

UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
ESCOLA DE ENGENHARIA INDUSTRIAL METALÚRGICA DE VOLTA REDONDA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA AMBIENTAL

CAIO HENRIQUE DA SILVA SANTOS

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO CITRAL SOBRE *Aspergillus flavus*

VOLTA REDONDA
2021

CAIO HENRIQUE DA SILVA SANTOS

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO CITRAL SOBRE *Aspergillus
flavus***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Ambiental da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Tecnologia Ambiental.

Orientadora: Prof^a. D.Sc. Ana Paula Martinazzo
Co-Orientadora: Prof^a. D.Sc. Lilian Weitzel Coelho Paes
Co-Orientador: Prof. D.Sc. Carlos Eduardo de Souza Teodoro

Volta Redonda, RJ
2021

Ficha catalográfica automática - SDC/BEM
Gerada com informações fornecidas pelo autor

S237a Santos, Caio Henrique da Silva
Avaliação da atividade antifúngica do citral sobre
Aspergillus flavus / Caio Henrique da Silva Santos ; Ana Paula
Martinazzo, orientadora ; Paes, Lilian Weitzel Coelho; Teodoro,
Carlos Eduardo de Souza /, coorientador. Volta Redonda, 2021.
76 f.

Dissertação (mestrado)-Universidade Federal Fluminense,
Volta Redonda, 2021.

DOI: <http://dx.doi.org/10.22409/PGTA.2021.m.41193339812>

1. Microbiologia. 2. Óleos Essenciais. 3. Fungos. 4.
Química Teórica. 5. Produção intelectual. I. Martinazzo,
Ana Paula, orientadora. II. Teodoro, Carlos Eduardo de Souza /
Paes, Lilian Weitzel Coelho, coorientadores. III. Universidade
Federal Fluminense. Escola de Engenharia Industrial e
Metalúrgica de Volta Redonda. IV. Título.

CDD -

CAIO HENRIQUE DA SILVA SANTOS

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO CITRAL SOBRE *Aspergillus
flavus***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Ambiental da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Tecnologia Ambiental.

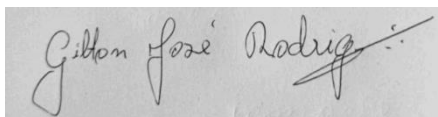
Aprovada em 25 / 06 / 2021.

BANCA EXAMINADORA

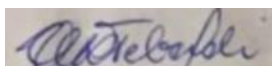


Prof^a. D.Sc. Ana Paula Martinazzo - UFF

Orientadora



Prof. D.Sc. Gilton José Rodrigues - UFF



Prof. D.Sc. Victor Maximiliano Reis Tebaldi – UBM/UGB

Volta Redonda/RJ

2021

RESUMO

Os fungos da espécie *Aspergillus flavus* são produtores das aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 em condições de pós-colheita como o armazenamento, transporte e processamento de alimentos. Estes podem causar perdas econômicas significativas para produtores, comerciantes e processadores de diversas culturas suscetíveis. O uso de produtos naturais como os óleos essenciais é uma alternativa interessante para combater esses agentes e aumentar a durabilidade dos produtos, sendo uma alternativa ao uso de agrotóxicos no controle de fungos. Os óleos essenciais podem inibir o crescimento do fungo através de danos da estrutura da membrana celular e alterações nas funções das organelas da célula fúngica, inibindo a atividade do núcleo e a síntese de proteínas. Citral é o nome dado a uma mistura de dois isômeros geométricos: geranial e neral e ocorre naturalmente em muitos óleos essenciais. Como antifúngico, danifica a estrutura da parede celular e membrana, levando à perda de funções da membrana. Neste cenário, este estudo teve como objetivos, avaliar, através de análises experimentais e teóricas, a interação, a reatividade e a atividade antifúngica do citral sobre o *A. flavus*, seus efeitos na germinação de esporos, permeabilidade da membrana e biossíntese de ergosterol. Os cálculos teóricos indicam que tanto o geranial (106,68 Kcal/mol) como o neral (107,93 Kcal/mol) possuem energia de interação com o ergosterol, sendo o segundo ligeiramente mais estável que o primeiro. A germinação de esporos por *A. flavus* foi comprometida quando exposto a diferentes concentrações de citral, principalmente quando comparados os resultados obtidos nas concentrações superiores a 0,8 µL/mL com o controle. Foram observadas alterações no metabolismo do fungo, onde o *A. flavus*, ao ser exposto a um meio com adição de glicose, teve sua ação natural de acidificação do meio inibida em determinadas concentrações (0,08 e 0,16 µL/mL). Os efeitos do citral na biossíntese do ergosterol foram avaliados, onde a quantificação do esterol foi gradualmente diminuída a partir da exposição a certas concentrações de citral (0,04; 0,08; 0,16; 0,32; 0,64 µL/mL).

Palavras-chave: fungos, óleos essenciais, TFD, metabolismo secundário

ABSTRACT

Aspergillus flavus is a species of fungi that produce the aflatoxins B1, B2, G1 e G2 under post-harvest conditions such as storage, transport and food processing. The fungi may cause significant economic losses to producers, traders and processors of various susceptible cultures. The use of natural products such as essential oils is an interesting alternative against these pathogens and are able to increase the products durability. Thus, it has been tested as an alternative to agrochemicals in control of fungi. Essential oils can inhibit the fungi growth by interrupting fungal membrane structure and function, inhibiting the nuclei activity and synthesis of proteins. Citral is the name given to a mixture of two geometric isomers: geranial and neral and occur naturally in a series of essential oils. As an antifungal, it is capable of damaging the cell wall and membrane structures, which leads to loss of membrane functions. In this context, this study aimed to conduct theoretical and experimental studies to evaluate the interaction, reactivity and the antifungal activity of citral on *A. flavus* by assessing the effects on fungi spore germination, membrane permeability, ergosterol biosynthesis. Theoretical calculations indicate that both geranial (106,68 Kcal/mol) and neral (107,93 Kcal/mol) have interaction energy with ergosterol as neral being slightly stabler than the geranial. The germination of spores by *A. flavus* was drastically compromised when exposed to different concentrations of citral, mainly at concentrations higher than 0.8 $\mu\text{L/mL}$. Changes in the metabolism of the fungi were observed. When incubated with citral and exposed in a medium with glucose, the natural acidification of the medium was inhibited at certain concentrations (0,08 e 0,16 $\mu\text{L/mL}$). The effects of citral on the ergosterol biosynthesis illustrates that the sterol quantification gradually decreased as citral concentrations increased (0,04; 0,08; 0,16; 0,32; 0,64 $\mu\text{L/mL}$).

Key words: fungi, essential oils, DFT, secondary metabolism.

Dedico este trabalho aos meus pais, pois graças aos seus esforços e sacrifícios pude cursar o Ensino Superior e agora um Mestrado.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais Irany e Fátima e minha irmã Izadora por todo carinho, incentivo e apoio incondicional em todos os momentos da minha caminhada durante o mestrado.

À minha namorada Mayara, por estar comigo em todos os momentos, por todo o amor, carinho e apoio ao longo destes anos.

À Universidade Federal Fluminense (UFF) e o Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Ambiental (PGTA) pela oportunidade de realizar o mestrado.

À minha orientadora professora Ana Paula Martinazzo, por todos os ensinamentos, pela paciência e apoio em todos os momentos durante o mestrado.

Ao coorientador professor Carlos Eduardo de Souza Teodoro, por todos os ensinamentos, apoio e orientações durante as atividades no laboratório.

À coorientadora professora Lilian Weitzel Coelho Paes por todos os ensinamentos na área de Química Teórica, onde tive a oportunidade de desvendar um novo mundo.

A todos os professores e funcionários do PGTA pelos ensinamentos e apoio durante esta jornada.

Aos amigos da turma do PGTA-2018, em especial Analyse Villanueva, Alexandra e Fernando Raggi pela amizade e companhia no mestrado.

Aos colegas de Laboratório de Biotecnologia e Processamentos Agrícolas e Pós-Colheita, em especial a aluna de graduação Sabrinna Aires pelo auxílio e suporte essenciais nas minhas primeiras atividades no laboratório.

Aos amigos da Azevedo Consultoria Ambiental que durante todo o mestrado me apoiaram incondicionalmente para a realização deste sonho.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Estrutura química da quitina.	20
Figura 2: Estrutura do ergosterol presente na membrana fúngica.	21
Figura 3: Via biossintética do ergosterol.	22
Figura 4: <i>Aspergillus flavus</i> crescido em meio de cultura.	26
Figura 5: Estrutura da Aflatoxina B1.	27
Figura 6: Ciclo biossintético dos metabólitos secundários.	29
Figura 7: Capim-limão (<i>Cymbopogon citratus</i>).	33
Figura 8: Estrutura geranial (a); neral (b) e ergosterol (c).	38
Figura 9: Orbitais moleculares <i>HOMO</i> para geranial (a) e neral (b) em fase gasosa.	47
Figura 10: Orbitais moleculares <i>LUMO</i> para geranial (a) e neral (b) em fase gasosa.	47
Figura 11: Orbitais moleculares <i>HOMO</i> para geranial (a) e neral (b) em fase aquosa.	48
Figura 12: Orbitais moleculares <i>LUMO</i> para geranial (a) e neral (b) em fase aquosa.	48
Figura 13: Mapa de Potencial Eletrostático das moléculas de geranial (a) e neral (b).	49
Figura 14: Estruturas otimizadas dos complexos com wb97xd/6-311g(d,p) em fase aquosa.	50
Figura 15: Efeito das diferentes concentrações do citral na acidificação do meio pelo fungo quando estimulado por glicose após incubação.	51
Figura 16: Efeito de diferentes concentrações de citral na germinação de esporos de <i>A. flavus</i>	55
Figura 17: Efeitos do citral na produção de ergosterol de <i>A. flavus</i> após os períodos de incubação.	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Parâmetros estruturais calculados em fase aquosa do Geranial com o método AM1	43
Tabela 2: Parâmetros estruturais calculados em fase aquosa do Neral com o método AM1	44
Tabela 3: Parâmetros estruturais calculados em fase aquosa do Ergosterol com métodos AM1	45
Tabela 4: Energia dos orbitais de fronteira para o Geranial e Neral com WB97XD/6-311g(d,p).	46
Tabela 5: Energias absolutas Ergosterol, Neral, Geranial e Complexos com wb97xd/6-311g(d,p).	50
Tabela 6: Resumo da análise de variância dos dados obtidos do efeito do citral, durante o período de incubação, sobre a quantidade a (%) de acidificação do meio produzida pelo fungo <i>A. flavus</i>	52
Tabela 7: Porcentagem média (%) de acidificação do meio por período de incubação.	53
Tabela 8: Resumo da análise de variância dos dados obtidos do efeito do citral, durante o período de incubação (dias) sobre a germinação de esporos do fungo <i>A. flavus</i>	55
Tabela 9: Porcentagem média de inibição, <i>in vitro</i> , da germinação de esporos do fungo <i>Aspergillus flavus</i> para diferentes dosagens ($\mu\text{L/mL}$) de citral durante o período de incubação.	56
Tabela 10: Resumo da análise de variância dos dados obtidos do efeito do citral, durante o período de incubação (horas), sobre a quantidade de ergosterol sintetizada pelo fungo <i>A. flavus</i>	59
Tabela 11: Quantificação média de ergosterol encontrado no fungo <i>Aspergillus flavus</i> para diferentes dosagens ($\mu\text{L/mL}$) de citral durante os diferentes períodos de incubação.....	59

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AF	Aflatoxina
Al	Alumínio
ATP	Adenosina Trifosfato
B	Boro
BDA	Batata Dextrose Ágar
Br	Bromo
C	Carbono
CFM	Concentração Fungicida Mínima
CIM	Concentração Inibitória Mínima
Cl	Cloro
CPCM	Conductor-like Polarizable Continuum Model
DFT	Density Functional Theory
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
eV	elétron-volt
Ge	Germânio
GPI	GPI - Glicosilfosfatidilinositol
H	Hidrogênio
Hg	Mercúrio
<i>HOMO</i>	Highest Occupied Molecular Orbital
I	Iodo
<i>LUMO</i>	Lowest Unoccupied Molecular Orbital

MEP	Mapa de Potencial Eletrostático
MNDO	Modified Neglect of Diatomic Overlap
N	Nitrogênio
OE	Óleos Essenciais
P	Fósforo
PCM	Polarizable Continuum Model
PER	Peroxidase
pH	Potencial Hidrogeniônico
RNA	Ácido Ribonucleico
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
S	Enxofre
SDA	Sabouraud Dextrose-Ágar
Si	Silício
Sn	Estanho
TFD	Teoria do Funcional da Densidade
Zn	Zinco

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVOS	17
2.1	OBJETIVO GERAL	17
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
3.1	FUNGOS	18
3.1.1	Gênero <i>Aspergillus</i>	22
3.1.2	<i>Aspergillus flavus</i>	25
3.2	ÓLEOS ESSENCIAIS	27
3.2.1	Metabolismo Secundário das plantas	27
3.2.2	Propriedades e Composição dos Óleos Essenciais	29
3.2.3	Propriedades Antifúngicas e Modo de Ação dos Óleos Essenciais	31
3.2.4	Citral	32
3.3	MÉTODO SEMIEMPÍRICO	34
3.4	O MÉTODO TFD	35
3.4.1	Método de Solvatação Implícita	36
4	MATERIAL E MÉTODOS	38
4.1	CÁLCULOS TEÓRICOS	38
4.2	INIBIÇÃO DA ACIDIFICAÇÃO ESTIMULADA POR GLICOSE	39
4.3	ENSAIO DE INIBIÇÃO DA GERMINAÇÃO DE ESPOROS	40
4.4	QUANTIFICAÇÃO DE ERGOSTEROL	41
4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	42
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
5.1	MODELAGEM MOLECULAR	43
5.1.1	Parâmetros Estruturais	43
5.2	ANÁLISE DOS ORBITAIS DE FRONTEIRA GERANIAL E NERAL	46
5.3	ENERGIA DE INTERAÇÃO	49
5.4	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DO CITRAL NA INIBIÇÃO DA ACIDIFICAÇÃO DO FUNGO <i>A. flavus</i> ESTIMULADA POR GLICOSE	51
5.5	AVALIAÇÃO EXPERIMENTAL DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO CITRAL SOBRE A GERMINAÇÃO DE ESPOROS DO FUNGO <i>A. flavus</i>	54
5.6	AVALIAÇÃO DA QUANTIFICAÇÃO DE ERGOSTEROL	57
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	62
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63

8 APÊNDICES	76
APÊNDICE A – Tabela de comprimentos médios de ligação para algumas ligações simples, duplas e triplas	76

1 INTRODUÇÃO

Os fungos são organismos eucariontes, que podem assumir formas unicelulares ou multicelulares, se apresentando como leveduras ou estruturas filamentosas (LUI, TYRING e MCGINNIS, 2006). Sua estrutura é composta por membrana plasmática, parede celular e citoplasma com organelas funcionais (ROBINSON, 2014). Apesar da grande importância na indústria alimentícia, inúmeras perdas econômicas são associadas a fungos por causarem redução de nutrientes, da palatabilidade e à presença de micotoxinas, que são metabólitos secundários com potencial para produzir toxicoses no homem e nos animais (FILHO et al., 2013).

As espécies do gênero *Aspergillus* ocorrem predominantemente na terra e tem uma longa história de aplicação na agricultura e na indústria. São usadas para sintetizar biologicamente matérias-primas, produtos semiacabados ou produtos acabados na indústria alimentícia e farmacêutica (ZHANG et al., 2016). A espécie *Aspergillus flavus* é predominantemente encontrada em culturas alimentares, particularmente milho, amendoim, sementes oleaginosas e nozes, ocorrendo em regiões tropicais e subtropicais em todo o mundo. As perdas econômicas inerentes à presença deste fungo em alimentos estão diretamente relacionadas à produção de aflatoxinas, que são responsáveis por causar morbidades em humanos e animais, incluindo câncer e até mesmo levando a óbitos (KHLANGWISSET et al., 2011; WINTER e PEREG, 2019).

O aumento do risco à saúde por diversas patologias, como câncer, doenças hepáticas e alterações endócrinas, causadas por resíduos químicos em alimentos, tem levado à busca de alternativas sustentáveis de manejo agrícola, como o uso de óleos essenciais para o desenvolvimento de fungicidas naturais (BOMFIM et al., 2020). O uso de produtos naturais como os óleos essenciais se configura como uma alternativa interessante para combater esses agentes microbianos e aumentar a durabilidade de produtos. Devido à existência de microrganismos resistentes a antibióticos e antissépticos convencionais e a conscientização da população referente aos efeitos de aditivos químicos na saúde, tem-se aumentado o interesse na utilização de produtos naturais efetivos e seguros a fim de se evitar assim danos para quem o ingere (WIŃSKA et al., 2019).

Os óleos essenciais são líquidos oleosos aromáticos obtidos a partir de material vegetal - flores, sementes, folhas, cascas, raízes; possuem atividades antimicrobianas atribuídas aos seus vários constituintes como terpenoides e compostos fenólicos, reduzindo o crescimento e limitando a sobrevivência de diversos microrganismos patogênicos. O

mecanismo de ação dos óleos essenciais está relacionado a alteração da permeabilidade e fluidez da membrana, danificação da parede e membrana celular em vários graus, extravasamento do citoplasma e inibição parcial da biossíntese de DNA, RNA, proteínas e do ergosterol (BURT, 2004; LV et al., 2011; YUTANI et al., 2011; KEREKES et al., 2013; RAUT e KARUPPAYIL, 2014).

O monoterpeno citral é o nome dado a uma mistura de dois isômeros geométricos: geranial e neral. Faz parte da composição de diversos óleos essenciais de espécies cítricas e aromáticas como o capim-limão (*Cymbopogon citratus*), lípia (*Lippia alba*), capim-limão-brasileiro (*Elionurus latiflorus*) e alfazema-do-brasil (*Aloysia gratissima*) (FRIEDMAN et al., 2004).

Diversos estudos tem demonstrado que o citral pode apresentar efeitos anti-inflamatórios, antitumorais e antioxidantes, além de agir como agente bactericida e fungicida. Quando o fungo é exposto ao citral, este agente danifica a estrutura da parede celular e membrana, causa danos às organelas do citoplasma celular e inibe o crescimento fúngico em determinadas concentrações. Também é alvo de diversas pesquisas que investigam suas propriedades como conservante alimentício, por exemplo, em sucos de laranja, saladas de fruta e peixes (FRIEDMAN et al., 2004; JIANG e LUO et al., 2005; MARQUES et al., 2013; SANTOS et al., 2017; TANG et al., 2018; ZIELIŃSKA et al., 2018; THIELMANN e MURANYI, 2019).

Neste cenário, o presente trabalho buscou avaliar a atividade antifúngica do citral sobre o fungo *Aspergillus flavus* por meio da realização de experimentos em laboratório e da modelagem molecular para avaliar a interação e reatividade do componente com elementos da membrana do microrganismo e sua atividade antifúngica.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade antifúngica do citral no controle do *Aspergillus flavus*

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a modelagem molecular para avaliar a interação e reatividade do citral com moléculas análogas que formam as membranas do microrganismo;
- Avaliar o efeito do citral na permeabilidade da membrana de *A. flavus*;
- Avaliar o efeito do citral na germinação de esporos por *A. flavus*;
- Avaliar o efeito do citral na biossíntese de ergosterol por *A. flavus*.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 FUNGOS

Os fungos consistem em uma variedade de organismos com diversas formas e funções, sendo registrados em quase todos os nichos ecológicos e definidos por uma combinação de características morfológicas, estruturais, químicas, nutricionais e de DNA (ROBINSON, 2014). São organismos cosmopolitas e onipresentes em ambientes subaéreos e subsolares, e atuam na natureza como decompositores, simbiontes e patógenos mutualistas de animais e plantas (GADD, 2007). Tem a capacidade de adotar uma variedade de estratégias de crescimento, metabolismo, morfologia, adaptação a ambientes extremos e associações com animais, plantas, algas e cianobactérias (YU e KELLER, 2005; GRIMM et al., 2005; MAGAN, 2007; ROUSK e BAATH, 2011; ALWATHNANI e PERVEEN, 2012). A nutrição é do tipo heterotrófica, na qual se alimentam através de absorção de carboidratos e outros nutrientes de animais, plantas ou matéria em decomposição no substrato em que vivem (MCCONNAUGHEY, 2007). Possuem um papel na manutenção da estrutura do solo, devido ao seu hábito de crescimento de ramificação filamentosa, produção de exopolímeros e no acesso de nitrogênio orgânico às plantas (ZAK et al., 2019). Também possuem papel no ciclo biogeoquímico dos elementos como o carbono, nitrogênio, fósforo, enxofre e metais (GADD, 2006).

