaves agitações 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 foi deixada em repouso por 3-5 minutos, tempo para que os fragmentos de hifas (partículas mais pesadas) se depositasse no fundo, e o sobrenadante foi 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 (MOTA et al., 2012; RASOOLI; ABYANEH, 2004).

4.6 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

A determinação da CIM de citrionelol foi realizada pela técnica de microdiluição, utilizando-se 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 citrionelol duplamente concentradas diluídas em RPMI 1640. 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 as drogas-teste 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 feito 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 foi definida como a menor concentração da droga (produto natural) capaz de inibir

100% o crescimento fúngico observado nas cavidades. O experimento foi realizado 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. O experimento foi realizado em triplicata e os valores de CFM foram expressos como média geométrica (ERNST et al., 1999; KLEPSEK et al., 1998).

4.8 EFEITOS SOBRE O CRESCIMENTO MICELIAL

A análise da interferência de citronelol sobre o crescimento micelial foi realizada pela determinação da massa micelial seca de *C. oxysporum* URM – 5234, e *C. cladosporioides* URM – 5737 (PEREIRA et al., 2011a; SHARMA; TRIPATHI, 2008). Em tubos de ensaio esterilizado foram adicionados 2,5 mL do RPMI 1640, previamente acrescido da solução da droga-teste nas respectivas 1/2CIM, CIM e 2xCIM. Em seguida, foi adicionado 0,5 mL do inóculo em cada tubo. No tubo controle correspondente, o inóculo foi adicionado em RPMI 1640 sem adição das drogas testadas. Todo o sistema foi incubado a 28°C por um tempo total de 7 dias, quando foi determinado o peso da massa micelial seca. Para isto, 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 foi calculado, considerando o experimento controle como 100% de produção micelial. O experimento foi realizado em triplicata.

4.9 EFEITOS SOBRE A GERMINAÇÃO DOS CONÍDIOS

Em tubos de ensaio estéreis, 500 µL do RPMI 1640 acrescido de citronelol em diversas concentrações (1/2CIM, CIM e 2xCIM), foram homogeneamente misturadas com 500 µL da suspensão dos conídios fúngicos e imediatamente incubados a temperatura de 28°C. Amostras dessa mistura foram tomadas após 48 horas 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 foi realizado na ausência de citronelol. Todo o experimento foi feito em triplicata (LIU et al., 2007; PEREIRA et al., 2011a).

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

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

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente foram realizados os testes para determinar a CIM e a CFM do citrônolol frente as cepas de *Cladosporium* spp., e seus respectivos valores estão apresentados na tabela 1. Através dos resultados obtidos, pode-se observar que o citrônolol na concentração 512 µg/mL, foi capaz de inibir todas as cepas ensaiadas (*C. oxysporum* URM-5234, *C. oxysporum* URM 5412, *C. cladosporioides* URM-6246). Porém é importante ressaltar também que o citrônolol obteve maior ação inibitória frente à cepa *C. cladosporioides* URM-5737 (CIM - 256 µg/mL), o que comprova que de fato esta droga possui um potencial de inibição sobre o gênero de fungos filamentosos em questão.

Para comprovar a confiabilidade do teste, foram realizados testes controles, onde foi possível constatar: (1) o crescimento dos fungos na ausência da droga, mostrando que a inibição do crescimento foi ocasionada pela presença do citrônolol (controle de crescimento); (2) o não crescimento dos fungos quando utilizado apenas o meio de cultura sem a presença do inóculo, evidenciando a esterilidade do meio de cultura (controle de esterilidade); e, (3) a não interferência no crescimento das cepas estudadas quando utilizado o DMSO nas mesmas concentrações como agente emulsificante das drogas que foram utilizadas nos testes (teste com DMSO), mostrando a fidedignidade do método utilizado.

Os resultados encontrados na CFM mostraram que o citrônolol possui ação fungicida sobre os fungos estudados, entretanto, pode-se perceber que para ter ação satisfatória frente ao *Cladosporium* spp. O monoterpene teve seus valores de CFM aumentados em duas vezes (CFM = 1024 µg/mL – *C. oxysporum* URM-5412 e *C. cladosporioides* URM-6246; CFM = 512 µg/mL – *C. cladosporioides* URM-5737) e quatro vezes (CFM = 2048 µg/mL – *C. oxysporum* URM-5234), em relação aos valores de CIM.

Na literatura, é relatado a existência de diferentes tipos de testes que possibilitam a verificação da atividade antifúngica dos mais diversos compostos naturais extraídos de plantas. No entanto, Scorzoni et al. (2007), afirmam que essa grande disponibilidade de métodos influencia diretamente em seus resultados obtidos, pois os mesmos não possuem princípios e nem sensibilidades iguais, tornando os resultados distintos.

Desta maneira, para determinar a CIM e conseqüentemente a CFM, foi escolhida de forma exclusiva a metodologia de microdiluição em caldo que de acordo com Alves et al. (2008), é uma das técnicas mais indicadas para a determinação da concentração mínima de um agente, que poderá inibir ou matar um micro-organismo. A técnica de microdiluição aplicada

ao teste foi adaptada aos padrões da norma de referência do documento M38-A da *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), que é um método destinado a realização de testes de sensibilidade com fungos filamentosos que comumente causam infecções invasivas, como *Aspergillus*, *Fusarium* e *Rhizopus*; *Pseudallescheria boydii*; e a forma miceliana de *Sporothrix schenckii*.

Tabela 1 – Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) sobre as cepas de *Cladosporium* spp.

Cepas	Citronelol	
	CIM ($\mu\text{g/mL}$)	CFM ($\mu\text{g/mL}$)
<i>C. oxysporum</i> URM 5234	512	2048
<i>C. oxysporum</i> URM 5412	512	1024
<i>C. cladosporioides</i> URM 6246	512	1024
<i>C. cladosporioides</i> URM 5737	256	512

De Bona et al. (2014), justificam o uso da microdiluição como uma técnica econômica, que entre outros aspectos, inclui a economia de espaço, meios de cultura e reagentes, proporcionando assim a realização de um teste quantitativo, que pode ser repetido diversas vezes com diluições uniformes dos produtos naturais em apenas uma placa para vários microorganismos, mantendo-se ainda a confiabilidade do teste. Já Ostrosky et al. (2008) listam outras vantagens, como metodologia barata, que possui grande reprodutibilidade, e que é mais sensível do que outros métodos descritos na literatura, além de requererem pequena quantidade de amostra.

Para poder avaliar a eficácia de forma quantitativa da ação do citronelol diante das cepas ensaiadas, a partir das concentrações determinadas no trabalho, as mesmas foram comparadas com os valores descritos por Sartoratto et al. (2004), que julgam valores de CIM entre 50 e 500 $\mu\text{g/mL}$ como de forte atividade antimicrobiana, valores entre 600 e 1500 $\mu\text{g/mL}$ de atividade moderada, e valores acima de 1500 $\mu\text{g/mL}$ de fraca atividade. Com base nisso, pode-se afirmar o citronelol possui ação antifúngica forte diante das cepas estudadas, já que as concentrações encontradas foram de 256 $\mu\text{g/mL}$ e 512 $\mu\text{g/mL}$.

Ao analisar os resultados de CIM e CFM, percebe-se claramente diferenças entre seus valores, observando-se que a CFM tem valores maiores que a CIM. Este fato pode ser considerado normal, pois como explica Aoudou et al. (2010), os valores fungicidas de agentes antimicrobianos comumente ensaiados, em geral, são mais elevados em relação aos valores de CIM, o que tornam válidos os nossos resultados.

De acordo com Pereira (2012), o citronelol possui uma estrutura química bem definida, possuindo um grupamento com função álcool em sua cadeia, o que lhe confere uma molécula de oxigênio. Segundo Ait-Ouazzou et al. (2011), este fato torna os monoterpenos alcoólicos significativamente mais ativos do que os monoterpenos hidrocarbonetos, sendo esta uma das possíveis características que atribui o poder antifúngico do citronelol.

Desta maneira, para comprovar este referido potencial antifúngico, algumas pesquisas são reportadas na literatura acerca da ação do citronelol, assim como pode ser observado no trabalho realizado por Shim e Lim (2004), que avaliaram o poder de citronelol através da técnica de microdiluição em caldo frente a cepas de *Trichophyton* spp., e averiguaram a inibição do crescimento deste gênero de fungos filamentosos a valores de CIM entre 250 µg/mL e 2000 µg/mL, concentrações que inicialmente assemelham-se com os encontrados no presente trabalho, porém que nos valores finais ultrapassam aqueles que foram apresentados neste trabalho.

Da mesma forma, Pereira et al. (2014) investigaram, através da técnica de microdiluição em caldo, os efeitos de citronelol contra cepas de *Trichophyton rubrum*, fungos comumente causadores de dermatofitoses em humanos. Os resultados obtidos mostraram forte ação inibitória do monoterpeno frente as cepas em questão, já que o estudo apresentou valores de CIM que variaram de 8 a 1024 µg/mL, porém sendo que 50% das cepas testadas foram inibidas pela concentração de 64 µg/mL, um valor consideravelmente melhor do que aqueles obtidos neste trabalho. Aoudou et al. (2010), também analisaram a atividade antifúngica de citronelol frente a fungos das espécies *Fusarium*, *Aspergillus*, e *Penicillium*, e verificaram que os mesmos são suscetíveis ao citronelol, porém a técnica utilizada para esta investigação foi a de difusão em ágar.

O estudo acerca do poder antifúngico do citronelol ainda é considerado modesto na literatura devido à pouca quantidade de testes que são relatados com essa finalidade. Ao relacionar sua ação antifúngica frente ao gênero *Cladosporium* spp., observamos que até o presente momento não existe nenhuma explanação a respeito. Entretanto, pode ser visto que os fungos filamentosos do gênero *Cladosporium* spp., já foram testados frente a outros produtos

naturais com potencial antifúngico, como os óleos essenciais de *Cinnamomum zeylanicum* (MOREIRA et al., 2007), *Piper cernuum*, *Piper diospyrifolium*, *Piper crassinervium*, e *Piper solmsianum umbelata* (MORANDIM et al., 2010), *Piper aduncum*, *P. arboreum* e *P. tuberculatum* (NAVICKIENE et al., 2006), *Melissa officinalis* L. (MENEZES et al., 2015) e composto o químico isolado β -pineno (MOREIRA et al., 2007).

