



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ALIMENTOS E NUTRIÇÃO

WANESSA SALES DE ALMEIDA

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA, ATIVIDADE ANTIBACTERIANA,
ANTIFÚNGICA E ANTIAFLATOXIGÊNICA DO ÓLEO ESSENCIAL
DE *Lippia lasiocalycina***

TERESINA, PI

2019

WANESSA SALES DE ALMEIDA

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA, ATIVIDADE ANTIBACTERIANA,
ANTIFÚNGICA E ANTIAFLATOXIGÊNICA DO ÓLEO ESSENCIAL
DE *Lippia lasiocalycina***

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição, da Universidade Federal do Piauí como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Alimentos e Nutrição.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Maria Christina Sanches Muratori

Co-orientador: Prof. Dr. Sidney Gonçalo de Lima

Área de concentração: Qualidade de Alimentos

TERESINA, PI

2019

WANESSA SALES DE ALMEIDA

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA, ATIVIDADE ANTIBACTERIANA,
ANTIFÚNGICA E ANTIAFLATOXIGÊNICA DO ÓLEO ESSENCIAL
DE *Lippia lasiocalycina***

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição, da Universidade Federal do Piauí como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Alimentos e Nutrição.

Aprovada em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Maria Christina Sanches Muratori (Orientadora)
Universidade Federal do Piauí - UFPI

Prof^ª. Dr^ª. Raizza Eveline Escórcio Pinheiro (Membro Interno)
Universidade Federal do Piauí - UFPI

Prof. Dr. Rodrigo Maciel Calvet (Membro Externo)
Instituto Federal do Maranhão - IFMA

Prof^ª. Dr^ª. Maria Marlúcia Gomes Pereira Nóbrega (Suplente)
Universidade Federal do Piauí - UFPI

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus que com seu infinito amor me permitiu concluir mais uma etapa.

À minha família que me apoiou nesses anos de luta, sempre me incentivando e me dando forças para seguir em frente.

Ao Stanley, por ter toda a paciência do mundo com as minhas reclamações constantes, crises de choro e cansaço que me acompanharam ao longo desses anos (Thanks, baby)!

Aos parceiros do Laboratório de Geoquímica – LAGO, por todo o empenho em me auxiliar nos experimentos.

À Embrapa-Meio Norte pela parceria.

À equipe do NUEPPA por todo o apoio e pelas horas gastas para que tudo saísse dentro do cronograma.

À CAPES pelo financiamento parcial da pesquisa.

À minha orientadora, Professora Christina.

A todos os aqui citados e aos que ajudaram de forma direta ou indireta, meus sinceros agradecimentos.

“Um pouco de ciência nos afasta de Deus.
Muito, nos aproxima”.

Louis Pasteur

RESUMO

ALMEIDA, W. S. **Caracterização química, atividade antibacteriana, antifúngica e antiaflatoxigênica do óleo essencial de *Lippia lasiocalycina***. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição), Universidade Federal do Piauí – UFPI, Teresina - PI, 2019.

A contaminação de alimentos por espécies fúngicas produtoras de aflatoxinas geram enormes perdas econômicas e afetam diretamente a saúde dos consumidores. A busca por métodos de conservação mais naturais tem levantado interesse sobre o potencial de óleos essenciais como antifúngicos em alimentos. Assim, o presente trabalho teve como objetivo caracterizar quimicamente e avaliar a atividade antibacteriana, antifúngica e antiaflatoxigênica do óleo essencial de *Lippia lasiocalycina*. O óleo foi extraído por hidrodestilação e a análise dos constituintes químicos foi realizada por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas. A concentração inibitória mínima foi determinada pelo método de microdiluição contra cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* e *Aspergillus flavus*. O potencial de inibição do crescimento fúngico e da produção de aflatoxina B₁ foi testado por contato direto e por ação dos compostos voláteis. Foram identificados mais de 90% dos componentes presentes no óleo essencial e o óxido de piperitenona foi definido como o principal composto (57.55%) seguido por limoneno (20.69%). O óleo essencial de *Lippia lasiocalycina* apresentou atividade fungicida contra as cepas de *C. albicans* e *A. flavus* nas concentrações de 512 e 256 µg/mL⁻¹, respectivamente, e não demonstrou atividade sobre as cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. O óleo essencial de *Lippia lasiocalycina* inibiu em 94% o crescimento de *Aspergillus flavus* por contato direto enquanto os compostos voláteis potencializaram a produção de aflatoxina B₁ e se mostrou aplicável no controle fúngico de cepas de *Candida albicans* e *Aspergillus flavus*. Ademais, o óleo essencial de *Lippia lasiocalycina* quando empregado por vaporização em cepas de *A. flavus* estimulou a produção de aflatoxina B₁, favorecendo a sua aplicabilidade em pesquisas científicas.

Palavras-chave: *Aspergillus flavus*. Aflatoxina. Óxido de Piperitenona. Fungo.

ABSTRACT

ALMEIDA, W. S. **Chemical characterization, antibacterial, antifungal and anti-aflatoxigenic activity of *Lippia lasiocalycina* essential oil.** Thesis (Master in Food and Nutrition), Federal University of Piauí – UFPI, Teresina - PI, 2019.

Contamination of food by aflatoxin-producing fungal species generates huge economic losses and directly affects the health of consumers. The search for more natural conservation methods has raised interest in the potential of essential oils like antifungals in food. Thus, the present work aimed to characterize chemically and to evaluate the antibacterial, antifungal and antiaflatoxigenic activity of the essential oil of *Lippia lasiocalycina*. The oil was extracted by hydrodistillation and the analysis of the chemical constituents was performed by gas chromatography coupled to the mass spectrometer. The minimum inhibitory concentration was determined by the microdilution method against strains of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* and *Aspergillus flavus*. The potential for inhibition of fungal growth and aflatoxin B₁ production was tested by direct contact and by action of volatile compounds. More than 90% of the components present in the essential oil were identified and piperitenone oxide was defined as the main compound (57.55%) followed by limonene (20.69%). *Lippia lasiocalycina* essential oil had fungicidal activity against *C. albicans* and *A. flavus* strains at concentrations of 512 and 256 µg / mL⁻¹, respectively, and showed no activity on strains of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Lippia lasiocalycina* essential oil inhibited 94% growth of *Aspergillus flavus* by direct contact while volatile compounds potentiate the production of aflatoxin B₁ and proved to be applicable to the fungal control of *Candida albicans* and *Aspergillus flavus* strains. In addition, the essential oil of *Lippia lasiocalycina* when used by vaporization in strains of *A. flavus* stimulated the production of aflatoxin B₁, favoring its applicability in scientific research.

Keywords: *Aspergillus flavus*. Aflatoxin. Piperitenone oxide. Fungus.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Representação esquemática de um processo de hidrodestilação	18
Figura 2. <i>Aspergillus flavus</i>	23
Figura 3. Estrutura química da AFB ₁ , AFB ₂ , AFG ₁ , AFG ₂ , AFM ₁ e AFM ₂	25
Figura 4. Representação esquemática da determinação da concentração inibitória mínima em microplacas.....	31
Figura 5. Identificação dos poços em placa de Petri para determinação da CBM ou CFM	32
Figura 6. Representação esquemática da determinação da concentração inibitória mínima para <i>A. flavus</i> em microplaca	33
Figura 7. Representação esquemática dos sentidos de medição dos diâmetros das colônias de <i>Aspergillus flavus</i>	35
Figura 8. Representação esquemática do método de análise de ação dos componentes voláteis	36
Figura 9. Estrutura química do óxido de piperitenona	39
Figura 10. Curva de calibração para aflatoxina B ₁	42
Figura 11. Produção de aflatoxina B ₁ por cepa de <i>Aspergillus flavus</i>	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Limites máximos tolerados de aflatoxinas em alimentos.....	27
Tabela 2. Composição química do óleo essencial de <i>Lippia lasiocalycina</i>	38
Tabela 3. Concentração inibitória mínima (MIC) e concentração microbicida mínima (MMC) do óleo essencial de <i>Lippia lasiocalycina</i> sobre cepas microbianas.....	41
Tabela 4. Concentração inibitória mínima (MIC) e concentração fungicida mínima (MFC) do óleo essencial de <i>Lippia lasiocalycina</i> sobre cepas de <i>Aspergillus flavus</i>	43
Tabela 5. Crescimento das colônias de <i>Aspergillus flavus</i> durante exposição ao óleo essencial de <i>Lippia lasiocalycina</i> por contato direto	45
Tabela 6. Crescimento das colônias de <i>Aspergillus flavus</i> durante exposição ao óleo essencial de <i>Lippia lasiocalycina</i> por ação dos compostos voláteis	46
Tabela 7. Percentual de inibição do crescimento de <i>Aspergillus flavus</i> após contato com o óleo essencial de <i>Lippia lasiocalycina</i> por técnica aplicada	47
Tabela 8. Produção de aflatoxina B ₁ por cepas de <i>Aspergillus flavus</i> após contato direto com o óleo essencial de <i>Lippia lasiocalycina</i>	48
Tabela 9. Produção de aflatoxina B ₁ por cepas de <i>Aspergillus flavus</i> por ação dos compostos voláteis presentes no óleo essencial de <i>Lippia lasiocalycina</i> ...	49

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AFB₁ aflatoxina B₁

AFG₁ aflatoxina G₁

AFG₂ aflatoxina G₂

AFM₁ aflatoxina M₁

AFM₂ aflatoxina M₂

ANVISA Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BHIA Brain Infusion Heart Agar

BHI Brain Heart Infusion Caldo

BPF Boas Práticas de Fabricação

CBM concentração bactericida mínima

CCD cromatografia em camada delgada

CCS Centro de Ciências da Saúde

CFM concentração fungicida mínima

CLAE cromatografia líquida de alta eficiência

CLSI Clinical and Laboratory Standards Institute

CEN Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

CYA Agar Czapeck Extrato de Levedura

DMSO dimetilsulfóxido

DO densidade óptica

DP desvio padrão

EMBRAPA Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

GC/MS Cromatografia gasosa associada a espectrometria de massas

IARC Agência Internacional de Pesquisas sobre Câncer

LAGO Laboratório de Geoquímica Orgânica

LLEO óleo essencial de *Lippia lasiocalycina*

MIC concentração inibitória mínima

MMC concentração microbicida mínima

PO óxido de piperitenona

R² coeficiente de correlação

SDA Sabouraud Dextrose Agar

SDB Sabouraud Dextrose Broth

UFC Unidades Formadoras de Colônia

UFPI Universidade Federal do Piauí

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 Óleos essenciais.....	15
2.2 <i>Lippia lasiocalycina</i>	16
2.3 Métodos de obtenção de óleos essenciais	17
2.4 Caracterização química de óleos essenciais	18
2.5 Determinação de atividade antifúngica	19
2.6 Fungos	20
2.7 <i>Candida albicans</i>	21
2.8 <i>Aspergillus flavus</i>	23
2.9 Micotoxinas	24
2.10 Aflatoxinas	25
2.11 Aspectos legais de micotoxinas no Brasil	26
3. OBJETIVOS.....	28
3.1 Geral	28
3.2 Específicos	28
4. METODOLOGIA	29
4.1 Material vegetal.....	29
4.2 Cepas	29
4.3 Extração do óleo essencial	29
4.4 Caracterização química	29
4.5 Determinação da atividade antimicrobiana	30
4.6 Atividade antimicrobiana intrínseca.....	30
4.7 Concentração fungicida e bactericida mínima	31
4.8 Determinação da atividade antifúngica	30
4.8.1 Preparação da solução-estoque.....	32
4.8.2 Padronização do inóculo	32
4.8.3 Determinação da concentração inibitória mínima.....	32

4.8.4	Determinação da concentração fungicida mínima	34
4.9	Determinação da capacidade toxigênica da cepa	34
4.10	Inibição do crescimento fúngico em meio sólido.....	34
4.10.1	Óleo essencial incorporado ao meio de cultura.....	34
4.10.2	Óleo essencial aplicado em papel filtro.....	35
4.11	Determinação da capacidade toxigênica da cepa.....	36
4.12	Determinação e quantificação de aflatoxina.....	36
4.13	Análises estatísticas	37
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
6.	CONCLUSÕES.....	50
7.	REFERÊNCIAS.....	51
	APÊNDICES.....	68
	APÊNDICE A. CONCENTRAÇÃO FUNGICIDA MÍNIMA DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Lippia lasiocalycina</i>	68
	APÊNDICE B. ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Lippia lasiocalycina</i> POR CONTATO DIRETO	69
	APÊNDICE C. ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Lippia lasiocalycina</i> POR AÇÃO DOS COMPOSTOS VOLÁTEIS.....	70
	APÊNDICE D. ARTIGO PUBLICADO	

1. INTRODUÇÃO

Devido a mudança nos hábitos de vida da população, ocorreu uma maior preocupação com a qualidade dos alimentos ingeridos, bem como com a segurança dos conservantes utilizados nos produtos industrializados. Paralelamente, a indústria tem buscado opções para reduzir a quantidade de substâncias químicas em seus produtos, sinalizando para uma tendência mundial de adesão a meios mais naturais de conservação alimentar (MACHADO; BORGES; BRUNO, 2011).

O controle da multiplicação de espécies fúngicas causadoras de fitopatologias dentro da agroindústria normalmente é feito com o emprego de aditivos químicos sintéticos mais conhecidos como defensivos agrícolas (BENHOSSI; ANDRETTO; TEODORO, 2015). Desde 2008, o Brasil figura como um dos maiores consumidores de agrotóxicos no mundo movimentando cifras de bilhões de dólares por ano. As culturas de milho, soja, algodão e cana-de-açúcar respondem por 80% das vendas do setor e os fungicidas são responsáveis por 14% do mercado nacional (CARNEIRO et al., 2015). Diversas pesquisas têm indicado para um potencial cumulativo e tóxico, à longo prazo, por exposição e ingestão sucessivas dessas substâncias que acabam por fazer parte do produto final que chega à mesa dos consumidores (RUMIATO; MONTEIRO, 2017, GERAGE; MEIRA; SILVA, 2017). A crescente preocupação com o potencial efeito deletério dos defensivos agrícolas sintéticos tem despertado o interesse do mercado de produção alimentícia para alternativas menos tóxicas e de melhor aceitabilidade popular (LEAL et al., 2016, PRAKASH et al., 2015). Diante disso, os produtos advindos de fontes vegetais como os extratos e óleos essenciais têm alcançado lugar de destaque (MOOSAVI-NASAB et al., 2018). Na indústria de alimentos e, principalmente de grãos, um problema recorrente é a contaminação por espécies fúngicas, sendo *Aspergillus flavus* um contaminante que preocupa visto sua capacidade de produzir metabólitos tóxicos e potencialmente carcinogênicos, além de termorresistentes, que apresenta difícil remoção depois de formados no alimento (OLIVEIRA; KOLLER, 2011; KLICH, 2007).

Nesse cenário, os óleos essenciais surgem como uma alternativa promissora e tem sido alvo de várias pesquisas visando esclarecer seu potencial antimicrobiano e antifúngico bem como seu emprego em produtos voltados à segurança e qualidade alimentar. Outro ponto que os torna interessantes é o fato de, em sua maioria, serem de uso rotineiro na culinária ou na

medicina popular, tornando sua aceitabilidade bem maior quando comparados aos aditivos sintéticos (PEREIRA et al., 2006).

O Brasil é um país rico em biodiversidade e figura entre os quatro maiores produtores de óleo essencial no mundo (BIZZO; HOVELL; REZENDE, 2009). Em se tratando do gênero *Lippia*, entre 70 e 75% das espécies catalogadas estão no Brasil e são conhecidas por seu aroma agradável e inúmeras aplicações práticas, sendo muito empregadas como condimentos, dando sabor aos alimentos, e no tratamento de doenças por suas propriedades antiinflamatórias e antifúngicas (FUNARI et al., 2012).