A reprodução pode ocorrer de maneira sexual (divisão celular e meiose), parasexual (envolve divisão celular seguida de uma desdiploidização gradual) ou assexual (apenas divisões mitóticas), por meio de brotamento (assexuado), esporulação (sexual ou assexuada) (WEBSTER e WEBER, 2007; HEITMAN et al., 2013). Na reprodução assexuada, um único indivíduo dá origem a uma duplicata genética do progenitor sem uma contribuição genética de outro indivíduo. Alguns fungos unicelulares (leveduras) se reproduzem por divisão celular simples (mitose) na qual uma célula sofre divisão nuclear e se divide em duas células filhas; após algum crescimento, essas células se dividem e, eventualmente, uma população de células se forma. Em fungos filamentosos, o micélio pode se fragmentar em vários segmentos, cada um dos quais é capaz de se transformar em um novo indivíduo (HAWKER, 2016). Já a reprodução sexual ocorre em três estágios: a plasmogamia consiste na fusão de dois núcleos haploides compatíveis. Neste caso, dois tipos nucleares estão presentes na mesma célula, mas os núcleos ainda não se fundiram. A cariogamia resulta na fusão desses núcleos haploides e

na formação de um núcleo diploide. Depois que a cariogamia ocorre, a meiose geralmente segue e restaura a fase haploide do fungo. Os núcleos haploides que resultam da meiose são geralmente incorporados em esporos chamados meiosporos (WALLEN e PERLIN, 2018).

Uma célula fúngica é formada por um núcleo, membrana plasmática, parede celular e as organelas celulares (WEBER, 2016). A parede celular do fungo é uma estrutura dinâmica que protege a célula contra mudanças de pressão osmótica e estresses e permite que a célula do fungo interaja com ambiente ao redor. A estrutura da parede celular em fungos é composta principalmente por quitina, glucanos, mananos e glicoproteínas (FREE, 2013).

Os polissacarídeos são responsáveis pela rigidez e forma da célula, além de possuírem em sua estrutura proteínas como galactomanoproteínas, proteínas com âncoras de glicosilfosfatidilinositol (GPI) e proteínas de superfície que funcionam como sensores da integridade da parede celular e componentes de resposta a estresses sofridos pela célula. A quitina (Figura 1), um longo homopolímero linear de N-acetilglucosamina ligada a beta-1,4, é considerada um componente relativamente menor, embora estruturalmente importante, da parede celular do fungo. Quando a síntese de quitina é interrompida, a parede fica desordenada e a célula fúngica torna-se malformada e osmoticamente instável. O glucano é o principal polissacarídeo estrutural da parede celular do fungo, constituindo aproximadamente 50-60% do peso seco da estrutura (MONEY, 2016).

Todas as paredes celulares dos fungos têm um componente de proteína que está fortemente entrelaçado na matriz estrutural à base de quitina e glucano. A quantidade de proteína dentro das paredes celulares dos fungos filamentosos é estimada em aproximadamente 20-30% da parede celular em massa. As proteínas da parede celular funcionam na manutenção da forma celular, protegendo a célula contra substâncias estranhas, mediando a absorção de moléculas, transmitindo sinais intracelulares de estímulos externos e sintetizando e remodelando componentes da parede celular (BOWMAN e FREE, 2006; MONEY, 2016). Além de dar forma à célula fúngica, a parede celular também tem a função de proteção da célula contra estresses como alterações em pH, temperatura e pressão osmótica (YOSHIMI, MIYAZAWA e ABE, 2016).

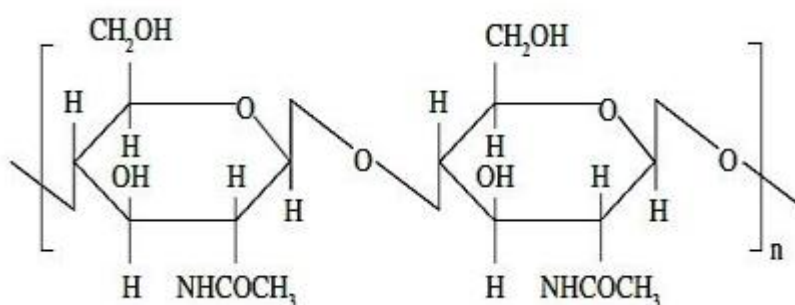


Figura 1: Estrutura química da quitina.

Fonte: SPIN-NETO, 2008.

O citoplasma consiste em várias organelas envolvidas por membrana, como mitocôndrias, aparelho de Golgi, ribossomos, retículo endoplasmático, lisossomos, microtúbulos e um núcleo. Uma propriedade única da membrana nuclear é que ela persiste através da metáfase da mitose, ao contrário das células vegetais e animais, onde se dissolve e se reforma. O núcleo possui cromossomos pareados (ROBINSON, 2014).

A membrana fúngica é composta por uma bicamada fosfolipídica e conta com uma enorme variedade de proteínas ancoradas em sua estrutura. As principais funções atreladas a membrana são a organização e funcionamento da estrutura celular como o controle de fluidez e o mecanismo de transporte intramembrana e participa de uma ampla gama de processos dinâmicos da célula, incluindo secreção, endocitose, sensoriamento ambiental, absorção de nutrientes, morfogênese e síntese da parede celular (DOUGLAS e KONOPKA, 2014).

A membrana plasmática do fungo é responsável pela atividade de acidificação de um meio através do bombeamento de prótons mediada pela H^+ -ATPase, podendo ser estimulada pela adição de glicose ao meio (GOMES et al., 1998). Para alimentar esse sistema de transporte, os prótons (H^+) são bombeados para fora da célula pela membrana plasmática, o que resulta em uma diminuição no pH do meio externo no qual as células estão suspensas. Como estímulo a essa atividade, a glicose pode ser adicionada ao meio, onde é rapidamente absorvida pelas células através de seus sistemas de transporte intramembrana, o que consequentemente irá diminuir o pH do meio (TATSADJIEU et al., 2009).

As H^+ -ATPases desempenham um papel essencial na fisiologia celular do fungo. A interferência na função H^+ -ATPase por antagonistas pode inibir a capacidade de fungos de promover a perturbação no sistema de transporte intramembrana e, consequentemente, inibir acidificação do meio, podendo até levar à morte da célula (MELLO et al., 2011).

O ergosterol ($C_{28}H_{44}O$) (Figura 2) é o principal esterol da membrana fúngica que regula a fluidez, espessura e permeabilidade da membrana plasmática, além de atuar na biogênese e funcionamento da mesma (ZHANG e RAO, 2010; DUPONT et al., 2012; SANT et al., 2016). É um esterol específico para fungos e é o principal componente de sua membrana celular (TIAN et al. 2012a). A danificação de sua estrutura acarreta perturbações no desenvolvimento (LUO et al., 2004) e metabolismo (TATSADJIEU et al., 2009) da célula, sendo estas avaliadas, neste estudo, através dos ensaios de inibição da germinação de esporos e inibição da acidificação estimulada por glicose, respectivamente.

Sua biossíntese pela via da acetil-coA envolve cerca de vinte passos (DHINGRA e CRAMER, 2017) (Figura 3) e se configura como um dos principais processos metabólicos do fungo, pois exerce diversas funções biológicas que auxiliam no crescimento e manutenção do microrganismo (ALCAZAR-FUOLI et al., 2008), sendo realizada através de três passos envolvendo mais de vinte sub passos (HU et al., 2017). Esta via se caracteriza como um dos mais importantes alvos de drogas antifúngicas, pelo qual drogas antifúngicas inibem o crescimento de células fúngicas é a interrupção das vias normais de biossíntese de esteróis, levando a uma redução na biossíntese de ergosterol (COWEN et al., 2015). A eficiência do citral na inibição da biossíntese do ergosterol em fungos é bem estabelecida na literatura (TAO et al., 2014; SOUSA et al., 2016; WANG et al., 2019). Porém, uma compreensão dos mecanismos reguladores da biossíntese de esteróis permanece um alvo terapêutico subdesenvolvido (DHINGRA e CRAMER, 2017).

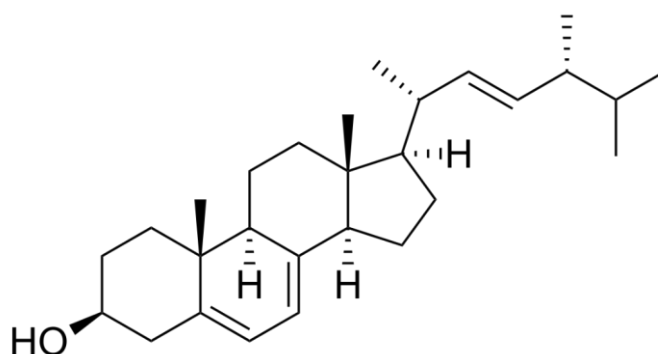


Figura 2: Estrutura do ergosterol presente na membrana fúngica.

Fonte: DUPONT et al., 2012.

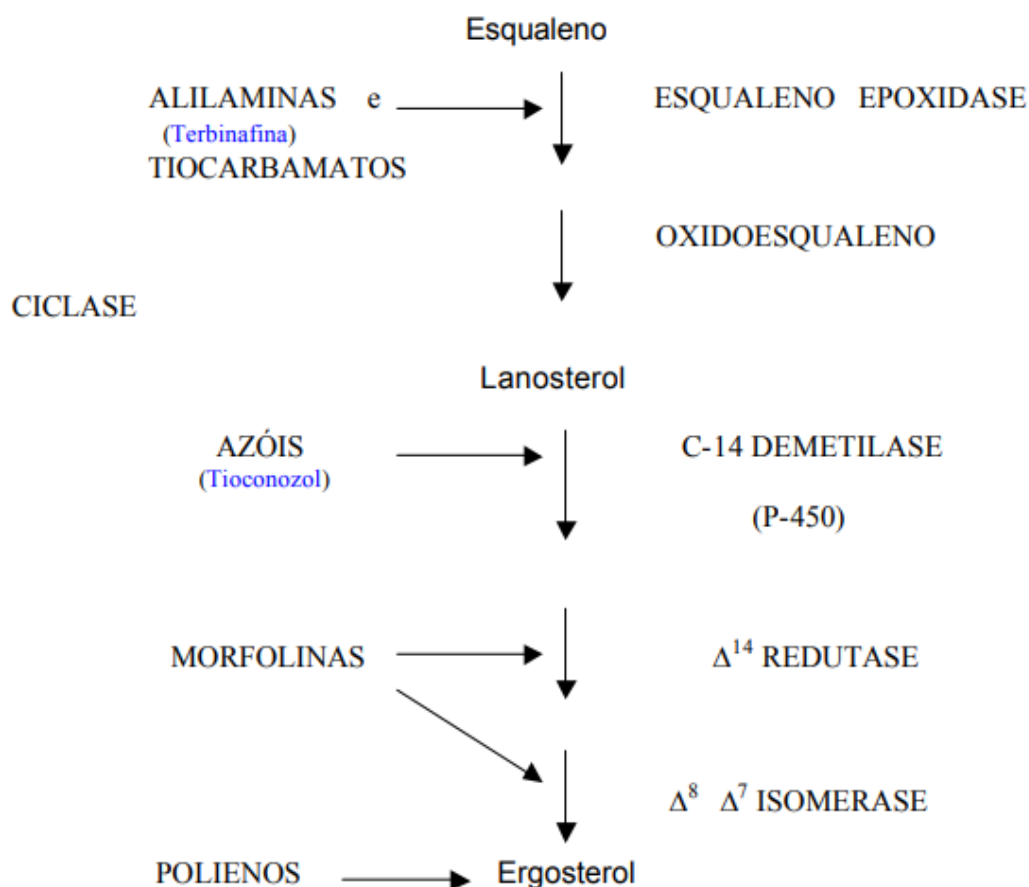


Figura 3. Via biossintética do ergosterol.

Fonte: ROCHA, 2002.

A classificação mais recente dos fungos, considera sete filós: *Chytridiomycota*, *Blastocladiomycota*, *Neocallimastigomycota*, *Microsporidia*, *Glomeromycota*, *Ascomycota* e *Basidiomycota*, dez subfilós, trinta e cinco classes, doze subclasses e 129 ordens (AINSWORTH, 2008).

3.1.1 Gênero *Aspergillus*

Os fungos do gênero *Aspergillus* formam um grupo diverso de espécies que ocorrem em diferentes tipos de habitats e possuem impacto significativo na saúde humana e animal (SAMSON et al., 2014). São pertencentes ao Reino Fungi, Divisão Ascomycota e à Ordem Eurotiales (KLICH e PITCH, 1988). A nomenclatura do gênero foi dada por Antônio Micheli em 1727 devido à semelhança do conidióforo, estrutura morfológica produtora de esporos,

com o aspergillum, objeto utilizado em cerimônias litúrgicas na Igreja Católica para aspersão de água benta (BENNETT, 2009).

Os membros do gênero *Aspergillus* são cosmopolitas e componentes predominantes de diferentes ecossistemas em uma ampla gama de zonas ambientais e climáticas, pelo fato de eles poderem colonizar uma grande variedade de substratos, por exemplo, solo, ambientes salinos, agroecossistemas, ambientes polares, plantas, animais e líquenes, pedras, relacionados com a água, fósseis e humanos. A ocorrência de espécies de *Aspergillus* é controlada por vários fatores, incluindo o microclima, a disponibilidade de substratos, bem como a atividade da água e interações ecológicas complexas. A sobrevivência em diferentes habitats ambientais e geográficos pode estar relacionada à diversidade metabólica, alta capacidade reprodutiva e capacidades competitivas das cepas de *Aspergillus* na natureza (ABDEL-AZEEM et al., 2016).

Um dos principais adjetivos associados às espécies do gênero *Aspergillus* é sua “onipresença” devido à sua habilidade de se dispersar no ar e crescer em absolutamente qualquer lugar com nutrientes disponíveis, sendo mais comumente encontrados no solo e na serrapilheira associada (DESOUBEAUX e CRAY, 2018). A digestão é exógena realizada através da secreção de ácidos e enzimas no ambiente em volta para a quebra de polímeros grandes em frações menores, sendo uma característica marcante do Reino Fungi. Tal estratégia permite que estes fungos degradem desde celuloses, hemiceluloses e pectinas até lipídeos, quitinas e queratinas (MARGULIS e CHAPMAN, 2009; BENNETT, 2010). Os métodos de reprodução das espécies do gênero ocorrem de maneiras sexuada (cerca de 36% das espécies com ciclo sexual conhecidos) ou assexuada (cerca de 64%) e ambos envolvem o desenvolvimento vegetativo de uma rede de hifas que assim formam o micélio (VARGA et al., 2014). A atual classificação do gênero *Aspergillus* consiste em quatro subgêneros (*Aspergillus*, *Circumdati*, *Fumigati* e *Nidulantes*) em um total de 339 espécies (GAUTIER; NORMAND e RANQUE, 2016).

Várias espécies de fungos são amplamente utilizadas industrialmente para a produção de alimentos, bebidas, ácidos orgânicos e uma grande variedade de enzimas. Para o gênero *Aspergillus*, há uma ampla comunidade dedicada a pesquisas acadêmicas e industriais com seus metabólitos sendo descobertos, explorados e otimizados (ABDEL-AZEEM et al., 2016). As aplicações incluem a produção de policetídeos por *A. terreus*, usado no tratamento da hipercolesterolemia (YIN et al., 2016); enzimas para utilização na indústria farmacêutica, alimentícia e de combustíveis como lipases por *A. ibericus* (OLIVEIRA et al., 2017), lacases por *A. nidulans* (KURTZ e CHAMPE, 1982), *A. oryzae* (HOSHIDA et al.,

2005), *A. niger* (BOHLIN et al., 2006), *A. fumigatus* (SUGAREVA et al., 2006), tanases por *A. niger* (PINTO et al., 2001) e *A. ficuum* (MA et al., 2015), pectinases por *A. niger* (LI et al., 2020), proteases por *A. awamori* (NEGI e BANERJEE, 2010) e *A. oryzae* (VISHWANATHA et al., 2009), lactases por *A. oryzae* (DE VRESE et al., 2015), celulases por *A. niger* (RODRÍGUEZ-ZÚÑIGA et al., 2011), amilases por *A. oryzae* (ASRAT e GIRMA, 2018) e *A. fumigatus* (RATNASRI et al., 2014); ácidos orgânicos para utilização na indústria alimentícia, farmacêutica, química e no apoio ao avanço de tecnologias como ácido cítrico por *A. niger* (PAPAGIANNI, 2007), ácido itacônico por *A. terreus* (OKABE et al., 2009), ácido kójico por *A. oryzae* (TERABAYASHI et al., 2010), *A. tamarii* (EL-METWALLY et al., 2020), *A. parasiticus* e *A. flavus* (CHANG et al., 2011) e ácido glucônico por *A. niger* (ZHANG, ZHANG e BAO, 2016).

Entretanto, fungos do gênero *Aspergillus* também são amplamente associadas a diversas perdas econômicas, principalmente na agricultura podendo contaminar produtos agrícolas em diferentes estágios, incluindo pré-colheita, colheita, processamento e manuseio (PERRONE et al., 2007). As contaminações ocorrem devido a produção de micotoxinas por fungos em produtos agrícolas e alimentares derivados, sendo denominadas aflatoxinas (AF), no caso de produção por *Aspergillus*. *A. flavus* normalmente produz as aflatoxinas dos grupos AFB1 e AFB2, enquanto *A. parasiticus* produz AFG1 e AFG2, bem como AFB1 e AFB2 (IQBA, ASI e ARIÑO, 2013). As safras afetadas pela contaminação por aflatoxina incluem cereais (milho, sorgo, arroz, trigo), sementes oleaginosas (amendoim, girassol, soja, algodão), especiarias (pimenta malagueta, pimenta preta, coentro, açafrão, gengibre) e nozes (amêndoa, coco, castanha, nozes, pistache). A aflatoxina também pode ser encontrada no leite, ovos e carne de animais alimentados com ração contaminada (TIRMENSTEIN e MANGIPUDY, 2014). Por exemplo, um estudo realizado nos Estados Unidos estimou um potencial prejuízo econômico podendo ultrapassar um bilhão de dólares em decorrência da contaminação de milho por aflatoxinas de *A. flavus* e *A. parasiticus* (MITCHELL et al., 2016).

Aspergillus spp. também podem causar uma variedade de patologias em seres humanos. Tais doenças são referidas como aspergiloses, podendo acometer a pele, olhos, ouvidos, pulmão e outros órgãos por espécies como *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. nidulans*, *A. ustus*, *A. terreus* e *A. fischerianus* (PARIZE et al., 2009; WEIGT et al., 2009; SHAH e HAZEN, 2013; ERDEM et al., 2017; FRÍAS-DE-LEÓN et al., 2018; RUDRAMURTHY et al., 2019). *A. fumigatus* se apresenta como um dos principais patógenos do gênero devido ao fato de apresentar bom crescimento na temperatura de 37°C em comparação a outras espécies, podendo causar três categorias de manifestações clínicas: reações alérgicas, aspergilose

pulmonar crônica e aspergilose invasiva (DAGENAIS e KELLER, 2009; PAULUSSEN et al., 2016).

3.1.2 *Aspergillus flavus*

O *Aspergillus flavus* foi descrito por Link em 1809 como uma espécie assexuada que produz apenas esporos assexuados, os conídios e escleródios. É uma espécie morfológicamente complexa, sendo classificada em dois grupos com base em seu tamanho de escleródios: cepas L (Grupo I) com escleródios > 400 µm de diâmetro e cepas S (Grupo II) com escleródios <400 µm de diâmetro (AMAIKE e KELLER, 2011). Esta espécie de fungo é predominantemente encontrada em culturas alimentares, particularmente milho, amendoim, sementes oleaginosas e nozes, ocorrendo em regiões tropicais e subtropicais em todo o mundo (KHLANGWISSET et al., 2011).

Em geral, o *A. flavus* é conhecido como um bolor de característica aveludada, com cor que varia do amarelo ao verde ou marrom com sua parte inversa de dourada para vermelho-marrom (Figura 4). Os conidióforos são de comprimento variável, áspero, sem caroço e espinhoso. Eles podem ser unisseriados ou bisseriados. Cobrem toda a vesícula e as fiálides apontam para todas as direções. Os conídios são globosos a subglobosos, conspicuamente echinulato, variando de 3,5 a 4,5 µm de diâmetro (HEDAYATI, et al., 2007).