Desta maneira, estes fatos concedem grande importância a esta pesquisa, pois a mesma se destaca entre os trabalhos acima descritos, por ser o primeiro que avalia a ação antifúngica do citrionelol frente aos fungos do gênero *Cladosporium* spp., trazendo inovação e destaque para o meio científico na área de produtos naturais, e principalmente para o meio de produção de alimentos, já que vislumbra-se que o citrionelol demonstrando potencial antifúngico efetivo, poderá futuramente ser utilizado nas indústrias para o controle do gênero de fungos filamentosos estudado.

Os resultados obtidos através dos testes de CIM e CFM foram de grande significância para esta pesquisa, e nos impulsionaram a ir mais adiante e verificar a ação do monoterpeno contra outros eventos do desenvolvimento fúngico como germinação de conídios e formação micelial. São fatores muito importantes para o seu crescimento e que possuem também grande importância quando relacionados aos alimentos, já que quando desenvolvido sobre estes, os fungos podem causar maiores danos e conseqüentemente grandes perdas por ocasionar deterioração.

Portanto, foram realizados os testes de ação do citrionelol sob o crescimento micelial e germinação de conídios das cepas *C. oxysporum* URM – 5234 e *C. cladosporioides* URM – 5737, escolhidas para a realização destes testes. Para a execução dos experimentos, foram utilizadas estruturas fúngicas como fragmentos de hifas e conídios, que são responsáveis pelo desenvolvimento e multiplicação dos organismos em questão, e que ocorrem principalmente quando estão em contato com substratos que viabilizam estes eventos, como os alimentos, que fornecem diversos tipos de nutrientes que potencializam essa evolução.

A avaliação dos efeitos antifúngicos do citrionelol sobre o crescimento micelial das cepas citadas anteriormente foram realizadas através da quantificação da massa micelial seca, onde o inóculo fúngico foi exposto ao meio de cultura RMPI 1640 acrescido do citrionelol em diferentes concentrações (1/2CIM, CIM, e 2xCIM), e subsequentemente tomados para averiguar a quantidade da massa seca.

Para a confiabilidade deste teste também foram realizados controles em todas as etapas, onde o inóculo foi introduzido no meio de cultura RPMI 1640 sem a presença da droga,

permitindo assim a visualização do crescimento dos fungos ensaiados. Os resultados obtidos estão apresentados nas figuras 4 e 5, que mostram o percentual de massa micelial seca produzida na ausência (controle) e na presença do citronelol, produzidas pelas cepas fúngicas *C. oxysporum* URM – 5234 e *C. cladosporioides* URM – 5737 respectivamente.

Ao analisar os efeitos do citronelol perante os fungos ensaiados, observou-se que a formação do micélio de ambas as cepas foi inibida por todas as concentrações da droga ($p < 0,05$), quando comparadas ao percentual exibido pelos seus respectivos controles (100% de desenvolvimento do micélio). Quando analisadas entre si, pode-se constatar que para os resultados obtidos frente a cepa *Cladosporium oxysporum* URM – 5234, as concentrações, 1/2CIM, CIM, e 2xCIM apresentaram ação inibitória semelhantes ($p > 0,05$).

Também foi possível observar que o citronelol obteve ação mais eficaz frente a cepa de *C. cladosporioides* URM – 5737, pois todas as concentrações testadas da droga conseguiram inibir o seu desenvolvimento micelial ($p < 0,05$), deixando seus valores representativos de massa micelial seca abaixo da faixa dos 25% do percentual do seu controle. Os resultados também mostraram que as concentrações 1/2CIM e CIM tiveram resultados de ação semelhantes ($p > 0,05$), porém 1/2CIM diferiu quando comparada a 2xCIM, indicando maior eficiência desta última.

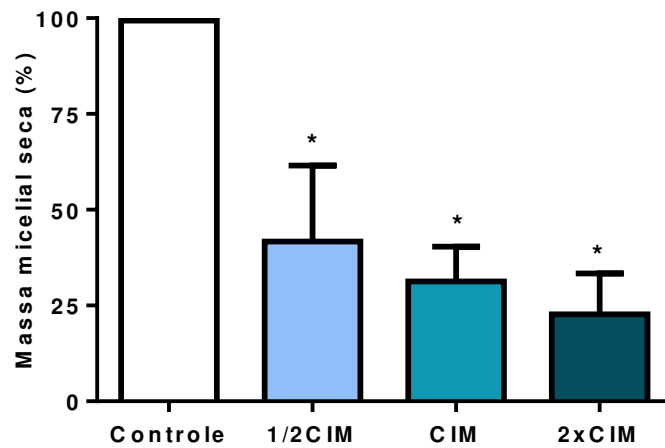
Esses resultados possuem importante valor, já que ação de interferir na formação do micélio fúngico interessa de forma grandiosa para as indústrias de alimentos que através de uma possível utilização dessa droga podem controlar o crescimento desses organismos, e assim diminuir os estragos que podem ser causados aos seus produtos alimentícios.

Na literatura não é relatado a avaliação do poder antifúngico do citronelol frente ao gênero *Cladosporium* spp., no que diz respeito ao crescimento micelial. Portanto, para comprovar a eficácia deste teste, tornando nossos resultados mais pontuais, observou-se outros trabalhos na literatura os quais analisaram através desta metodologia o poder de interferência de agentes naturais sobre o crescimento micelial de outras espécies de fungos filamentosos.

Assim, foi observado o trabalho de Pereira et al. (2011a), que avaliaram o poder antifúngico do óleo essencial de *Cymbopogon winterianus* em diversas concentrações sobre a produção micelial de uma cepa de *Trichophyton rubrum*, e obtiveram resultado de inibição de 100% da produção de seu micélio.

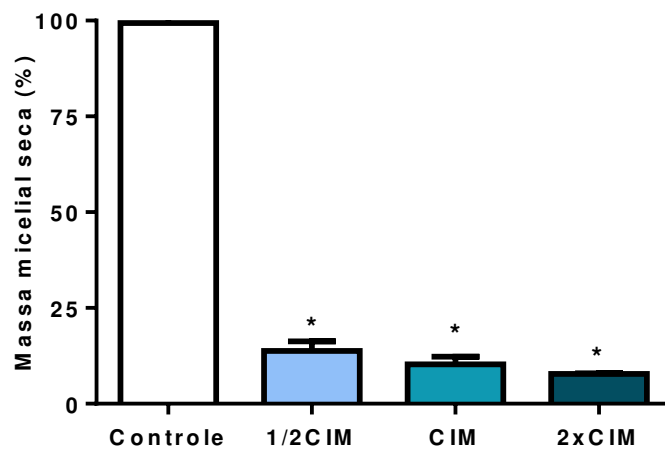
Da mesma forma, Pereira et al. (2011b) avaliaram o potencial antifúngico de *Cymbopogon winterianus* diante do crescimento micelial da cepa de *Trichophyton mentagrophytes* em diferentes concentrações, e como o trabalho anterior o óleo inibiu 100% da

Figura 4 – Percentual de massa micelial seca produzido por *Cladosporium oxysporum* URM 5234 na ausência (controle) e na presença de citronelol 1/2CIM (256 $\mu\text{g/mL}$), CIM (512 $\mu\text{g/mL}$) e 2xCIM (1024 $\mu\text{g/mL}$).



* $p < 0,05$ quando comparado ao controle (teste t não pareado).

Figura 5 – Percentual de massa micelial seca produzido por *Cladosporium cladosporioides* URM 5737 na ausência (controle) e na presença de citronelol 1/2CIM (128 $\mu\text{g/mL}$), CIM (256 $\mu\text{g/mL}$) e 2xCIM (512 $\mu\text{g/mL}$).



* $p < 0,05$ quando comparado ao controle (teste t não pareado).

produção do micélio deste micro-organismo.

Os óleos essenciais das plantas são constituídos de uma mistura complexa de compostos, que caracterizam-se pela presença de dois ou três compostos majoritários, que geralmente determinam a sua propriedade biológica (BAKKALI et al., 2008), e dentre esses compostos estão os monoterpenos, que por possuir caráter hidrofóbico, possivelmente interagem com a membrana das células fúngicas, alterando sua integridade e causando a morte micelial (PEREIRA et al., 2011b).

Mais recentemente Pereira et al. (2014) também analisaram sobre duas cepas de *T. rubrum* a ação inibitória do citronelol sobre seus crescimentos miceliais, e assim como no presente trabalho, obtiveram efeitos positivos, já que a droga inibiu de forma efetiva esse evento fúngico.

Os trabalhos citados são fundamentais para esta pesquisa, pois os estes conferem suporte ao nosso teste, dando-o mais confiabilidade, já que há boa reprodutibilidade do mesmo, e exibição de resultados satisfatórios com relação ao poder antifúngico de outros produtos naturais.

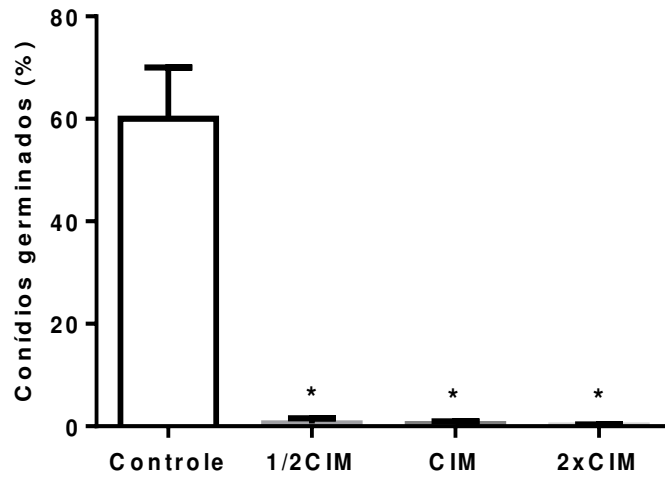
O poder antifúngico do citronelol também foi avaliado diante da germinação de conídios das cepas de *Cladosporium* anteriormente citadas, com intensão de verificar se o mesmo promoveria alteração no desenvolvimento dessas estruturas. O teste foi realizado através da homogeneização da suspensão de conídios com o meio de cultura RPMI 1640 acrescido de citronelol em diferentes concentrações, 1/2CIM, CIM e 2xCIM, e após 48 horas foi tomado para a análise.

Para comprovar a viabilidade do teste também foram realizados controles com a ausência da droga em todas as etapas, mostrando que a inibição da germinação dos conídios durante os procedimentos foram decorrentes da presença da droga. Os valores percentuais determinados dos conídios germinados na ausência (controle) e na presença do citronelol estão expressos nas figuras 6 e 7.