Apesar do avanço nas pesquisas quanto às propriedades químicas e farmacológicas do gênero *Lippia* ainda há espécies que carecem de estudos elucidativos, como *Lippia lasiocalycina*. Há apenas uma fonte de literatura relatando o estudo preliminar dos constituintes químicos do extrato alcoólico de *L. lasiocalycina* (FUNARI et al., 2012). Nenhuma informação relativa às atividades biológicas ou composição química do óleo essencial está disponível. Por ser uma planta de catalogação recente no Piauí (EMBRAPA, 2017), os campos de pesquisa são vastos tornando o estudo dos efeitos de seu óleo essencial no crescimento bacteriano bem como sobre a proliferação de *A. flavus* e produção de aflatoxinas de suma importância dada a escassez de informações quanto ao tema e a relevância, para a economia tanto a nível estadual como mundial, de um método natural de conservação de grãos e oleaginosas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Óleos essenciais

O uso de plantas medicinais e aromáticas é uma constante desde os primórdios da humanidade. Essas plantas são comumente utilizadas pela população por apresentarem diversas propriedades, dentre elas podemos citar as anti-inflamatórias e analgésicas. Apesar de serem de uso comum, os mecanismos responsáveis por seus efeitos no organismo, em sua maioria, ainda permanecem desconhecidos (BOUKHATEM et al., 2014).

Dentre as substâncias de origem natural, os óleos essenciais figuram entre os de maior importância tanto econômica quanto científica, sendo produtos versáteis com aplicabilidade nos mais variados setores (BERNARDOS et al., 2015). Eles são produzidos pelas plantas como mecanismo de defesa à injúrias e ataques de insetos (COSTA et al., 2015; LI et al., 2013) e se apresentam como líquidos oleosos, atuando nos mais diversos sítios de ação, não sendo conhecido até o momento resistência microbiana a esses compostos (CARVAJAL; ALVAREZ; OSORIO, 2016).

Óleos essenciais são ricos em substâncias bioativas (MEDEIROS et al., 2011). Sua composição química é complexa e apresenta uma gama de constituintes, embora alguns desses acabem por se mostrarem em porcentagem maior em detrimento de outros. Essa composição varia entre as espécies vegetais e as épocas do ano. Entretanto, monoterpenos, sesquiterpenos e seus derivados, como os aldeídos e fenóis, têm sido identificados com uma grande frequência nas mais variadas espécies (HAJLAOUI et al., 2010).

A busca por conservantes naturais tem sido um grande desafio nos últimos anos. A adesão a um estilo de vida mais saudável bem como o aumento na procura por produtos livres ou com quantidades reduzidas de conservantes e outros agentes químicos tem impulsionado pesquisas em todo o mundo objetivando atender as necessidades do mercado ao mesmo tempo em que se promove a qualidade dos alimentos (BERNARDOS et al., 2015; MISHRA et al., 2012). Nesse sentido, o emprego de óleos essenciais surge como uma importante alternativa, visto que apresentam baixa toxicidade e são de fácil obtenção, apresentando-se, assim, como uma das mais promissoras técnicas de inibição do crescimento fúngico (HU et al., 2017).

Apesar de existirem muitas famílias de plantas que possuem substâncias aromáticas em sua composição Labiateae, Compositae, Lamiaceae, Apiaceae, Asteraceae, Lauraceae, Umbellifereae (MEDEIROS et al., 2011) e Verbenaceae (COSTA et al., 2017) tem sido as mais

implicadas na ação contra fungos toxigênicos (MEDEIROS et al., 2011). Alguns óleos essenciais como o de menta (KEDIA et al., 2016), canela (KOSEGARTEN et al., 2017), açafraão-da-terra (FERREIRA et al., 2013) e tomilho (KOHYAMA et al., 2015) já foram estudados e apresentaram resultados promissores, tendo sido identificado taxa de inibição de crescimento fúngico de 100% para o óleo essencial de menta (KEDIA et al., 2016) e para o de *Lippia alba* (PANDEY; SONKER; SINGH, 2016).

2.2 *Lippia lasiocalycina*

A família Verbenaceae possui, aproximadamente, 36 gêneros de plantas e 1000 espécies vegetais distribuídas em regiões pantropicais. O Brasil é o país que apresenta a maior diversidade de táxons com 16 gêneros e cerca de 290 espécies. As plantas dessa família costumam se apresentar em forma de ervas, arbustos, subarbustos e lianas (COSTA et al., 2017). Dentre os gêneros pertencentes à essa família, pode-se destacar o *Lippia* constituído por cerca de 200 espécies que apresentam aspecto chamativo e odor agradável (OLIVEIRA et al., 2006).

Popularmente à família Verbenaceae são atribuídas diversas propriedades curativas, sendo seu uso frequente em forma de chá, xaropes, tinturas ou banhos no tratamento de várias doenças (SANTOS et al., 2015). O gênero *Lippia* é largamente empregado na medicina popular nos distúrbios gastrointestinais e em doenças respiratórias como infusão feita de diversas partes das plantas ou como antifúngicos, antimicrobianos, larvicidas e anestésicos quando do uso do óleo essencial (LINDE et al., 2010).

Algumas espécies do gênero *Lippia* já tem seu potencial medicamentoso comprovado, como por exemplo, *Lippia sidoides* que apresenta atividade antifúngica (FARIAS et al., 2012; FONTENELLE et al., 2007); *Lippia origanoides* com atividade antinociceptiva (OLIVEIRA et al., 2014) e antimicrobiana (BARRETO et al., 2014); *Lippia salviifolia* com potencial antitumoral (GOMIDE et al., 2013); e *Lippia alba* com atividade sobre o crescimento fúngico e sobre a produção de aflatoxinas por *Aspergillus flavus* (PANDEY; SONKER; SINGH, 2016).

Lippia lasiocalycina é uma espécie nativa, mas não endêmica nas regiões Nordeste, Centro-Oeste, Sudeste e Sul do Brasil (OLIVEIRA, 2014) catalogada, no estado do Piauí, em 2015 (EMBRAPA, 2017). Apesar do potencial apresentado pelo gênero, esta espécie possui

apenas um único estudo abordando a composição química de seu extrato hidroalcoólico sendo a investigação quanto ao óleo essencial uma pesquisa inédita.

2.3 Métodos de obtenção de óleos essenciais

Os óleos essenciais correspondem à fração volátil de plantas ou de parte delas, após um processo de separação. Há diferentes métodos disponíveis para esse processo (LAGO et al., 2014). A escolha da metodologia de extração afeta diretamente a composição do produto final (BUSATO et al., 2014).

A extração de compostos utilizando solventes (líquido-líquido) é utilizada para materiais florais frágeis que não suportam o calor empregado em outros métodos e apresenta algumas vantagens quando comparado a outras técnicas (TONGNUANCHAN; BENJAKUL, 2014). O baixo consumo de água e energia associados às condições em que ocorre a extração (temperatura e pressão baixas) torna essa metodologia de fácil uso. Entretanto, a escolha correta do solvente tem impacto direto na qualidade da análise, visto que alguns são mais eficientes que outros dependendo da substância que se quer extrair. Outro fator importante é a toxicidade desses solventes. Atualmente, o etanol é considerado o solvente de escolha para extratos alcóolicos por ser seguro para o meio ambiente e permitir a aplicação em alimentos. Ademais, a presença do etanol melhora a qualidade aromática e a estabilidade do extrato por reduzir a oxidação dos compostos (KOSHIMA et al., 2012).

Uma outra técnica bastante utilizada é a destilação a vapor sendo esta a mais empregada na extração de óleos essenciais de plantas. A amostra é colocada em água fervente ou aquecida por vapor para que ocorra a quebra das moléculas presentes e, conseqüentemente, a liberação dos compostos aromáticos. A temperatura de aquecimento deve ser suficiente para induzir esse processo (TONGNUANCHAN; BENJAKUL, 2014). Apresenta como desvantagem o longo tempo despendido na extração e o fato de que o aquecimento pode causar a degradação de compostos termolábeis que possam estar presentes na amostra (PÉRINO-ISSARTIER et al., 2013).

A hidrodestilação (Figura 1) em pressão atmosférica é o método padrão para extração de óleos essenciais (HERNANDEZ-OCHOA et al., 2012) presentes em amostras que não são solúveis em água e que apresentam um alto ponto de ebulição (TONGNUANCHAN; BENJAKUL, 2014). Diferentemente da destilação a vapor, na hidrodestilação o material alvo

da extração fica completamente submerso em água fervente. Nesse sistema, a água atua como uma barreira protetora para os óleos presentes no material ao impedir seu superaquecimento (PARIKH; DESAI, 2011). A principal vantagem dessa técnica é que a amostra pode ser aquecida em temperaturas inferiores a 100°C minimizando a perda dos componentes voláteis (TONGNUANCHAN; BENJAKUL, 2014).

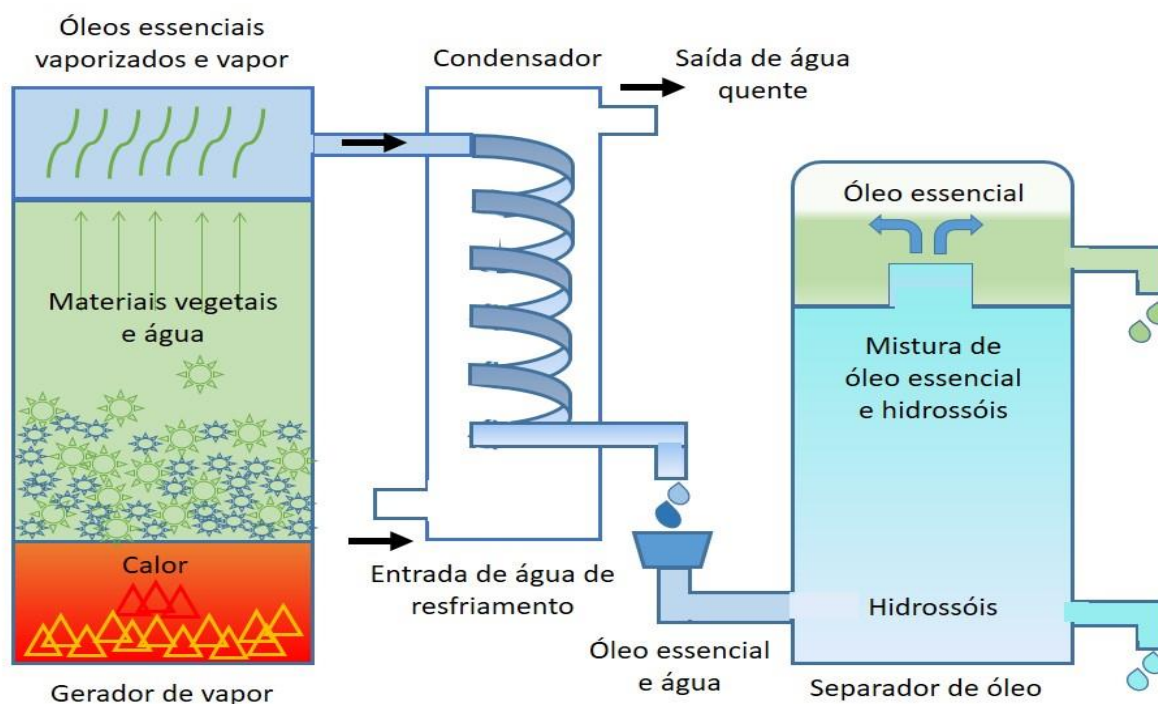


Figura 1. Representação esquemática de um processo de hidrodestilação (TONGNUANCHAN; BENJAKUL, 2014 adaptado).

2.4 Caracterização química de óleos essenciais

Os óleos essenciais são misturas complexas formados por muitos componentes voláteis. Na fração volátil costumam estar presentes mono e sesquiterpenos assim como álcoois e ésteres. Para a identificação da composição dos óleos essenciais a técnica mais utilizada é a cromatografia gasosa associada a espectrometria de massas (GC/MS) (TRANCHIDA et al., 2013).

A análise de misturas complexas, com destaque para as de origem natural, é a principal aplicabilidade da cromatografia em fase gasosa. Ela é utilizada quando se quer informações

quanto aos constituintes de uma amostra, na busca por marcadores toxicológicos bem como na investigação de adulteração em produtos (CORDEIRO et al., 2015).

A cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas é um método que exige uma quantidade pequena de amostra, o que facilita as análises, ao mesmo tempo em que o preparo dessas amostras é simples (LLANA-RUÍZ-CABELLO et al., 2016). Entretanto, os resultados apresentados pelo método são feitos por comparação entre as massas encontradas na amostra e um banco de dados do equipamento. Ao levarmos em conta que diversas substâncias podem ter massas similares, a identificação de alguns constituintes pode ser errônea quando se considera esse único parâmetro (TRANCHIDA et al., 2013; HANTAO et al., 2012; JALALI-HERAVI; MOAZENI; SERESHTI, 2011).

Apesar de algumas limitações quanto aos resultados apresentados, a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas ainda é a técnica mais utilizada e possibilita a análise de extratos obtidos de plantas cujos componentes majoritários são os compostos voláteis. Como alternativa para aumentar a confiabilidade dos experimentos pode-se realizar o fracionamento total do óleo essencial para que se possa obter informações quanto a composição química de forma mais detalhada (FILIPPI et al., 2013).

2.5 Determinação de atividade antifúngica

A determinação de atividade antifúngica de extratos vegetais é, frequentemente, determinada por técnicas simples que podem fornecer resultados qualitativos ou quantitativos. As principais metodologias empregadas para esta finalidade são o método bioautográfico, a diluição e a difusão em ágar (VALGAS et al., 2007).

O método bioautográfico utiliza a cromatografia em camada delgada (CCD) e é o mais indicado para substâncias antimicrobianas novas ou que ainda não foram identificadas. Os compostos, após separação por CCD, são colocados em contato com placas contendo ágar e micro-organismos previamente inoculados, gerando áreas de inibição de crescimento nas zonas que contém agentes antimicrobianos. Na pesquisa de substâncias com atividade antimicrobianas de origem vegetal, essa técnica se mostra interessante pois permite localizar de forma direta os constituintes com ação efetiva, mesmo que ele seja um componente de uma matriz complexa (RIOS; RECIO; VILAR, 1988).

O método de diluição é usado para determinar a concentração inibitória mínima. Nela, vários tubos de ensaio/placas (ou microplacas na microdiluição) contendo caldo ou ágar e micro-organismos teste, recebem diluições consecutivas do composto que se deseja avaliar. A seguir, esses tubos são incubados a temperatura e tempo pré-definidos. A leitura da MIC pode ser feita a olho nu ou em espectrofotômetro (SILVEIRA et al., 2009; ALVES et al., 2008). O caldo contendo quimioterápico conhecido é utilizado como controle positivo enquanto que o caldo contendo solvente, utilizado na diluição da amostra, atua como controle negativo. Esse método fornece resultados quantitativos e tem a vantagem de não sofrer interferência da velocidade de crescimento microbiano (OSTROSKY et al., 2008).

Em se tratando de extratos vegetais, o método de difusão em ágar utilizando discos ou poços permite uma boa análise, pois possibilita que o solvente empregado na extração evapore do disco antes que este entre em contato com o meio de cultura como também permite colocar quantidades definidas de extrato diretamente nos poços que contenham o meio (RIOS; RECIO; VILLAR, 1988). Essa técnica, baseia-se no tamanho da zona de inibição de crescimento de determinado micro-organismo quando exposto a uma ou mais substâncias em meio de cultura sólido. A avaliação da atividade antifúngica é feita comparando o composto em estudo com uma droga padrão, que atua como controle positivo, enquanto o solvente utilizado na dissolução dos extratos é utilizado como controle negativo. O halo de inibição é medido partindo-se da circunferência do poço/disco até a margem onde não há mais crescimento microbiano e a partir desse diâmetro pode-se classificar o micro-organismo como sensível, moderadamente sensível ou resistente (OSTROSKY et al., 2008).

Não há, até o momento, uma padronização de métodos para a determinação de atividade antifúngica sendo, portanto, todos os métodos descritos acima aceitos (MIRA DE BONA et al., 2014).