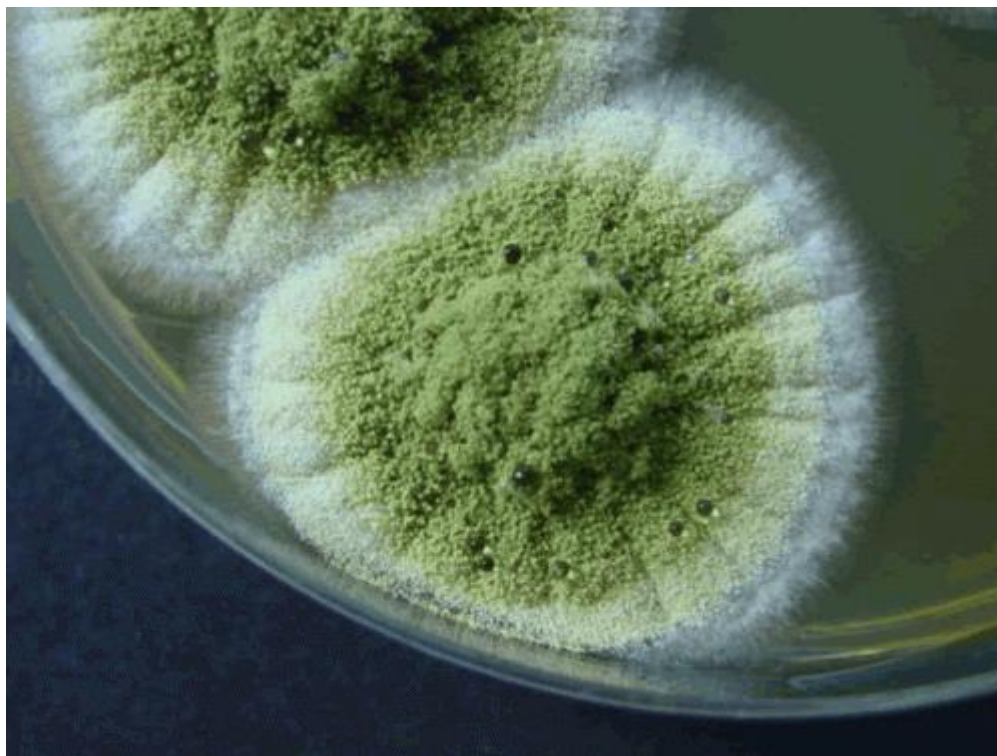


Figura 4: *Aspergillus flavus* crescido em meio de cultura.

Fonte: ASPERGILLUS WEBSITE, 2019.

O *A. flavus* produz em seu metabolismo secundário as aflatoxinas, um contaminante globalmente comum a alimentos. Estes fungos podem produzir aflatoxina em condições de pós-colheita como o armazenamento, transporte e processamento de alimentos. A produção de aflatoxinas pode sofrer influência de diversos fatores como: estresse hídrico e precipitação, capacidade de adaptação do genótipo da cultura para o clima, danos causados por insetos e práticas agrícolas (KHLANGWISSET et al., 2011).

As aflatoxinas causam efeitos negativos aos seres humanos e animais, podendo causar a supressão do desenvolvimento e do sistema imunológico, câncer e morte e a contaminação de culturas agrícolas com aflatoxinas causa perdas econômicas significativas para produtores, comerciantes e processadores de diversas culturas suscetíveis (COTTY e JAIME-GARCIA, 2007). Em consequência, estas toxinas respondem por milhões de dólares anualmente em perdas em todo o mundo em saúde humana, saúde animal e produtos agrícolas condenados (ZAIN, 2010).

Quimicamente, as aflatoxinas são derivadas da difuranocumarina produzidos por uma via de policetídeos. Existem quatro aflatoxinas principais, B1, B2, G1 e G2, com as letras referentes à cor de sua fluorescência sob luz ultravioleta (azul ou verde) e os números indicando sua distância relativa de migração em uma placa cromatográfica de camada

delgada. Existem muitas outras aflatoxinas menos comuns. A aflatoxina B1 (Figura 5) é o carcinógeno naturalmente mais potente e, geralmente, se o termo aflatoxina é usado no singular, o autor está se referindo à aflatoxina B1 (KLICH, 2007).

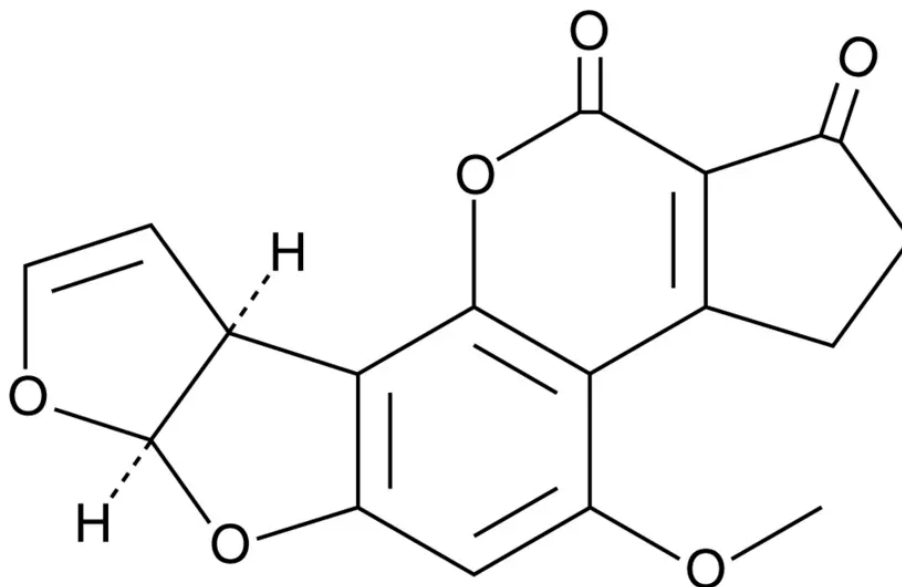


Figura 5: Estrutura da Aflatoxina B1.

Fonte: URREGO NOVOA e DÍAS, 2006.

3.2 ÓLEOS ESSENCIAIS

3.2.1 Metabolismo Secundário das plantas

O metabolismo secundário é um conjunto metabólico, cujos produtos, embora não necessariamente essenciais para o organismo produtor, garantem vantagens para sua sobrevivência e para perpetuação de sua espécie em seu ecossistema (SIMÕES, 2010).

As plantas apresentam um arsenal metabólico (enzimas, coenzimas e organelas) capaz de produzir, transformar e acumular inúmeras outras substâncias não necessariamente relacionadas de forma direta à manutenção da vida do organismo produtor, sendo relacionadas a relações mutualísticas (por exemplo, atração de organismos benéficos como os polinizadores) ou antagonistas (estratégias de defesa desenvolvidas contra predadores, parasitoides e patógenos) com outros organismos (HARTMANN, 2004 e GUNATILAKA, 2012).

A origem dos metabólitos secundários nas plantas pode ser descrita a partir do metabolismo da glicose, via dois intermediários principais, o ácido chiquímico e o acetato (SIMÕES, 2010) (Figura 6).

O ácido chiquímico origina os aminoácidos aromáticos, precursores da maioria dos metabólitos secundários aromáticos. A via do ácido chiquímico consiste em sete etapas sequenciais iniciada pela condensação aldólica de dois metabólitos da glicose: o fosfaenolpiruvato e a eritrose-4-fosfato (Figura 6).

Uma vez formado, o ácido chiquímico pode ser metabolizado em ácido corísmico ou ácido gálico. Os derivados do ácido chiquímico são: taninos hidrolisáveis, alcaloides indólicos e quinolínicos, protoalcaloides, alcaloides isoquinolínicos e benzilisoquolínicos, fenilpropanoides, lignoides e cumarinas (SANTOS-SANCHEZ et al., 2019).

Através da via do acetato são fornecidas as unidades acetila que compõem a acetilcoenzima (acetil-SCoA ou acetil-CoA), o precursor de vários grupos de substâncias, tais como os aminoácidos alifáticos, terpenoides, esteroides, ácidos graxos e triglicerídeos, os produtos derivados do acetato podem ser originados a partir do ciclo do ácido cítrico (aspartato, glutamina, lisina, ornitina, dando origem a alcaloides pirrolidínicos, tropânicos, pirrolizidínicos, piridínico, quinolizidínicos), glicosídeos cianogenéticos, glicosinolatos, óleos voláteis, saponinas, heterosídeos cardiotônicos, ácidos graxos, acetogeninas, heterosídeos e polissacarídeos (SOUZA et al., 2020).

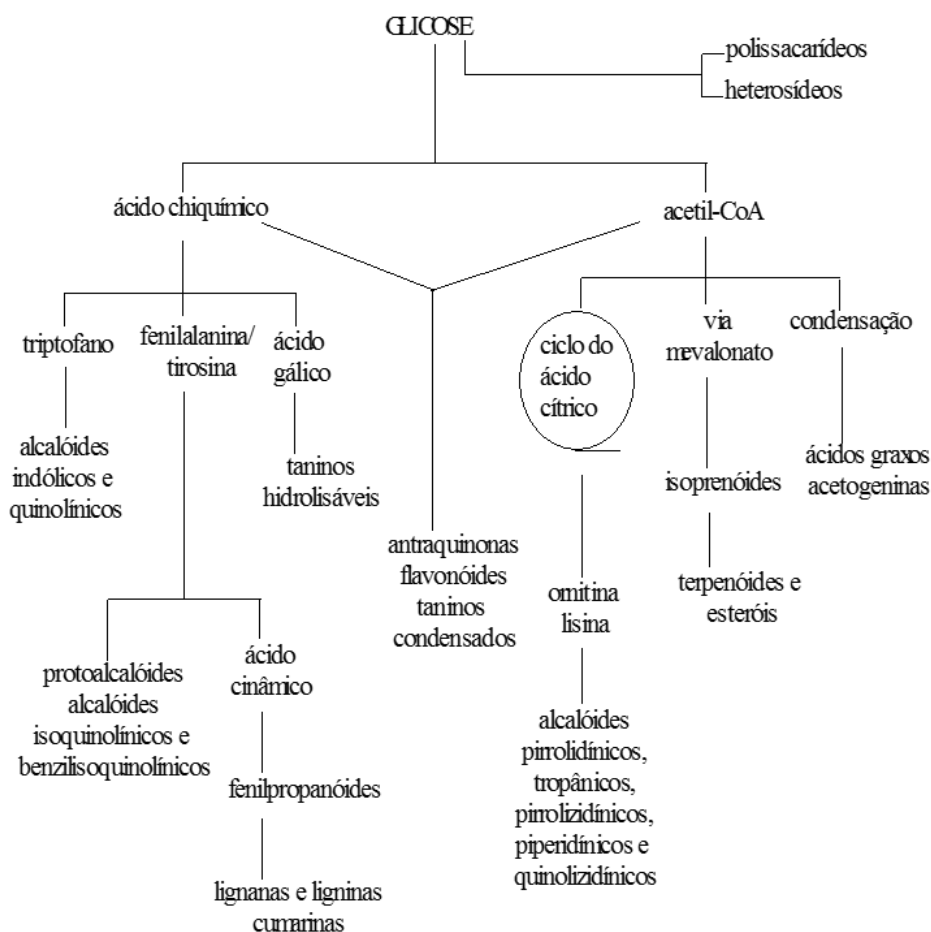


Figura 6: Ciclo biossintético dos metabólitos secundários.

Fonte: SIMÕES et al., 2010.

3.2.2 Propriedades e Composição dos Óleos Essenciais

Os óleos essenciais são líquidos oleosos aromáticos obtidos a partir de material vegetal (flores, brotos, sementes, folhas, galhos, cascas, ervas, madeira, frutas e raízes). Podem ser obtidos por diversos métodos como: expressão, fermentação, *enfleurage* ou extração, mas o método de destilação a vapor é o mais comumente usado para produção comercial de óleos essenciais (BURT, 2004).

Os óleos essenciais possuem atividades antimicrobianas que se mostraram eficazes em diversas aplicações, diminuindo o crescimento e a sobrevivência de microrganismos. Tais propriedades antimicrobianas podem torná-los potenciais alternativas aos antibióticos. Esses atributos, atrelados a uma crescente demanda por opções de aditivos alimentares naturais, levou a um interesse no uso de óleos essenciais como potenciais antimicrobianos alternativos (CALO et al., 2015).

Tais compostos possuem uma vasta gama de metabolitos secundários que podem inibir ou retardar o crescimento de bactérias e fungos, e seus componentes têm uma variedade de alvos, particularmente a membrana, parede celular e o citoplasma, e em certas situações, alteram completamente a morfologia das células (BURT e REINDERS, 2003; CHORIANOPOULOS et al., 2008; DE MARTINO, FEO e NAZZARO, 2009).

As atividades biológicas dos óleos essenciais estão diretamente correlacionadas com a presença de seus componentes voláteis bioativos. Quimicamente, os óleos essenciais consistem em compostos de terpeno (mono-, sesqui- e diterpenos), álcoois, ácidos, ésteres, aldeídos, cetonas, aminas e sulfetos. Os componentes dos óleos essenciais podem ser divididos em dois grupos: compostos terpênicos e compostos aromáticos. Sua composição pode depender de que parte da planta é extraído: flores, partes verdes (folhas e caules), casca, madeira, frutos inteiros, apenas pericarpo ou sementes, ou raízes. Acredita-se que os óleos essenciais sejam produzidos pelas plantas em resposta a estressores e, portanto, as condições de crescimento podem afetar o rendimento e o conteúdo dos óleos essenciais (CALO et al., 2015).

A solubilidade dos componentes do óleo essencial em água está diretamente correlacionada com a capacidade de penetrar na parede celular de bactérias e fungos. A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais ocorre devido a solubilidade na bicamada lipídica da membrana celular dos microrganismos (VALERIANO et al., 2012).

As diferenças na constituição e concentração dos óleos essenciais influenciam diretamente na atividade antimicrobiana do óleo essencial, a ação dos monoterpenos tem sido explicada pelo efeito tóxico na função e estrutura da membrana celular, devido às características lipofílicas, os monoterpenos preferencialmente, tendem a se deslocar da fase aquosa em direção às estruturas da membrana, o que resulta na sua expansão, aumento da fluidez e permeabilidade, desordenando as proteínas embebidas da membrana, alterando o processo de transporte de íons e inibindo a respiração celular, assim danos causados na estrutura da membrana citoplasmática acarretam o comprometimento das funções, como local de ação enzimática, barreira seletiva e geração de energia (ROCHA et al., 2009).

A composição do óleo essencial de uma planta é determinada geneticamente, sendo geralmente específica para um determinado órgão e característica para o seu estágio de desenvolvimento, mas as condições ambientais são capazes de causar variações significativas, como a influência do ciclo vegetativo, temperatura, pH, umidade relativa, duração total de exposição ao sol, regimes de ventos, grau de hidratação do terreno e presença de

micronutrientes e o tipo de cultivo também influem sobre a composição química dos óleos essenciais (PEREIRA et al., 2006).

Na agricultura, os óleos essenciais vêm sendo utilizados como alternativa no controle de inseto-praga, bioherbicidas, na inibição de fungos patogênicos, como agente anti-séptico e antibacteriano, tendo sua bioatividade relacionada a compostos majoritários como citronelal, citronelol e geraniol entre outros constituintes, denominadas de um modo geral como monoterpenos (OOTANI et al., 2013).

3.2.3 Propriedades Antifúngicas e Modo de Ação dos Óleos Essenciais

A atividade antimicrobiana ou antifúngica do óleo essencial pode ser causada pelas propriedades dos terpenos e terpenoides, que devido à sua natureza altamente lipofílica e baixo peso molecular, são capazes de romper a membrana celular, causando morte celular. Como agentes antifúngicos, podem inibir o crescimento do fungo por interferir na sua estrutura e interromper função das organelas da célula fúngica, inibindo a atividade do núcleo e a síntese de proteínas (NAZZARO et al., 2017).

Alguns estudos evidenciam a perturbação e alteração da membrana plasmática, além da inibição da formação da parede celular fúngica através da ação de óleos essenciais (NAZZARO et al., 2017). A inibição da polimerização da quitina pode afetar a maturação da parede celular, a formação de septo e as gemas, através da danificação do mecanismo de divisão e crescimento celular (YUTANI et al., 2011). Os mecanismos também envolvem a alteração da permeabilidade, fluidez e danificação da membrana, extravasamento do citoplasma e inibição parcial da biossíntese de DNA, RNA e proteínas e inibição da biossíntese do ergosterol (YUTANI et al., 2011; KERESKES et al., 2013).

Os monoterpenos agem rompendo a membrana citoplasmática microbiana, que perde sua alta impermeabilidade para prótons e íons maiores; se ocorrer perturbação da integridade da membrana, suas funções estarão comprometidas não apenas como uma barreira, mas também como uma matriz para enzimas e como um transdutor de energia (CRISTANI, et al., 2007).

Na membrana fúngica, o ergosterol é necessário para o crescimento e funcionalidade da membrana celular. Além de também servir como um biorregulador da fluidez, simetria e integridade da membrana, o ergosterol contribui para o funcionamento adequado das enzimas ligadas a ela. A atividade de óleos essenciais pode inibir a síntese de ergosterol na célula fúngica fazendo com que a membrana possa se tornar mais porosa (KHAN et al., 2010).

O ergosterol é o principal alvo de agentes antifúngicos utilizados tanto no combate a pragas agrícolas como contra patógenos humanos, portanto, o conhecimento de tal estrutura e de sua biossíntese é fundamental no desenvolvimento de novas drogas e nos estudos relacionados ao desenvolvimento de mecanismos de resistência aos antifúngicos (ALCAZAR-FUOLI et al., 2008). Esta estrutura também desempenha um papel direto nas interações patógeno-hospedeiro dos fungos, induzindo a reações autoimunes como a inflamação (KOSELYNY et al., 2018).

A inibição da síntese do ergosterol em fungos gera uma série de perturbações no desenvolvimento e germinação de esporos. Gutarowska e Zakowska (2009) propuseram um modelo matemático para descrever a relação entre a formação de biomassa e a quantidade de ergosterol em duas espécies de fungo, descobrindo que tal relação acontece em duas fases do crescimento micelial, incluindo a fase germinativa do fungo, onde o ergosterol é o esterol dominante. O controle da germinação de esporos e a geração de biomassa do fungo podem estar diretamente associados a este mecanismo de inibição.

O ergosterol também é essencial na morfogênese e manutenção da mitocôndria fúngica, organela responsável pelo processo de respiração celular. A capacidade de bombeamento de prótons por parte dos fungos mediada pela H^+ -ATPase é crucial para a regulação do pH interno da célula fúngica. A enzima ATPase mantém a homeostase celular, a estabilidade osmótica e atua o processo de respiração celular, regulando as concentrações de íons no interior da célula (TATSADJIEU et al., 2009; ZHANG et al., 2010). Portanto, o ergosterol é essencial para homeostase na célula fúngica, onde perturbações em sua biossíntese pode configurar perda de estabilidade osmótica do fungo (ZHANG e RAO, 2010).

A atividade antifúngica dos óleos essenciais também pode inibir a atividade do transportador de membrana H^+ -ATPase, que desempenha um papel importante na fisiologia da célula fúngica ao gerar um gradiente eletroquímico de prótons através da membrana celular, que energiza absorção de nutrientes, além de regular o pH intracelular e o crescimento de células fúngicas (AHMAD et al., 2013).

3.2.4 Citral

Citral (3,7-dimetil-2-6-octadienal) é o nome dado a uma mistura de dois isômeros geométricos: geranial (trans-citral, citral A) e neral (cis-citral, citral B) e ocorre naturalmente em muitos óleos essenciais de frutos cítricos, ervas e especiarias como o capim-limão

(*Cymbopogon citratus* – Figura 7), lípia (*Lippia alba*), capim-limão-brasileiro (*Elionurus latiflorus*) e alfazema-do-brasil (*Aloysia gratissima*) (FRIEDMAN et al., 2004).



Figura 7: Capim-limão (*Cymbopogon citratus*).

Fonte: UFSC (2020).

O geranial tem um forte odor, enquanto o neral tem um odor mais doce e menos intenso. Devido ao seu aroma característico de limão, o citral tornou-se uma substância aromatizante de grande importância e uma matéria-prima muito utilizada para as indústrias farmacêutica, alimentícia, de perfumaria e cosmética (MARQUES et al., 2013).