Através dos resultados, observou-se que o citronelol interferiu de forma eficaz sobre a germinação de conídios das cepas *C. oxysporum* URM – 5234, e *C. cladosporioides* URM – 5737 ($p < 0,05$), quando as mesmas foram comparadas aos seus respectivos controles.

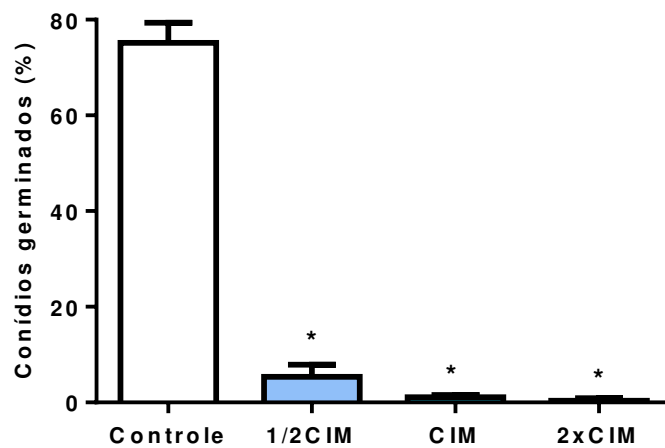
Os valores (% \pm desvio-padrão) de todas as concentrações sobre a germinação de conídios de ambas as cepas foram as seguintes: *Cladosporium oxysporum* URM 5234 (Controle: 60,00 \pm 10,00; citronelol 1/2CIM: 0,58 \pm 1,01; CIM: 0,41 \pm 0,57; 2xCIM: 0,18 \pm 0,16) e *Cladosporium cladosporioides* URM 5737 (Controle: 75,18 \pm 4,16; 1/2CIM: 5,39 \pm 2,49;

Figura 6 – Percentual de conídios germinados de *Cladosporium oxysporum* URM 5234 na ausência (controle) e na presença de citronelol 1/2CIM (256 µg/mL), CIM (512 µg/mL) e 2xCIM (1024µg/mL).



*p < 0,05 quando comparado ao controle (teste t não pareado).

Figura 7 – Percentual de conídios germinados de *Cladosporium cladosporioides* URM 5737 na ausência (controle) e na presença de citronelol 1/2CIM (128 µg/mL), CIM (256 µg/mL) e 2xCIM (512 µg/mL).



*p < 0,05 quando comparado ao controle (teste t não pareado).

CIM: $1,11 \pm 0,44$; 2xCIM: $0,33 \pm 0,57$).

Ao serem comparadas entre si, constatou-se que as concentrações relacionadas ao teste da cepa *C. oxysporum* URM – 5234, obtiveram ação inibitória semelhante no desenvolvimento dos conídios ($p > 0,05$), no entanto, as concentrações do teste realizado com a cepa *C. cladosporioides* URM – 5737, obtiveram semelhança quando comparadas CIM e 2xCIM ($p > 0,05$), porém diferindo notavelmente da ação da 1/2CIM, que demonstrou menor poder entre elas para interferir na germinação do fungo relacionado.

Na literatura ainda não se reportam trabalhos relacionando os efeitos do citrionelol em relação a germinação dos conídios de fungos do gênero *Cladosporium* spp., desta maneira não se pode comparar os nossos resultados diretamente a outras pesquisas.

De fato, o que se pode afirmar é que os nossos resultados se mostraram satisfatórios para o que foi proposto, e para torna-los ainda mais fidedignos pode-se observar e apontar outros trabalhos que utilizaram a mesma metodologia para testar o potencial antifúngico de outros agentes naturais diante de outras espécies de fungos filamentosos, como por exemplo, no trabalho realizado por Menezes et al. (2015), que avaliaram o potencial antifúngico do óleo essencial de *Melissa officinalis* frente a germinação de conídios de uma cepa de *C. carrionii*, e obtiveram resultado de forte inibição em todas as concentrações avaliadas, sendo que os melhores resultados foram constatados nas concentrações de CIM ($256\mu\text{g/mL}$) e 2xCIM ($512\mu\text{g/mL}$).

Da mesma forma, Pereira et al. (2014), avaliaram os efeitos antifúngicos de citrionelol sob a germinação de conídios de duas cepas de *T. rubrum*, e verificaram que essas estruturas obtiveram seu desenvolvimento inibido de forma efetiva na concentração de 2xCIM da droga, resultado semelhante ao encontrado em nosso trabalho.

Com o mesmo objetivo de avaliar o potencial de inibição da germinação, porém com metodologia diferente do presente trabalho, Tian et al. (2012), obtiveram resultado satisfatório ao investigar a ação do óleo essencial de *Cinnamomum jensenianum* frente a uma cepa de *Aspergillus flavus*. Da mesma forma Tzortzakis e Economakis (2007), avaliaram o potencial de *Cymopogon citratus* L. frente a germinação de conídios das cepas de *Colletotrichum coccodes*, *Botrytis cinérea*, *Cladosporium herbarum*, *Rhizopus stolonifer* e *Aspergillus niger*, e também obtiveram resultados positivos em relação a inibição deste evento.

A evolução das estruturas como as hifas e conídios são providenciais para sobrevivência e multiplicação dos fungos no meio ambiente, e esta sobrevivência depende consequentemente

da colonização de substratos para que a sequência de reprodução e dispersão destes organismos sejam sempre bem sucedidas e continuadas.

Os fungos filamentosos como o *Cladosporium* spp., possuem como constituinte básico a hifa, que em conjunto forma uma massa chamada normalmente de micélio. Este micélio possui duas constituições importantes: o sistema vegetativo, que é responsável pelo desenvolvimento fúngico e pela absorção dos nutrientes, situando-se geralmente no interior dos tecidos parasitados, dentre os quais estão os alimentos; e o sistema reprodutivo, que é gerado a partir da diferenciação das hifas vegetativas, onde essas estruturas se alongam em sentido vertical do plano do micélio, originando os férteis conidióforos que produzem os conídios que são cápsulas de resistência e importante material de reprodução fúngica (LACAZ et al., 2002; MORAES; PAES; HOLANDA, 2010).

Assim como as hifas, os conídios dos fungos do gênero *Cladosporium* spp., podem ser considerados motivos de importante preocupação para as indústrias de alimentos, porque de acordo com Sabariego, Guardia e Sanchez (1999), a produção dessas estruturas pode ser dada em grandes quantidades, pois esses micro-organismos são os mais abundantes do espectro aéreo, devido ao elevado número de espécies que o gênero apresenta.

O ar pode ser um importante vetor na distribuição desses conídios, e estes podem originar os fungos que são relevantes para a deterioração dos alimentos, pois uma vez dispersos, os conídios podem detectar sinais externos e iniciar um processo chamado de germinação (DAO; DANTIGNY, 2011; SEONG et al., 2008).

Para germinarem, os conídios necessitam da presença de nutrientes de baixo peso molecular em massa, tais como açúcares e aminoácidos, que podem vir dos alimentos, assim como também de água e de ar. Desta maneira, os conídios passam por diversas alterações, onde ocorre um intumescimento da célula, promovendo uma reorganização do seu núcleo, e mudança das suas propriedades de superfície, o que resulta na formação de um ou mais filamentos finos, conhecidos como tubos germinativos, que se ramificam em todos os sentidos formando uma nova massa filamentosa, ou seja, formam um novo micélio (MORAES; PAES; HOLANDA, 2010; OSHEROV; MAY, 2001).

Essas transformações morfológicas caracterizam um simples ciclo celular não sexuado do *Cladosporium* spp., que proporciona o crescimento longitudinal de suas hifas, que podem penetrar nas camadas mais internas dos alimentos e/ou um crescimento lateral sobre os mesmos, que aumentam o raio da lesão ocasionando sua deterioração e conseqüentemente sua perda, trazendo prejuízos para as grandes indústrias (GUPTA; CHAUDHRY; ELEWSKI 2003).

A contaminação fúngica dos alimentos é um problema crônico nos países em desenvolvimento e os resultados apontam um declínio na qualidade e quantidade destes produtos. Os fungos sozinhos são capazes de causar uma redução de quase 20% no rendimento dos alimentos, afetando principalmente frutas e vegetais frescos que são altamente suscetíveis ao ataque destes micro-organismos em condições de alta umidade e alta temperatura (BOYRAZ; OZCAN, 2006; TIAN et al., 2011).

Por causa dessas preocupações, os investigadores há anos vêm buscando novos meios para controlar os fungos contaminantes, principalmente porque a aplicação de fungicidas sintéticos tem causado uma série de problemas ambientais e de saúde, por serem muitas vezes cancerígenos, teratogênicos, altamente tóxicos, além de terem ação pouco efetiva quando entram em contato com matéria orgânica (TIAN et al., 2011).

Dentro deste contexto, também nos mais recentes anos o uso de produtos vegetais com propriedades antimicrobianas tem sido reconhecido e utilizado para a conservação de alimentos. E entre os diferentes grupos de produtos vegetais, os óleos essenciais são especialmente recomendados como um dos grupos mais promissores dentre os produtos naturais (VARMA; DUBEY, 2001), pois muitos desses óleos essenciais são classificados como "geralmente considerados como seguros" (GRAS) pela *United State Food and Drug Administration* (FDA) dependendo da dose utilizada, e por isso são alvos potenciais para o desenvolvimento de antifúngicos naturais (TOLOUEE et al., 2010).

Burt et al. (2004), demonstraram em seu trabalho que o óleo essencial de diversos produtos vegetais como coentro, cravo, orégano, tomilho, hortelã e mostarda, já foram aplicados com a finalidade de conservação de alimentos à base de carne contra micro-organismos. Já Medeiros et al. (2011), utilizaram em seu trabalho os óleos essenciais de orégano e capim-limão em embalagens de alimentos para a conservação de mangas armazenadas em sacos de papel, e obtiveram bons resultados de controle frente a fungos como *Alternaria alternata*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Lasiodiplodia theobromae*

Os óleos essenciais possuem essa primordial característica graças aos seus diversos componentes químicos, a exemplo dos terpenos, os quais também são apontados na literatura como promissores agentes antifúngicos, que possuem mecanismo de ação sob as células fúngicas relacionado ao seu caráter lipofílico (PADUCH et al., 2007), inclusive já se conhecendo atualmente alguns alvos específicos de sua ação como a parede e a membrana das células fúngicas, além do ergosterol (MIRON et al., 2014; PEREIRA et al., 2014).

A ação dos terpenos sobre as estruturas mencionadas diminui sua elasticidade (GARCIA et al., 2008), e em adição a inibição da biossíntese do ergosterol alteram a conformação da parede e a fluidez da membrana plasmática das células fúngicas (MARTINEZ-ROSSI; PERES; ROSSI, 2008).