2.6 Fungos

Os fungos são organismos que convivem conosco em quase todos os ambientes, decompondo resíduos ao mesmo tempo em que podem desencadear doenças (MORAES; PAES; HOLANDA, 2010). São conhecidamente eucariontes, uni ou multicelulares, com um núcleo verdadeiro que envolve seu material genético. Eles são formados, estruturalmente, por

células alongadas semelhantes a tubos cilíndricos que se agrupam para formar o que se chama de micélio (GUERRA et al., 2011).

A reprodução dos fungos pode ocorrer por esporos, sendo esta a forma sexuada, ou por conídios, que corresponde à forma assexuada. Para germinarem, tanto esporos como conídios necessitam de umidade e de calor bem como de bom suprimento de ar para seu desenvolvimento (MORAES; PAES; HOLANDA, 2010).

Uma das principais características dos fungos é a sua capacidade de desenvolvimento em ambientes com condições que são inóspitas para a maioria dos micro-organismos, como a baixa atividade de água e o teor de oxigênio (CRUZ et al., 2006). A contaminação dos alimentos devido ao crescimento fúngico pode ocorrer ao longo de toda a cadeia produtiva, sendo mais comum durante o processamento e a estocagem, ocasionando sua deterioração através de processos oxidativos (PRAKASH et al., 2015).

Os fungos toxigênicos bem como as micotoxinas podem estar presentes em uma variedade de alimentos que vão desde grãos, como arroz e milho, até produtos como sucos industrializados e vinhos. A prevalência desses micro-organismos está diretamente ligada às variações climáticas locais bem como às condições de plantio, transporte e armazenamento (SCHATZMAYR; STREIT, 2013).

2.7 Candida albicans

Candida spp. são leveduras comensais comumente encontradas em mucosas e em tecidos epiteliais. Apesar de ser um habitante natural do organismo de muitos animais, incluindo o homem, as espécies do gênero *Candida* podem levar a infecções fúngicas oportunistas, sendo *Candida albicans* a mais envolvida (GULLO et al., 2016; CASTRO; LIMA, 2011). A baixa imunidade do hospedeiro aliada à versatilidade das leveduras em sobreviver nos mais diferentes ambientes e condições estão diretamente relacionadas à transição de um micro-organismo inofensivo para um infeccioso (CASSONE, 2015; LI et al., 2015). As leveduras possuem vários fatores de virulência que viabilizam seu caráter invasivo como a capacidade de aderir aos tecidos, a possibilidade de conversão das leveduras unicelulares em formas filamentosas, a hidrofobicidade de sua parede celular e a produção de algumas enzimas extracelulares que auxiliam na expressão de sua patogenicidade (ISHIDA et al., 2006; CALDERONI; FONZI, 2001).

Diversos fármacos são utilizados no tratamento de infecções micóticas. Os antissépticos como tintura de iodo e violeta de genciana são exemplos de algumas substâncias muito empregadas como antimicóticos. O desenvolvimento das pesquisas farmacológicas possibilitou a descoberta e o emprego de antifúngicos mais modernos como o cetoconazol, miconazol, anfotericina B e clotrimazol (LIMA et al., 2006). Entretanto, o uso extensivo ocasionou a resistência ao tratamento e dificuldades no combate às infecções fúngicas oportunistas (BARBOSA et al., 2016). Mutações em proteínas que reduzem a capacidade dos medicamentos de interagir e se ligar na parede celular e o efluxo ativo dos fármacos para fora da célula por meio de transportadores e bombas expressas na membrana são alguns dos mecanismos desenvolvidos por *Candida albicans* para burlar a ação dos principais antifúngicos (SCHNEIDER; MORSCHHAUSER, 2015; SHAFREEN et al., 2014).

Visto a ocorrência cada vez mais frequente de micro-organismos que expressam resistência às terapias medicamentosas, há de se buscar alternativas que possibilitem o tratamento dessas afecções de forma eficiente. O uso de extratos vegetais, como os óleos essenciais, tem sido apontado como uma das fontes mais promissoras, tanto para o descobrimento de novos fármacos quanto como auxiliar para os já existentes (GUIMARÃES et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2016; LUCENA et al., 2015). O fato de serem uma mistura complexa de substâncias aliado com a ação em múltiplos sítios-alvo tornam o desenvolvimento de resistência aos óleos essenciais um acontecimento pouco provável (SALES et al., 2014). O efeito sinérgico entre os extratos vegetais e os medicamentos sintéticos pode inibir tanto as bombas de efluxo como eliminar plasmídeos que estejam envolvidos na resistência antimicrobiana (PEREIRA et al., 2015).

Além da recente observação do fenômeno de resistência bacteriana ao antimicrobianos um outro problema tem ocasionado preocupação nos últimos anos, a produção de toxinas por fungos, principalmente dentro da indústria de alimentos. Nesse cenário, os óleos essenciais têm figurado entre as alternativas mais promissoras e pesquisadas para o controle da multiplicação de espécies fúngicas (SILVA et al., 2012; DIKBAS et al., 2008). Por serem de origem natural, os óleos essenciais têm melhor aceitação e menor toxicidade quando comparados aos pesticidas e agrodefensivos (PARANAGAMA et al., 2003).

2.8 *Aspergillus flavus*

O gênero *Aspergillus* foi documentado pela primeira vez em 1729 pelo botânico Pier Antonio Michelli. Atualmente é composto por mais de 260 espécies e 7 subgêneros que são ainda divididos em seções. A identificação do gênero é de certa forma simples pelas características que apresentam no conidióforo; já a diferenciação das espécies é complexa, exigindo que sejam analisadas diversas características morfológicas (CASTRO et al., 2011).

As colônias formadas por *Aspergillus* apresentam coloração que pode variar entre verde e amarelo-oliva. Esse gênero é o mais comumente envolvido na contaminação de alimentos, sendo as espécies da divisão *flavi*, como *Aspergillus flavus* (Figura 2), as mais envolvidas na produção de micotoxinas (RITTER, 2007). Diferentemente de outras espécies, como *Aspergillus parasiticus*, *A. flavus* pode se proliferar em diversos hospedeiros vegetais tendo uma certa preferência por aqueles ricos em óleo como o milho e o algodão (AMAIKE; KELLER, 2011).

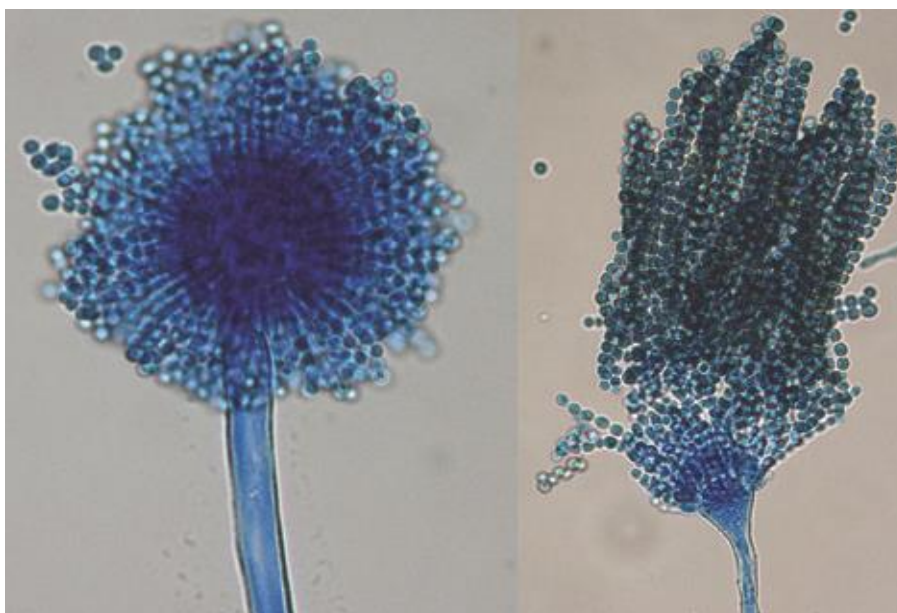


Figura 2. *Aspergillus flavus* (THE UNIVERSITY OF ADELAIDE, 2016).

Aspergillus flavus apresenta um crescimento ótimo em temperaturas acima de 25°C e umidade relativa entre 80 e 90%, sendo um contaminante comum durante o armazenamento dos alimentos. Apesar dessa faixa ser a ideal, *A. flavus* detém a capacidade de desenvolvimento em ambientes com atividade de água de 0,78 com um teor de umidade de 16%. O fato de os locais de armazenagem contarem com alta concentração de CO₂ e pouco oxigênio também

viabilizam o crescimento de bolores, tornando-o um ambiente propício para o desenvolvimento dessas espécies (REIS, 2009).

As faixas de temperatura e as condições de umidade em que *Aspergillus flavus* pode se desenvolver, fazem dele uma espécie presente em todo o mundo, especialmente nas regiões de clima tropical (KLICH, 2007; HEDAYTI et al., 2007). Além disso, ele ocorre naturalmente como um saprófito nos solos, sendo responsável por diversas doenças na cadeia agrícola como a podridão da orelha do milho ao mesmo tempo em que pode afetar a saúde humana e animal, causando prejuízos financeiros que chegam a um bilhão de dólares anualmente (DOMENICO et al., 2015; ESPER et al., 2014; AMAIKE; KELLER, 2011).

2.9 Micotoxinas

Micotoxinas são metabólitos secundários produzidos durante o crescimento de algumas espécies de fungos filamentosos. Sendo estes de espécies variadas, também o são seus metabólitos (KARLOVSKY, 2014). Quimicamente, são formadas por anéis heterocíclicos que podem estar dispostos de forma simples ou em grupos de seis a oito anéis dispostos de forma irregular (ROCHA et al., 2014).

A preocupação quanto à presença desses contaminantes nos alimentos vem do fato de que as micotoxinas são conhecidamente tóxicas ao organismo humano e animal. Dentre os efeitos deletérios ao organismo humano a carcinogenicidade, mutagenicidade e alterações na química sanguínea, além de alterações imunopatológicas, são as de maior destaque (ABBAS et al., 2017).

O processo de contaminação dos alimentos por micotoxinas pode ocorrer dentro de toda a cadeia agrícola, desde o momento do plantio até a estocagem do produto acabado. Rotação de cultura, uso de produtos químicos e controle biológico do crescimento fúngico são algumas das estratégias que tentam reduzir a presença de micotoxinas na matéria-prima. Cabendo aqui destacar que as substâncias utilizadas nesses processos não podem ser tóxicas nem afetar o sabor ou composição nutricional do alimento (KARLOVSKY et al., 2016).

Nesse cenário, as aflatoxinas são as principais micotoxinas conhecidas e estudadas dentre as mais de 400 existentes. Elas podem ser produzidas por espécies tanto do gênero *Aspergillus* quanto por *Fusarium* (HOJNIK et al., 2017; ALSHANNAQ; YU, 2017). As aflatoxinas, são entre as micotoxinas, as mais frequentemente associadas aos efeitos

carcinogênicos e mutagênicos sendo, pois, um importante contaminante de produtos alimentícios (KARLOVSKY et al., 2016).

2.10 Aflatoxinas

As aflatoxinas são assim denominadas por serem produzidas, principalmente, por *Aspergillus flavus*. Dentre elas, a B₁, B₂, G₁ e G₂ (Figura 3) são as mais conhecidas e estudadas. Sua denominação vem da fluorescência que emitem (B: *blue*; G: *green*) e sua mobilidade na corrida cromatográfica. Apesar de serem produzidas por *A. flavus*, apenas 50% dos fungos da espécie têm essa capacidade (ROCHA et al., 2014).

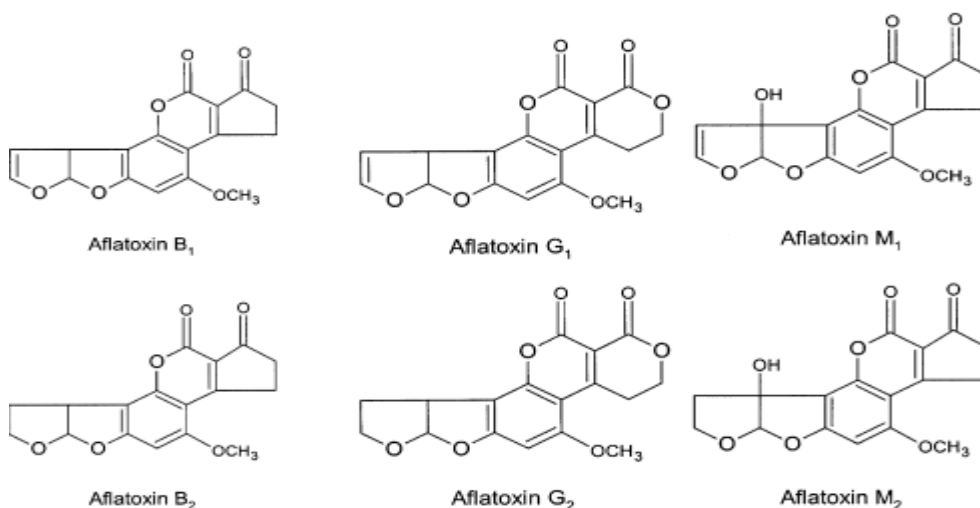


Figura 3. Estrutura química da AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂, AFM₁ e AFM₂ (ZAIN, 2011).

A aflatoxina B₁ (AFB₁) é comprovadamente a mais tóxica dentre as micotoxinas, provocando câncer hepático e genotoxicidade tanto em humanos quanto em animais. No organismo dos ruminantes, a ração contaminada por aflatoxina B₁ e B₂ sofre um processo de metabolização originando a aflatoxina M₁ (AFM₁) e M₂ (AFM₂). Essa biotransformação permite que AFM₁ e AFM₂ sejam secretadas e estejam presentes no leite e produtos derivados (ZAIN, 2011).

As doenças ocasionadas por aflatoxinas são genericamente chamadas de aflatoxicoses. A exposição aguda a essas substâncias resulta em hepatotoxicidade que pode levar a morte. Já a exposição de forma crônica está ligada ao surgimento de câncer hepático, principalmente em pessoas que já tenham hepatite B. Os efeitos sobre o fígado estão diretamente relacionados ao

fato de que a AFB₁ é metabolizada pelas enzimas do citocromo P450, gerando vários metabólitos que vão atuar de forma deletéria tanto localmente como sistemicamente (AHLBERG; JOUTSJOKI; KORHONEN, 2015).

Segundo a Agência Internacional de Pesquisas sobre Câncer (IARC), a aflatoxina B₁ é carcinogênica, pertencendo à Classe 1 de compostos onde estão agrupadas as substâncias com maior potencial carcinogênico para o ser humano (MARTINS et al., 2017; DAI et al., 2017; SNIGDHA; HARIPRASAD; VENKATESWARAN, 2015; SCAGLIONI et al., 2014).

No mundo inteiro, estima-se que 4,5 bilhões de pessoas estão expostas a quantidades não mensuradas de aflatoxinas, exposição essa que implica em diversos problemas de saúde, (NIKBAKHT NASRABADI et al., 2013) ao mesmo tempo em que 25% da produção mundial de grãos são contaminados por aflatoxinas todos os anos (KEDIA et al., 2014). Apesar do uso de aditivos químicos, as micotoxinas ainda são uma questão a ser solucionada (KOSEGARTEN et al., 2017).

Na tentativa de inibir o crescimento de *Aspergillus flavus* e, conseqüentemente, a produção de aflatoxina, algumas técnicas têm sido estudadas. Dentre as mais discutidas atualmente, está o uso de produtos naturais, como os compostos voláteis presentes em várias espécies de plantas (JATAPAN et al., 2017). Essa estratégia tem se mostrado efetiva na redução tanto do crescimento fúngico quanto da micotoxina, tendo sido identificadas variações nas taxas de inibição dependendo do óleo essencial empregado (TAHUER et al., 2017; LIANG et al., 2015).