O citral, como agente antifúngico, atua na permeabilização da parede celular e membrana. Após entrar na célula do microrganismo, o citral influencia a expressão de genes do DNA do núcleo, causa agregação não-funcional de macromoléculas, altera os processos de respiração celular e metabolismo energético, levando a desordem metabólica da célula fúngica, à perda de funções até a morte da célula. (JIANG; LUO et al., 2005). Além disso, o citral pode agir na oxidação lipídica das membranas celulares, na acumulação excessiva de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), o que pode causar danos oxidativos a componentes celulares e pode danificar a morfologia celular dos fungos e prejudicar o funcionamento das mitocôndrias (ZHENG et al., 2015; WANG et al., 2018).

Os efeitos do citral contra *A. flavus* são bem descritos na literatura. Os efeitos na função fisiológica da célula fúngica compreendem danificação a estrutura da parede celular e da membrana, levando à perda das funções. O citral interfere também na produção de esporos, diminuição na atividade da malato desidrogenase e succinato desidrogenase, diminuição na atividade $[Na^+, K^+]$ -ATPase pela membrana celular e diminuição da taxa de consumo de proteínas e açúcar (LUO et al., 2004; XIE et al., 2004; JIANG e LUO, 2005; LÓPEZ-MALO et al., 2005; LIANG et al., 2015; TANG et al., 2018).

O citral tem mostrado melhor eficiência contra *A. flavus* quando comparado à utilização de seus compostos separados, como, por exemplo comparado ao geranial (TANG et al., 2018), o que pode induzir ao entendimento de que os compostos do citral (neral e geranial) podem atuar em sinergismo. Os componentes do citral também podem diminuir a produção de aflatoxinas de fungos (WANG et al., 2019).

3.3 MÉTODO SEMIEMPÍRICO

Os Métodos semiempíricos utilizam parâmetros cujos valores são adequados aos dados experimentais ou aos resultados dos cálculos mais sofisticados, sem tornar seus resultados muito discrepantes quando relacionados aos obtidos experimentalmente (ATKINS e FRIEDMAN, 2011).

Os cálculos semiempíricos demandam computacionalmente muito menos que os cálculos *ab initio*, pelo fato da redução de integrais que devem ser calculadas, desta forma, o tratamento de sistemas moleculares contendo uma grande quantidade de átomos.

São encontrados vários métodos para parametrização como exemplo, o AM1 (DEWAR, 1985), PM6 (STEWART, 1989) e RM1 (ROCHA et al., 2006), dentre outros.

Esses métodos diferem-se principalmente, na quantidade e na qualidade de parâmetros desenvolvidos para elementos da tabela periódica presentes em diversos sistemas, sendo capaz de reproduzir uma variedade de dados experimentais como geometrias de equilíbrio, calores de formação, momentos de dipolo e energias de ionização.

O método AM1 é oriundo de uma alteração do método MNDO (Modified Neglect of Diatomic Overlap), gerando assim, novos parâmetros.

O método AM1 está parametrizado para 32 elementos da Tabela Periódica (incluindo a maioria dos alcalinos, alcalinos terrosos, e dos grupos 13-17, além do Zn e Hg).

3.4 O MÉTODO TFD

A modelagem molecular está focada na aplicação das leis fundamentais da física e química para o estudo de moléculas. O objetivo final é criar modelos e simulações, que podem ajudar a prever, racionalizar e estimar as propriedades das moléculas e suas interações. O desenvolvimento de hardwares e algoritmos mais eficientes e as técnicas computacionais realizadas por computadores poderosos revolucionaram a modelagem molecular.

Os cálculos semiempíricos, como o nome indica, são baseados em alguns cálculos empíricos do campo de força, baseados nos elétrons de valência e orbitais moleculares e em alguns conjuntos de dados parametrizados. É baseado na equação de Schrödinger (1), utilizam um hamiltoniano mais simples que o molecular correto ($\hat{H}$) no entanto, mais aproximações são realizadas para resolvê-lo, e as integrais muito complicadas que devem ser calculados no método *ab initio* não são realmente avaliados em métodos semiempíricos.

$$\hat{H}\Psi = E\Psi \quad (1) \quad \text{(Equação 01)}$$

Sendo:

$\hat{H}$: Operador hamiltoniano

Ψ : Função de onda

E : Energia Total

Os cálculos baseiam-se em uma espécie de biblioteca de integrais compilada para encontrar o melhor ajuste de alguma entidade calculada, como geometria, energia e calor de formação aos valores experimentais.

O método semiempírico AM1 foi desenvolvido por Dewar et al. (1985) e foi parametrizado para compostos contendo H, B, Al, C, Si, Ge, Sn, N, P, O, S, F, Cl, Br, I, Zn e Hg usando 100 compostos modelo.

Uma metodologia de modelagem molecular que tem tido bastante sucesso é a Teoria do Funcional da Densidade (TFD) devido ao seu custo computacional, além de trabalhar com um elevado número de átomos. Formulada por Hohenberg, Kohn e Sham (1990) é uma metodologia alternativa ao método de HF de obter energia eletrônica de um sistema atômico ou molecular. Ela se baseia em descrever os elétrons interagentes do sistema, sujeito a um potencial externo, por meio da densidade eletrônica.

O sucesso por trás desta teoria está na correlação de troca funcional, que utiliza a densidade eletrônica para descrever intrinsecamente o efeito de muitos corpos com o formalismo de uma única partícula (COHEN et al., 2012). Em outras palavras, a densidade, uma observável 3D, é utilizada para descrever a complicada física por de trás das interações entre os elétrons, e, portanto, determinar exatamente tudo sobre o sistema. Ou seja, sistemas onde a função de onda teria dificuldades enormes de calcular as interações, podem ser facilmente calculados utilizando TFD (COHEN et al., 2012). Assim, devido à elevada precisão dos resultados eletrônicos calculados utilizando TFD, além da baixa sobrecarga computacional, houve a difusão deste método, fazendo com que ele se tornasse um dos mais populares métodos computacionais utilizados (KADUK et al., 2012).

A maior fonte de erro em TFD está na natureza aproximada da energia de troca e de correlação. É importante destacar que não há um funcional de correlação-troca que seja ideal para se calcular todas as propriedades moleculares, fazendo-se necessário realizar diferentes estudos para se escolher o melhor funcional para o sistema molecular e propriedade de interesse.

Por isso, numerosos esquemas têm sido desenvolvidos para obter formas aproximadas do funcional para esta energia, sendo que atualmente ainda há esforços na busca por funcionais mais precisos para aplicação em áreas específicas (ATKINS e PAULA, 2006).

É importante esclarecer que não existe um melhor método. Tudo dependerá do sistema a ser analisado, o tipo de recursos de computador ou equipamento disponível, e a precisão necessária, de modo que cada método tem suas vantagens e desvantagens.

3.4.1 Método de Solvatação Implícita

Nos modelos contínuos de solvatação, o solvente é representado implicitamente por um contínuo infinito, definido por propriedades macroscópicas características do meio. Desta forma, não há estrutura do solvente definida (YU e KARPLUS, 1988).

O modelo contínuo de solvatação mais popular é o PCM (“Polarizable Continuum Model”) ou modelo do contínuo polarizável desenvolvido no grupo de Jacopo Tomasi (1981) no início da década de 80, ele descreve o soluto de forma quântica, no qual se determina por diferenciação numérica o potencial da superfície, enquanto que, de forma auto consistente, se integra o solvente junto com o potencial da superfície. Assim, o soluto é representado por uma distribuição de cargas (calculada quanto-mecanicamente) e o solvente continua representado por um dielétrico contínuo.

A distribuição de cargas do soluto polariza o dielétrico ao seu redor e induz novas cargas aparentes sobre a superfície da cavidade que envolve o soluto. Essas cargas induzidas geram o campo de reação que é introduzido no hamiltoniano molecular do soluto como uma perturbação. A diversificação deste modelo com várias modificações ao longo dos anos, fez com que ele se tornasse conhecido como PCMs, no plural. Estes modelos contemplam, além dos efeitos eletrostáticos, as contribuições de cavitação, dispersão e repulsão. Além disso, permitem a criação de cavidades mais flexíveis à simetria da molécula o que aumenta a aplicabilidade destes métodos. Existem outros métodos de solvatação implícita, se diferenciam pela criação da cavidade e pela descrição do potencial eletrostático de interação soluto-solvente.

O modelo CPCM é utilizado para melhorar a energia livre de solvatação e a geometria das moléculas envolvidas em mecanismos de reações e interações químicas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido nos Laboratórios de Biotecnologia, de Pós-Colheita e Processamento de Produtos Agrícola e de Química Teórica, na Escola de Engenharia Industrial Metalúrgica de Volta Redonda, *campus* da Universidade Federal Fluminense.

4.1 CÁLCULOS TEÓRICOS

Os cálculos teóricos foram realizados com estratégias para a redução do custo computacional. As moléculas foram otimizadas com o método semiempírico AM1 (Austin Model 1), e em seguida submetida à cálculos “Single Point” com o método TFD (HOHENBERG, KOHN e SHAM, 1990), com a finalidade de obter as energias de interação do complexo.

As estruturas iniciais foram obtidas através do desenho das moléculas utilizando a interface gráfica do programa Gaussview® 5.0 (Figura 8). Os cálculos teóricos foram realizados utilizando o programa Gaussian® 09w.

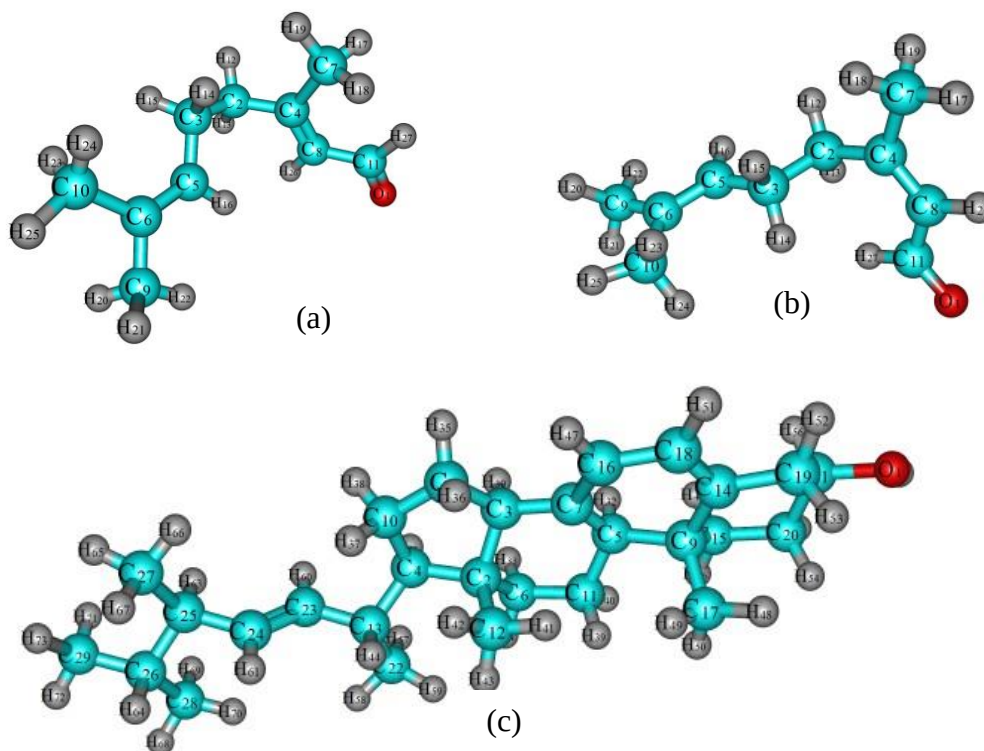


Figura 8: Estrutura geranial (a); neral (b) e ergosterol (c)

Todas as moléculas foram otimizadas com o método semiempírico AM1 e posteriormente realizado cálculos com o método TFD nas estruturas já otimizadas. De posse dos valores de energias obtidas através do cálculo TFD, foi calculada a energia de interação entre os compostos neral e geranial com o ergosterol, a partir da Equação 02:

$$E_{int} = E_{complexo} - (E_{citral} + E_{ergosterol}) \quad (\text{Equação 02})$$

Sendo:

$E_{complexo}$ - energia total do conjunto ergosterol+citral (neral e/ou geranial);

E_{citral} - energia total do neral ou geranial isolado;

$E_{ergosterol}$ - energia total do ergosterol isolado.

4.2 INIBIÇÃO DA ACIDIFICAÇÃO ESTIMULADA POR GLICOSE

O experimento foi conduzido conforme metodologia de Mello et al. (2011) com algumas modificações. Para avaliar a interferência do citral no metabolismo do *A. flavus*, foi analisada a extrusão de H^+ das células fúngicas com estímulo de glicose ao meio.

Os fungos (1×10^6 esporos/mL) foram incubados em frascos com 50 mL de meio de cultura Caldo Batata Dextrose (CBD) por 14 dias com agitação (150 rpm) à 28°C. Para o ensaio de inibição da acidificação, o citral (Sigma-Aldrich – 99% de pureza) foi adicionado nas concentrações de 0,00 (controle); 0,04; 0,08; 0,16 $\mu\text{L/mL}$ dissolvido em Tween 80 a 0,1% para períodos de pré-incubação de 30 minutos, 1 e 2 horas à 28°C. Após cada período de pré-incubação, foram adicionados 10 mL de solução de 0,5 M glicose e os níveis de pH foram medidos a cada minuto, durante 30 minutos. Todos os testes foram realizados em triplicata. A concentração de extrusão de H^+ foi calculada a partir da Equação 03, onde “ ΔpH ” é a diferença entre o pH inicial ($T = 0$) e final ($T = 30$).

$$\Delta\text{pH} = \text{pH}_{30} - \text{pH}_0 \quad (\text{Equação 03})$$

Sendo:

ΔpH : A concentração de extrusão de H^+

pH_0 : pH obtido no $T = 0$

pH_{30} : pH obtido no $T = 30$

Os resultados são apresentados em porcentagem (%) assumindo que os valores obtidos no controle correspondem a 100% de acidificação.

4.3 ENSAIO DE INIBIÇÃO DA GERMINAÇÃO DE ESPOROS

A fim de se avaliar o efeito de diferentes concentrações de citral sobre a germinação de esporos do fungo *A. flavus*, foi conduzido um ensaio de acordo com os métodos utilizados por Tian et al. (2012b) com modificações. Para verificar o efeito de citral na germinação de esporos, foram preparadas soluções de meio de cultura CBD contendo as concentrações do citral (Sigma-Aldrich – 99% de pureza) nas concentrações 0,00; 0,02; 0,04; 0,08; 0,16; 0,32 e 0,64 µL/mL dissolvido em Tween 80 a 0,1% e a suspensão de esporos (1×10^6 esporos/mL) em três repetições. Para este experimento foram adicionadas duas concentrações (0,32 e 0,64 µL/mL) a mais do que o testado no item 4.2 a fim de se obter resultados mais significativos quanto a eficácia do citral.

A suspensão de esporos utilizada foi obtida a partir da adição de 10 mL de água destilada esterilizada à placa de Petri contendo a colônia fúngica de *A. flavus* crescida por 15 dias, liberando-se os esporos para a água com o auxílio de uma alça de Drigalski. A suspensão de esporos foi filtrada em uma camada dupla gaze e sua concentração determinada com auxílio de Câmara de Neubauer e microscópio ótico. As soluções foram mantidas em incubadora B.O.D para verificação da performance do composto em três períodos (24, 48 e 72 h) a 28°C. Destas soluções, alíquotas de 20 µL foram pipetadas para observação em microscópio ao final de cada período de incubação. Ao microscópio óptico, foi realizada a contagem total de esporos germinados e comparados ao controle para se determinar a porcentagem (%) de inibição da germinação de esporos em cada concentração de citral e repetição analisada, conforme Equação 04 a seguir:

$$(\%) E_{\text{Germinados}} = (E_{\text{Germinados}} \div E_{\text{Total}}) \times 100 \quad (\text{Equação 04})$$

Sendo:

$E_{\text{Germinados}}$ - número de esporos contados como germinados;

E_{Total} - número total de esporos germinados no controle.

Como esporo germinado, foi considerado o esporo que apresentou a emergência de tubo germinativo (TIAN et al., 2012b).

4.4 QUANTIFICAÇÃO DE ERGOSTEROL

O experimento foi conduzido conforme Alves et al. (2017), com modificações. O fungo *A. flavus* foi cultivado em meio de cultura CBD (28 °C por 24, 48 e 72 horas) contendo citral (Sigma-Aldrich – 99% de pureza) nas concentrações de 0,00 (controle); 0,04; 0,08; 0,16; 0,32; 0,64 µL/mL dissolvido em Tween 80 a 0,1%. Para este experimento foram adicionadas duas concentrações (0,32 e 0,64 µL/mL) a mais do que o testado no item 4.2 a fim de se obter resultados mais significativos quanto a eficácia do citral. Depois da incubação, o micélio foi filtrado com o auxílio de papel filtro (0,05 mm) e lavado duas vezes com água destilada estéril. Para a extração dos lipídeos, 3 mL de uma solução alcoólica de hidróxido de potássio (25%) foram adicionadas a cada massa celular e agitadas em vórtex (modelo QL-901) por 1 minuto.

Os tubos foram incubados a 85°C por 1 h em banho-maria e resfriados em temperatura ambiente. Após, uma mistura de 1 mL de água destilada estéril e 3 mL de *n*-heptano foram adicionadas em cada tubo, seguido de agitação em vórtex por 3 minutos. O sobrenadante foi removido e a leitura realizada em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 282 e 230 nm. A absorção de ergosterol foi o resultado da subtração da absorção obtida a 282 nm e 232 nm, tendo em vista que à 282nm são realizadas leituras para ergosterol e 24 (28) desidroergosterol, enquanto a 232nm apenas a absorção do desidroergosterol é obtida. Os resultados foram expressos como porcentagem de ergosterol em comparação com o controle de crescimento e representam as médias de cinco repetições, conforme Equação 05 abaixo:

$$(\%) \text{ Ergosterol} = \frac{(E_{282} - E_{232}) \times 100}{(E_{282_{\text{controle}}} - E_{232_{\text{controle}}})} \quad (\text{Equação 05})$$

Sendo:

E282: Absorção obtida a 282nm

E232: Absorção obtida a 232nm

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variáveis qualitativas foram analisadas estatisticamente por Análise de Variância e Teste de Médias. Para as variáveis quantitativas, foi realizada Análise de Variância, Correlação e Regressão.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 MODELAGEM MOLECULAR

5.1.1 Parâmetros Estruturais

Nesta etapa foram realizados os cálculos de minimização de energia e obtenção de parâmetros geométricos das moléculas de geranial, neral e ergosterol em fases gasosa e aquosa obtidos através do método semiempírico AM1. Após a otimização as moléculas foram submetidas à cálculo ‘*Single Point*’ com o método TFD, utilizando o funcional WB97XD e a base 6-311g(d,p) para obtenção das energias e comparação dos parâmetros estruturais calculados com método AM1.

Os parâmetros geométricos mais importantes das estruturas obtidos após os cálculos de otimização em fase aquosa são apresentados nas Tabelas 1 (geranial), 2 (neral) e 3 (ergosterol), visto que os parâmetros estruturais não foram alterados por influência do meio (gás ou água).

Tabela 1: Parâmetros estruturais calculados em fase aquosa do geranial com o método AM1.

Ligação (Å)	Solvente H ₂ O
	AM1
O1-C11	1,239
C11-C8	1,460
C8-C4	1,346
C4-C7	1,484
C4-C2	1,491
C2-C3	1,519
C3-C5	1,481
C5-C6	1,343
C6-C9	1,483
Ângulo	
O1-C11-C8	122,43
C11-C8-C4	124,60
C8-C4-C7	124,16

C8-C4-C2	120,83
C7-C4-C2	115,01
C4-C2-C3	111,30
C3-C5-C6	123,16
C5-C6-C10	122,19
C5-C6-C9	121,78
Diedro	
C11-C8-C4-C2	179,12

Tabela 2: Parâmetros estruturais calculados em fase aquosa do neral com o método AM1.

Ligação (Å)	Solvente H ₂ O
	AM1
O1-C11	1,239
C11-C8	1,460
C8-C4	1,346
C4-C7	1,484
C4-C2	1,491
C2-C3	1,519
C3-C5	1,481
C5-C6	1,343
C6-C9	1,483
Ângulo (°)	
O1-C11-C8	122,43
C11-C8-C4	124,60
C8-C4-C7	124,16
C8-C4-C2	120,83
C7-C4-C2	115,01
C4-C2-C3	111,30
C3-C5-C6	123,16
C5-C6-C10	122,19
C5-C6-C9	121,78
Diedro (°)	

C11-C8-C4-C2	-0,670
--------------	--------

Tabela 3: Parâmetros estruturais calculados em fase aquosa do ergosterol com métodos AM1.