No tocante ao que se refere a membrana plasmática, a ação dos terpenos interfere de forma importante em sua permeabilidade, pois prejudicam a interação entre os lipídios e as proteínas engastadas na membrana, podendo alterar o transporte de íons (PEREIRA, 2012), e ocasionar liberação de constituintes intracelulares vitais, além de causar danos nos sistemas enzimáticos dos fungos (MARINO; BERSANI; COMI, 2001), o que pode levar a inibição do crescimento fúngico por promover a lise ou a morte celular (CHEN e VILJOEN, 2010; DALLEAU et al., 2008; SIKKEMA; DE BONT; POOLAN, 1995; TROMBETTA et al., 2005).

Assim, utilidade dos terpenos para o meio industrial vem ganhando visibilidade nos últimos anos, e dentre eles podemos destacar o monoterpene citronelol, que através dos resultados obtidos nesse trabalho apresenta-se como potencial antifúngico, pois mostrou ação de inibição considerada efetiva frente aos eventos de crescimento, desenvolvimento micelial, e germinação de conídios dos fungos estudados. Portanto, entrando para a classe dos produtos naturais que futuramente poderão ser utilizados como princípio ativo de sanitizantes que poderão ter aplicação tanto em equipamentos, como em alimentos.

Entretanto, para que de fato se possa aplicar este constituinte diretamente na superfície dos alimentos, primeiramente deve-se realizar alguns estudos mais aprofundados a seu respeito, pois de acordo com Beraldo et al. (2013) e Burt (2004), o aroma intenso desses produtos naturais podem causar interferência no aspecto sensorial dos alimentos, podendo ocasionar uma possível rejeição. Em vista disso, ainda se faz necessário estudos específicos para atenuação dessa forte característica do monoterpene, que se otimizado, futuramente possibilitará com mais propriedade seu uso como princípio ativo de sanitizantes de alimentos, evitando prejuízos para os proprietários de indústrias por perdas de alimentos deteriorados por fungos, tornando os alimentos seguros e atribuindo características sensoriais agradáveis para melhor aquisição pelos consumidores.

6 CONCLUSÕES

A presente pesquisa pode ser apontada como de grande importância para o meio científico, já que se destaca por ser a primeira que investiga a ação do monoterpene citrionelol frente as cepas de fungos filamentosos do gênero *Cladosporium* spp.

Sua importância pode ser ainda mais evidenciada porque através dos ensaios realizados foi possível observar e concluir, que o citrionelol possui poder antifúngico relevante sobre os fungos estudados, os quais são considerados importantes agentes contaminantes de alimentos. Isto porque o citrionelol apresentou atividade inibitória sobre o crescimento, desenvolvimento micelial e a germinação de conídios das cepas de *Cladosporium* spp., que são essenciais para a proliferação desses fungos no meio ambiente e, conseqüentemente, para a possível contaminação de alimentos que estejam em exposição nestes ambientes.

Estes resultados tornam-se valorosos, pois faz possível o citrionelol despontar como um promissor constituinte ativo de sanitizantes para aplicação em alimentos nas indústrias. Entretanto, mesmo com a comprovação do seu potencial antifúngico contra fungos dematiáceos do gênero *Cladosporium* spp., se faz necessário estudos mais aprofundados sobre a minimização do seu odor antes de aplica-lo, pois por possuir esta como uma de suas características mais intensas, seu contato direto com os alimentos pode alterar suas características sensoriais, tornando-os inviáveis para a comercialização ou seu consumo.

REFERÊNCIAS

AIT-OUAZZOU, A.; CHERRAT, L.; ESPINA, L.; LORAN, S.; ROTA, C.; PAGAN, R. The antimicrobial activity of hydrophobic essential oil constituents acting alone or in combined processes of food preservation. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 12, n. 3, p. 320-329, 2011.

ALMEIDA, I; COSTA, E.; GUINÉ, R. **Caracterização bioquímica e fúngica de peras secadas por diferentes processos**. In: GUINÉ, R. Secagem de peras. Da tradição a ciência. Viseu: CI&DETS. 2010. Cap. 10. p. 155-172.

ALVES, E. G.; VINHOLIS, A. H. C.; LUCIANA, A. C.; FURTADO, N. A. J. C.; SILVA, M. L. A.; CUNHA, W. R.; MARTINS, C. H. G. Estudo comparativo de técnicas de screening para avaliação da atividade antibacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1224-1229, 2008.

ALVO, A. D. Filamentous fungi. Chromoblastomycosis. Microbiology and immunology. Mycology – chapter five. Disponível em: <<http://www.microbiologybook.org/mycology/mycology-5.htm>>. Acesso em: 25 nov 2015

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, R. C. Z.; CHALFOUN, S. M; ANGELICO, C. L.; PEREIRA, M. C. Avaliação *in vitro* da atividade fungitóxica de extratos de condimentos na inibição de fungos isolados de pães artesanais. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 33, n. 2, p. 545-551, 2009.

ATALAS MICOLOGIA. Cladosporium herbarum. Disponível em: <<http://atlasmicologia.blogspot.com.br/search/label/Cladosporium>>. Acesso em: 25 nov 2015.
BASTOS, J. F. A.; MOREIRA, I. J. A.; RIBEIRO, T. P.; MEDEIROS, I. A.; ANTONIOLLI, A. R.; SOUSA, D. P.; SANTOS, M. R. V. Hypotensive and vasorelaxant effects of citronellol, a monoterpene alcohol, in rats. **Basic & clinical pharmacology & toxicology**, v. 106, n. 4, p. 331-337, 2009.

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.

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

BERALDO, C.; DANELUZZI, N. S.; SCANAVACCA, J.; DOYAMA, J. T.; JÚNIOR, A. F.; MORITZ, C. M. F. Eficiência de óleos essenciais de canela e cravo-da-índia como sanitizantes na indústria de alimentos. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 43, n. 4, p. 436-440, 2013.

BONIFÁCIO, T. Z.; MARTINELLI, T. C. A.; MARMITT, B. G.; ROMÃO, N. F.; SOBRAL, F. O. S. Avaliação da contaminação fúngica em amendoim comercializado á granel no município de Ji-Paraná/RO. **South American Journal of Basic Education, Technical and Technological**, v. 2, n. 1, p. 17-29, 2015.

BOYRAZ, N.; OZCAN, M. Inhibition of phytopathogenic fungi by essential oil, hydrosol, ground material and extract of *Summer savory* (*Satureja hortensis* L.) growing wild in Turkey. **International journal of food microbiology**, v. 107, n. 3, p. 238-242, 2006.

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.

BRITO, R. G.; GUIMARÃES, A. G.; QUINTANS, J. S. S.; SANTOS, M. R. V.; SOUSA, D. P.; PASSOS JR, D. B.; LUCCA JR, W.; BRITO, F. A.; BARRETO, E. O.; OLIVEIRA, A. P.; QUINTANS JR, L. J. Citronellol, a monoterpene alcohol, reduces nociceptive and inflammatory activities in rodents. **Journal of Natural Medicines**, v. 66, n. 4, p. 637-644, 2012.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, n. 3, p. 223-25, 2004.

CARVALHO, I. T. **Microbiologia dos Alimentos**. Recife: EUDUFRPE, 2010. 84 p.

CHEN, W; VILJOEN, A. M. Geraniol — A review of a commercially important fragrance material. **South African Journal of Botany**, v. 76, n. 4, p. 643-651, 2010.

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.

COLLA, F.L.; RODRIGUES, L.B.; DICKEL, E.L.; BORSOI, A.; NASCIMENTO, V.P.; SANTOS, L.R. Avaliação *in vitro* de clorexidina, amônia quaternária e ácido peracético frente a amostras de *Salmonella Heidelberg* isoladas de abatedouro avícola em 2005 e 2009. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 4, p. 289 – 292, 2012.

CURTIS, L.; CONROY, L.; COLI, S.; BAKER, K.; OUR, CH.; HERSHOW, R.; NORLOCK-CRUZ, F.; SCHEFF, P. *Aspergillus* surveillance project at a large tertiary-care hospital. **Journal of Hospital Infection**. v. 59, n. 3, p.188-196, 2005.

DALLEAU, S.; CATEAU, E.; BERGÈS, T.; BERJEAUD, J. M.; IMBERT, C. *In vitro* activity of terpenes against *Candida* biofilms. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 31, n. 6, p. 572–576, 2008.

DAO, T.; DANTIGNY, P. Control of food spoilage fungi by ethanol. **Food control**, v. 22, n. 3, p. 360-368, 2011.

DE BONA, E. A. M.; PINTO, F. G. S.; FRUET, T. K.; JORGE, T. C. M.; Alexandre, C. M. Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da

concentração inibitória mínima (cim) de extratos vegetais aquosos e etanólicos. **Arquivo Instituto Biologia, São Paulo**, v. 81, n. 3, p. 218-225, 2014.

DE SOUSA, D. P.; GONÇALVES, J. C. R.; QUINTANS-JUNIOR, L.; CRUZ, J. S.; ARAUJO, D. A. M.; ALMEIDA, R. N. Study of anticonvulsant effect of citronellol, a monoterpene alcohol, in rodents. **Neuroscience letters**, v. 401, n. 3, p. 231-235, 2006.

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.

ENGELKIRK, P. G.; DUBEN-ENGELKIRK, J. **Burton, microbiologia para ciências da saúde**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012. 388 p.

ERNST, E. J.; KLEPSE, M. E.; ERNST, M. E.; MESSER, S. A.; PFALLER, M. A. In vitro pharmacodynamic properties of MK-0991 determined by time-kill methods. **Mycology**, v. 33, n. 2, p. 75-80, 1999.

FIGUEIREDO, H. S. **Efeito antisséptico de iodóforos e gluconato de clorexidina na pele no sítio pré-operatório**. 2013. 23 f. Monografia (Graduação em Medicina) – Faculdade de Medicina da Bahia da Universidade Federal da Bahia, Salvador. 2013.

GARCIA, R.; ALVES, E. S. S.; SANTOS, M. P.; AQUIJE, G. M. F. V.; FERNANDES, A. A. R.; SANTOS, R. B.; VENTURA, J. A.; FERNANDES, P. M. B. Antimicrobial activity and potential use of monoterpenes as tropical fruits preservatives. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, n. 1, p. 163-168, 2008.

GOMPERTZ, O. F.; GAMBALE, W.; PAULA, C. R.; CORREA, B. Biologia dos fungos. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 8. ed. Rio de Janeiro: Atheneu. cap. 65. P 479491. 2008.