2.11 Aspectos legais sobre micotoxinas no Brasil

As micotoxinas são um problema global e que trazem diversos prejuízos tanto econômicos quanto à saúde da população. Por estarem presentes nos mais variados alimentos e nos mais variados ambientes, houve a necessidade de se estabelecer leis que determinassem os níveis admissíveis desses contaminantes nos produtos disponibilizados aos consumidores. Apesar dos esforços, ainda não se tem uma legislação uniforme, ficando a critério de cada país a determinação dos níveis de micotoxinas aceitáveis em alimentos para consumo tanto animal quanto humano (FREIRE et al., 2007).

No Brasil, os aspectos legais relacionados à segurança alimentar e às Boas Práticas de Fabricação (BPF) são estabelecidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

Nesse âmbito, as principais legislações vigentes são a RDC nº 12/2001 que trata da qualidade alimentar a nível microbiológico e estabelece limites de carga microbiana nos mais diversos tipos de alimentos (BRASIL, 2001); e temos também, a RDC nº 07/2011 que abrange especificamente a presença de micotoxinas (BRASIL, 2011).

Relativo aos padrões regulamentares, estão contemplados na RDC nº 07/2011 as aflatoxinas B₁, B₂, G₁, G₂ e M₁ (Tabela 1), ocratoxina A, desoxinivalenol, fumonisinas FB₁ e FB₂, patulina e zearalenona. Apesar de definir os limites máximos permitidos em vários alimentos, como arroz, soja, castanhas e vinho, o recomendando pela RDC é que os níveis desses contaminantes devem ser reduzidos ao mínimo possível, empregando sempre as BPF e visando a saúde e segurança da população (BRASIL, 2011).

Tabela 1. Limites máximos tolerados de aflatoxinas em alimentos.

Alimento	Aflatoxina	Limite
Leite fluído	M ₁	0,5 µg/L ⁻¹
Leite em pó		5 µg/kg ⁻¹
Milho em grãos (inteiro, partido, amassado, moído)	B ₁ + B ₂ + G ₁ + G ₂	20 µg/kg ⁻¹
Cereais e produtos de cereais exceto milho e derivados, incluindo cevada malteada		5 µg/kg ⁻¹
Amendoim (com casca, descascado, cru ou tostado)		20 µg/kg ⁻¹
Castanha-do-Brasil com casca para consumo direto		10 µg/kg ⁻¹
Produtos de cacau e chocolate		5 µg/kg ⁻¹
Feijão		5 µg/kg ⁻¹

Fonte: BRASIL, 2011.

3. OBJETIVOS

3.1 GERAL

Caracterizar quimicamente o óleo essencial de *Lippia lasiocalycina* e avaliar seu potencial sobre o crescimento de micro-organismos.

3.2 ESPECÍFICOS

- Extrair o óleo essencial de *Lippia lasiocalycina*;
- Caracterizar quimicamente os compostos majoritários presentes no óleo essencial de *Lippia lasiocalycina*;
- Determinar a concentração inibitória mínima (MIC) do óleo essencial de *Lippia lasiocalycina* sobre cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*.
- Determinar a concentração inibitória mínima (MIC) do óleo essencial de *Lippia lasiocalycina* sobre a multiplicação de *Aspergillus flavus*.
- Avaliar o efeito do óleo essencial de *Lippia lasiocalycina* sobre o crescimento radial de *Aspergillus flavus* e sobre a produção de aflatoxina B₁.

4. METODOLOGIA

4.1 Material vegetal

O material vegetal de *Lippia lasiocalycina* foi coletado às 9:00 da manhã no município de Gilbués (Latitude: 9° 49' 30" Sul, Longitude: 45° 20' 38" Oeste), Estado do Piauí, Brasil, em abril de 2016. A região apresenta clima tropical sub-úmido com altas temperaturas e baixo índice pluviométrico localizado no semiárido nordestino. A espécie vegetal utilizada neste estudo foi disponibilizada pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA Meio-Norte (-5.036410, -42.797898). Após prévia identificação, um exemplar foi depositado no herbário da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CEN) sob o número CEN92437.

4.2 Cepas

A atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Lippia lasiocalycina*, foi determinada frente a cepas de *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Candida albicans* (ATCC 10231), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Staphylococcus aureus* (SA-1199B) e *Aspergillus flavus*. As cepas de *Aspergillus flavus* foram adquiridas da micoteca do Núcleo de Estudos, Pesquisas e Processamento de Alimentos da Universidade Federal do Piauí.

4.3 Extração do óleo essencial

O óleo essencial de *Lippia lasiocalycina* (LLEO) foi obtido de folhas frescas da planta por hidrodestilação, utilizando aparelho de destilação do tipo Clevenger por aproximadamente três horas. O rendimento do óleo essencial variou de 0,40 a 0,52%. No final do processo, o óleo resultante foi recolhido, seco com sulfato de sódio, pesado e armazenado sob refrigeração. O óleo foi solubilizado em H_2CCl para cromatografia gasosa e análise de espectrometria de massa. As extrações foram realizadas pela Embrapa – Meio Norte.

4.4 Caracterização química

A análise da composição química dos compostos voláteis presentes no óleo essencial de *Lippia lasiocalycina* foi realizada pela técnica de cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG/MS). Para tal, foi utilizado um Cromatógrafo Shimadzu®, modelo CGMS-QP2010 SE equipado com injetor automático AOC-5000 e coluna SLB-5ms

(30 m x 0.25 mm x 0,25 µm). Hélio foi empregado como gás de arraste (1,0 mL/min), temperatura do injetor 250°C. A coluna foi programada com uma temperatura inicial de 60°C (3,0 min), seguido por um aumento de 3°C/minuto até atingir 240°C (durante 10 min); a temperatura do detector foi de 250°C. Foi injetado 1,0 µL do óleo essencial previamente diluído em 1,0 mL de diclorometano (1:100). As condições de MS eram tipo de quadrupolo triplo de detector de íons operando por impacto eletrônico (70 eV; 45 a 450Da). A identificação e quantificação dos constituintes foi obtida com base nas áreas dos picos cromatográficos correspondentes, determinação do índice de Kovats e comparação com os registros de bancos de dados e da literatura (WILEY, NIST, PHEROBASE) com similaridade igual ou superior a 90%. As análises foram realizadas no Laboratório de Geoquímica Orgânica (LAGO) do Departamento de Química da Universidade Federal do Piauí.

4.5 Determinação da atividade antimicrobiana

Para a determinação da atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Lippia lasiocalycina* foi adotada a metodologia descrita no manual *Clinical and Laboratory Standards Institute* – CLSI, 2003.

As cepas bacterianas foram mantidas em ágar Brain Infusion Heart (BHIA, Himedia, Índia) inclinada a 4,0°C, e antes do ensaio as células foram transferidas e cultivadas em estufa BOD por 24 h a 37°C em Brain Heart Infusion (BHI, Himedia, Índia). A cepa de levedura foi mantida em ágar Sabouraud Dextrose (SDA, Himedia, Índia) inclinada a 4,0°C e antes do ensaio as células foram transferidas e cultivadas por 24 horas a 37°C em caldo Sabouraud Dextrose (SDB, Himedia, Índia).

Os ensaios para avaliação da atividade antimicrobiana intrínseca foram realizados no Laboratório de Pesquisas em Microbiologia do Departamento de Parasitologia e Microbiologia, Centro de Ciências da Saúde (CCS) da Universidade Federal do Piauí (UFPI).

4.6 Atividade antimicrobiana intrínseca

A determinação da concentração inibitória mínima (MIC) foi realizada segundo o método de microdiluição (CLSI, 2003). Neste ensaio foram utilizadas microplacas de 96 poços (12 colunas e oito linhas) com fundo chato. Uma solução-estoque do produto-teste foi previamente preparada dissolvendo 10.000 µg do óleo essencial em 1,0 mL de dimetilsulfóxido

(DMSO). Esta solução inicial foi então diluída em água destilada esterilizada para uma concentração de $1.024 \mu\text{g/mL}^{-1}$. A MIC dos produtos testes foi determinada pela microdiluição em caldo Brain-Heart Infusion (BHI) com suspensões microbianas de 10^5UFC/mL^{-1} , ajustadas por comparação com a escala 0,5 de McFarland e com concentrações do produto variando de 8,0 a $512,0 \mu\text{g/mL}^{-1}$ (Figura 4). As placas inoculadas foram incubadas a 37°C por 24 horas. Após esse período a leitura dos poços com ou sem crescimento microbiano foi realizada pela observação da presença/ausência de turvação. A MIC foi definida como a menor concentração da droga na qual não foi observado crescimento microbiano.

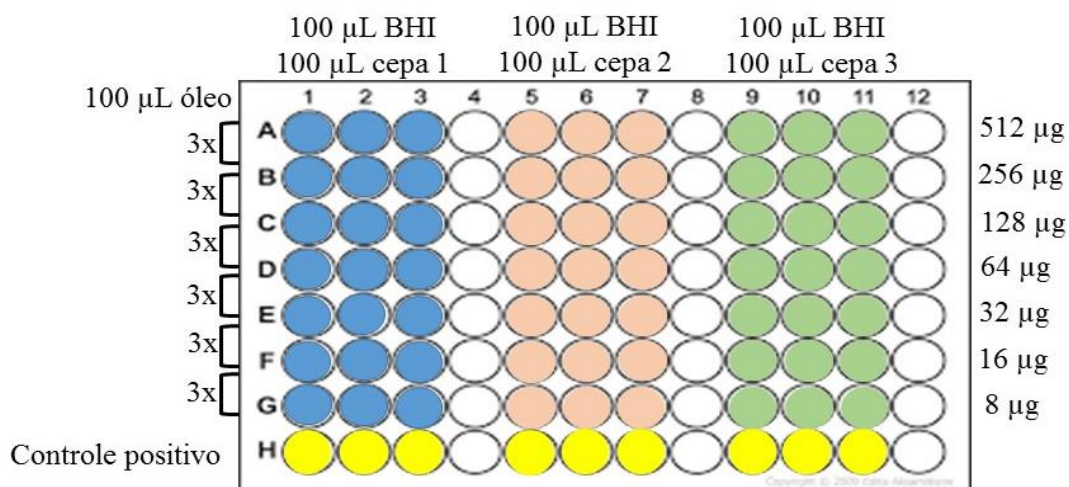


Figura 4. Representação esquemática da determinação da concentração inibitória mínima em microplacas (Arquivo pessoal).

4.7 Concentração fungicida e bactericida mínima

Para determinação da concentração bactericida ou fungicida mínima (CBM ou CFM), alíquotas de $10 \mu\text{L}$ das diluições testadas por microdiluição foram transferidas para regiões previamente identificadas de placas de Petri (Figura 5) contendo meios Agar BHI ou Agar Sabouraud, respectivamente, com o auxílio de micropipetadores, seguido de incubação a 37°C por 24 h. A região em que não houve crescimento fúngico ou bacteriano foi indicada como a menor concentração do óleo a ter ação fungicida/bactericida.

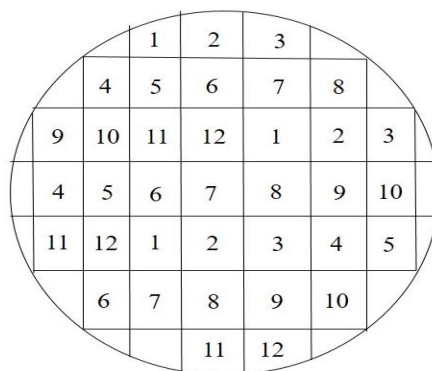


Figura 5. Identificação dos poços em placa de Petri para determinação da CBM ou CFM (Arquivo pessoal).

4.8 Determinação da atividade antifúngica

Para a determinação da atividade antifúngica do óleo essencial de *Lippia lasiocalycina* foi adotada a metodologia descrita no manual *Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI* (2008) com modificações.

4.8.1 Preparação da solução-estoque

O óleo essencial de *Lippia lasiocalycina* foi previamente preparado dissolvendo 10.000 µg do óleo essencial em 1,0 mL de dimetilsulfóxido (DMSO). Esta solução inicial foi então diluída em água destilada esterilizada para uma concentração de 1.024 µg/mL⁻¹.

Na avaliação da atividade do óleo essencial de *Lippia lasiocalycina* sobre o crescimento fúngico e sobre a produção de aflatoxinas, o óleo foi solubilizado em água destilada estéril e em uma solução de Tween 20 (0,5%).

4.8.2 Padronização do inóculo

As cepas de *Aspergillus flavus* foram inoculados em Agar Czapeck Extrato de Levedura (CYA) e incubados a 25°C por sete dias. Com as culturas obtidas preparou-se uma suspensão de esporos adicionando sobre a colônia 1,0 mL de solução salina 0,85% esterilizada e 0,01 mL de uma solução de Tween 20 (0,5%), homogeneizando delicadamente com uma alça de Drigalski, obtendo-se assim, uma suspensão de esporos. A mistura resultante de conídios e fragmentos de hifas foi retirada e transferida para um tubo de ensaio esterilizado. Após três a

cinco min, quando as partículas mais pesadas se depositaram ao fundo, a suspensão superior foi transferida para outro tubo de ensaio, e homogeneizada em vórtex durante 15 segundos. A densidade da suspensão foi lida em espectrofotômetro e ajustada para uma densidade óptica (DO) de 0,09 a 0,11 (transmitância de 80 a 82%). Em seguida, 1,0 mL dessa suspensão foi diluído no meio caldo batata dextrose (1:50), correspondendo a duas vezes a densidade necessária de $0,4 \times 10^4$ a $5,0 \times 10^4$ UFC/mL⁻¹, aproximadamente.

4.8.3 Determinação da concentração inibitória mínima

A determinação da MIC foi feita por microdiluição empregando microplacas de fundo chato com 96 poços. Nas três primeiras colunas todos os poços receberam 100 µL do meio caldo batata dextrose e 100 µL do inóculo fúngico. Em seguida, 100 µL do óleo essencial previamente diluído foram adicionados ao primeiro poço de cada coluna e o conteúdo homogeneizado. Foram então transferidos 100 µL desse poço para o poço seguinte e assim sucessivamente (Figura 6). Os poços da linha H continham apenas 100 µL do inóculo e 100 µL do meio de cultura, sendo esse o controle do inóculo. O controle de esterilidade do meio, sem óleo essencial e sem inóculo, também foi feito. As placas foram então incubadas a 25°C durante 48 a 50 horas. Após esse período, foi observado o crescimento fúngico identificado pela turbidez do meio.

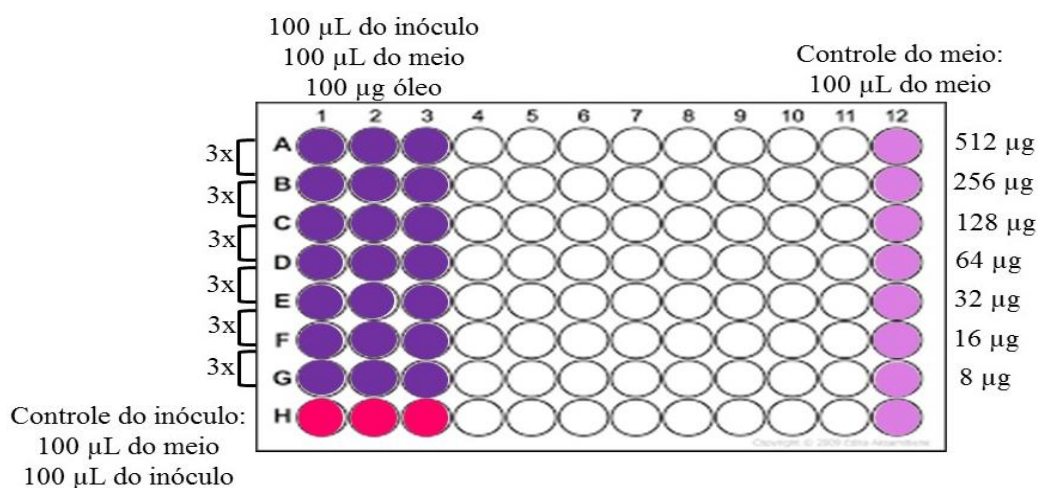


Figura 6. Representação esquemática da determinação da concentração inibitória mínima para *A. flavus* em microplaca (Arquivo pessoal).