Ligação (Å)	Solvente H ₂ O AM1
O1-C21	1,425
C21-C20	1,522
C6-C2	1,520
C2-C3	1,550
C11-C6	1,519
C16-C7	1,345
C7-C5	1,502
C23-C24	1,335
C10-C8	1,530
C26-C28	1,515
Ângulo (°)	
O1-C21-C20	111,26
O1-C21-C19	106,44
C21-C20-C15	109,95
C15-C9-C17	109,19
C16-C18-C14	121,73
C2-C3-C7	112,47
C8-C3-C2	104,09
C13-C23-C24	123,42
C24-C25-C26	110,21
C25-C26-C29	111,29
Diedro (°)	
O1-C21-C20-C15	176,68
C5-C7-C3-C2	53,62

Os resultados listados nas Tabelas 1, 2 e 3 foram comparados com a tabela de comprimentos médios de ligação para ligações simples, duplas e triplas apresentando uma boa correlação (BROWN et al., 2005). A principal observação está em relação ao ângulo diedro

das estruturas do neral e geranial, o que leva aos dois isômeros. Onde o trans-isômero é conhecido por geranial ou citral A e o cis-isômero é conhecido como neral ou citral B.

5.2 ANÁLISE DOS ORBITAIS DE FRONTEIRA GERANIAL E NERAL

A energia dos orbitais de fronteira, que envolvem o orbital molecular ocupado de maior energia - *HOMO*, do inglês Highest Occupied Molecular Orbital, e o orbital molecular desocupado de menor energia - *LUMO*, do inglês Lowest Unoccupied Molecular Orbital, são descritores químico-quânticos bastante utilizados que apresentam um papel importante nas reações químicas e na formação de diversos complexos de transferência de cargas.

A análise dos orbitais moleculares permite estimar a reatividade relativa entre confôrmeros. A estabilidade molecular pode ser indicada pela diferença de energia *HOMO-LUMO*, que representa a diferença entre as energias desses orbitais. Alto valor desta diferença indica alta estabilidade da molécula, no sentido de baixa reatividade nas reações químicas, enquanto moléculas com baixo valor são geralmente mais reativas.

Na Tabela 4 são apresentados os resultados dos cálculos para as energias do E_{HOMO} , E_{LUMO} , e a diferença de energia *HOMO-LUMO* (ΔE) para o geranial e neral em fase gás e com solvente água. É relatado na literatura que os orbitais moleculares *HOMO* e *LUMO* são descritores de reatividade global que exercem importante papel nas reações químicas no que se refere à transferência de cargas. Assim, uma energia elevada do *HOMO* acarretará a capacidade de doar elétrons, e quanto menor a energia do *LUMO* menor será o impedimento para aceitar elétrons (FLEMING, 1976; GALEMBECK e CARAMORI, 2003).

Tabela 4: Energia dos orbitais de fronteira para o geranial e neral com WB97XD/6-311g(d,p).

Parâmetros	geranial		neral	
	Gás	Água	Gás	Água
<i>HOMO</i> (eV)	-6,42	-6,31	-6,50	-6,34
<i>LUMO</i> (eV)	-1,80	-1,86	-1,72	-1,81
ΔE	4,62	4,45	4,77	4,43
Energia Total (hartree)	-466,0002	-465,8546	-466,0041	-465,8552

Analisando a Tabela 4 observa-se que a energia do *HOMO* do neral é 0,08 eV (50 Kcal/mol) mais estável que o geranial em fase gás. Em fase aquosa essa diferença diminui para 0,03 eV (18,82 Kcal/mol).

Outra observação importante é que a água estabiliza as energias das moléculas de geranial e neral.

A diferença de energia *HOMO-LUMO* em fase aquosa permite atribuir o neral como sendo a molécula mais reativa, pois apresenta um valor mais baixo.

Em relação ao *LUMO* sabe-se que quanto menor a energia do *LUMO* menor será o impedimento para aceitar elétron, novamente os dados demonstram não haver diferença significativa nas energias.

Nas Figuras 9 e 10 são apresentados os orbitais moleculares *HOMO* e o *LUMO* para as moléculas do geranial e neral em fase gás e com solvente água calculados com o funcional WB97XD e a base 6-311g(d,p).

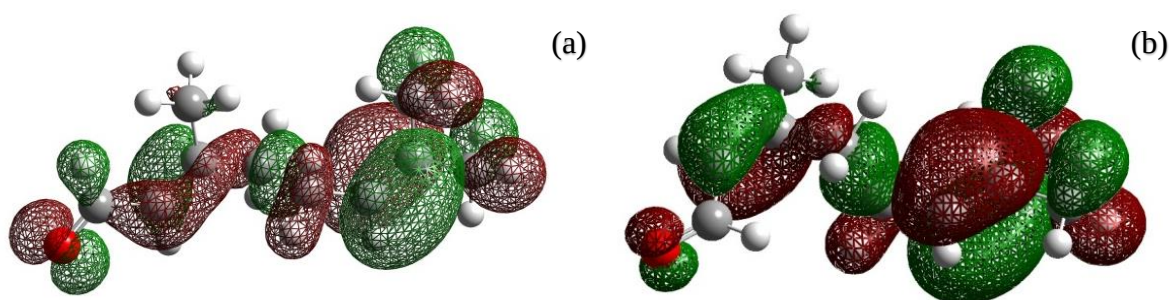


Figura 9: Orbitais moleculares *HOMO* para geranial (a) e neral (b) em fase gasosa.

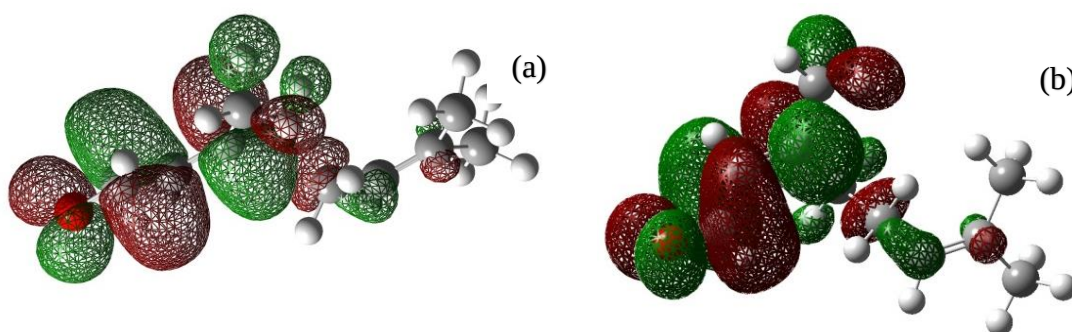


Figura 10: Orbitais moleculares *LUMO* para geranial (a) e neral (b) em fase gasosa.

Nas Figuras 11 e 12 são apresentados os orbitais moleculares *HOMO* e o *LUMO* para as moléculas de geranial e neral em fase aquosa.

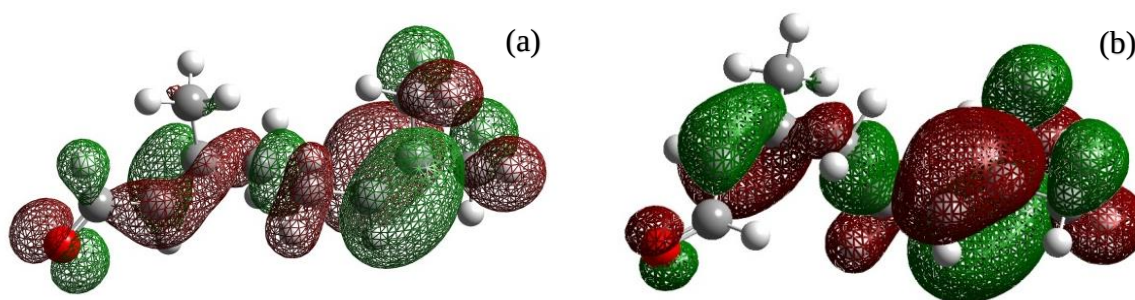


Figura 11: Orbitais moleculares *HOMO* para geranial (a) e neral (b) em fase aquosa.

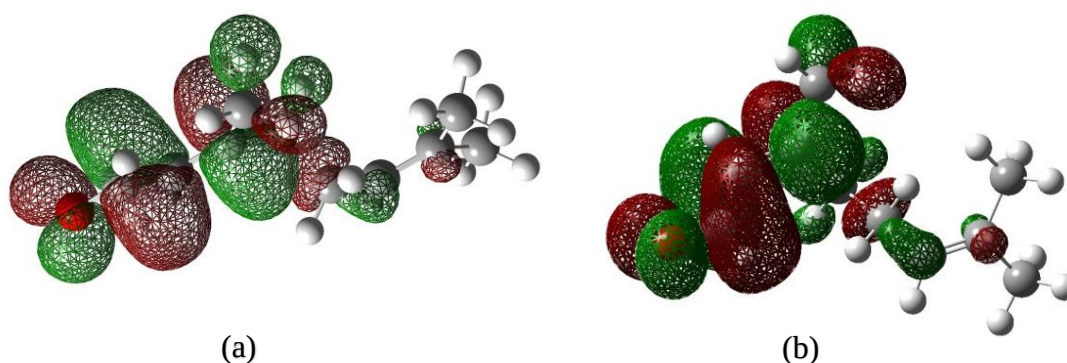


Figura 12: Orbitais moleculares *LUMO* para geranial (a) e neral (b) em fase aquosa.

Analisando as Figuras 9(a), 10(a) e 11(a), 12(a), observa-se que estas moléculas também apresentam o *HOMO* com caráter π ligante entre os átomos de carbono. Pode-se observar que a principal contribuição no *HOMO* do átomo de oxigênio é o orbital p para ambas as moléculas de citral, enquanto o *LUMO* apresenta caráter π antiligante. Outra observação importante é que o grupo CH_3 para ambas as moléculas não contribuem na formação do *LUMO*.

Ao analisar o *HOMO* para as duas moléculas geranial e neral, pode-se observar que os glóbulos estão distribuídos na região de cadeia carbônica, o que facilitaria os ataques nucleofílicos com quantidade mínima de energia necessária para reagir com os elétrons nesta região.

Na Figura 13 é apresentado o MEP (Mapa de Potencial Eletrostático) das moléculas de geranial e neral apenas em fase aquosa, visto que os processos ocorrem em solução, utilizando o método TFD com o funcional WB97XD e a base 6-311g(d,p)

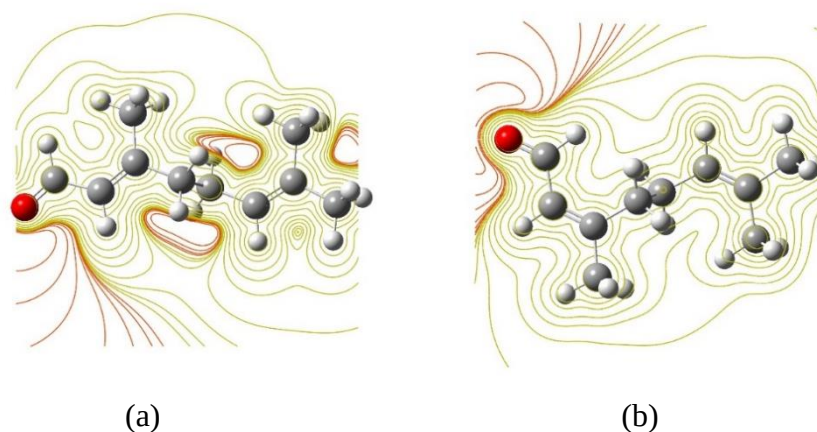
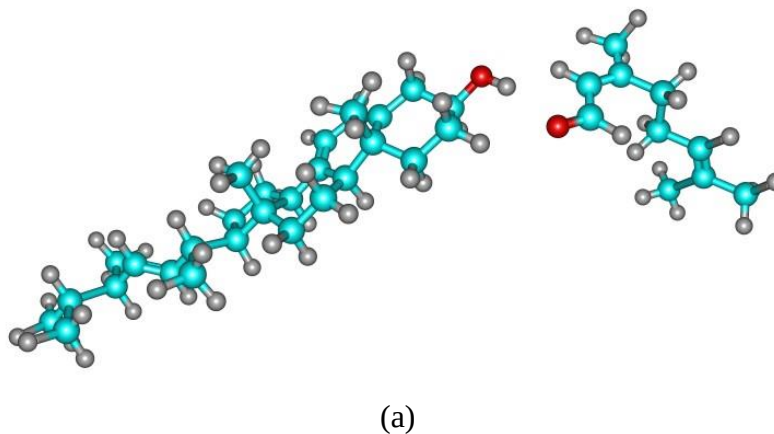


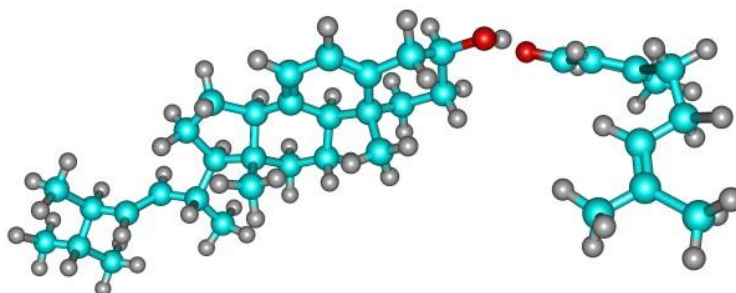
Figura 13: Mapa de Potencial Eletrostático das moléculas de geranial (a) e neral (b).

Analisando a Figura 13 pode-se observar que as regiões onde se encontram os átomos de oxigênio são as regiões ricas em elétrons, desta forma, entende-se que esta região será o possível local de interação com outras moléculas.

5.3 ENERGIA DE INTERAÇÃO

Na Figura 14 é apresentado o modo de interação entre o ergosterol com o neral (a) e o geranial (b) em fase aquosa.





(b)

Figura 14: Estruturas otimizadas dos complexos com wb97xd/6-311g(d,p) em fase aquosa.

As distancias calculadas do átomo de oxigênio (O) do neral e geranial para a hidroxila (OH) do ergosterol foi de 2,14 Å em ambos os complexos.

A Tabela 5 apresenta as energias de absolutas para o ergosterol, neral, geranial e os seus respectivos complexos.

Tabela 5: Energias absolutas ergosterol, neral, geranial e complexos com wb97xd/6-311g(d,p).

Sistemas	Energia absoluta
ergosterol	-1168,9446
neral	-465,8552
geranial	-465,8546
ergosterol+neral	-1634,7998
ergosterol+geranial	-1634,7992

A partir dos dados da Tabela 5 foi possível calcular a energia de interação. A energia de interação para o complexo ergosterol com neral é -0,172 hartree, enquanto para o complexo ergosterol com geranial é de -0,170 hartree. Para melhor comparação estes valores foram convertidos em kcal/mol, assim o complexo ergosterol com neral apresenta um valor de 107,93 Kcal/mol, por outro lado o complexo de ergosterol com geranial o valor de 106,68 Kcal/mol. Desta forma, conclui-se que o complexo do ergosterol com neral é ligeiramente mais estável que o complexo com geranial.

Para verificar a eficácia, *in vitro*, do citral contra *A. flavus* foram executados os seguintes métodos: avaliação da inibição da acidificação do meio estimulada por glicose para verificação de possíveis danos à membrana plasmática, avaliação da inibição da germinação de esporos e avaliação da inibição da biossíntese do ergosterol.

5.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DO CITRAL NA INIBIÇÃO DA ACIDIFICAÇÃO DO FUNGO *A. flavus* ESTIMULADA POR GLICOSE

Foi monitorada a acidificação do meio estimulado por glicose, em três períodos de pré-incubação (30 min, 1 e 2 h), onde o fungo foi incubado com diferentes concentrações de citral para avaliar sua eficácia na inibição da acidificação do meio por *A. flavus*, com adição de glicose como estímulo (Figura 15).

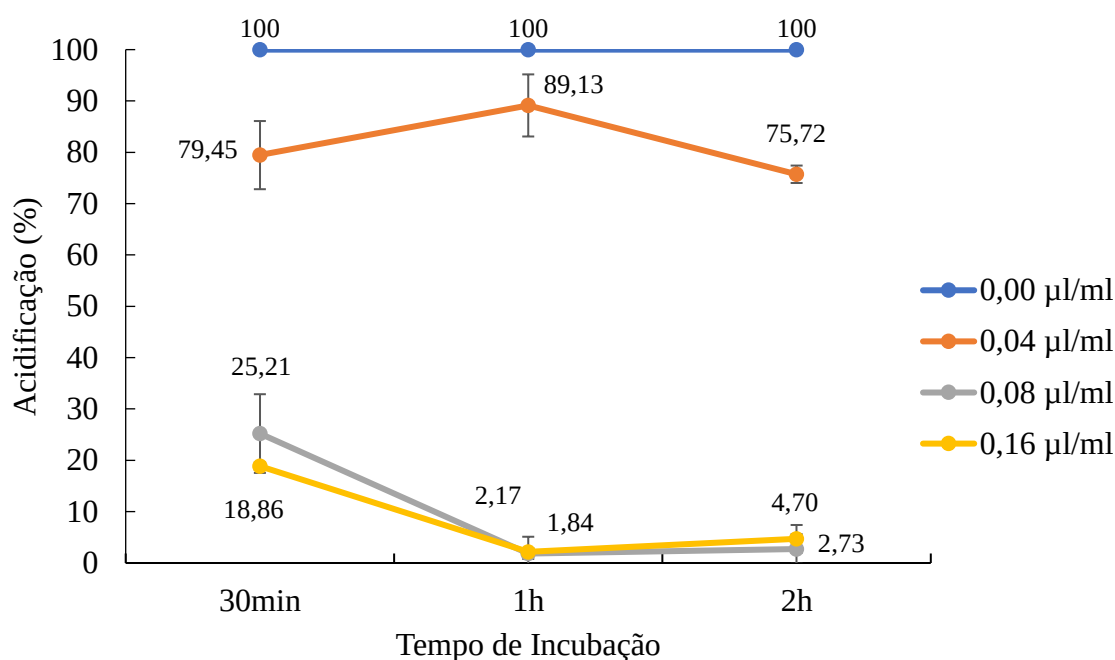


Figura 15. Efeito das diferentes concentrações do citral na acidificação do meio pelo fungo quando estimulado por glicose após incubação.

Conforme Figura 15, observa-se que há acentuada acidificação do meio quando o fungo foi incubado sem o citral (controle) e na concentração de 0,04 µL/mL quando comparado com as concentrações de 0,08 e 0,16 µL/mL. Portanto, as concentrações mais altas de citral utilizadas neste estudo se mostraram mais eficazes na inibição da acidificação do meio, pelo fungo, estimulada por glicose.

A Tabela 6 ilustra o resumo da análise de variância do efeito do citral e do tempo de incubação na inibição da acidificação do meio estimulada por glicose do fungo *A. flavus*.

Tabela 6: Resumo da análise de variância dos dados obtidos do efeito do citral, durante o período de incubação, sobre a quantidade a (%) de acidificação do meio produzida pelo fungo *A. flavus*

Fonte de variação	GL	QM	P>0,05
Concentrações citral (C)	3	20428.853610	*
Tempo de incubação (t)	2	331.442269	*
D x t	6	193.704221	*
Erro	24	47.197900	
Total	35		
CV = 13,74%			

*Significativo a 5% de significância teste F.

A Tabela 6 ilustra que houve efeito significativo para as diferentes concentrações de citral, para o tempo de incubação, assim como para a interação (C x t), indicando que a inibição da acidificação do meio estimulada por glicose em *A. flavus* por citral, depende da interação entre a concentração do composto e o tempo de incubação. A avaliação do comportamento do controle da acidificação do meio estimulada por glicose dentro de cada fator está apresentada na Tabela 7.

Foi observado ao longo da exposição dos resultados que, em todas as análises obtidas, o valor CV variou de 13,74 a 17,26%. Pimentel-Gomes (1985) classificou os CV como baixos, quando inferiores a 10%; médios de 10 - 20%; altos de 20 - 30% e muito altos quando superiores a 30%. Contudo, esta classificação é bastante abrangente e não leva em consideração as particularidades de cada fator estudado e a sua natureza.

A Tabela 7 indica a porcentagem média de acidificação do meio nos períodos de incubação de 30 minutos, 1 e 2 horas, calculada conforme a Equação 03.

Tabela 7: Porcentagem média (%) de acidificação do meio por período de incubação.