GORMEZANO, L. **Desenvolvimento e implementação de sistema para avaliar a cinética de remoção de resíduos presentes nos tubos de trocador de calor feixe tubular**. 2007. 121 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Escola de

engenharia Mauá do Centro Universitário do Instituto Mauá de Tecnologia, São Caetano do Sul. 2007.

GONZÁLEZ, L.; MANRIQUE, M.; MONTILLA, P.; ROJAS, T.; PERELLI, A.; CALZOLAIO, V. Identificación de flora fúngica en una empresa procesadora de alimentos del estado Carabobo. **Kasmera**, v. 38, n. 1, p. 45-52, 2010.

GUPTA, A. K.; CHAUDHRY, M.; ELEWSKI, B. *Tinea corporis*, *Tinea cruris*, *Tinea nigra*, and *pie*dra. **Dermatologic Clinics**. v. 21, n. 3, p. 395-400, 2003.

HERMANNNS, G.; PINTO, F. T.; KITAZAWA, S. E.; NOLL, I. B. Fungos e fumonisinas no período pré-colheita do milho. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 26, n. 1, p. 7-10, 2006.

JACULI, M. F. L. **Avaliação do uso de agentes saneantes em serviços de alimentação coletiva**. 2009. 39 F. Monografia (Graduação em Especialista de Qualidade de Alimentos) – Centro de Excelência de Turismo – UnB, Brasília. 2009.

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.

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C.; HEINS-VACCARI, E. M.; MELO, N. T. **Tratado de micologia médica**. 9. ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

LIMA, R. K. **Caracterização química e bioatividade do óleo essencial de folhas de goiabeira sobre a lagarta-docartucho do milho**. 2006. 57 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia, Área de Concentração em Agroquímica e Agrobioquímica) – Universidade Federal de Lavras, Lavras. 2006.

LIU, T.; ZHANG, Q.; WANG, L.; YU, L.; LENG, W.; YANG, J.; CHEN, L.; PENG, J. MA, L.; DONG, J.; XU, X.; XUE, Y.; ZHU, Y.; ZHANG, W.; YANG, L.; LI W.; SUN, L.; WAN, Z.; Ding, G.; YU, F.; TU, K.; QIAN, Z.; LI, R.; SHEN, Y.; LI, Y.; JIN QI. 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.

MARINO, M.; BERSANI, C.; COMI, G. Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from *Lamiaceae* and *Compositae*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 67, n. 7, p. 187-195, 2001.

MARTINEZ-ROSSI, N. M.; PERES, N. T. A.; ROSSI, A. Antifungal resistance mechanisms in dermatophytes. **Mycopathologia**, v. 166, n. 5-6, p. 369-383, 2008.

MEDEIROS, E. A. A.; SOARES, N. F. F.; POLITO, T. O. S.; SOUSA, M. M.; SILVA, D. F. P. Sachês antimicrobianos em pós-colheita de manga. **Revista Brasileira de Fruticultura**. v. 33, p. 363-370, 2011.

MENEZES, C. P.; GUERRA, F. Q. S.; PINHEIRO, L. S.; TRAJANO, V. N.; Pereira, F. O.; SOUZA, V. G.; Souza, F. S.; Lima, E. O. Investigation of *Melissa officinalis* L. Essential Oil for Antifungal Activity against *Cladosporium carrionii*. **International Journal Of Tropical Disease & Health**, v. 8, n. 2, p. 49-56, 2015.

MEZZARI, A.; PERIN, C.; JUNIOR, S.A.S.; BERND, L.A.G.; DI GESU, G. Fungos Anemófilos e Sensibilização em Indivíduos Atópicos em Porto Alegre. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v. 44, n. 5, p. 269-272, 2002.

MINAMI, P. S. **Micologia: métodos laboratoriais de diagnósticos das micoses**. Barueri-SP: Manole, 2003.199 p.

MIRON, D.; BATTISTI, F.; SILVA, F. K.; LANA, A. D.; PIPPI, B.; CASANOVA, B.; GNOATTO, S.; FUENTEFRIA, A.; MAYORGA, P.; SCHAPOVAL, E. E. S. Antifungal activity and mechanism of action of monoterpenes against dermatophytes and yeasts. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 24, n. 6, p. 660-667, 2014.

MORAES, A. M. L.; PAES, R. A.; HOLANDA, V. L. **Micologia**. In: MOLINARO, E. M.; CAPUTO, L. F. G.; AMENDOEIRA, M. R. R. Conceitos e métodos para formação de

profissionais em laboratório de saúde. 4. Ed. Rio de Janeiro: EPSJV; IOC. cap. 4. p. 399-494. 2010.

MORAIS, M. S. **Levantamento e avaliação da intensidade de doenças na mandioca e produção de celulasas por fungos fitopatogênicos à cultura no estado da Paraíba.** 2014. 109 f. Tese (Doutorado em Biologia de Fungos) – Departamento de Micologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 2014.

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.

MOREIRA, A. C. P.; LIMA, E. D. O.; SOUZA, E. L. D.; VAN DINGENEN, M. A.; TRAJANO, V. N. Inhibitory effect of *Cinnamomum zeylanicum* Blume (*Lauraceae*) essential oil and beta-pinene on the growth of dematiaceous moulds. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 1, p. 33-38, 2007.

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.

NASCIMENTO, H. M.; DELGADO, D. A.; BARBARIC, I. F. Avaliação da aplicação de agentes sanitizantes como controladores do crescimento microbiano na indústria alimentícia. **Revista Ceciliana**, v. 2, n. 1, p. 1-3, 2010.

NAVICKIENE, H. M. D.; MORANDIM, A. D. A.; ALÉCIO, A. C.; REGASINI, L. O.; BERGAMO, D. C. B.; TELASCREA, M.; CAVALHEIRO, A. J.; LOPES, M. N.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M.; MARQUES, M. O. M.; YOUNG, M. C. M.; KATO, M. J. Composition and antifungal activity of essential oils from *Piper aduncum*, *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum*. **Química Nova**, v. 29, n. 3, p. 467-470, 2006.

NEWELL, D. G.; KOOPMANS, M.; VERHOEF, L.; DUIZER, E.; AIDARA-KANE, A.; SPRONG, H. Food-borne diseases - The challenges of 20 years ago still persist while new

ones continue to emerge. **International Journal of Food Microbiology**, v. 139, n. 1, p.3-15, 2010.

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.

OKIGBO, R. N.; OGBONNAYA, U. O. Antifungal effects of two tropical plant leaf extracts (*Ocimum gratissimum* and *Aframomum melegueta*) on postharvest yam (*Dioscorea* spp.) rot. **African Journal Biotechnology**, v. 5, n. 9, p. 727-731, 2006.

OSHEROV, N.; MAY, G. S. The molecular mechanisms of conidial germination. **FEMS Microbiology Letters**, v. 199, n. 2, p. 153-160, 2001.

OSTROSKY, E. A.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E. L.; KANEKO, T. M.; NISHIKAWA, S. O.; FREITAS, B. R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Rev bras farmacogn**, v. 18, n. 2, p. 301-307, 2008.

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.

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, 2011a.

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, 2011b.

PEREIRA, F. O. **Investigação do mecanismo da atividade antifúngica de monoterpenos frente a cepas de *Trichophyton Rubrum***. 2012. 182 f. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa. 2012.

PEREIRA, F. 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**, n. 0, p. 1-7, 2014.

PEREIRA, N. F. M. C. **Atividade antifúngica de produtos naturais contra leveduras que deterioram alimentos**. 2011. 46 f. Monografia (Graduação em Especialização em Microbiologia) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2011.

RASOOLI, I., ABYANEH, M.R. Inhibitory effect of thyme oils on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. **Food Control**, v. 15, n. 6, p. 79–483, 2004.

REDU, J. F. M. **Atividade biocida de desinfetantes e fitoquímicos frente a fungos isolados de animais silvestres mantidos em centro de recuperação**. 2014. 95 f. 2007. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2014.

REVANCAR, S.G.; PATTERSON, J. E.; SUTTON, D. A.; PULLEN, R.; RINALDI, M. G. Disseminated phaeohyphomycosis: review of an emerging mycosis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 35, p. 1022-1023, 2002.

RIVAS, S.; THOMAS, C. M. Molecular interactions between tomato and the leaf mold pathogen: *Cladosporium fulvum*. **Annual Review of Phytopathology**, v. 43, p. 395-436, 2005.

RODRIGUEZ-LINARES, D.; CODORNIU-HERNANDEZ, E.; AGUILERA-CORRALES, Y.; RAPADO-PANEQUEB, M.; QUERT-ALVAREZA, R.; FERROC, N. Structural changes on citronellol induced by gamma radiation. **Journal of Physical Organic Chemistry**, v. 22, n. 5, p. 527-532, 2009.

SABARIEGO, S.; GUARDIA, C. D.; SANCHEZ, F. A. Contribución al estudio aeromicológico de la atmósfera de la ciudad de Granada (S. España): variaciones estacionales e intradiarias. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 16, n. 1, p. 230-234, 1999.

SANTOS, G. G. **Qualidade físico-química, microbiológica e ocorrência de micotoxinas de *Alternaria alternata* em derivados de tomate**. 2014. 92 f. Tese (Doutorado em Nutrição Humana) - Departamento de Nutrição da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, Brasília. 2014.

SARTORATTO, A.; MACHADO, A. L. M.; DELARMELINA, C.; FIGUEIRA, G. M.; DUARTE, M. C. T.; REHDER, V. L. G. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, n. 4, p. 275-280, 2004.

SCORZONI, L.; BENADUCCI, T.; ALMEIDA, A. M. F.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. SILVA.; GIANINNI, MARIA, J. S. M. The use of standard methodology for determination of antifungal activity of natural products against medical yeasts *Candida* spp and *Cryptococcus* spp. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 3, p. 391-397, 2007.

SEONG, K. Y.; ZHAO, X.; XU, J. R.; GÜLDENER, U.; KISTLER, H. C. Conidial germination in the filamentous fungus *Fusarium graminearum*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 45, n. 4, p. 389-399, 2008.

SHARMA, N.; TRIPATHI, A. Effects of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck epicarp essential oil on growth and morphogenesis of *Aspergillus niger* (L.) Van Tieghem. **Microbiological Research**, v. 163, n. 3, p. 337-344, 2006.

SHIN, S.; LIM, S. Antifungal effects of herbal essential oils alone and in combination with ketoconazole against *Trichophyton* spp. **Journal of applied microbiology**, v. 97, n. 6, p. 1289-1296, 2004.

SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**-[Reimpressão]- Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012. 388 p.

SIKKEMA, J.; DE BONT, J. A. M.; POOLAN, B. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. **Microbiological Reviews**, v. 59, n. 2, p. 201-222, 1995.

SILVA JR., E. A. Controle higiênico-sanitário de alimentos. **Sorveteria brasileira**, ano XXI, n. 129, p. 41-50, 1999.

SILVA, L. F. **Fungos: um estudo sobre a sua ocorrência nos alimentos**. 2008. 31 f. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Especialização em Microbiologia) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2008.

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

SOUZA, J. B.; DANIEL, L. A. Comparação entre hipoclorito de sódio e ácido peracético na inativação de *E. coli*, *colifagos* e *C. perfringens* em água com elevada concentração De matéria orgânica. **Engenharia Sanitária Ambiental**, v. 10, n. 2, p. 111-117, 2005.

SRAY, S.; JAHID, I. K.; HA, S. D. Biofilm formation in food industries: A food safety concern. **Food Control**, v. 31, n. 2, p. 572-585, 2013.

TAMSIKAR, J.; NAIDU, J.; SINGH, S.M. Phaeohyphomycotic sebaceous cyst due to *Cladosporium cladosporioides*: case report and review of literature. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 16, n. 1, p. 55-57, 2006.

TASIC, S.; TASIC, N. M. *Cladosporium* spp. - cause of oportunicistic mycoses. **Acta Facultatis Medicae Naissensis**, v. 24, n. 1, p. 15-19, 2007.

TELLES, E. M. **A higienização na prevenção e no controle do biofilme: uma revisão**. 2011. 43 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Produção, Tecnologia e Higiene de Alimentos de Origem Animal) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Porto Alegre. 2011.

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.

TOLOUEE, M.; ALINEZHAD, S.; SABERI, R.; ESLAMIFAR, A.; ZAD, S. J.; JAIMAND, K.; TAEB, J.; REZAEI, M. B.; KAWACHI, M.; SHAMS-GHAHFAROKHI, M.; RAZZAGHI-ABYANEH, M. Effect of *Matricaria chamomilla* L. flower essential oil on the growth and ultrastructure of *Aspergillus niger* van Tieghem. **International Journal of Food Microbiology**, v. 139, n. 3, p. 127-133, 2010.

TROMBETA, D.; CASTELLI, F.; SARPIETRO, M. G.; VENUTI, V.; CRISTANI, M.; DANIELE, C.; SAIJA, A.; MAZZANTI, G.; BISIGNANO, G. Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 49, n. 6, p. 2474-8, 2005.

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.

VARMA, J.; DUBEY, N. K. Efficacy of essential oils of *Caesulia axillaris* and *Mentha arvensis* against some storage pests causing biodeterioration of food commodities. **International Journal of Food Microbiology**, v. 68, n. 3, p. 207-210, 2001.

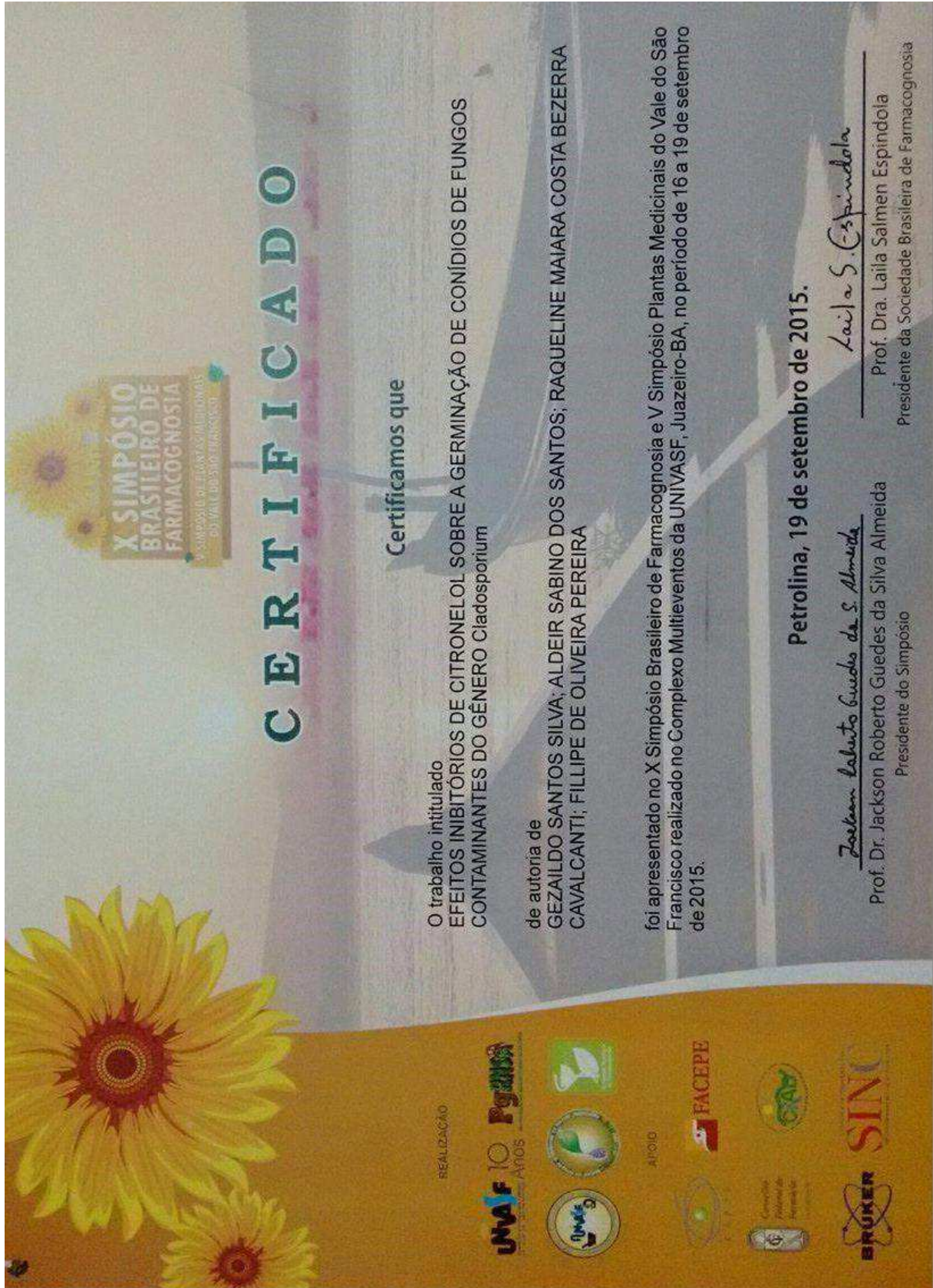
VENERANDA, N. RDC 210 traz novas exigências para BPE. **Revista Controle de Contaminação**, São Paulo, p. 10-15, 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (2002). **Food safety and foodborne illness**, Revised January. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs237/en/print.html>>. Acesso em: 23 abril 2013.

ZOPPAS, B. C. A.; BARRERA, R. M. V.; GONZÁLES, D. F. 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. 34, n. 2, p. 55-58, 2011.

APÊNDICE

APÊNDICE A – Certificado de trabalho apresentado no X SIMPÓSIO BRASILEIRO DE FARMACOGNOSIA



APÊNDICE B – Artigo Antifungal activity of geraniol and citronellol against food-relevant dematiaceous fungi *Cladosporium* spp.

NPC

Natural Product Communications

2015
Vol. 10
No. 0
1 - 2

Antifungal Activity of Geraniol and Citronellol Against Food-relevant Dematiaceous Fungi *Cladosporium* spp.

A. S. dos Santos ^a, G. S. Silva ^a, K. V. S. Silva ^a, M. I. O. Lima ^a, E. O. Lima ^b and F. O. Pereira^{a*}

^aLaboratory of Biochemistry, Academic Unit of Health, Education and Health Center, Federal University of Campina Grande, Cuité, Paraíba, Brazil 58175-000

^bLaboratory of Mycology, Department of Pharmaceutical Science, Health Sciences Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil, 58051-970

fillipepereira@ufcg.edu.br, Telephone: 55-83-998168410.

Received: October XX, 2015; Accepted: XX, 2015

Cladosporium spp. is a group of dematiaceous food-relevant fungi which are well dispersed in the environment and easily cause food spoilage and poisoning. The inhibitory effects of two monoterpenoids, (geraniol and citronellol), against strains of *Cladosporium carrioni*, *C. cladosporioides*, and *C. oxysporum* were investigated, and the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Fungicide Concentration (MFC) of the drugs were determined. MIC and MFC values of citronellol varied from 256 to 512 µg/mL and from 256 to 2048 µg/mL, respectively. MIC and MFC of geraniol varied similarly as compared to citronellol. Conidia germination, mycelial dry weight, and conidiogenesis of *Cladosporium* spp. were reduced by test-drugs (p<0.05). Such cell events are essential for fungal infection and development in foods. In conclusion, the inhibitory effects observed for citronellol and geraniol against *Cladosporium* spp. suggest that the drugs may serve as effective agents for controlling fungal contamination and growth in foods.

Keywords: citronellol, geraniol, *Cladosporium*, antifungal.

Cladosporium spp., dematiaceous fungi, are contaminants found as saprophytes in the soil and decaying materials, particularly in temperate regions, such as the semi-arid region of Brazil. The species most often isolated are *Cladosporium elatum*, *C. herbarum*, *C. sphaerospermum*, *C. cladosporioides*, *C. carrionii*, and *C. oxysporum* [1-2]. *Cladosporium* species are producers of volatile organic compounds associated with the odors of decaying food. Further, the genus *Cladosporium* produces several secondary metabolites; mycotoxins such as cladosporin and emodin, which are heat resistant and cause serious problems to human internal organs [3].

One of the main methods for controlling fungal growth in foods is application of chemical sanitizers such as chlorine or quaternary ammonium products. However, demand for natural alternatives to replace chemically synthesized antimicrobials to provide microbiologically safe foods, has been increasing [4]. In this context many studies have been conducted with natural substances, like the terpenes, investigating possible applications in microbiological food control. Terpene compounds, widely distributed in plants, are hydrogenated cyclic or aliphatic carbon chains. Within the group, those oxygenated due to the action of specific enzyme systems are called monoterpenoids (C₁₀), such as citronellol and geraniol [5].