4.8.4 Determinação da concentração fungicida mínima

A concentração fungicida mínima (CFM) do óleo essencial de *Lippia lasiocalycina* sobre cepas de *Aspergillus flavus* foi determinada através do plaqueamento de 10 µL das diluições testadas por microdiluição em regiões previamente identificadas de placas de Petri contendo o meio de cultura CYA. As placas foram incubadas em estufa BOD a 25°C durante sete dias e avaliadas quanto ao crescimento fúngico. O ensaio foi realizado em triplicata.

4.9 Determinação da capacidade toxigênica da cepa

As cepas de *Aspergillus flavus* foram testadas quanto à sua capacidade de produzir aflatoxinas segundo Geisen (1996) com modificação quanto ao meio de cultura empregado. Inicialmente elas foram cultivadas em placas de Petri contendo o meio CYA durante cinco dias em uma temperatura de 25°C. Logo após, foram cortados três plugs de cada colônia, de forma equidistante, e transferidos para microtubos de 2,0 mL onde foram adicionados 500 µL de clorofórmio. Os tubos foram então centrifugados por 10 minutos a 4.000 rpm. Após essa etapa, o extrato clorofórmico foi filtrado em filtros Millex® (polietileno com membrana PTFE 0,22 micrômetros de poro e 13 mm de diâmetro), restando assim alguma partícula que pudesse estar presente na amostra. Esse filtrado foi então transferido para outro microtubo de 2,0 mL e o conteúdo evaporado em banho-maria a 60°C. Os microtubos foram armazenados em freezer (-20°C) até o momento da análise por CLAE quando foram então ressuspensos na fase móvel.

4.10 Inibição do crescimento fúngico em meio sólido

O óleo essencial de *Lippia lasiocalycina* foi testado quanto à inibição na multiplicação de *Aspergillus flavus* na mesma concentração determinada no teste de concentração inibitória mínima (MIC) bem como em concentrações subinibitórias.

4.10.1 Óleo essencial incorporado ao meio de cultura

A técnica foi desenvolvida de acordo com Viegas (2004) e Wang et al. (2005). Para a realização deste teste, o óleo essencial de *Lippia lasiocalycina* foi diluído em solução de dimetilsulfóxido (DMSO) 2,5%, até atingir as concentrações de ¼ MIC, ½ MIC, MIC, 2MIC e 3MIC. Em seguida, 4,0 mL da solução de óleo diluído foi adicionada a 4,0 mL do meio CYA

antes da temperatura de solidificação (aproximadamente 45°C), e homogeneizado na própria placa de Petri. Após a solidificação do meio, o fungo foi inoculado em um ponto central da placa, com o auxílio de uma agulha. Foi utilizado como controle o fungo inoculado no meio de cultura CYA, sem óleo essencial. O ensaio foi realizado em triplicata. Após a conclusão das etapas anteriores, as placas foram incubadas a 25°C por sete dias, e a avaliação do crescimento micelial foi determinada pela mensuração do diâmetro de cada colônia em dois diferentes sentidos pré-estabelecidos (Figura 7).

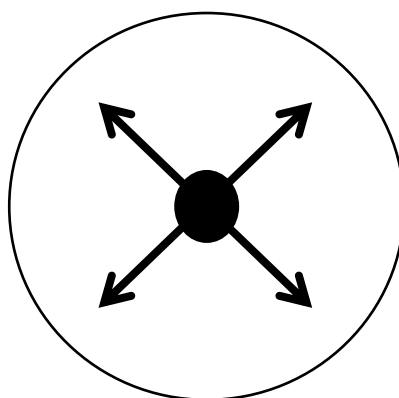


Figura 7. Representação esquemática dos sentidos de medição dos diâmetros das colônias de *Aspergillus flavus* (Arquivo pessoal).

Com base na média aritmética das duas medições de cada replicata, o cálculo da porcentagem de inibição com relação ao controle foi realizado através da seguinte equação:

$$\text{Porcentagem de inibição} = \left(1 - \frac{Da}{Db}\right) \times 100$$

Onde,

Da: indica o diâmetro da colônia na placa contendo o teste

Db: o diâmetro da colônia na placa controle

4.10.2 Óleo essencial aplicado em papel filtro

Para o teste de ação dos compostos voláteis (ALVAREZ-CASTELLANOS, 2001), o óleo essencial de *Lippia lasiocalycina* foi diluído em uma solução de dimetilsulfóxido (DMSO) 2,5%, até atingir as concentrações de ¼ MIC, ½ MIC, MIC, 2MIC e 3MIC.

O meio de cultura Agar Czapeck Extrato de Levedura (CYA) foi adicionado em placas de Petri (60x15mm) no volume de 4,0 mL. Após a solidificação, 4,0 mL do óleo essencial já diluído foram aplicados na superfície de um disco de papel de filtro com 4,0 cm de diâmetro, previamente esterilizado. O papel de filtro foi fixado na parte interna da tampa da placa de Petri (Figura 8) e o fungo inoculado em um ponto central da placa, com o auxílio de uma agulha. A placa foi incubada a 25°C por 7 dias. O ensaio foi realizado em triplicata. O cálculo da porcentagem de inibição foi o mesmo do item 4.10.1.

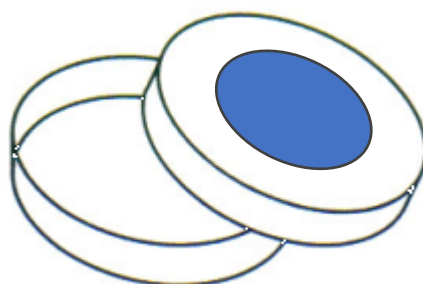


Figura 8. Representação esquemática do método de análise de ação dos componentes voláteis. (Arquivo pessoal)

4.11 Determinação da capacidade toxigênica da cepa

Para avaliação da ação do óleo essencial sobre a produção de aflatoxina por *Aspergillus flavus*, a técnica empregada foi a descrita no item 4.9. As colônias utilizadas foram aquelas que apresentaram crescimento após os tratamentos por contato direto com o óleo essencial (item 4.10.1) e por ação de seus compostos voláteis (item 4.10.2).

4.12 Determinação e quantificação de aflatoxina

Para a determinação e quantificação de aflatoxina B₁ foi utilizado cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu modelo Prominence com detector de fluorescência (excitação: 360 nm e emissão: 460 nm) modelo RF-10AXL SUPER, loop de 20 µL, de acordo com a metodologia proposta por Truckess et al. (1994). As separações cromatográficas foram realizadas por uma coluna ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈ de sílica gel em fase reversa (150x4,6 mm id., 5,0 micrômetros de tamanho de partículas).

Inicialmente o extrato seco foi ressuspendido em 1,0 mL de acetonitrila, homogeneizado em agitador tipo vórtex, e filtrado com filtro Millex® em polietileno com membrana PTFE 0,22 micrômetros de poro e 13 mm de diâmetro. Em seguida, foi retirada uma alíquota de 200 µL do extrato filtrado e acrescido de 700 µL de solução derivatizante (ácido trifluoroacético: ácido acético glacial: água 20:10:70 v/v). A fase móvel utilizada foi acetonitrila:metanol:água (17:17:66 v/v) a uma vazão de 1,5 mL.min⁻¹. Foram feitas diluições seriadas do padrão de aflatoxinas (Japanese Aflatoxin Mix, Supelco, USA) que foram injetadas no cromatógrafo para obtenção posterior da curva de calibração utilizando o programa Microsoft® Excel 2013.

4.13 Análises estatísticas

As análises foram realizadas utilizando ANOVA, com comparação múltipla de Dunnett, porém quando alguma das pressuposições para execução da ANOVA não foi satisfeita, optou-se por teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Em todos os testes foram utilizados níveis de significância de 0,05, portanto p -valor < 0,05 indica diferença significativa. O *software* Rstudio na sua versão 1.1.453 foi empregado para manipulação e análise dos dados da pesquisa.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise da composição química por GC-MS permitiu identificar 14 componentes no óleo essencial de *Lippia lasiocalycina*, correspondendo a 90,10% das substâncias presentes. Monoterpenos e sesquiterpenos foram identificados (Tabela 2), sendo o óxido de piperitenona (PO) o constituinte majoritário (57,55%) seguido pelo limoneno (20,69%).

Tabela 2. Composição química do óleo essencial de *Lippia lasiocalycina*.

TR (min)	Composto	Similaridade (%)	IK	Área (%)
3.677	Metilbenzeno	93	770	0,31
7.121	α -pineno	96	939	1,17
8.816	Mirceno	92	991	0,20
10.195	<i>p</i> -Cimeno	93	1026	0,47
10.399	Limoneno	94	1031	20,69
10.986	Trans- β -ocimeno	97	1050	1,01
11.538	γ -Terpineno	91	1062	0,18
19.849	Carvona	90	1242	0,26
21.998	<i>m</i> -Timol	94	1290	0,83
22.354	Tridecano	93	1299	1,03
24.199	Piperitenona	97	1342	3,04
25.283	Óxido de piperitenona	91	1365	57,55
31.175	Biciclogermacreno	92	1494	2,67
31.597	β -Bisaboleno	90	1509	0,68

Legenda: TR – tempo de retenção; IK – índice de Kovats.

A composição química de espécies do gênero *Lippia* tem sido extensamente estudada. Gonçalves et al. (2015) e Guimarães et al. (2014) encontraram carvacrol e 1,8-cineol como componentes majoritários para *Lippia sidoides*. Costa et al. (2005) ao analisar a mesma espécie encontrou o timol e o α -felandreno. Nogueira et al. (2007), em estudo realizado no Paraná, encontraram citral e trans-dihidrocarvone, enquanto Silva et al. (2006) identificaram citral como o principal componente de *Lippia alba*. Pesquisas anteriores verificaram que o óleo essencial de partes aéreas de *L. origanoides* coletadas em diferentes estados brasileiros

apresentaram carvacrol e timol como principais componentes químicos (SARRAZIN et al., 2015a; QUEIROZ et al., 2014; BORGES et al., 2012).

A variação dos componentes presentes nos óleos essenciais está diretamente relacionada à diversos fatores como o local de cultivo, tipo de solo, clima, temperatura, luminosidade e horário de coleta (ALENCAR-FILHO et al., 2017; BITU et al., 2015; SARRAZIN et al., 2015b). O perfil químico pode variar tanto entre espécies como interespecie (LIMA et al., 2016; MORAIS, 2009). Ademais, alguns constituintes se apresentam como típicos de determinadas espécies enquanto outros são tidos como uma exceção.

O óxido de piperitenona é um monoterpeno oxigenado natural (Figura 9), também conhecido como rotundifolona, empregado em diferentes produtos como detergentes, cremes e loções. Na indústria de alimentos costuma ser utilizado como um flavorizante (SOTTO et al., 2017). Diversas atividades farmacológicas foram evidenciadas para PO, incluindo atividade antiviral contra o herpesvírus tipo 1 (CIVITELLI et al., 2014), ação repelente contra *Aedes aegypti* (TRIPATHI et al., 2004), efeito vasodilatador em ratos hipertensos (LAN et al., 2017), potencial anticancerígeno (NAKAMURA et al., 2014) e ação antiparasitária (TELES et al., 2011). O óxido de piperitenona não é um composto comum no gênero *Lippia*. É mais comum em diferentes espécies de hortelã, como *Mentha spicata* e *Mentha rotundifolia*. Algumas espécies de *Lippia* podem exibir o óxido de piperitenona como um componente menor (BOZOVIC; PIROLI; RAGNO, 2015), mas a sua presença como constituinte principal não é um achado comum.

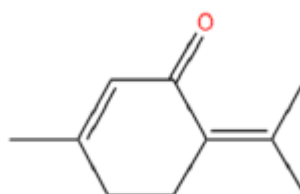


Figura 9. Estrutura química do óxido de piperitenona (BOZOVIC; PIROLI; RAGNO, 2015).

Dentre as espécies do gênero *Lippia* o PO foi identificado, recentemente, em *Lippia pedunculosa* em uma concentração superior a 70% (NASCIMENTO et al., 2017). A presença do óxido de piperitenona como o contituente majoritário do óleo essencial de *Lippia lasiocalycina* (57.55%), sinaliza para uma gama de aplicações biológicas possíveis e o indicam

como uma boa fonte de obtenção desse composto. A presença de PO no óleo essencial de *Lippia lasiocalycina* é uma descoberta inédita.

Os terpenos são considerados os metabólitos secundários mais produzidos pelas plantas e têm aplicação nos mais variados setores como na indústria farmacêutica e de solventes (WANG et al., 2016). Eles possuem uma grande diversidade estrutural e podem exercer funções cruciais para o desenvolvimento vegetal, estando costumeiramente envolvidos nos mecanismos de defesa (SRIVIDYA et al., 2015; VIEGAS JÚNIOR, 2003). Nas análises realizadas nesse experimento o LLEO demonstrou ser rico em terpenos.

O limoneno é um monoterpreno monocíclico presente em mais de 300 espécies vegetais. Apresenta-se em duas possíveis conformações, *S*-(-)-limoneno e *R*-(+)-limoneno, e ambos estão diretamente relacionados à inibição do crescimento de micro-organismos, especialmente dos fungos (DUETZ et al., 2003). Em óleos essenciais cítricos é mais comum a presença do isômero *R*-(+)-limoneno, enquanto o *S*-(-)-limoneno é mais comum em ervas e algumas variedades de plantas, como em espécies do gênero menta (MARÓSTICA JÚNIOR; PASTORE, 2007). O limoneno foi identificado como um dos constituintes majoritários do LLEO.

A atividade antifúngica do LLEO pode ser atribuída à presença de monoterprenos hidrofóbicos, como PO e limoneno, além de outros componentes menores que são capazes de causar a partição lipídica da membrana celular e aumentar sua permeabilidade a eletrólitos essenciais (BAKKALI et al., 2008; DUETZ et al., 2003; OUMZIL et al., 2002). Os produtos naturais das plantas são considerados como tendo uma boa atividade inibitória se apresentarem $MIC \leq 100 \mu\text{g/mL}^{-1}$, uma atividade inibitória moderada se apresentarem MIC variando de 100 a $500 \mu\text{g/mL}^{-1}$, uma atividade inibitória fraca se apresentarem MIC variando de 500 a $1000 \mu\text{g/mL}^{-1}$ e nenhuma atividade inibitória se apresentarem $MIC > 1000 \mu\text{g/mL}^{-1}$ (HOLETZ et al. 2002). De acordo com esses critérios, os resultados obtidos a partir dos ensaios para avaliar a atividade antimicrobiana (Tabela 3) mostraram que o óleo essencial de *Lippia lasiocalycina* não apresentou atividade sobre cepas bacterianas Gram-positivas e Gram-negativas. Entretanto, o óleo foi ativo contra a cepa de levedura testada (Tabela 3), e embora nesta faixa de concentração do LLEO a atividade seja considerada fraca, seu efeito inibitório foi fungicida. Este resultado indica que o LLEO é uma fonte de fitoquímicos que poderiam ser usados na prevenção ou tratamento de micoses em hospedeiros humanos e animais, bem como, poderiam ser usados para prevenção da contaminação de alimentos por espécies de fungos.

Tabela 3. Concentração inibitória mínima (MIC) e concentração microbicida mínima (MMC) do óleo essencial de *Lippia lasiocalycina* sobre cepas microbianas.