Concentrações ($\mu\text{L/mL}$)	Tempo de incubação		
	30 min	1 h	2 h
0,00	100aA	100aA	100aA
0,04	79,45bA	89,13aA	75,72bA
0,08	25,21cA	1,84bB	2,73cB
0,16	18,86cA	2,17bB	4,70cB

*Letras iguais, minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, não se diferem estatisticamente entre si, pelo Teste de Tukey com nível de significância de 5%.

Os resultados da Tabela 7 mostraram que o citral reduz a acidificação do meio extracelular de *A. flavus* induzida por glicose de maneira dependente do tempo e da concentração. Observou-se que já na concentração 0,04 $\mu\text{L/mL}$ houve redução da acidificação em relação ao controle desde o primeiro período. Quando consideradas as concentrações 0,08 e 0,16 $\mu\text{L/mL}$, fica evidenciado que houve acentuada inibição da acidificação do meio, que é intensificada a partir de 1 hora de incubação com diferença significativa entre os valores obtidos, sugerindo que a eficácia destas concentrações é dependente do tempo.

Helal et al. (2007) indicaram que o óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon citratus*), cujo principal constituinte é o citral (68,4%), possui ação antifúngica contra *A. flavus* atuando na danificação da membrana das células fúngicas. Os autores incubaram o fungo por 12 h com uma concentração 1,0 $\mu\text{L/mL}$ do óleo essencial comparando com um controle, e indicaram que o óleo essencial provoca distúrbio da membrana plasmática. Este efeito perturba o equilíbrio osmótico da célula, levando eventualmente à inibição do crescimento celular.

Tian et al. (2012a) evidenciaram a susceptibilidade do *A. flavus* ao óleo essencial de endro (*Anethum graveolens*), sem detalhar os componentes do óleo, para a inibição da acidificação do meio induzida por glicose, indicando que a ação do antifúngico é dependente da concentração do óleo assim como do tempo de incubação. Os efeitos antagonistas foram observados nas concentrações 0,25; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0 $\mu\text{L/mL}$ a partir de dez minutos de incubação. Em comparação, o presente estudo necessitou da utilização de concentrações menores de citral para se observar tais efeitos antifúngicos (0,08 e 0,16 $\mu\text{L/mL}$).

Bhatia et al. (2012) testaram a eficácia de componentes de óleos essenciais, o isoeugenol e o *o*-methoxycinamaldeído, contra *Candida albicans* para a inibição da acidificação do meio induzida por glicose, obtendo níveis de inibição de 70,40 e 42,54%,

respectivamente após período de incubação de 24 h. Os autores indicam que os principais mecanismos de ação estão associados a inibição da atividade de bombeamento de prótons mediada por H^+ -ATPase e ruptura da membrana plasmática. No presente estudo, após 1 h de incubação, obtiveram-se níveis acima de 90% de inibição da acidificação para as concentrações 0,08 e 0,16 $\mu\text{L/mL}$.

Os dados obtidos neste trabalho sugerem que o citral é um antifúngico para *A. flavus* e seu possível mecanismo de ação pode incluir a inibição da enzima H^+ -ATPase e a danificação da membrana plasmática, sendo dependente da concentração e tempo de exposição do fungo ao composto.

5.5 AVALIAÇÃO EXPERIMENTAL DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO CITRAL SOBRE A GERMINAÇÃO DE ESPOROS DO FUNGO *A. flavus*

Os fungos filamentosos se reproduzem através de esporos, dos quais crescem na forma de filamentos multicelulares chamados hifas. A rede interconectada de hifas forma o micélio e suporta o conidióforo fértil que contém os esporos que podem ser propagados (MANSO et al., 2013). Terpenos como o citral são compostos antimicrobianos ativos de óleos essenciais e tem a membrana plasmática do fungo como um dos principais alvos. Para *Aspergillus*, é evidenciado que o citral atua na inibição da germinação e na permeabilização da membrana dos esporos fúngicos (TIAN et al., 2012a).

Uma vez que o citral se mostrou eficaz na inibição da acidificação do meio extracelular estimulada por glicose, sendo um mecanismo que envolve a danificação da membrana, procedeu-se para avaliação dos efeitos no desenvolvimento do fungo.

Na Figura 16 é ilustrado o efeito inibitório do citral na germinação de esporos do fungo *A. flavus*, nas diferentes concentrações testadas durante o período de incubação de 72 horas.

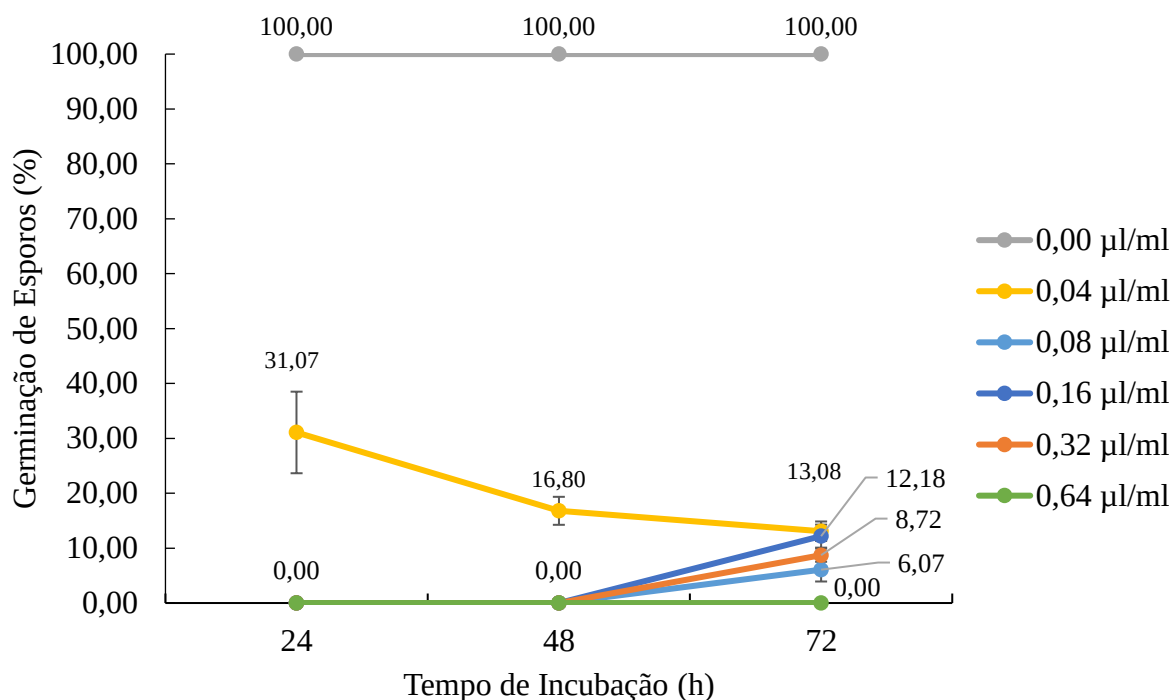


Figura 16: Efeito de diferentes concentrações de citral na germinação de esporos de *A. flavus*.

Pode-se observar por meio da Figura 16 que houve diferença no número de esporos germinados em todas as concentrações testadas, o que evidencia a eficácia do citral no controle desta etapa do desenvolvimento de *A. flavus*.

A Tabela 8 ilustra o resumo da análise de variância do efeito do citral e do tempo de incubação na germinação de esporos do fungo *A. flavus*.

Tabela 8: Resumo da análise de variância dos dados obtidos do efeito do citral, durante o período de incubação (dias) sobre a germinação de esporos do fungo *A. flavus*.

Fonte de variação	GL	QM	P>0,05
Concentrações citral (C)	5	7071.662963	*
Tempo de incubação (t)	2	1625.685185	*
C x t	10	607.151852	*
Erro	36	7.537037	
Total	53		
CV = 17,26%			

*Significativo a 5% de significância teste F.

A Tabela 8 ilustra que houve efeito significativo para as diferentes concentrações de citral, para o tempo de incubação, assim como para a interação (C x t), indicando que a inibição na germinação de esporos do fungo *A. flavus* com o citral, depende da interação entre a concentração do citral e o tempo de incubação. A avaliação do comportamento do controle da germinação de esporos do fungo dentro de cada fator está apresentada na Tabela 9.

Tabela 9: Porcentagem média de inibição, *in vitro*, da germinação de esporos do fungo *Aspergillus flavus* para diferentes dosagens ($\mu\text{L/mL}$) de citral durante o período de incubação.

Concentrações citral ($\mu\text{L/mL}$)	Germinação de esporos (%)		
	24 h	48 h	72 h
0,00	100,00aA	100,00aA	100,00aA
0,04	31,07bA	16,80bB	13,08bB
0,08	0,00cA	0,00cA	6,07cB
0,16	0,00cA	0,00cA	12,184bB
0,32	0,00cA	0,00cA	8,72bcB
0,64	0,00cA	0,00cA	0,00dA

*Letras iguais, minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, não se diferem estatisticamente entre si, pelo Teste de Tukey com nível de significância de 5%.

Os resultados apresentados na Tabela 9 demonstram que todas as concentrações do citral provocaram um determinado grau de inibição da germinação de esporos do *A. flavus*, para a concentração 0,64 $\mu\text{L/mL}$ não foram observados esporos germinados em nenhum dos três períodos avaliados, mostrando a eficácia do composto. Nas concentrações de 0,08, 0,16, 0,32 $\mu\text{L/mL}$ nos períodos de 24 e 48 h a inibição foi completa (100%), com redução no período de 72 h de incubação, no qual as três concentrações ainda apresentam alta porcentagem de inibição. Observa-se ainda que para a concentração 0,04 $\mu\text{L/mL}$ houve uma redução na inibição conforme o tempo de incubação aumentou.

Os resultados apresentaram variações, porém indicaram que a inibição da germinação ocorre e depende da interação entre a concentração de citral aplicada e o tempo de incubação, sendo válido para futuros trabalhos, a aplicação de diferentes concentrações e período para avaliar com maior precisão o comportamento da espécie fúngica frente ao composto.

Comportamento similar foi observado no estudo realizado por López-Malo et al. (2005), no qual foi constatado que o citral atuou como agente antimicrobiano frente ao *A.*

flavus, apontando que a maior concentração testada (1,5 µL/mL) foi mais eficaz para o controle do crescimento micelial, retardando a germinação dos esporos.

A eficiência do citral em relação a inibição da germinação de esporos de fungos é evidenciada em estudos no controle do *A. flavus* (LUO et al., 2004), onde os autores utilizaram as concentrações 0,5; 1,0; 1,5; e 2,0 mg/mL para evidenciar os efeitos morfológicos do citral no fungo, ilustrando ainda, que o citral danifica a estrutura da membrana, levando a célula a perder funções vitais, e causava desordem metabólica. À medida que a concentração de citral aumentava, as alterações morfológicas eram mais evidentes. O presente estudo utilizou de concentrações menores, porém evidenciou também que estas podem inibir parcial ou completamente a germinação de esporos por um certo período.

Ramachandran et al. (2008) utilizaram o citral em concentrações a 10 e 12% para ilustrar a permeabilização de esporos de *Aspergillus niger*. Os testes realizados para as duas concentrações preveniram a germinação dos esporos do fungo, provocando também a permeabilização e alterações morfológicas nos esporos. Os testes foram realizados por 24 h e vão de encontro com os resultados encontrados no presente estudo para as concentrações 0,08, 0,16, 0,32 e 0,64 µL/mL apesar das concentrações serem mais altas.

Portanto, verifica-se que os mecanismos de ação do citral para inibição da germinação de esporos envolvem a danificação e permeabilização da membrana plasmática, e alterações morfológicas que levam a distúrbios metabólicos no fungo.

5.6 AVALIAÇÃO DA QUANTIFICAÇÃO DE ERGOSTEROL

A avaliação da quantificação de ergosterol foi realizada com o intuito de verificar a eficácia do citral na inibição da biossíntese deste esterol por *A. flavus*. Na Figura 17 é ilustrado o efeito do citral na produção de ergosterol em diferentes concentrações após os períodos de incubação de 24, 48 e 72 horas.

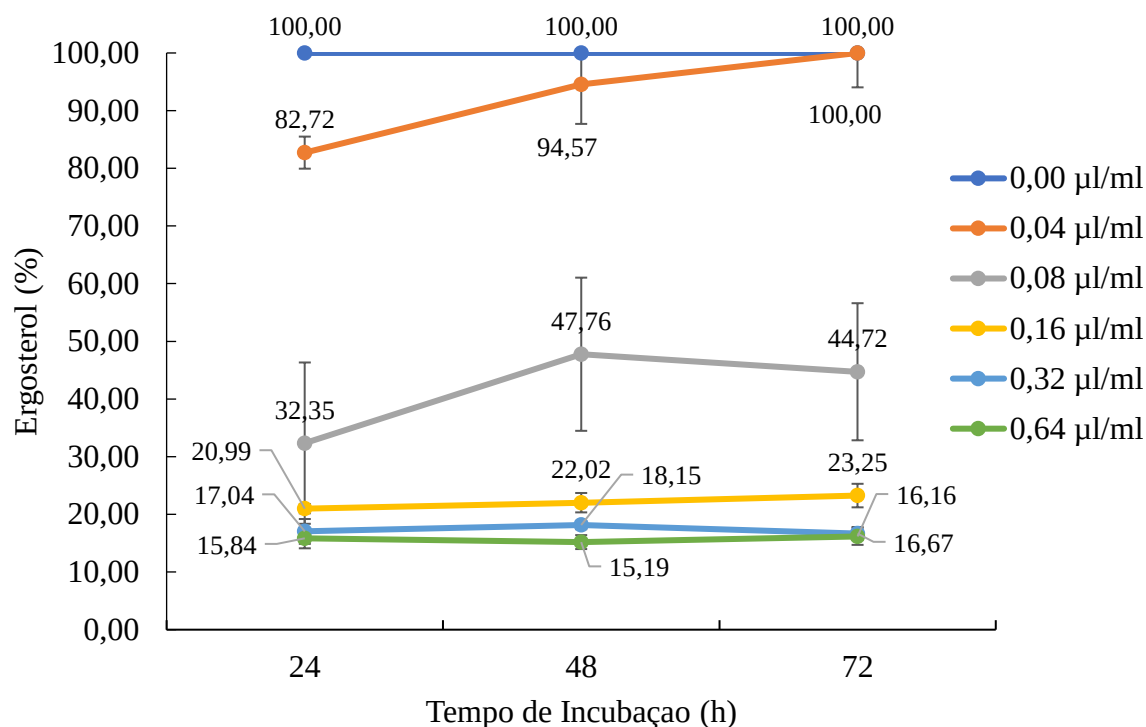


Figura 17: Efeitos do citral na produção de ergosterol de *A. flavus* após os períodos de incubação.

Na Figura 17 está disposto que à medida que a concentração da concentração de citral aumenta, maior a inibição da síntese de ergosterol por *A. flavus*. Enquanto que a menor concentração utilizada (0,04 µL/mL) induziu pouca inibição da biossíntese do ergosterol pelo fungo, as concentrações mais altas (0,32 e 0,64 µL/mL) utilizadas se mostraram mais eficazes, atingindo níveis de inibição acima de 80%.

Hua et al. (2014) utilizaram o citral para verificar sua eficácia na inibição da biossíntese do ergosterol por *A. ochraceus*. A completa inibição da produção do esterol foi obtida na concentração de 200 µg/mL, porém, em concentrações menores (50 e 100 µg/mL) foi observada apenas inibição parcial da biossíntese de ergosterol. Como o estudo de Hua et al. (2014) utilizou-se de concentrações maiores, entende-se que a inibição da biossíntese do ergosterol possa ser dependente da concentração.

A Tabela 10 ilustra o resumo da análise de variância do efeito do citral e do tempo de incubação na quantidade de ergosterol sintetizada pelo fungo *A. flavus*.

Tabela 10: Resumo da análise de variância dos dados obtidos do efeito do citral, durante o período de incubação (horas), sobre a quantidade de ergosterol sintetizada pelo fungo *A. flavus*

Fonte de variação	GL	QM	P>0,05
Concentração citral (C)	5	0.609800	*
Tempo de incubação	2	0.048259	*
C x t	10	0.005413	*
Erro	70	0.001336	
Total	87		
CV = 14,43%			

*Significativo a 5% de significância teste F.

A Tabela 10 ilustra que houve efeito significativo para as diferentes concentrações de citral, para o tempo de incubação, assim como para a interação (C x t), indicando que a inibição da biossíntese do ergosterol do fungo *A. flavus* pelo citral, depende da interação entre a concentração do citral e o tempo de incubação. A avaliação do comportamento da quantificação de ergosterol do fungo dentro de cada fator está apresentada na Tabela 11.

Tabela 11: Quantificação média de ergosterol encontrado no fungo *Aspergillus flavus* para diferentes dosagens ($\mu\text{L/mL}$) de citral durante os diferentes períodos de incubação

Concentração citral ($\mu\text{L/mL}$)	Absorção de ergosterol (nm)		
	24 h	48 h	72 h
0,00	0,4875aA	0,5280aA	0,5960aB
0,04	0,4020bA	0,5000aB	0,5950aC
0,08	0,1580cA	0,2520bB	0,2660bB
0,16	0,1020cdA	0,1160cA	0,1380cA
0,32	0,0820dA	0,0960cA	0,1000cA
0,64	0,0760dA	0,0820cA	0,0980cA

*Letras iguais, minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, não se diferem estatisticamente entre si, pelo Teste de Tukey com nível de significância de 5%.

As concentrações mais altas testadas (0,32 e 0,64 $\mu\text{L/mL}$) se mostraram mais eficazes no controle da biossíntese de ergosterol por *A. flavus* durante todo o período de incubação. As concentrações testadas de 0,08 e 0,16 $\mu\text{L/mL}$ apresentaram eficácia nos testes realizados para todos os períodos de incubação. A eficácia da concentração 0,04 $\mu\text{L/mL}$ foi observada nas primeiras 24 h de incubação, após isso, os níveis de ergosterol se mantiveram similares ao controle (0,00 $\mu\text{L/mL}$).

Tian et al. (2012b) quantificaram o conteúdo de ergosterol de *A. flavus* quando exposto ao óleo essencial de *Cinnamomum jensenianum*, cuja composição é formada por monoterpenos e sesquiterpenos. As observações dos autores indicaram que o agente antifúngico pode induzir um prejuízo considerável na biossíntese de ergosterol do fungo em concentrações que variaram de 0,25 a 2,0 $\mu\text{L/mL}$. As concentrações que induziram redução na biossíntese do ergosterol são semelhantes às do presente estudo (0,16; 0,32 e 0,64 $\mu\text{L/mL}$). Esses dados sugerem que a biossíntese do ergosterol é um dos alvos de óleos essenciais e seus componentes contra o *A. flavus*.

O citral também possui eficácia na redução da biossíntese do ergosterol em *Penicillium digitatum* (OUYANG et al., 2016), onde uma concentração de citral, metade de sua Concentração Mínima Inibitória (1/2 CIM – 0,89 $\mu\text{g/mL}$) reduziu drasticamente a produção do esterol quando comparada a um controle. Os autores utilizaram de quatro períodos de incubação e sugerem que a inibição da biossíntese do ergosterol seja dependente do tempo. No presente estudo, observa-se que a eficácia do citral nas concentrações 0,16; 0,32 e 0,64 $\mu\text{L/mL}$ não foram dependentes dos tempos de incubação.

Os resultados do presente estudo também corroboram com as observações de Pinto et al. (2009), que observaram que os óleos essenciais de cravo (0,32 $\mu\text{L/mL}$) e eugenol (0,32 $\mu\text{L/mL}$) prejudicaram consideravelmente a biossíntese do ergosterol por *Candida albicans* em concentrações subinibitórias.

Menezes et al. (2020) sugerem que o citral age ligando-se ao ergosterol da membrana fúngica e que o composto também destrói a permeabilidade e integridade da membrana do *Cladosporium oxysporum*. Rajput e Karuppayil (2013) ilustram a eficiência do citral na inibição da biossíntese do ergosterol e indicam que o composto age na alteração do perfil do ergosterol no fungo *Candida albicans*. O citral também foi responsável por destruir a permeabilidade da membrana e integridade do fungo comumente associado à contaminação pós-colheita *Penicillium italicum*, causando perdas significativas em lipídios totais no conteúdo de ergosterol (TAO et al., 2014). Leite et al. (2014) ilustram, *in vitro*, que a complexação do citral com o ergosterol pode ocorrer, causando a abertura de poros na

membrana do fungo e alterando a permeabilidade da célula. A interação do citral com o ergosterol é evidenciada nos cálculos teóricos do presente estudo, com a indicação dos principais orbitais onde estas podem ocorrer.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os cálculos realizados no presente estudo indicaram que dois isômeros que compõem o citral possuem energia de interação com o ergosterol, sendo o neral o mais estável. Os testes realizados *in vitro* indicaram que o citral possui efeitos inibitórios sobre o fungo *A. flavus*, conforme os três experimentos realizados.