This study presents the antifungal potential of citronellol and geraniol against strains of the genus *Cladosporium*. These monoterpenoids have demonstrated various biological activities; researchers have shown that geraniol has an outstanding neuroprotective [6], insecticidal [7], and antineoplastic activities [8]. Currently, there are reports in the literature confirming the antifungal potential of

geraniol against strains of *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp. and *Penicillium* spp. [9]. Meanwhile, it is reported that citronellol has: antimicrobial [9], anti-inflammatory [10] and repellent activities [11].

Initially, it was determined the MFC and MIC of citronellol and geraniol against the *Cladosporium* spp. strains. As can be seen in Table 1, the test-drugs inhibited the growth of the strains tested starting from the 512 µg/mL concentration. Importantly, the species *C. carrioni* was the most sensitive, having lower MIC values for both drugs. The control tests, confirmed viability of the fungal inoculum, sterility of the medium and no ungal growth when DMSO was used in the same concentrations as the drugs emulsifier. The fungicidal activity of citronellol was found in concentrations above the respective MIC values when tested against strains of *C. cladosporioides* and *C. oxysporum*. For the *C. carrioni* strains, the MIC of citronellol was identical to the MFC. Geraniol showed similar results.

Table 1: Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum fungicide concentration (MFC) of citronellol and geraniol against *Cladosporium* spp. strains.

Fungi	MIC/MFC (µg/mL) Citronellol	MIC/MFC (µg/mL) Geraniol
<i>C. carrioni</i> LM 227	256/256	512/512
<i>C. carrioni</i> URM 5109	256/256	256/512
<i>C. cladosporioides</i> URM 5737	512/1024	512/512
<i>C. cladosporioides</i> URM 6246	256/512	512/512
<i>C. oxysporum</i> URM 5234	512/2048	512/2048
<i>C. oxysporum</i> URM 5412	512/1024	512/1024

In our study, citronellol and geraniol showed outstanding antifungal activity against all of the strains tested. The literature has no reports of citronellol and geraniol antifungal activity against *Cladosporium* spp. This unique character makes the results of this study highly relevant. However, the antifungal potential of geraniol and citronellol has been reported in other studies, which proved such antifungal activity against dermatophyte species by inhibiting ergosterol biosynthesis. The antifungal activity against contaminant fungi such as *Fusarium*, *Aspergillus*, and *Penicillium* species was determined [12-13]. The essential oil of *Cymbopogon winterianus* Jowitt ex. Bor (high in citronellol and geraniol) is therefore recognized as having antifungal activity [14].

Cladosporium spp. causes spots on plants and fruit, usually as a consequence of fungal mycelial production. Inhibiting this process can prevent the deterioration and loss of contaminated foods [5, 15]. For these reasons, the effect of the test drugs on the mycelial growth of *Cladosporium* spp. (1/2MIC, MIC and 2xMIC) was analyzed by dry mycelial mass measurements, see (Figure 1). Our results showed that at all concentrations tested, citronellol and geraniol significantly inhibited ($p < 0.05$) the mycelial growth of *C. cladosporioides* URM 5737, and *C. oxysporum* URM 5234 as compared to the control. Regarding the strain *C. carrioni* LM 227, geraniol only showed inhibition ($p < 0.05$) at the MIC and 2xMIC concentrations (Figure 1a).

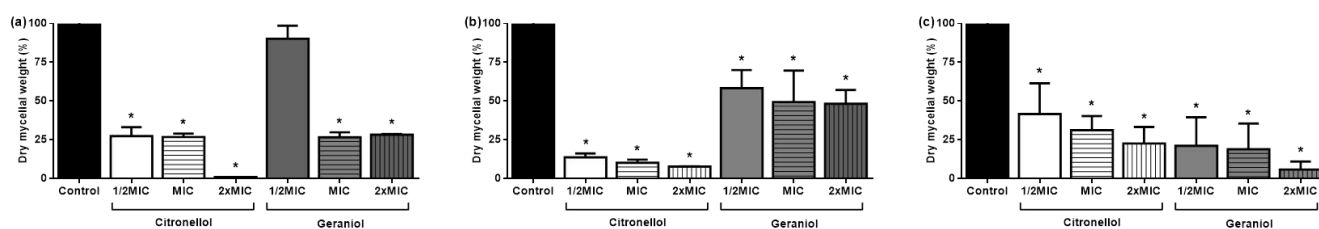


Figure 1. Percentage of dry mycelial weight produced by *Cladosporium carrioni* LM 227 (a), *Cladosporium cladosporioides* URM 5737 (b) and *Cladosporium oxysporum* URM 5234 (c) in the absence (control) and presence of citronellol and geraniol. Control produced 100% of dry mycelial weight. * $p < 0.05$ compared to control.

The growth of filamentous fungi involves polarized hyphae growth, revealing an increase in horizontal extensions and branching of hyphae in a continuous manner. However, for this morphological phenomenon to occur, the germination of fungal conidia has a decisive role [16]. On this basis, we felt it necessary to analyze the effects of citronellol and geraniol on *Cladosporium* spp. conidia germination: interference in the conidia germination process of

Cladosporium spp. can be seen in Figure 2. For these experimental conditions, all concentrations of the test-drugs inhibited the conidia germination processes of *C. cladosporioides* URM 5737, *C. carrioni* LM 227 and *C. oxysporum* URM 5234 when compared to the test controls (absence of the drug) ($p < 0.05$).

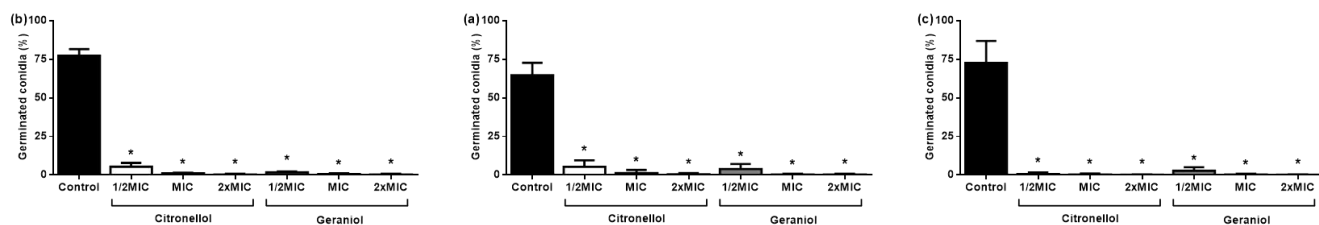


Figure 2. Percentage of germinated conidia of *Cladosporium carrioni* LM 227 (a), *Cladosporium cladosporioides* URM 5737 (b) and *Cladosporium oxysporum* URM 5234 (c) in the absence (control) and presence of citronellol and geraniol. * $p < 0.05$ compared to control.

Later, we asked whether conidiogenesis itself would be hampered by the presence of citronellol and geraniol. For this, we analyzed the amount of conidia produced by the fungi in cultures in the presence of the test-drugs (Figure 3). The results show that all groups showed inhibition of conidial production ($p < 0.05$), except geraniol (1/2MIC), which did not significantly inhibit conidiogenesis for *C. oxysporum*

URM 5234 as compared to the control (Figure 3c). The inhibitory effects of natural drugs, (including monoterpenoids) on mycelium, conidia production, and germination of conidia for *Trichophyton rubrum* [13] and *Rhizopus oryzae* [18] have been previously reported.

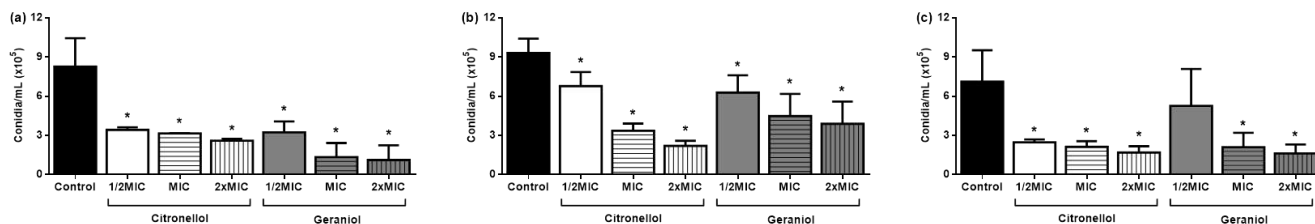


Figure 3. Number of conidia/mL produced by *Cladosporium carrioni* LM 227 (a), *C. cladosporioides* URM 5737 (b) and *C. oxysporum* URM 5234 (c) in the absence (control) and presence of citronellol and geraniol. *p < 0.05 compared to control.

There is evidence in the literature that due to the lipophilic profile of terpenes, their antifungal mode of action involves disruption of the plasma membrane lipid bilayer. A subsequent release of intracellular components, and disruption of the activity of membrane enzymes, interferes with energy dependent processes such as: solute transport, metabolism regulation, ergosterol synthesis, cell wall formation and morphogenesis [5, 13, 17].

Fungi are capable of causing large income losses in food, principally affecting fresh fruits, and vegetables. In high humidity and high temperature conditions they are highly susceptible to contamination [5]. For years, researchers have been seeking an alternative to applying chlorine-based compounds; new ways to control fungi contaminants. Currently, the safety of such chemical preservatives is being debated, since many of these products have both carcinogenic and teratogenic properties, as well as residual toxicity [19-20].

The use of natural antimicrobial agents for food preservation is becoming a globally recognized control measure; to be used either alone or combined with other preservation technologies [15]. Although many reports highlight terpenes and essential oils as potential flavoring agents, they represent a source for natural drugs with antifungal potential. Yet, possible application as food preservatives requires specific knowledge of their properties, such as those presented in this study. Further, their organoleptic effects on the food matrix must also be analyzed [5, 21].

Our results are relevant because they demonstrate that both citronellol and geraniol effectively interfere in relevant fungal growth processes. In conclusion, we present two natural drugs with anti-*Cladosporium* potential; citronellol and geraniol, which may well be useful in the food industry. However, even with proof of their antifungal potential, further studies are necessary so that the drugs may be applied appropriately as preservatives in food.

Experimental

Fungal strains: For the antifungal activity tests, the strains: *C. carrioni* (LM 227, URM 5109), *C. cladosporioides* (URM 5737, URM 6246), and *C. oxysporum* (URM 5234, URM 5412), were taken from the culture collections of the (Federal University of Paraíba) Mycology Laboratory, and the (Federal University of Pernambuco) Department of Mycology. The fungi were grown in potato dextrose agar at 28° C for 7 days. Recent cultures were overlaid with sterile saline (0.9 % NaCl), and the suspensions formed by gentle agitation. The resulting mixture of conidia and hyphal fragments were transferred to sterile test tubes. The conidia were counted using a hemocytometer and adjusted to an inoculum of approximately 10⁶ conidia/mL [13, 22].