Cepas	MIC ($\mu\text{g/mL}^{-1}$)	MMC ($\mu\text{g/mL}^{-1}$)	MMC/ MIC	Efeito Inibitório
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	≥ 1024	-	-	Sem atividade
<i>S. aureus</i> SA1199-B	≥ 1024	-	-	Sem atividade
<i>E. coli</i> ATCC 25922	≥ 1024	-	-	Sem atividade
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	512	512	1	Fungicida

Na análise de aflatoxinas produzidas por *Aspergillus flavus* a técnica mais utilizada é a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detector de fluorescência. As aflatoxinas produzidas por *A. flavus* apresentam fluorescência quando estimuladas sendo possível quantificá-las em níveis muito baixos por essa técnica (RAOTA; GIOVANELA, 2016; HUSSAIM, 2011). Entretanto, para que se verifique a confiabilidade dos resultados obtidos a construção de uma curva de calibração com a utilização de padrões em concentrações conhecidas se faz necessária.

As curvas de calibração são muito utilizadas em estudos analíticos e representam uma relação entre a concentração de um analito ou substância teste e a intensidade do sinal observado (BARROS NETO; PIMENTEL; ARAÚJO, 2002). Para a construção de uma curva de calibração um mínimo de cinco concentrações diferentes deve ser testado (em triplicata), uma equação da reta de regressão de y em x deve ser estimada pelo método dos mínimos quadrados e um gráfico de dispersão apresentado. A avaliação da associação linear entre as variáveis é dada pelo coeficiente de correlação (R^2) que deve apresentar valor acima de 0,990 (BRASIL, 2017). No presente estudo, o coeficiente de correlação obtido foi de 0,9997 (Figura 10) demonstrando que o sinal do equipamento é proporcional às concentrações conhecidas das soluções padrão, a relação sinal/concentração é a mesma para as amostras e o padrão e que o sinal observado provém apenas do analito.

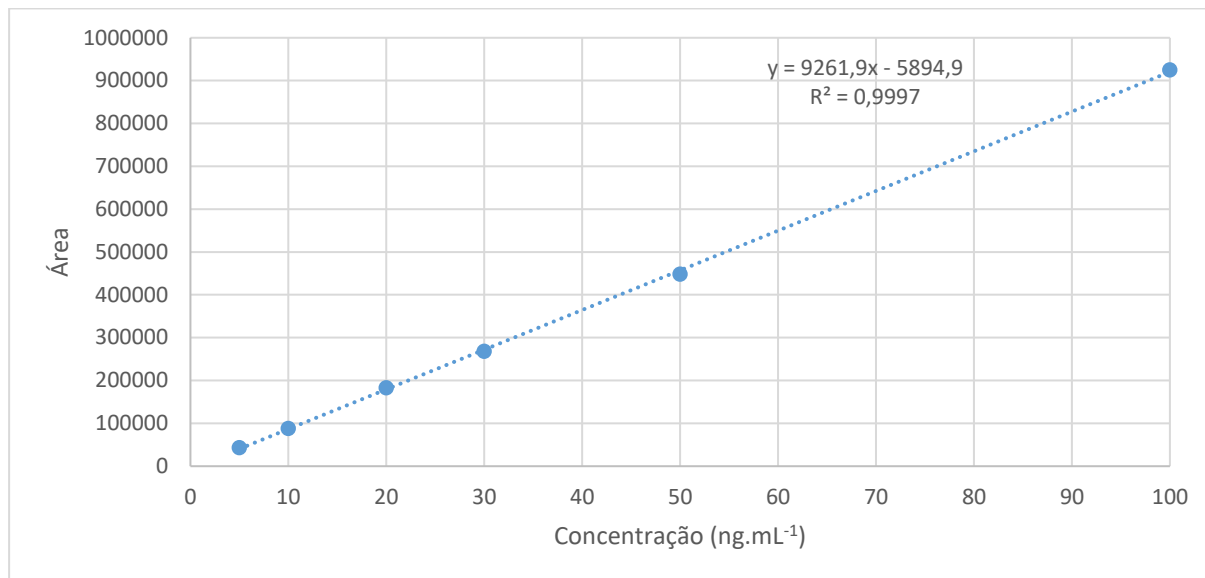


Figura 10. Curva de calibração para aflatoxina B₁.

Apesar de seu alto poder de contaminação e rápido crescimento, nem todas as espécies de *Aspergillus flavus* são produtoras de aflatoxinas (KATSURAYAMA; TANIWAKI, 2017). Assim, a cepa utilizada neste estudo foi testada quanto à sua capacidade de produção de aflatoxina B₁ e os resultados são apresentados na Figura 11.

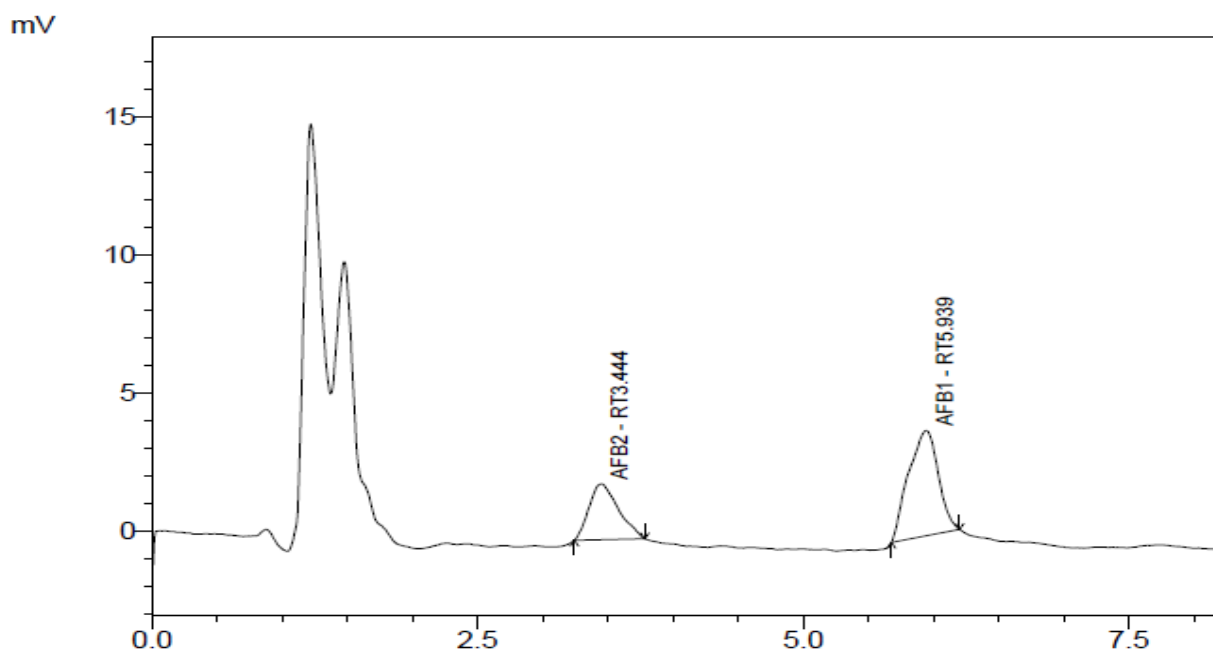


Figura 11. Produção de aflatoxina B₁ por cepa de *Aspergillus flavus*.

A concentração mínima inibitória do óleo essencial de *Lippia lasiocalycina* sobre cepas de *Aspergillus flavus* foi de 256 $\mu\text{g/mL}^{-1}$. Nesta concentração o óleo essencial se mostrou fungicida (Tabela 4) e com aumento da inibição da multiplicação fúngica diretamente proporcional ao aumento da concentração do óleo essencial (Apêndice 1).

Tabela 4. Concentração inibitória mínima (MIC) e concentração fungicida mínima (MFC) do óleo essencial de *Lippia lasiocalycina* sobre cepas de *Aspergillus flavus*.

Cepas	MIC ($\mu\text{g/mL}^{-1}$)	MFC ($\mu\text{g/mL}^{-1}$)	MFC/ MIC	Efeito Inibitório
<i>Aspergillus flavus</i>	256	256	1	Fungicida

A investigação do potencial antifúngico de óleos essenciais de espécies do gênero *Lippia* têm sido extensivamente estudadas. Estrada-Cano e colaboradores (2017) observaram que o óleo essencial de *Lippia berlandieri* possui ação antifúngica sobre *Fusarium oxysporum*; Tomazoni et al. (2016) demonstrou que o óleo essencial de *Lippia alba* foi efetivo contra cepas de *Alternaria solani*; *Lippia micronera* (Scotto et al., 2016), *Lippia sidoides* (Brito et al., 2015) e *Lippia alba* (Cortez et al., 2015) demonstraram atividade contra cepas de *Candida albicans*; Fernandes e colaboradores (2015) relatam a efetividade de *Lippia gracilis* contra *Monosporascus cannonballus*. Apesar de todas as pesquisas que envolvem o gênero *Lippia* algumas espécies ainda não tiveram seu potencial investigado. Até o momento, não há relatos na literatura que abordem a atividade antifúngica do óleo essencial de *Lippia lasiocalycina* e sua implicação na produção de aflatoxina B₁ por cepas de *Aspergillus flavus*.

No presente estudo, o óleo essencial de *Lippia lasiocalycina* foi testado sobre a multiplicação de cepas de *Aspergillus flavus* por duas técnicas diferentes: contato direto, em que o óleo essencial foi adicionado diretamente ao meio de cultura, e ação dos compostos voláteis presentes no óleo essencial nas concentrações $\frac{1}{4}$ MIC (64 $\mu\text{g/mL}^{-1}$), $\frac{1}{2}$ MIC (128 $\mu\text{g/mL}^{-1}$), MIC (256 $\mu\text{g/mL}^{-1}$), 2MIC (512 $\mu\text{g/mL}^{-1}$) e 3MIC (768 $\mu\text{g/mL}^{-1}$). Na técnica de contato direto pode-se observar que do 2º ao 5º dia de medições as concentrações 2MIC e 3MIC apresentaram crescimento médio radial significativa inferior ao tratamento controle. No sexto dia, apenas a concentração 3MIC apresentou inibição significativa. No sétimo dia de experimento, apesar de possuir a menor área média, o tratamento 3MIC não apresentou diferença significativa quando comparado ao controle (Tabela 5). Já para a técnica de ação dos

compostos voláteis nota-se que somente no 1º dia de experimento o óleo essencial de *Lippia lasiocalycina* na concentração 3MIC apresentou área de crescimento médio significativamente inferior ao tratamento controle. Nas demais situações não houve diferença significativa (Tabela 6).

Os óleos essenciais são formados por diversas substâncias e exercem variadas funções nas plantas que os produzem (BRUM et al. 2014). São constituídos principalmente por compostos fenólicos e derivados terpênicos que influenciam diretamente em sua atividade antifúngica e antimicrobiana (MIRANDA et al., 2016). Os monoterpenos atuam por mecanismos diretos na membrana celular dos microrganismos interagindo de forma tóxica e alterando sua estrutura (MAIA; DONATO; FRAGA, 2015) ao mesmo tempo em que inibem a respiração e o transporte de íons aumentando a permeabilidade da membrana celular (MERCIER; PROST; PROST, 2009). Os dois principais componentes encontrados no óleo essencial de *Lippia lasiocalycina* foram o óxido de piperitenona (57,55%) e o limoneno (20,69%), ambos monoterpenos, que provavelmente são os principais envolvidos nos efeitos inibitórios demonstrados sobre a multiplicação das cepas de *Aspergillus flavus*.

O emprego de diferentes metodologias para avaliar a influência de óleos essenciais sobre o crescimento de espécies fúngicas nos permite selecionar a técnica que apresenta os melhores resultados possibilitando uma análise por simples comparação. Na Tabela 7, pode-se constatar que o percentual de inibição do LLEO na técnica por contato direto tem distribuição superior se comparado à técnica por ação dos compostos voláteis nos tratamentos ¼MIC (p -valor=0,0299), MIC (p -valor=0,0368), 2MIC (p -valor=0,0002) e 3MIC (p -valor<0,001). Por exemplo, no tratamento 3MIC empregando a técnica por contato direto obteve-se média de inibição de 58%, mediana de 70% e máximo de 94,4% enquanto que por ações dos compostos voláteis observa-se que a média foi inferior (8,29%), com mediana de 0% e máximo de 59,8%. Esses dados demonstram que o óleo essencial de *Lippia lasiocalycina* quando empregado pela técnica de contato de direto foi mais efetivo na inibição da multiplicação de *Aspergillus flavus*. A maior interação do óleo essencial com a parede fúngica no contato direto, interferindo possivelmente no metabolismo da cepa, bem como a volatilização de componentes essenciais presentes no LLEO na técnica de ação dos compostos voláteis podem justificar os resultados obtidos.

Tabela 5. Crescimento das colônias de *Aspergillus flavus* durante exposição ao óleo essencial de *Lippia lasiocalycina* por contato direto.

Tratamento	Dia 0	Dia 1	Dia 2	Dia 3
	Média* (DP)	Média* (DP)	Média* (DP)	Média* (DP)
Controle	0,03 (0)a	0,15 (0,04)a	18,18 (8,58)a	20,97 (4,1)a
¼ MIC	0,03 (0)a	0,07 (0,02)a	11,92 (0,56)a	14,86 (8,31)a
½ MIC	0,03 (0)a	0,09 (0,04)a	10,70 (3,92)a	21,02 (4,74)a
MIC	0,03 (0)a	0,14 (0,09)a	4,97 (3,57)a	14,38 (3,95)a
2MIC	0,03 (0)a	0,06 (0,01)a	0,26 (0,13)b	2,15 (0,34)b
3MIC	0,03 (0)a	0,07 (0,04)a	0,11 (0,03)b	0,26 (0,13)b
Tratamento	Dia 4	Dia 5	Dia 6	Dia 7
	Média* (DP)	Média* (DP)	Média** (DP)	Média** (DP)
Controle	23,76 (0)a	23,76 (0)a	23,76 (0)a	23,76 (0)a
¼ MIC	19,52 (7,3)a	23,05 (1,2)a	23,05 (1,2)a	23,76 (0)a
½ MIC	22,65 (1,92)a	23,76 (0)a	23,76 (0)a	23,76 (0)a
MIC	21,26 (4,3)a	22,52 (2,2)a	22,52 (2,2)a	23,76 (0)a
2MIC	9,07 (3,5)b	19,18 (2,7)b	23,05 (1,2)a	23,19 (0,9)a
3MIC	0,57 (0,4)b	2,27 (2,1)b	4,38 (3,9)b	10,41 (11,6)a

*ANOVA.

** teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Linhas com letras diferentes da letra do controle expressam diferença significativa, na comparação múltipla de Dunnett.

Legenda: DP – Desvio Padrão.

Tabela 6. Crescimento das colônias de *Aspergillus flavus* durante exposição ao óleo essencial de *Lippia lasiocalycina* por ação dos compostos voláteis.

Tratamento	Dia 0	Dia 1	Dia 2	Dia 3
	Média* (DP)	Média* (DP)	Média* (DP)	Média* (DP)
Controle	0,03 (0)a	0,15 (0,04)a	18,18 (8,58)a	20,97 (4,1)a
¼ MIC	0,03 (0)a	0,06 (0,01)b	22,35 (1,22)a	23,76 (0)a
½ MIC	0,03 (0)a	0,06 (0,01)b	18,44 (9,22)a	23,76 (0)a
MIC	0,03 (0)a	0,11 (0,03)a	20,42 (3,82)a	23,76 (0)a
2MIC	0,03 (0)a	0,11 (0,02)a	19,31 (4,63)a	23,76 (0)a
3MIC	0,03 (0)a	0,06 (0,01)b	10,94 (6,65)a	23,76 (0)a
Tratamento	Dia 4	Dia 5	Dia 6	Dia 7
	Média* (DP)	Média* (DP)	Média* (DP)	Média* (DP)
Controle	23,76 (0)a	23,76 (0)a	23,76 (0)a	23,76 (0)a
¼ MIC	23,76 (0)a	23,76 (0)a	23,76 (0)a	23,76 (0)a
½ MIC	23,76 (0)a	23,76 (0)a	23,76 (0)a	23,76 (0)a
MIC	23,76 (0)a	23,76 (0)a	23,76 (0)a	23,76 (0)a
2MIC	23,76 (0)a	23,76 (0)a	23,76 (0)a	23,76 (0)a
3MIC	23,76 (0)a	23,76 (0)a	23,76 (0)a	23,76 (0)a

Fonte: Base de dados da pesquisa.