A perturbação da membrana plasmática alterou a capacidade de bombeamento de prótons de dentro para fora da célula fúngica e vice-versa, podendo ser visualizada por meio da inibição da acidificação do meio estimulada por glicose. As concentrações de 0,08 e 0,16 $\mu\text{L/mL}$ foram as que obtiveram maior sucesso nos ensaios realizados.

A exposição de esporos de *A. flavus* tendeu a causar inibição no crescimento fúngico e na germinação de seus esporos. As concentrações testadas de 0,08, 0,16 e 0,32 $\mu\text{L/mL}$ se mostraram 100% eficazes nas primeiras 48 h de incubação, enquanto que para a concentração 0,64 $\mu\text{L/mL}$ não foi observada a germinação de esporos em todo o período de incubação.

O ensaio de quantificação de ergosterol evidenciou que o citral promoveu certo degraú de inibição da biossíntese deste esterol pelo fungo, onde as concentrações que obtiveram mais sucesso neste mecanismo foram 0,32 e 0,64 $\mu\text{L/mL}$.

O citral se mostrou eficaz no controle do desenvolvimento de *A. flavus* e na promoção de perturbações metabólicas no fungo nos testes realizados *in vitro* após períodos de incubação de 24, 48 e 72 h. A utilização de cálculos teóricos pode facilitar a estruturação de metodologias que possam ser assertivas na descrição mais detalhada deste mecanismo de ação e no desenvolvimento futuro de novos antifúngicos mais eficazes.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-AZEEM, A.M.; SALEM, F.M.; ABDEL-AZEEM, M.A.; NAFADY, N.A.; MOHESIEN, M. T.; SOLIMAN, E.A. Biodiversity of the Genus *Aspergillus* in different habitats. **New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering**. Elsevier, 2016. p. 3-28.

AHMAD, A.; KHAN, A.; MANZOOR, N. Reversal of efflux mediated antifungal resistance underlies synergistic activity of two monoterpenes with fluconazole. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 48, p. 80–86, 2013.

AINSWORTH, Geoffrey Clough. **Ainsworth & Bisby's dictionary of the fungi**. Cabi, 2008.

ALCAZAR-FUOLI, L. MELLADO, E.; ALASTRUEY-IZQUIERDO, A.; CUENCA-ESTRELLA, M.; RODRIGUEZ-TUDELA, J.L. *Aspergillus* section *Fumigati*: antifungal susceptibility patterns and sequence-based identification. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 52, n. 4, p. 1244-1251, 2008.

ALVES, J.C.; FERREIRA, G.F.; SANTOS, J.R.; SILVA, L.C.; RODRIGUES, J.F.; NETO, W.; FARAH, E.I.; SANTOS, A.R.C.; MENDES, B.S.; SOUSA, L.V.N.F.; MONTEIRO, A.S.; SANTOS, V.L.; SANTOS, D.A.; PEREZ, A.C.; ROMERO, T.R.L.; DENADAI, A.M.L.; GUZZO, L. S. Eugenol induces phenotypic alterations and increases the oxidative burst in *Cryptococcus*. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 2419, 2017.

ALWATHNANI, H.A.; PERVEEN, K. Biological control of fusarium wilt of tomato by antagonist fungi and cyanobacteria. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 5, p. 1100-1105, 2012.

AMAIKE, S.; KELLER, N.P. *Aspergillus flavus*. **Annual review of phytopathology**, v. 49, p. 107-133, 2011.

ASPERGILLUS WEBSITE. *Aspergillus flavus*, 2019. Disponível em: <https://www.aspergillus.org.uk/content/aspergillus-flavus-38>. Acesso em: 19 jul 2019.

ASRAT, B.; GIRMA, A. Isolation, production and characterization of amylase enzyme using the isolate *Aspergillus niger* FAB-211. **International Journal of Biotechnology and Molecular Biology Research**, v. 9, n. 2, p. 7-14, 2018.

ATKINS, P.W.; FRIEDMAN, R.S. **Molecular quantum mechanics**. Oxford university press, 2011.

ATKINS, P.; PAULA, J. **Physical Chemistry**. Eighth Edi ed. New York, 2006.

BENNETT, J.W. *Aspergillus*: a primer for the novice. **Medical mycology**, v. 47, n. sup1, p. S5-S12, 2009.

BENNETT, J.W. An overview of the genus *Aspergillus*. **Aspergillus: molecular biology and genomics**, p. 1-17, 2010.

BHATIA, R. SHREAZ, S.; KHAN, N.; MURALIDHAR, S.; BASIR, S.F.; MANZOOR, N.; KHAN, L.A. Proton pumping ATPase mediated fungicidal activity of two essential oil components. **Journal of basic microbiology**, v. 52, n. 5, p. 504-512, 2012.

BOHLIN, C.; JÖNSSON, L.J.; ROTH, R.; VAN ZYL, W.H. Heterologous expression of *Trametes versicolor* laccase in *Pichia pastoris* and *Aspergillus niger*. In: **Twenty-Seventh Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals**. Humana Press, 2006. p. 195-214.

BOMFIM, N.S.; KOHIYAMA, C.Y.; NAKASUGI, L.P.; NERILO, S.B.; MOSSINI, S.A.G.; ROMOLI, J.C.Z.; MIKCHA, J.M.G.; FILHO, B.A.D.A.; MACHINSKI, M. Antifungal and antiaflatoxigenic activity of rosemary essential oil (*Rosmarinus officinalis* L.) against *Aspergillus flavus*. **Food Additives & Contaminants**, v. 37, n. 1, p. 153-161, 2020.

BOWMAN, S.M.; FREE, S.J. The structure and synthesis of the fungal cell wall. **Bioessays**, v. 28, n. 8, p. 799-808, 2006.

BROWN, T.; LEMAY, H.; BURSTEN, B.; BURDGE, J. Química: a ciência central. 9ª Edição. 2005.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, n. 3, p. 223-53, 2004.

BURT, S.A.; REINDERS, R.D. Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. **Lett. Appl. Microbiol.** v. 36, p. 162-167, 2003.

CALO, J.R.; CRANDALL, P.G.; O'BRYAN, C.A.; RICKE, S.C. Essential oils as antimicrobials in food systems—A review. **Food Control**, v. 54, p. 111-119, 2015.

CHANG, P.K.; SCHARFENSTEIN, L.L.; LUO, M.; MAHONEY, N.; MOLYNEUX, R.J.; YU, J.; BROWN, R.L.; CAMPBELL, B.C. Loss of *msnA*, a putative stress regulatory gene, in *Aspergillus parasiticus* and *Aspergillus flavus* increased production of conidia, aflatoxins and kojic acid. *Toxins*, v. 3, n. 1, p. 82-104, 2011.

CHORIANOPOULOS, N.G.; GIAOURIS, E.D.; SKANDAMIS, P.N.; HAROUTOUNIAN, S.A.; NYCHAS, G.J.E. Disinfectant test against monoculture and mixed-culture biofilms composed of technological, spoilage and pathogenic bacteria: Bactericidal effect of essential oil and hydrosol of *Satureja thymbra* and comparison with standard acid-base sanitizers. **J. Appl. Microbiol.** v.104, p.1586-1599, 2008.

COHEN, A. J.; MORI-SÁNCHEZ, P.; YANG, W. Challenges for density functional theory. **Chemical reviews**, v. 112, n. 1, p. 289-320, 2012.

COTTY, P.J.; JAIME-GARCIA, R. Influences of climate on aflatoxin producing fungi and aflatoxin contamination. **International Journal of Food Microbiology**, v. 119, n. 1-2, p. 109-115, 2007.

COWEN, L.E.; SANGLARD, D.; HOWARD, S.J.; ROGERS, P.D.; PERLIN, D.S. Mechanisms of antifungal drug resistance. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 5, n. 7, p. a019752, 2015.

CRISTANI, M.; D'ARRIGO, M.; MANDALARI, G.; CASTELLI, F.; SARPIETRO, M.G.; MICIELI, D.; TROMBETTA, D. Interaction of Four Monoterpenes Contained in Essential Oils with Model Membranes: Implications for Their Antibacterial Activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 15, p. 6300–6308, 2007.

DAGENAIS, T.R.T; KELLER, N.P. Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in invasive aspergillosis. **Clinical Microbiology reviews**, v. 22, n. 3, p. 447-465, 2009.

DE MARTINO, L.; DE FEO, V.; NAZZARO, F. Chemical composition and *in vitro* antimicrobial and mutagenic activities of seven lamiaceae essential oils. **Molecules.**, v 14, p. 4213–4230, 2009.

DE VRESE, M.; LAUE, C.; OFFICK, B.; SOETH, E.; REPENNING, F.; THOß, A.; SCHREZENMEIR, J. A combination of acid lactase from *Aspergillus oryzae* and yogurt bacteria improves lactose digestion in lactose maldigesters synergistically: A randomized, controlled, double-blind cross-over trial. **Clinical Nutrition**, v. 34, n. 3, p. 394-399, 2015.

DESOUBEAUX, G.; CRAY, C. Animal models of aspergillosis. **Comparative medicine**, v. 68, n. 2, p. 109-123, 2018.

DEWAR, M. J. S.; ZOEBISCH, E. G.; HEALY, E. F.; STEWART, J. J. P. Development and use of quantum mechanical molecular models. 76. AM1: A new general purpose quantum mechanical molecular model. **J. Am. Chem. Soc.** v. 107, p. 3902, 1985.

DHINGRA, S.; CRAMER, R.A. Regulation of sterol biosynthesis in the human fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*: opportunities for therapeutic development. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 92, 2017.

DOUGLAS, L.M.; KONOPKA, J.B. Fungal membrane organization: the eisosome concept. **Annual review of microbiology**, v. 68, p. 377-393, 2014.

DUPONT, S.; LEMETAIS, G.; FERREIRA, T.; CAYOT, P.; GERVAIS, P.; BENEY, L. Ergosterol biosynthesis: a fungal pathway for life on land? **Evolution: International Journal of Organic Evolution**, v. 66, n. 9, p. 2961-2968, 2012.

EL-METWALLY, M.M.; ELBEALY, E.R.; BELTAGY, D.M.; SHAABAN, M.; EL-KOTT, A.F. Suppressive efficiency of Kojic acid from *Aspergillus tamarii* MM11 against HepG-2 cell line derived from human liver cancer. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 19, n. 8, p. 1661-1668, 2020.

ERDEM, E.; YAGMUR, M.; BORAL, H.; ILKIT, M.; ERSOZ, R.; SEYEDMOUSAVI, S. *Aspergillus flavus* keratitis: experience of a tertiary eye clinic in Turkey. **Mycopathologia**, v. 182, n. 3-4, p. 379-385, 2017.

FILHO, F.C.C.; CALVET, R.M.; ROSA, C.A.R.; PEREIRA, M.M.G.; COSTA, A.P.R.; MURATORI, M.C.S. Monitoramento de fungos toxigênicos e aflatoxinas em rações utilizadas em piscicultura. **Ciência Animal Brasileira**, v. 14, n. 3, p. 305-311, 2013.

FLEMING, I. **Frontier Orbitals and Organic Chemical Reactions**, John Wiley and Sons: New York, 1976.

FREE, S.J. Fungal cell wall organization and biosynthesis. **Advances in genetics**, v. 81, p. 33-82, 2013.

FRÍAS-DE-LEÓN, M.G.; ROSAS-DE-PAZ, E.; ARENAS, R.; ATOCHE, C.; DUARTE-ESCALANTE, E.; DE SOSCHIN, D.M.; ACOSTA-ALTAMIRANO, G; REYES-MONTES, M. R. Identification of *Aspergillus tubingensis* in a primary skin infection. **Journal de Mycologie Medicale**, v. 28, n. 2, p. 274-278, 2018

FRIEDMAN, M.; HENIKA, P.R.; LEVIN, C.E.; MANDRELL, R.E. Antibacterial activities of plant essential oils and their components against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* in apple juice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 19, p. 6042–6048, 2004.

GADD, G. M. Geomycology: biogeochemical transformations of rocks, minerals, metals and radionuclides by fungi, bioweathering and bioremediation. **Mycological Research**, v. 111, n. 1, p. 3–49, 2007.

GADD, G.M. Fungi in biogeochemical cycles. Cambridge University Press, 2006.

GAUTIER, M.; NORMAND, A.C.; RANQUE, S. Previously unknown species of *Aspergillus*. **Clinical microbiology and infection**, v. 22, n. 8, p. 662-669, 2016.

GALEMBECK, S.E.; CARAMORI, G.F. Qual o sitio de reação? Um experimento computacional. **Química Nova**, v. 26, n. 6, p. 957-959, 2003.

GOMES, V.M.; OKOROKOV, L.A.; ROSE, T.L.; FERNANDES, K.V.S.; XAVIER-FILHO, J. Legume vicilins (7S storage globulins) inhibit yeast growth and glucose stimulated acidification of the medium by yeast cells. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1379, n. 2, p. 207-216, 1998.

GRIMM, L.H.; KELLY, S.; KRULL, R.; HEMPEL, D.C. Morphology and productivity of filamentous fungi. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 69, n. 4, p. 375-384, 2005.

GUNATILAKA, A.L. Plant Natural Products. **Natural products in chemical biology**. New York, USA: Wiley, 2012. p. 3-31.

GUTAROWSKA, B.; ZAKOWSKA, Z. Mathematical models of mycelium growth and ergosterol synthesis in stationary mould culture. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 48, p. 605610, 2009.

HARTMANN, T. Plant-derived secondary metabolites as defensive chemicals in herbivorous insects: a case study in chemical ecology. **Planta**, v. 219, n. 1, p. 1-4, 2004.

HAWKER, Lilian E. The physiology of reproduction in fungi. **Cambridge University Press**, 2016.

HEDAYATI, M.T.; PASQUALOTTO, A.C.; WARN, P. A.; BOWYER, P.; DENNING, D.W. *Aspergillus flavus*: human pathogen, allergen and mycotoxin producer. **Microbiology**, v. 153, n. 6, p. 1677-1692, 2007.

HEITMAN, J.; SUN, S.; JAMES, T.Y. Evolution of fungal sexual reproduction. **Mycologia**, v. 105, n. 1, p. 1-27, 2013.

HELAL, G.A. SARHAN, M.M.; ABU SHAHLA, A.N.K.; ABOU EL-KHAIR, E.K. Effects of *Cymbopogon citratus* L. essential oil on the growth, morphogenesis and aflatoxin production of *Aspergillus flavus* ML2-strain. **Journal of Basic Microbiology**, v. 47, n. 1, p. 5-15, 2007.

HOHENBERG, P.; KOHN, W.; SHAM, L. Advanced Quantum Chemistry, v. 21, n. 7, 1990.

HOSHIDA, H.; FUJITA, T.; MURATA, K.; KUBO, K.; AKADA, R. Copper-dependent production of a *Pycnoporus coccineus* extracellular laccase in *Aspergillus oryzae* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 69, n. 6, p. 1090-1097, 2005.

HU, Z.; HE, B.; MA, L.; SUN, Y.; NIU, Y.; ZENG, B. Recent advances in ergosterol biosynthesis and regulation mechanisms in *Saccharomyces cerevisiae*. **Indian journal of microbiology**, v. 57, n. 3, p. 270-277, 2017.

IQBA, S.Z.; ASI, M.R.; ARIÑO, A. Aflatoxins. In: **Brenner's Encyclopedia of Genetics**. 2. ed. Academic Press, 2013. 4368 p.

JIANG, L.; LUO, M. Molecular Mechanism of Inhibitory Effects of Citral on *Aspergillus flavus*. **Life Science Research**, p. S1, 2005.

KADUK, B.; KOWALCZYK, T.; VOORHIS, T. VAN. Constrained density functional theory. **Chemical reviews**, v. 112, n. 1, p. 321–70, 2012.

KEREKES, E.B.; DEAK, E.; TAKO, M.; TSERENNADMID, R.; PETKOVITS, T.; VAGVOLGYI, C.; KRISCH, J. Anti-Bio film forming and anti-quorum sensing activity of selected essential oils and their main components on food-related microorganisms. **Journal of Applied Microbiology**, v. 115, p. 933–942, 2013.

KHAN, A.; AHMAD, A.; AKHTAR, F.; YOUSUF, S.; XESS, I.; KHAN, L. A.; MANZOOR, N. *Ocimum sanctum* essential oil and its active principles exert their antifungal activity by disrupting ergosterol biosynthesis and membrane integrity. **Research in microbiology**, v. 161, n. 10, p. 816-823, 2010.

KHLANGWISSET, P.; SHEPHARD, G.S.; WU, F. Aflatoxins and growth impairment: A review. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 41, n. 9, p. 740–755, 2011.

KLICH, M.A. *Aspergillus flavus*: the major producer of aflatoxin. **Molecular plant pathology**, v. 8, n. 6, p. 713-722, 2007.

KLICH, M.A.; PITT, J.I. **A laboratory guide to the common *Aspergillus* species and their teleomorphs**. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, Division of Food Processing, 1988.

KOSELNY, K.; MUTLU, N.; MINARD, A.Y.; KUMAR, A.; KRYSAN, D.J.; WELLINGTON, M. A genome-wide screen of deletion mutants in the filamentous *Saccharomyces cerevisiae* background identifies ergosterol as a direct trigger of macrophage pyroptosis. **MBio**, v. 9, n. 4, 2018.

KURTZ, M.B.; CHAMPE, S.P. Purification and characterization of the conidial laccase of *Aspergillus nidulans*. **Journal of bacteriology**, v. 151, n. 3, p. 1338-1345, 1982.

LEITE, M.C.A.; BEZERRA, A.P.D.B.; SOUSA, J.P.D.; GUERRA, F.Q.S.; LIMA, E.D.O. Evaluation of antifungal activity and mechanism of action of citral against *Candida albicans*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, 2014.

LI, Q.; RAY, C.S.; CALLOW, N.V.; LOMAN, A.A.; ISLAM, S.M.; JU, L.K. *Aspergillus niger* production of pectinase and α -galactosidase for enzymatic soy processing. **Enzyme and microbial technology**, v. 134, p. 109476, 2020.

LIANG, D; XING, F.; SELVARAJ, J.N.; LIU, X.; WANG, L.; HUA, H.; ZHOU, L.; ZHAO, Y.; WANG, Y.; LIU, Y. Inhibitory effect of cinnamaldehyde, citral, and eugenol on aflatoxin biosynthetic gene expression and aflatoxin B1 biosynthesis in *Aspergillus flavus*. **Journal of Food Science**, v. 80, n. 12, p. M2917-M2924, 2015

LUO, M.; JIANG, L.K.; HUANG, Y.X.; XIAO, M.; LI, B.; ZOU, G.L. Effects of citral on *Aspergillus flavus* spores by quasi-elastic light scattering and multiplex microanalysis techniques. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 36, n. 4, p. 277-83, 2004.

LUPI, O.; TYRING, S. K.; MCGINNIS, M. Fungal Tropical Dermatology: Fungal Tropical Disease. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 55, n. 4, p. 723-4, 2006.

LV, F.; LIANG, H.; YUAN, Q.; LI, C. *In vitro* antimicrobial effects and mechanism of action of selected plant essential oil combinations against four food-related microorganisms. **Food Research International**, v. 44, n. 9, p. 3057–3064, 2011.

MA, W.L.; ZHAO, F.F.; YE, Q.; HU, Z.X.; YAN, D.; HOU, J.; YANG, Y. Production and partial purification of tannase from *Aspergillus ficuum* Gim 3.6. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 45, n. 8, p. 754-768, 2015.

MAGAN, N. Fungi in extreme environments. **The Mycota**, v. 4, p. 85-103, 2007.

MANSO, S.; CACHO-NERIN, F.; BECERRIL, R.; NERÍN, C. Combined analytical and microbiological tools to study the effect on *Aspergillus flavus* of cinnamon essential oil contained in food packaging. **Food Control**, v. 30, n. 2, p. 370-378, 2013.

MARGULIS, L.; CHAPMAN, M.J. **Kingdoms and domains: an illustrated guide to the phyla of life on Earth**. Academic Press, 2009.