Test compounds: Citronellol and geraniol were purchased from Sigma-Aldrich® (Brazil). Emulsions were freshly prepared for the tests by dissolving first in dimethylsulfoxide (DMSO), and sterilized

distilled water to obtain a concentration of 1024 µg/mL. From this concentration, dilutions were performed to achieve a concentration of µg/mL using RPMI 1640 medium.

Determination of minimum inhibitory concentration (MIC): Determining the MIC for each test-drug was carried out by microdilution technique using 96 well flat bottom micro-titer plates as adapted from document M38-A of the CLSI [21]. To each row of the plate was added 100 µL of the diluted test drugs in RPMI 1640. To each well of the plate was added 100 µL of a previously prepared inoculum diluted in RPMI 1640 at a ratio of 1:50. A fungal control was performed by replacing the test drug using sterile saline (growth control). A sterility control and DMSO were also performed. The plates were sealed and incubated at 28° C for 5 days. The MIC values were determined by visual analysis of growth inhibition in each well, as compared to control growth. The MIC was the lowest concentration of drugs capable of inhibiting observed fungal growth in the wells by 100%. The experiment was performed in triplicate and MIC values expressed as a geometric mean.

Determination of minimum fungicide concentration (MFC): A 10 µL aliquot from each well having no fungal growth was subcultured onto a plate with Sabouraud dextrose agar. The plates were incubated at 28° C for 5 days. MFC was considered to be the lowest concentration sown, where the growth was less than 3 colony-forming units. The experiment was performed in triplicate and the MFC values were expressed as a geometric mean [23-24].

Effects on conidia germination: In sterile test tubes, 500 µL of the RPMI 1640 plus the test-drugs (1/2MIC, MIC, 2xMIC) were homogeneously mixed with 500 µL of *C. carrioni* LM 227, *C. cladosporioides* URM 5737, and *C. oxysporum* URM 5234 inocula. The tubes were incubated at 28° C for 48 hours. The quantities of germinated and non-germinated conidia were determined using a hemocytometer. The percentage of germinated conidia was calculated for each experimental group. A control with no drug was used. The whole experiment was performed in triplicate [25].

Effects on dry mycelial weight: The analysis of test-drug interference on mycelial growth was performed by determining the dry mycelial mass *C. carrioni* LM 227, *C. cladosporioides* URM 5737, and *C. oxysporum* URM 5234 [26, 27]. To a sterile test tube were added 2.5 mL of RPMI 1640, previously completed with the test-drugs solution (1/2MIC, MIC, 2xMIC), and then 0.5 mL of inoculum to each tube. Controls (no drugs) were made in a similar manner. The system was incubated at 28° C for 5 days to determine the dry mycelial mass. For this, the cultures were sterile filtered using filter paper (porosity: 11 µm), and washed with distilled sterile water. The mycelium retained in the filter paper was subjected to drying in an oven at 60°C for 10 minutes. At the end, the filter paper containing the dry mycelium was weighed and the dry mycelial mass percentage was calculated considering the experiment control as 100 % mycelial production. The experiment was performed in triplicate.

Effects on fungal conidiogenesis: The conidia production of *C. carrioni* LM 227, *C. cladosporioides* URM 5737, and *C. oxysporum* URM 5234 were analyzed after cultivation on Sabouraud dextrose agar in the absence and presence of test-drugs (1/2MIC, MIC, 2xMIC) [28]. Into sterile test tubes, was poured 10 mL of Sabouraud dextrose agar set in a water bath at 35° C. The test drugs were then added. Controls (no drugs) were made in a similar manner. On the surface of the medium was placed a 2 mm portion of fungal mycelium, newly grown in potato dextrose agar, and the whole system incubated at 28° C for 5 days. Afterwards, the conidia were collected by adding 5 mL of sterile saline solution to the surface of

the fungal colonies. The inoculum was analyzed in a hemocytometer to count the number of conidia in each group tested. Assays were performed in triplicate.

Statistical analysis: The results were expressed as mean ± SEM. The data were compared statistically using the unpaired t-test. A p <0.05 was considered significant.

Acknowledgments: The authors thank the Brazilian agency CNPq (National Counsel of Technological and Scientific Development) for financial support. The authors report no conflicts of interest.

References

- [1] Newell DG, Koopmans M, Verhoef L, Duizer E, Aidara-Kane A, Sprong H. (2010) Food-borne diseases - The challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge. *International Journal of Food Microbiology*, **139**, 3-15.
- [2] Bensch K, Braun U, Groenewald JZ, Crous PW. (2012) The genus *Cladosporium*. *Studies in Mycology*, **72**, 1–401.
- [3] Ogórek R, Lejman A, Pusz W, Miodynska P. (2012) Characteristics and taxonomy of *Cladosporium* fungi. *Mikologia Lekarska*, **19**, 80-85.
- [4] Suwa M, Oie S, Furukawa H. (2013) Efficacy of disinfectants against naturally occurring and artificially cultivated bacteria. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, **36**, 360-363.
- [5] Hyldgaard M, Mygind T, Meyer RL. (2012) Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Frontiers in Microbiology*, **3**, 1-24.
- [9] Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. (2008) Biological effects of essential oils—a review. *Food and Chemical Toxicology*, **46**, 446–475.
- [6] Prasad SN, Muralidhara. (2014) Neuroprotective effect of geraniol and curcumin in an acrylamide model of neurotoxicity in *Drosophila melanogaster*: relevance to neuropathy. *Journal of Insect Physiology*, **60**, 7-16.
- [7] Jeon JH, Lee CH, Lee HS. (2009) Food protective effect of geraniol and its congeners against stored food mites. *Journal of Food Protection*, **4**, 1468–1471.
- [8] Wiseman DA, Werner SR, Crowell PL. (2007) 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*, **320**, 1163–1170.
- [9] Aoudou Y, Léopold TN, Michel JDP, Xavier EF, Moses MC. (2010) Antifungal properties of essential oils and some constituents to reduce foodborne pathogen. *Journal of Yeast and Fungal Research*, **1**, 1-8.
- [10] Brito RG, Guimarães AG, Quintans JSS, Santos MR, De Sousa DP, Badaue-Passos DJr, De Lucca WJr, Brito FA, Barreto EO, Oliveira AP, Quintans LJr. (2012) Citronellol, a monoterpene alcohol, reduces nociceptive and inflammatory activities in rodents. *Journal of Natural Medicines*, **66**, 637-644.
- [11] Semmler M, Abdel-Ghaffar F, Schmidt J, Mehlhorn H. (2014) Evaluation of biological and chemical insect repellents and their potential adverse effects. *Parasitology Research*, **113**, 185–188.
- [12] Shin S, Lim S. (2004) Antifungal effects of herbal essential oils alone and in combination with ketoconazole against *Trichophyton* spp. *Journal of Applied Microbiology*, **97**, 1289–1296.
- [13] Pereira FO, Mendes JM, Mota KSL, Oliveira WA, Lima EO. (2015) Antifungal activity of geraniol and citronellol, two monoterpenes alcohols, against *Trichophyton rubrum* involves inhibition of ergosterol biosynthesis. *Pharmaceutical Biology*, **53**, 228-234.
- [14] Oliveira WA, Pereira FO, Luna CGDG, Lima IO, Wanderley PA, Lima RB, Lima EO. (2011) Antifungal activity of *Cymbopogon winterianus* Jowitt ex Bor against *Candida albicans*. *Brazilian Journal of Microbiology*, **42**, 433-441.
- [15] Riquelme M. (2013) Tip growth in filamentous fungi: a road trip to the apex. *Annual Review of Microbiology*, **67**, 587-609.
- [16] Seiler S, Plamann M. (2003) The genetic basis of cellular morphogenesis in the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Molecular Biology of the Cell*, **14**, 4352–4364.
- [17] Di Pasqua R, Betts G, Hoskins N, Edwards M, Ercolini D, Mauriello G. (2007) Membrane toxicity of anti-microbial compounds from essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **55**, 4863 – 4870.
- [18] Mota KSL, Pereira FO, Oliveira WA, Lima IO, Lima EO. (2012) Antifungal Activity of *Thymus vulgaris* L. Essential Oil and Its Constituent Phytochemicals against *Rhizopus oryzae*: Interaction with Ergosterol. *Molecules*, **17**, 14418-14433.
- [19] Tian J, Huang B, Luo X, Zeng H, Ban X, He J, Wang Y. (2012) The control of *Aspergillus flavus* with *Cinnamomum jensenianum* Hand.-Mazz essential oil and its potential use as a food preservative. *Food Chemistry*, **130**, 520-527.
- [20] Schoeny R. (2010) Disinfection by-products: a question of balance. *Environmental Health Perspective*, **118**, 466-467.
- [21] Gómez-López VM. (2013) Generation of trihalomethanes with chlorine-based sanitizers and impact on microbial, nutritional and sensory quality of baby spinach. *Postharvest Biology and Technology*, **85**, 210-217.
- [22] Clinical and Laboratory Standards Institute. (2002) *Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi*. Approved standard M38-A.
- [23] Klepser ME, Ernst EJ, Ernst ME, Messer SA, Pfaller MA. (1998) Evaluation of endpoints for antifungal susceptibility determinations with LY303366. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **42**, 1387-1391.
- [24] Ernst EJ, Klepser ME, Ernst ME, Messer SA, Pfaller MA. (1999) *In vitro* pharmacodynamic properties of MK-0991 determined by time-kill methods. *Mycology*, **33**, 75-80.
- [25] Liu T, Zhang Q, Wang L, Yu L, Leng W, Yang J, Chen L, Peng J, Ma L, Dong J, Xu X, Xue Y, Zhu Y, Zhang W, Yang L, Li W, Sun L, Wan Z, Ding G, Yu F, Tu K, Qian Z, Li R, Shen Y, Li Y, Jin Q. (2007) 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*, **11**, 8-100.
- [26] Rasooli I, Abyaneh MR. (2004) Inhibitory effect of thyme oils on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. *Food Control*, **15**, 479–483.
- [27] Sharma N, Tripathi A. (2006) Effects of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck epicarp essential oil on growth and morphogenesis of *Aspergillus niger* (L.) Van Tieghem. *Microbiological Research*, **163**, 337-344.
- [28] Tzortzakis NG, Economakis CD. (2007) Antifungal activity of lemongrass (*Cymbopogon citratus* L.) essential oil against key postharvest pathogens. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, **8**, 253-258.