* ANOVA. Linhas com letras diferentes da letra do controle expressam diferença significativa na comparação múltipla de Dunnett.

Legenda: DP – desvio padrão.

Tabela 7. Percentual de inibição do crescimento de *Aspergillus flavus* após contato com o óleo essencial de *Lippia lasiocalycina* por tipo de técnica aplicada.

Tratamento	Contato Direto (%)		Ação dos voláteis (%)		p-valor*
	Média	Mediana (Min-Max)	Média	Mediana (Min-Max)	
¼ MIC	12,84	0 (0-50,0)	4,25	0 (0-50,0)	0,0299
½ MIC	5,87	0 (0-37,5)	5,98	0 (0-41,1)	0,3565
MIC	11,13	0 (0-66,4)	1,99	0 (0-25,0)	0,0368
2MIC	30,08	21 (0-92,7)	3,07	0 (0-20,0)	0,0002
3MIC	58,00	70 (0-94,4)	8,29	0 (0-59,8)	<0,001

* Teste de Mann-Whitney.

Legenda: Min - valor mínimo; Max - valor máximo.

Durante seu processo de multiplicação os fungos produzem uma grande variedade de metabólitos, alguns essenciais ao seu desenvolvimento e outros não. As aflatoxinas são metabólitos secundários produzidos por algumas espécies de *Aspergillus*. Dentre as quatro principais aflatoxinas (B₁, B₂, G₁ e G₂) produzidas por espécies fúngicas, a aflatoxina B₁ é a mais estudada devido às suas propriedades hepatotóxicas e cancerígenas tanto em humanos quanto em animais (PANKAJ; SHI; KEENER, 2018; GACEM; HADJ-KHELIL, 2016; BLUMA; ETCHEVERRY, 2008). A contaminação de alimentos por aflatoxinas têm impactado de forma direta na produção e, principalmente, na exportação de diversos produtos do agronegócio sendo responsáveis por 25% das perdas da produção agrícola mundial (MANSO et al., 2014; PRAKASH et al., 2012). O aumento no rigor quanto aos níveis permitidos internacionalmente para micotoxinas em alimentos aliado aos anseios dos consumidores por produtos com reduzido teor de conservantes sintéticos têm incentivado a busca por alternativas naturais de controle tanto do crescimento das espécies produtoras como da inativação/inibição da toxina formada (RAMIREZ et al., 2018; UDOMKUN et al., 2017; TIAN et al., 2011).

Na análise de produção de aflatoxina B₁ por cepas de *Aspergillus flavus* após contato direto com o óleo essencial de *Lippia lasiocalycina* (Tabela 8) pode-se constatar que a concentração 2MIC foi capaz de reduzir a produção de aflatoxina B₁ enquanto a concentração 3MIC inibiu completamente sua produção, apesar de não apresentarem diferença significativa

nas análises estatísticas quando comparados ao grupo controle (p -valor $>0,05$). Na técnica de ação dos compostos voláteis (Tabela 9) em nenhuma das concentrações testadas houve redução na produção de aflatoxina B₁. De fato, o contato por ação dos compostos voláteis potencializou a produção de toxina na concentração MIC (256 $\mu\text{g/mL}^{-1}$) com diferença significativa quando comparado ao controle, sinalizando para uma provável aplicação do óleo essencial de *Lippia lasiocalycina* como indutor em cepas de *Aspergillus flavus* produtor de aflatoxina B₁ podendo essa potencialidade ser explorada pela indústria produtora de padrões de aflatoxinas largamente empregadas em pesquisas científicas.

Tabela 8. Produção de aflatoxina B₁* por cepas de *Aspergillus flavus* após contato direto com o óleo essencial de *Lippia lasiocalycina*.

Tratamento	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	<i>p</i>-valor**
Controle	0,0639	0,0602a	0,0585	0,0730	
¼ MIC	0,0582	0,0543a	0,0527	0,0676	
½ MIC	0,0528	0,0497a	0,0317	0,0771	
MIC	0,1169	0,0713a	0,0000	0,2793	0,0743
2MIC	0,0089	0,0000a	0,0000	0,0267	
3MIC	0,0000	0,0000a	0,0000	0,0000	

* Em nm².

** Teste de Kruskal-Wallis. Linhas com letra diferentes expressam diferença significativa na comparação múltipla de Dunnett.

Diversos estudos têm investigado a aplicação de óleos essenciais como controle alternativo do crescimento fúngico e produção de aflatoxinas em alimentos. Gómez e colaboradores (2018) observaram que os óleos essenciais de orégano (*Origanum Vulgare*) e canela (*Cinnamomum zeylanicum*) por contato direto e por vaporização foram efetivos na inibição de *A. flavus* e *A. parasiticus* bem como na produção de aflatoxina B₁; Moosavi-Nasab et al., (2018) constataram que o óleo essencial de *Syzygium aromaticum* previne tanto o crescimento como a produção de aflatoxina B₁ por *Aspergillus flavus*; Soares et al., (2016) demonstraram que os óleos essenciais de *Satureja montana* e *Origanum Vulgare* afetam diretamente o crescimento de cepas de *Aspergillus parasiticus*; El-Soud e colaboradores (2015)

também encontraram resultados semelhantes para o óleo essencial de *Ocimum basilicum* em cepas de *A. flavus*.

Tabela 9. Produção de aflatoxina B₁* por cepas de *Aspergillus flavus* após contato por ação dos compostos voláteis presentes no óleo essencial de *Lippia lasiocalycina*.

Tratamento	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	p-valor**
Controle	0,064	0,060a	0,058	0,073	
¼ MIC	0,870	0,696a	0,623	1,290	
½ MIC	0,530	0,676a	0,109	0,805	
MIC	1,534	0,935b	0,691	2,977	0,0362
2MIC	0,664	0,436a	0,427	1,129	
3MIC	0,193	0,135a	0,048	0,395	

* Em nm².

** Teste de Kruskal-Wallis. Linhas com letra diferentes da letra do controle expressam diferença significativa na comparação múltipla de Dunnett.

O mecanismo de ação dos óleos essenciais como substâncias antifúngicas ainda não está esclarecido. Um possível modo de ação seria a inibição da biossíntese na célula fúngica levando à uma redução do crescimento e da produção de metabólitos secundários. Acredita-se que por serem compostos lipofílicos, os óleos essenciais conseguem atravessar a membrana plasmática fúngica ou mesmo acumular-se nela interagindo com enzimas envolvidas nos diversos processos metabólicos das células. Tal fato alteraria a permeabilidade celular ocasionando um efluxo de prótons, desestabilizando a organização fúngica e levando à morte celular (GOMES et al., 2018; EL-AZIZ et al., 2015; PRAKASH et al., 2015; RAUT; KARUPPAYIL, 2014). Os compostos terpênicos são exemplos de substâncias lipossolúveis que afetam o processo de respiração celular e catalisam reações enzimáticas (KALEMBRA; KUNICKA, 2003). A presença do óxido de piperitenona e do limoneno, ambos monoterpenos, como constituintes majoritários do óleo essencial de *Lippia lasiocalycina* podem ter papel decisivo nos efeitos sobre a multiplicação e produção de aflatoxina B₁ por cepas de *Aspergillus flavus* observados neste estudo.

6. CONCLUSÕES

O óxido de piperitenona foi identificado como o constituinte majoritário do óleo essencial de *Lippia lasiocalycina*. A atividade antifúngica sobre cepas de *Candida albicans* e *Aspergillus flavus* ocorreram nas concentrações de 512 $\mu\text{g/mL}^{-1}$ e 256 $\mu\text{g/mL}^{-1}$, respectivamente. A multiplicação de *Aspergillus flavus* foi reduzida após contato direto com o óleo essencial. A atividade antiaflatoxigênica sobre cepas de *Aspergillus flavus* foi observada quando o óleo essencial foi aplicado por contato direto. Quando utilizada a técnica de ação dos compostos voláteis o óleo essencial *Lippia lasiocalycina* potencializou a produção de aflatoxina B₁.

7. REFERÊNCIAS

- ABBAS, H. K.; SHIER, W. T.; PLASENCIA, J.; WEAVER, M. A.; BELLALOU, N.; KOTOWICZ, J. K.; ACCINELLI, C.; TORRE-HERNANDEZ, M. E.; ZABLOTOWICZ, R. M. Mycotoxin contamination in corn smut (*Ustilago maydis*) galls in the field and in the commercial food products. **Food Control**. v. 71. p. 57-63. 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.06.006>
- AHLBERG, S. H.; JOUTSJOKI, V.; KORHONEN, H. J. Potencial of lactic acid bacteria in aflatoxin risk mitigation. **International Journal of Food Microbiology**. v. 207. p. 87-102. 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.04.042>
- ALECAR FILHO, J. M. T.; ARAÚJO, L. C.; OLIVEIRA, A. P.; GUIMARÃES, A. L.; PACHECO, A. G. M.; SILVA, F. S.; CAVALCANTI, L. S.; LUCCHESI, A. M.; ALMEIDA, J. R. G. S.; ARAÚJO, E. C. C. Chemical composition and antibacterial activity of essential oil from leaves of *Croton heliotropiifolius* in different seasons of the year. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 27. p. 440-444. 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjp.2017.02.004>
- ALSHANNAQ, A.; YU, JH. Occurrence, toxicity, and analyse of major mycotoxins in food. **International Journal of Environmental Research and Public Health**. v. 14. n. 632. p. 1-20. 2017. <http://dx.doi.org/10.3390/ijerph14060632>
- ALVAREZ-CASTELLANOS, P. P.; BISHOP, C. D.; PASCUAL – VILLALOBOS, M. J. Antifungal activity of the essential oil of flower heads of garland chrysanthemum (*Chrysanthemum coronarium*) against agricultural pathogens. **Phytochemistry**. v. 57. p. 99-102. 2001. [http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)00461-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9422(00)00461-1)
- ALVES, E. G.; VINHOLIS, A. H. C.; CASEMIRO, L. A.; FURTADO, N. A. J. C.; ANDRADE E SILVA, M. A.; CUNHA, W. R.; MARTINS, C. H. G. Estudo comparativo de técnicas screening para avaliação de atividade antibacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras. **Química Nova**. v. 31. n. 5. p. 1224-1229. 2008. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422008000500052>
- AMAIKE, S.; KELLER, N. P. *Aspergillus flavus*. **Annual Reviews of Phytopathology**. v. 49. p. 107-133. 2011. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-phyto-072910-095221>
- BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – a review. **Food and Chemical Toxicology**. v. 46. n. 2. 446-475. 2008. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106>
- BARBOSA, C. S.; ALVES, E. F.; FORTUNA, J. L.; MACENA, W. G. Atividade antifúngica preliminar dos extratos de *Punica granatum* (Linnaeus) e *Psidium guajava* (Linnaeus) sobre *Candida albicans*. **SaBios: Revista Saúde e Biologia**. v. 11. n. 1. p.66-73.2016.
- BARRETO, H. M.; LIMA, I. S.; COELHO, K. M. R. N.; OSÓRIO, L. R.; MOURÃO, R. A.; SANTOS, B. H. C.; COUTINHO, H. D. M.; ABREU, A. P. L.; MEDEIROS, M. G. F.; CITÓ, A. M. G. L.; LOPES, J. A. D. Effect of *Lippia origanoides* H.B.K. essential oil in the resistance to aminoglycosides in methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. **European Journal of Integrative Medicine**. v. 6. p. 560-564. 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.eujim.2014.03.011>

BARROS NETO, B.; PIMENTEL, M. F.; ARAÚJO, M. C. U. Recomendações para calibração em química analítica - parte I. Fundamentos e calibração com um componente (calibração univariada). **Química Nova**. v. 25. n. 5. p. 856-865. 2002. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422002000500024>

BENHOSSI, S.; ANDRETTO, A. P.; TEODORO, C. C. Saúde Pública: O impacto dos agrotóxicos na alimentação e ações concretas da ANVISA para o controle. **Revista UNINGÁ**. v. 43. p. 91-94. 2015.

BERNARDOS, A.; MARINA, T.; ZACEK, P.; PÉREZ-ESTEVE, E.; MARTÍNEZ-MAÑEZ, R.; LHOTKA, M.; KOURIMSKA, L.; PULKRABEK, J.; KLOUCEK, P. Antifungal effect of essential oils components against *Aspergillus niger* when loaded into silica mesoporous supports. **Journal Science Food and Agriculture**. v. 95. p. 2824-2831. 2015. <http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.7022>

BITU, V.C. N.; COSTA, J. G. M.; RODRIGUES, F. F. G.; COLARES, A. V.; COUTINHO, H. D. M.; BOTELHO, M. A.; PORTELA, A. C.; SANTANA, N. M.; MENEZES, I. R. A. Effect of collection time on composition of essential oil of *Lippia gracilis* Schauer (Verbenaceae) growing in Northeast Brazil. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**. v. 18. n. 3. p. 647-653. 2015. <http://dx.doi.org/10.1080/0972060X.2014.935043>

BIZZO, H. R.; HOVELL, A. M. C.; REZENDE, C. M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**. v. 32. n. 3. p. 588-594. 2009. <http://dx.doi.org/S0100-40422009000300005>

BLUMA, R. V.; ETCHEVERRY, M. G. Application of essential oils in maize grain: Impact on *Aspergillus* section *Flavi* growth parameters and aflatoxin accumulation. **Food Microbiology**. v. 25. p. 324-334. 2008. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2007.10.004>

BORGES, A. R.; AIRES, J. R. A.; HIGINO, T. M. M.; MEDEIROS, M. G. F.; CITÓ, A. M. G. L.; LOPES, J. A. D.; FIGUEIREDO, R. C. B. Q. Trypanocidal and cytotoxic activities of essential oils from medicinal plants of Northeast of Brazil. **Experimental Parasitology**. v. 132. n. 2. p. 123-128. 2012. <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2012.06.003>

BOZOVIC, M.; PIROLI, A.; RIGNO, R. *Mentha suaveolens* Ehrh. (Lamiaceae) essential oil and its main constituent piperitenone oxide: Biological activities and chemistry. **Molecules**. v. 20. p. 8605-8633. 2015. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules20058605>

BRASIL. RDC nº 166 de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. **Diário Oficial da República do Brasil**. Disponível em <<https://www20.anvisa.gov.br/coifa/pdf/rdc166.pdf>>. Acesso em 19 de agosto de 2018.

BRASIL. RDC nº 07 de 18 de fevereiro de 2011. Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. **Diário Oficial da República do Brasil**. Disponível em <http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2968262/RDC_07_2011_COMP.pdf/afe3f054-bc99-4e27-85c4-780b92e2b966>. Acesso em: 27 de julho de 2017.

BRASIL. RDC nº 12 de 02 de janeiro de 2001. Dispõe sobre o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Disponível em <<http://www20.anvisa.gov.br/coifa/pdf/rdc12.pdf>>. Acesso em: 19 de agosto de 2018.

http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/RDC_12_2001.pdf/15ffddf6-3767-4527-bfac-740a0400829b>. Acesso em: 27 de julho de 2017.

BRITO, D. I. V.; MORAIS-BRAGA, M. F. B.; CUNHA, F. A. B.; ALBUQUERQUE, R. S.; CARNEIRO, J. N. P.; LIMA, M. S. F.; LEITE, N. F.; SOUZA, C. E. S.; ANDRADE, J. C.; ALENCAR, L. B. B.; LAVOR, A. K. L. S.; FIGUEREDO, F. G.; LIMA, L. F.; COUTINHO, H. D. M. Análise fitoquímica e atividade antifúngica do óleo essencial de folhas de *Lippia sidoides* Cham. e do Timol contra cepas de *Candida* spp. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v. 17. n. 4. p. 836-844. 2015. http://dx.doi.org/10.1590/1983-084X/14_060

BRUM, R. B. C. S.; CASTRO, H. G.; CARDON, C. H.; PEREIRA, A. S.; CARDOSO, D. P.; SANTOS, G. R. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre fungos fitopatogênicos. **Magistra**. v. 26. n. 3. p. 361-371. 2014.