MARQUES, A.M.; LIMA, C.H.P.; ALVIANO, D.S.; ALVIANO, C. S.; ESTEVES, R. L.; KAPLAN, M.A.C. Traditional use, chemical composition and antimicrobial activity of *Pectis brevipedunculata* essential oil: a correlated lemongrass species in Brazil. **Emirate Journal of Food and Agriculture**, v. 25, p. 798–808, 2013.

MCCONNAUGHEY, M. Physical Chemical Properties of Fungi. **xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference**, p. 1 – 3, 2007

MELLO E.O.; RIBEIRO S.F.F.; CARVALHO A.O.; SANTOS I.S.; DA CUNHA M.; SANTA-CATARINA, C. GOMES, V.M. Antifungal activity of PvD1 defensin involves plasma membrane permeabilization, inhibition of medium acidification, and induction of ROS in fungi cells. **Current Microbiology**, v. 62, p. 1209–17, 2011.

MENEZES, C.P.; MEDEIROS, C.I.S.; PEREZ, A.L.A.L.; SOUSA, J.P.; PINHEIRO, L. S.; FILHO, A.A.O.; LIMA, E.O. Citral: antifungal activity and mode of action, against *Cladosporium oxysporum*. **Ciência e Natura**, v. 42, p. 54, 2020.

MITCHELL, N.J.; BOWERS, E.; HURBURGH, C.; WU, F. Potential economic losses to the US corn industry from aflatoxin contamination. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 33, n. 3, p. 540-550, 2016.

MONEY, N.P. Fungal cell biology and development. **The fungi**. Academic Press, 2016. p. 37-66.

NAZZARO, F.; FRATIANNI, F.; COPPOLA, R.; FEO, V.D. Essential Oils and Antifungal Activity. **Pharmaceuticals**, v. 10, n. 4, p. 86, 2017.

NEGI, S.; BANERJEE, R. Optimization of culture parameters to enhance production of amylase and protease from *Aspergillus awamori* in a single fermentation. **African Journal of Biochemistry Research**, v. 4, n. 3, p. 73-80, 2010.

OKABE, M.; LIES, D.; KANAMASA, S.; PARK, E.Y. Biotechnological production of itaconic acid and its biosynthesis in *Aspergillus terreus*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 84, n. 4, p. 597-606, 2009.

OLIVEIRA, F.; SALGADO, J.M.; ABRUNHOSA, L.; PÉREZ-RODRÍGUEZ, N.; DOMÍNGUEZ, J.M.; VENÂNCIO, A.; BELO, I. Optimization of lipase production by solid-state fermentation of olive pomace: from flask to laboratory-scale packed-bed bioreactor. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 40, n. 7, p. 1123-1132, 2017.

OOTANI, M.A.; AGUIAR, R.W.; RAMOS, A.C.; BRITO, D.R.; SILVA, J.B.D.; CAJAZEIRA, J.P. Use of essential oils in agriculture. **Journal of biotechnology and biodiversity**, v. 4, n. 2, p. 162-175, 2013.

OUYANG, Q.; TAO, N.; JING, G. Transcriptional profiling analysis of *Penicillium digitatum*, the causal agent of citrus green mold, unravels an inhibited ergosterol biosynthesis pathway in response to citral. **BMC genomics**, v. 17, n. 1, p. 1-16, 2016.

PAPAGIANNI, M. Advances in citric acid fermentation by *Aspergillus niger*: biochemical aspects, membrane transport and modeling. **Biotechnology advances**, v. 25, n. 3, p. 244-263, 2007.

PAULUSSEN, C.; HALLSWORTH, J.E.; ALVAREZ-PEREZ, S.; NIERMAN, W.C.; HAMILL, P.G.; BLAIN, D.; REDIERS, H.; LIEVENS, B. Ecology of aspergillosis: insights into the pathogenic potency of *Aspergillus fumigatus* and some other, v. 10, n. 2, p. 296-322, 2016.

PARIZE, P., CHANDESIS, M. O., LANTERNIER, F., POIRÉE, S., VIARD, J. P., BIENVENU, B., MIMOUN, M.; MECHAI, F. MAMZER, M.F.; HERMAN, P.; BOUGNOUX, M.E.; LECUIT, M.; LORTHOLARY, O. Antifungal therapy of *Aspergillus* invasive otitis externa: efficacy of voriconazole and review. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 3, p. 1048-1053, 2009.

PEREIRA, M.C.; VILELA, G.R., COSTA, L.M.A.S.; SILVA, R.F., FERNANDES, A.F.; FONSECA, E.W.N; PICCOLI, R.H.; Inibição do Desenvolvimento fúngico através da utilização de óleos essenciais de condimentos. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 30, n. 4, p. 731-738, 2006.

PERRONE, G.; SUSCA, A.; COZZI, G.; EHRLICH, K.; VARGA, J.; FRISVAD, J.C.; MEIJER, M.; NOONIM, P.; MAHAKARNCHANAKUL, W.; SAMSON, R.A. Biodiversity of *Aspergillus* species in some important agricultural products. **Studies in mycology**, v. 59, p. 53-66, 2007.

PINTO, G.A.; LEITE, S.G.; TERZI, S.C.; COURI, S. Selection of tannase-producing *Aspergillus niger* strains. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 32, n. 1, p. 24-26, 2001.

PINTO, E; VALE-SILVA, L.; CAVALEIRO, C.; SALGUEIRO, L. Antifungal activity of the clove essential oil from *Syzygium aromaticum* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. **Journal of Medical Microbiology**, v. 58, n. 11, p. 1454-1462, 2009.

RAJPUT, S.B.; KARUPPAYIL, S. Mohan. Small molecules inhibit growth, viability and ergosterol biosynthesis in *Candida albicans*. **SpringerPlus**, v. 2, n. 1, p. 1-6, 2013.

RAMACHANDRAN, S.; FONTANILLE, P.; PANDEY, A.; LARROCHE, C. Permeabilization and inhibition of the germination of spores of *Aspergillus niger* for gluconic acid production from glucose. **Bioresource technology**, v. 99, n. 11, p. 4559-4565, 2008.

RATNASRI, P.V.; LAKSHMI, B.K.M.; AMBIKA DEVI, K.; HEMALATHA, K.P.J. Isolation, characterization of *Aspergillus fumigatus* and optimization of cultural conditions for amylase production. **Int J Res Eng Technol**, v. 3, n. 2, p. 457-763, 2014.

RAUT, J. S.; KARUPPAYIL, S. M. A status review on the medicinal properties of essential oils. **Industrial Crops and Products**, v. 62, p. 250–264, 2014.

ROBINSON, R.K. **Encyclopedia of food microbiology**. 1. Ed. Academic press, 2014.

ROCHA, C.R; CARELI, R.T.; SILVA, R.P.; ALMEIDA, A.C.; MARTINS, E.R.; OLIVEIRA, E.M.B.; DUARTE, E.R. Óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. como

sanitizante natural para controle de bactérias sésseis em superfície utilizada para corte de alimentos. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 11, p. 15-18, 2009.

ROCHA, E.M.F. **Mecanismo molecular envolvido na resistência aos derivados de acridina e ao antimicótico tioconazol em *Aspergillus nidulans***. Tese (Doutorado em Genética) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2002.

ROCHA, G.B.; FREIRE, R.O.; SIMAS, A.M.; STEWART, J.J. Rm1: A reparameterization of am1 for h, c, n, o, p, s, f, cl, br, and i. **Journal of computational chemistry**, v. 27, n. 10, p. 1101-1111, 2006.

RODRÍGUEZ-ZÚÑIGA, U.F.; FARINAS, C.S.; BERTUCCI NETO, V.; COURI, S.; CRESTANA, S. Produção de celulases por *Aspergillus niger* por fermentação em estado sólido. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, n. 8, p. 912-919, 2011.

ROUSK, J.; BÅÅTH, E. Growth of saprotrophic fungi and bacteria in soil. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 78, n. 1, p. 17-30, 2011.

RUDRAMURTHY, S.M.; PAUL, R.A.; CHAKRABARTI, A.; MOUTON, J.W.; MEIS, J.F. Invasive aspergillosis by *Aspergillus flavus*: epidemiology, diagnosis, antifungal resistance, and management. **Journal of Fungi**, v. 5, n. 3, p. 55, 2019.

SANT, D.G.; TUPE, S.G.; RAMANA, C.V.; DESHPANDE, M.V. Fungal cell membrane - Promising drug target for antifungal therapy. **Journal of applied microbiology**, v. 121, n. 6, p. 1498-1510, 2016.

SANTOS, C.H.S.; PICCOLI, R.H.; TEBALDI, V.M.R. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais e compostos isolados frente aos agentes patogênicos de origem clínica e alimentar. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 76, p. 1-8, 2017.

SANTOS-SÁNCHEZ, N.F.; SALAS-CORONADO, R.; HERNÁNDEZ-CARLOS, B.; VILLANUEVA-CAÑONGO, C. Shikimic acid pathway in biosynthesis of phenolic compounds. **Plant physiological aspects of phenolic compounds**, p. 1-15, 2019.

SHAH, A.A.; HAZEN, K.C. Diagnostic accuracy of histopathologic and cytopathologic examination of *Aspergillus* species. **American journal of clinical pathology**, v. 139, n. 1, p. 55-61, 2013.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: UFRGS, 2010. 1104p.

SOUSA, J.; COSTA, A.; LEITE, M.; GUERRA, F.; SILVA, V.; MENEZES, C.; PEREIRA, F.; LIMA, E. Antifungal activity of citral by disruption of ergosterol biosynthesis in fluconazole resistant *Candida tropicalis*. **International Journal of Tropical Disease Health**, v. 11, n. 4, p. 1-11, 2016.

SOUZA, L.P.; GARBOWICZ, K.; BROTMAN, Y.; TOHGE, T.; FERNIE, A. R. The acetate pathway supports flavonoid and lipid biosynthesis in Arabidopsis. **Plant physiology**, v. 182, n. 2, p. 857-869, 2020.

SPIN-NETO, R.; PAVONE, C.; FREITAS, R.M.; MARCANTONIO, R.A.C.; MARCANTONIOJÚNIOR, E. Biomateriais à base de quitosana com aplicação médica e odontológica: revisão de literatura. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 37, n. 2, p. 155-161, 2008.

STEWART, J.J.P. Optimization of parameters for semiempirical methods I. Method. **Journal of Computational Chemistry**, v. 10, n. 2, p. 209-220, 1989.

SUGAREVA, V.; HÄRTL, A.; BROCK, M.; HÜBNER, K.; ROHDE, M.; HEINEKAMP, T.; BRAKHAGE, A.A. Characterisation of the laccase-encoding gene *abr2* of the dihydroxynaphthalene-like melanin gene cluster of *Aspergillus fumigatus*. **Archives of Microbiology**, v. 186, n. 5, p. 345-355, 2006.

TANG, X.; SHAO, Y.L.; TANG, Y.J.; ZHOU, W.W. Antifungal activity of essential oil compounds (geraniol and citral) and inhibitory mechanisms on grain pathogens (*Aspergillus flavus* and *Aspergillus ochraceus*). **Molecules**, v. 23, n. 9, p. 2108, 2018.

TAO, N.; OUYANG, Q.; JIA, L. Citral inhibits mycelial growth of *Penicillium italicum* by a membrane damage mechanism. **Food Control**, v. 1, n. 41, p. 116-21, 2014.

TATSADJIEU, N.L.; DONGMO, P.J.; NGASSOUM, M.B.; ETOA, F.X.; MBOFUNG, C.M.F. Investigations on the essential oil of *Lippia rugosa* from Cameroon for its potential use as antifungal agent against *Aspergillus flavus* Link ex. Fries. **Food control**, v. 20, n. 2, p. 161-166, 2009.

TERABAYASHI, Y.; SANO, M.; YAMANE, N.; MARUI, J.; TAMANO, K.; SAGARA, J.; DOHMOTO, M.; ODA, K.; OHSHIMA, E.; TACHIBANA, K.; HIGA, Y.; OHASHI, S.; KOIKE, H.; MACHIDA, M. Identification and characterization of genes responsible for biosynthesis of kojic acid, an industrially important compound from *Aspergillus oryzae*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 47, n. 12, p. 953-961, 2010.

THIELMANN, J.; MURANYI, P. Review on the chemical composition of *Litsea cubeba* essential oils and the bioactivity of its major constituents citral and limonene. **Journal of essential oil research**, v. 31, n. 5, p. 361-378, 2019.

TIAN, J., BAN, X., ZENG, H., HE, J., CHEN, Y. & WANG, Y. The mechanism of antifungal action of essential oil from dill (*Anethum graveolens* L.) on *Aspergillus flavus*. **PLoS ONE** 7, p. 30147, 2012a.

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, 2012b.

TIRMENSTEIN M. A., MANGIPUDY, R. Aflatoxin. In: **Encyclopedia of Toxicology**. 3. ed. Academic Press, 2014. 5220 p.

TOMASI, J.; PERSICO, M. Molecular Interactions in Solution: An Overview of Methods Based on Continuous Distributions of the Solvent. **Chem Rev**, v. 94, p. 2027, 1981.

UFSC. Capim-limão. **Horto Didático de Plantas Medicinais HU/CCS**, 2020. Disponível em: <https://hortodidatico.ufsc.br/capim-limao/>. Acesso em 21, maio de 2021.

URREGO NOVOA, J. R., DÍAS, G. J. Aflatoxinas: mecanismos de toxicidad en la etiología de cáncer hepático celular. **Revista de la Facultad de Medicina**, v. 54, n. 2, p. 108-116, 2006.

VALERIANO, C.; PICCOLI, R.H.; CARDOSO, M.G.; ALVES, E. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais em bactérias patogênicas de origem alimentar. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 14, n. 1, p. 57-67, 2012.

VARGA, J. SZIGETI, G.; BARANYI, N.; KOCSUBÉ, S.; O'GORMAN, C.M.; DYER, P.S. *Aspergillus*: sex and recombination. **Mycopathologia**, v. 178, n. 5-6, p. 349-362, 2014.

VISHWANATHA, K.S.; RAO, AG A.; SINGH, S.A. Characterisation of acid protease expressed from *Aspergillus oryzae* MTCC 5341. **Food Chemistry**, v. 114, n. 2, p. 402-407, 2009.

WALLEN, R.M.; PERLIN, M.H. An overview of the function and maintenance of sexual reproduction in dikaryotic fungi. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 503, 2018.

WANG, L.; JIANG, N.; WANG, D.; WANG, M. Effects of Essential Oil Citral on the Growth, Mycotoxin Biosynthesis and Transcriptomic Profile of *Alternaria alternata*. **Toxins**. V. 11, n. 10, p. 553, 2019.

WANG, Y.; FENG, K.; YANG, H.; YUAN, Y.; YUE, T. Antifungal mechanism of cinnamaldehyde and citral combination against *Penicillium expansum* based on FT-IR fingerprint, plasma membrane, oxidative stress and volatile profile. *Rsc Advances*, v. 8, n. 11, p. 5806-5815, 2018.

WEBER, R.W. Outdoor Allergens. **Pediatric Allergy: Principles and Practice**. 1. Ed. p. 185 – 190, 2016

WEBSTER, J.; WEBER, R. **Introduction to fungi**. Cambridge university press, 2007.

WEIGT, S.S.; ELASHOFF, R.M.; HUANG, C.; ARDEHALI, A.; GREGSON, A.L.; KUBAK, B.; FISHBEINE, M.C.; SAGGARA, R. KEANEF, M.P.; SAGGARA R.; LYNCH, J.P.; ZISMANA, D.A.; ROSSA D.J.; BELPERIO, J.A. *Aspergillus* colonization of the lung allograft is a risk factor for bronchiolitis obliterans syndrome. **American Journal of Transplantation**, v. 9, n. 8, p. 1903-1911, 2009.

WIŃSKA, K.; MACZKA, W.; ŁYCZKO, J.; GRABARCZYK, M.; CZUBASZEK, A.; SZUMNY, A. Essential oils as antimicrobial agents - Myth or real alternative?. **Molecules**, v. 24, n. 11, p. 2130, 2019.

- WINTER, G.; PEREG, L. A review on the relation between soil and mycotoxins: Effect of aflatoxin on field, food and finance. **European Journal of Soil Science**, v. 70, n. 4, p. 882-897, 2019.
- XIE, X. M.; FANG, J. R.; XU, Yang. Study of antifungal effect of cinnamaldehyde and citral on *Aspergillus flavus*. **Food Science**, v. 25, n. 9, p. 32-34, 2004.
- YIN, Y.; CAI, M.; ZHOU, X.; LI, Z.; ZHANG, Y. Polyketides in *Aspergillus terreus*: biosynthesis pathway discovery and application. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 100, n. 18, p. 7787-7798, 2016.
- YOSHIMI, A.; MIYAZAWA, K.; ABE, K. Cell wall structure and biogenesis in *Aspergillus* species. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 80, n. 9, p. 1700-1711, 2016.
- YU, H. A.; KARPLUS, M. **The Journal of Chemical Physics**, v. 89, p. 2366-2379, 1988.
- YU, J.; KELLER, N. Regulation of secondary metabolism in filamentous fungi. **Annu. Rev. Phytopathol.**, v. 43, p. 437-458, 2005.
- YUTANI, M.; HASHIMOTO, Y.; OGITA, A.; KUBO, I.; TANAKA, T.; FUJITA, K. Morphological changes of the filamentous fungus *Mucor mucedo* and inhibition of chitin synthase activity induced by anethole. **Phytotherapy Research**, v. 25, p. 1707–1713, 2011.
- ZAIN, M.E. Impact of mycotoxins on humans and animals. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 15, n. 2, p. 129-144, 2011.
- ZAK, D.R.; PELLITIER, P.T.; ARGIROFF, W.A. CASTILLO, B.; JAMES, T.Y.; NAVE, L.E.; AVERILL, C.; BEIDLER, K.V.; BHATNAGAR, J.; BLESCH, J.; CLASSEN, A.T.; CRAIG, M.; FERNANDEZ, C.W.; GUNDERSEN, P.; JOHANSEN, R.; KOIDE, R.T.; LILLESKOV, E.A.; LINDAHL, B.D.; NADELHOFFER, K.J.; PHILLIPS, R.P.; TUNLID, A. Exploring the role of ectomycorrhizal fungi in soil carbon dynamics. **New Phytologist**, v. 223, n. 1, p. 33-39, 2019.
- ZHANG, H.; TANG, Y.; RUAN, C.; BAI, X. Bioactive Secondary Metabolites from the Endophytic *Aspergillus* Genus. **Records of Natural Products**, v. 10, n. 1, 2016.
- ZHANG, H.; ZHANG, J.; BAO, J. High titer gluconic acid fermentation by *Aspergillus niger* from dry dilute acid pretreated corn stover without detoxification. **Bioresource technology**, v. 203, p. 211-219, 2016.
- ZHANG, Y.; GAMARRA, S.; GARCIA-EFFRON, G.; PARK, S.; PERLIN, D.S.; RAO, R. Requirement for ergosterol in V-ATPase function underlies antifungal activity of azole drugs. **PLoS Pathog**, v. 6, n. 6, p. e1000939, 2010.
- ZHANG, Y.; RAO, R. Beyond ergosterol: linking pH to antifungal mechanisms. **Virulence**, v. 1, n. 6, p. 551-554, 2010.
- ZHENG, S.; JING, G.; WANG, X.; OUYANG, Q.; JIA, L.; TAO, N. Citral exerts its antifungal activity against *Penicillium digitatum* by affecting the mitochondrial morphology and function. **Food Chemistry**, v. 178, p. 76-81, 2015.

ZIELIŃSKA, A.; MARTINS-GOMES, C.; FERREIRA, N.R.; SILVA, A.M.; NOWAK, I.; SOUTO, E.B. Anti-inflammatory and anti-cancer activity of citral: Optimization of citral-loaded solid lipid nanoparticles (SLN) using experimental factorial design and LUMiSizer®. **International journal of pharmaceutics**, v. 553, n. 1-2, p. 428-440, 2018.

8 APÊNDICES

APÊNDICE A – Tabela de comprimentos médios de ligação para algumas ligações simples, duplas e triplas (BROWN et al., 2005).

TABELA 8.5 Comprimentos médios de ligação para algumas ligações simples, duplas e triplas			
Ligação	Comprimento de ligação (Å)	Ligação	Comprimento de ligação (Å)
C—C	1,54	N—N	1,47
C=C	1,34	N=N	1,24
C≡C	1,20	N≡N	1,10
C—N	1,43	N—O	1,36
C=N	1,38	N=O	1,22
C≡N	1,16		
C—O	1,43	O—O	1,48
C=O	1,23	O=O	1,21
C≡O	1,13		