BOUKHATEM, M. N.; FERHAT, M. A.; KAMELI, A.; SAIDI, F.; KEBIR, H. T. Lemon grass (*Cymbopogon citratus*) essential oil as a potential anti-inflammatory and antifungal drugs. **Libyan Journal of Medicine**. v. 9. P. 1-10. 2014. <http://dx.doi.org/10.3402/ljm.v9.25431>

BUSATO, N. V.; SILVEIRA, J. C.; COSTA, A. O. S.; COSTA JÚNIOR, E. F. Estratégias de modelagem de extração de óleos essenciais por hidrodestilação e destilação a vapor. **Ciência Rural, Santa Maria**. v. 44. n. 9. p. 1574-1582. 2014. <http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20121330>

CALDERONE, R. A.; FONZI, W. A. Virulence factors of *Candida albicans*. **TRENDS in Microbiology**. v. 9. n. 7. p. 327-335. 2001. [http://dx.doi.org/10.1016/S0966-842X\(01\)02094-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0966-842X(01)02094-7)

CARNEIRO, F. F.; AUGUSTO, L. G.; RIGOTTO, R. M.; FRIEDRICH, K.; BÚRIGO, A. C. **Dossiê ABRASCO - Um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde**. Rio de Janeiro: EPSJV, 2015.

CARVAJAL, D.; ALVAREZ, R.; OSORIO, E. Chemical variability of essential oil of *Protium colombianum* from two tropical life zones and their in vitro activity against isolates of *Fusarium*. **Journal of Pest Science**. v. 89. p. 241-248. 2016. <http://dx.doi.org/10.1007/s10340-015-0667-x>

CASSONE, A. Vulvovaginal *Candida albicans* infections: pathogenesis, immunity and vaccine prospects. **BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology**. v. 122. p. 785-794. 2015. <http://dx.doi.org/10.1111/1471-0528.12994>

CASTRO, F. L. F. Interação entre fungos toxigênicos (*Aspergillus flavus* e *Fusarium verticilloides*) e carunchos (*Sitophilus zeamais*) em amostras de grãos de milho. 43 f. Tese (Doutorado). **Universidade de São Paulo**. 2011.

CASTRO, R. D.; LIMA, E. O. Atividade antifúngica dos óleos essenciais de sassafrás (*Ocotea odorifera* Vell.) e alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) sobre o gênero *Candida*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v. 13. n. 2. p. 203-208. 2011. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-05722011000200012>

CIVITELLI, L.; PANELLA, S.; MARCOCCI, M. E.; PETRIS, A.; GARZOLI, S.; PEPI, F.; VAVALA, E.; RAGNO, R.; NENCIONI, L.; PALAMARA, A. T.; ANGIOLELLA, L. *In vitro* inhibition of herpes simplex virus type 1 replication by *Mentha suaveolens* essential oil and its main component piperitenone oxide. **Phytomedicine**. v. 21. p. 857-865. 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phymed.2014.01.013>

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; Approved Standard – Second Edition. CLSI document M38-A2 (ISBN 1-56238-668-9). **Clinical and Laboratory Standards Institute**, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087 USA, 2008.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Sixth Edition. NCCLS document M7-A6 (ISBN 1-56238-486-4). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.

CORDERO, C.; RUBIOLO, P.; COBELLI, L.; STANI, G.; MILIAZZA, A.; GIARDINA, M.; FIROR, R.; BICCHI, C. Potencial of the reversed-inject differential flow modulator for comprehensive two-dimensional gas chromatography in the quantitative profiling and fingerprinting of essential oils of different complexity. **Journal of Chromatography A**. v. 1417. p. 79-95. 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2015.09.027>

CORTEZ, L. E. R.; YAMAGUCHI, M. U.; CORTEZ, D. A. C.; PESCO, D. C. S. Avaliação da atividade antifúngica dos óleos essenciais de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae) e *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf (Poaceae). **O Mundo da Saúde**. v. 39. n. 4. p. 433-440. 2015. <http://dx.doi.org/10.15343/0104-7809.20153904433440>

COSTA, P. S.; SOUZA, E. B.; BRITO, E. H. S.; FONTENELLE, R. O. S. Atividade antimicrobiana e potencial terapêutico do gênero *Lippia sensu lato* (Verbenaceae). **Hoehnea**. v. 44. n. 2. p. 158-171. 2017. <http://dx.doi.org/10.1590/2236-8906-68/2016>

COSTA, L. C. B.; PINTO, J. E. B. P.; BERTOLUCCI, S. K. V.; COSTA, J. C. B.; ALVES, P. B.; NICULAU, E. S. *In vitro* antifungal activity of *Ocimum selloi* essential oil and methylchavicol against phytopathogenic fungi. **Revista Ciência Agronômica**. v. 2. n. 46. p. 428-435. 2015. <http://dx.doi.org/10.5935/1806-6690.20150023>

COSTA, J. G. M.; RODRIGUES, F. F. G.; ANGÉLICO, E. C.; SILVA, M. R.; MOTA, M. L.; SANTOS, N. K. A.; CARDOSO, A. L. H.; LEMOS, T. L. G. Estudo químico-biológico dos óleos essenciais de *Hyptis martiusii*, *Lippia sidoides* e *Syzigium aromaticum* frente às larvas do *Aedes aegypti*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 15. n. 4. p. 304-309. 2005. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2005000400008>

CRUZ, R. S.; SOARES, N. F. F.; ANDRADE, N. J.; SILVA, D. J. P. Avaliação do desenvolvimento de fungos filamentosos deterioradores em diferentes atmosferas de oxigênio. **Revista Ceres**. v. 53. n. 309. p. 580-584. 2006.

DAI, Y.; HUANG, K.; ZHANG, B.; ZHU, L.; XU, W. Aflatoxin B1-induced epigenetic alterations: An overview. **Food and Chemical Toxicology**. v. 109. p. 1-7. 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2017.06.034>

DIKBAS, N.; KOTAN, R.; DADASOGLU, F.; SAHIN, F. Control of *Aspergillus flavus* with essential oil and methanol extract of *Satureja hortensis*. **International Journal of Food Microbiology**. v. 124. p. 179-182. 2008. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.03.034>

DOMENICO, A. S.; DANNER, M. A.; BUSO, C.; CHRIST, D.; COELHO, S. R. M. Análise de trilha da contaminação por aflatoxinas em grãos de milho armazenados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 50. n. 6. p. 441-449. 2015. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2015000600002>

DUETZ, W. A.; BOUWMEESTER, H.; BEILEN, J. B.; WITHOLT, B. Biotransformation of limonene by bacteria, fungi, yeasts, and plants. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 61. p. 269-277. 2003. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-003-1221-y>

EL-AZIZ, A. R. M. A.; MAHMOUD, M. A.; AL-OTHMAN, M. R.; AL-GAHTANI, M. F. Use of selected essential oils to control aflatoxin contaminated stored cashew and detection of aflatoxin biosynthesis gene. **The Scientific World Journal**. v. 2015. P. 1-13. 2015. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/958192>

EL-SOUD, N. H. A.; DEABES, M.; EL-KASSEM, L. A.; KHALIL, M. Chemical composition and antifungal activity of *Ocimum basilicum* L. essential oil. **Macedonian Journal of Medical Science**. v. 15. n. 3. p. 374-379. 2015. <http://dx.doi.org/10.3889/oamjms.2015.082>

EMBRAPA. Herbário CEN. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Recursos Genéticos e Biotecnologia. Disponível em <<http://pragawall.cenargen.embrapa.br/elcen2web/elc2html/elc2bd01a1.asp?id1=161&id2=387&id3=5&id4=257&id5=-1&id6=-1&fam=Verbenaceae>>. Acesso em 17 de setembro de 2017.

ESPER, R. H.; GONÇALEZ, E.; MARQUES, M. O. M.; FELICIO, R. C.; FELICIO, J. D. Potential of essential oils for protection of grains contaminated by aflatoxin produced by *Aspergillus flavus*. **Frontiers in Microbiology**. v. 5. p. 1-5. 2014. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2014.00269>

ESTRADA-CANO, C.; CASTRO, M. A. A.; MUNÓZ-CASTELLANOS, L.; GARCÍA-TRIANA, N. A. A.; HERNÁNDEZ-OCHOA, L. Antifungal activity of microcapsulated clove (*Eugenia caryophyllata*) and mexican oregano (*Lippia berlandieri*) essential oils against *Fusarium oxysporum*. **Journal of Microbial & Biochemical Technology**. v. 9. n. 1. p. 567-571. 2017. <http://dx.doi.org/10.4172/1948-5948.1000342>

FARIAS, E. M. F. G.; XIMENES, R. M.; MAGALHÃES, L. P. M.; CHIAPPETA, A. A.; SENA, K. X. F. R.; ALBUQUERQUE, J. F. C. Antifungal activity of *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae) against clinical isolates of *Candida* species. **Journal of Herbal Medicine**. v. 2. p. 63-67. 2012. <http://dx.doi.org/10.1016/j.hermed.2012.06.002>

FERNANDES, L. C. B.; ALBUQUERQUE, C. C.; SALES JÚNIOR, R.; OLIVEIRA, F. F. M.; GURGEL, E. P.; MESQUITA, M. V.; SILVA, M. D. S. Fungitoxicidade dos extratos vegetais e do óleo essencial de *Lippia gracilis* Schauer sobre o fungo *Monosporascus cannonballus* Pollack e Uecker. **Summa Phytopathologica**. v. 41. n. 2. p. 153-155. 2015. <http://dx.doi.org/10.1590/0100-5405/1978>

FERREIRA, F. D.; KEMMELMEIER, C.; ARROTÉIA, C. C.; COSTA, C. L.; MALLMANN, C. A.; JANEIRO, V.; FERREIRA, F. M. D.; MOSSINI, S. A. G.; SILVA, E. L.; MACHINSKI JÚNIOR, M. Inhibitory effect of the essential oil of *Curcuma longa* L. and curcumin on aflatoxin production by *Aspergillus flavus* Link. **Food Chemistry**. v. 136. p. 789-793. 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.08.003>

FILIPPI, J.; BELHASSEN, E.; BALDOVINI, N.; BREVARD, H.; MEIERHENRICH, U. J. Qualitative and quantitative analysis of vetiver essential oil by comprehensive two-dimensional gas chromatography and comprehensive two-dimensional gas chromatography/mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**. v. 1288. p. 127-148. 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2013.03.002>

FREIRE, F. C.O.; VIEIRA, I. G. P.; GUEDES, M. I. F.; MENDES, F. N. P. Micotoxinas; Importância na alimentação e na saúde humana e animal. **Embrapa Agroindústria Tropical Fortaleza, CE**. 2007. Disponível em <http://www.cnpat.embrapa.br/cd/jss/acervo/Dc_110.pdf>. Acesso em: 27 de julho de 2017.

FONTENELLE, R. O. S.; MORAIS, S. M.; BRITO, E. H. S.; KERNTOPF, M. R.; BRILHANTE, R. S. N.; CORDEIRO, R. A.; TOMÉ, A. R.; QUEIROZ, M. G. R.; NASCIMENTO, N. R. F.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. Chemical composition, toxicological aspects and antifungal activity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 59. p. 934-940. 2007. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkm066>

FUNARI, C. S.; GULLO, F. P.; NAPOLITANO, A.; CARNEIRO, R. L.; MENDES-GIANNINI, M. J. S.; FUSCO-ALMEIDA, A. M.; PIACENTE, S.; PIZZA, C.; SILVA, D. H. S. Chemical and antifungal investigations of six *Lippia* species (Verbenaceae) from Brazil. **Food Chemistry**. v. 135. p. 2086-2094. 2012. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.06.077>

GACEM, M. A.; HADJ-KHELIL, A. O. Toxicology, biosynthesis, bio-control of aflatoxin and new methods of detection. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**. v. 6. n. 9. p. 808-814. 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.apjtb.2016.07.012>

GEISEN, R. Multiplex polymerase chain reaction for the detection of potential aflatoxin and sterigmatocystin producing fungi. **Systematic and Applied Microbiology**. v. 19. p. 388-392. 1996. [http://dx.doi.org/10.1016/S0723-2020\(96\)80067-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0723-2020(96)80067-1)

GERAGE, J. M.; MEIRA, A. P. G.; SILVA, M. V. Food and nutrition security: pesticide residues in food. **Nutrire Journal**. v. 42. n. 3. p. 1-9. 2017. <http://dx.doi.org/10.1186/s41110-016-0028-4>

GÓMEZ, J. V.; TARAZONA, A.; MATEO-CASTRO, R.; GIMENO-ADELANTADO, J. V.; JIMÉNEZ, M.; MATEO, E. M. Selected plant essential oils and their main active components, a promising approach to inhibit aflatoxigenic fungi and aflatoxin production in food. **Food Additives and Contaminants**. v. 35. p. 1581-1595. 2018. <http://dx.doi.org/10.1080/19440049.2017.1419287>

GOMIDE, M. S.; LEMOS, F. O.; LOPES, M. T. P.; ALVES, T. M. A.; VICCINI, L. F.; COELHO, C. M. The effect of the essential oils from five different *Lippia* species on the

viability of tumor cell lines. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 23. p. 895-902. 2013. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2013000600006>

GONÇALVES, A. H.; PEREIRA, A. S.; SANTOS, G. R. S.; GUIMARÃES, L. G. L. Atividade fungitóxica **in vitro** dos óleos essenciais de **Lippia sidoides** Cham., **Cymbopogon citratus** (D.C.) Stapf. e de seus constituintes majoritários no controle de **Rhizoctonia solani** e **Sclerotium rolfsii**. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v. 17. n. 4. P. 1007-1015. 2015. http://dx.doi.org/10.1590/1983-084x/14_166

GUERRA, R. A. T.; KANAGAWA, A. I.; SANTOS, C. F.; SILVA, F. S.; SOUSA, F. B.; CAVALCANTI, G. A.; LUBENOW, J. A.; SILVA, M. B.; NEVES, M. A.; MENEZES, R. **Cadernos cb virtual: volume 2**. João Pessoa. 2011. Disponível em <http://portal.virtual.ufpb.br/biologia/novo_site/Biblioteca/Livro_2/5-fungos_briofitas.pdf>. Acesso em 23 de agosto de 2017.

GUIMARÃES, C. C.; FERREIRA, T. C.; OLIVEIRA, R. C. F.; SIMIONI, P. U.; UGRINOVICH, L. A. Atividade antimicrobiana in vitro do extrato aquoso e do óleo essencial do alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) e do cravo-da-índia (*Caryophyllus aromaticus* L.) frente a cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. **Revista Brasileira de Biociências**. v. 15. n. 2. p. 83-89. 2017.

GUIMARÃES, L. G. L.; CARDOSO, M. G.; SOUZA, R. M.; ZACARONI, A. B.; SANTOS, G. R. Óleo essencial de *Lippia sidoides* nativas de Minas Gerais: Composição, estruturas secretoras e atividade antibacteriana. **Revista Ciência Agronômica**. v. 45. n. 2. p. 264-245. 2014.

GULLO, F. P.; FUSCO-ALMEIDA, A. M.; MENDES-GIANNINI, M. J. S.; MARTINS, M. B. G.; CAMARGO, F. R.; HENRICH, S. V.; MARTINEZ, V. B.; MOREIRA, R. R. D. Essential oils and major compounds of *Hedychium coronarium* Koenig (Zingiberaceae) against pathogenic yeast of *Candida* and *Cryptococcus* genus. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**. v. 37. n. 1. p. 1-6. 2016.

HAJLAOUI, H.; SNOUSSI, M.; NOUMI, E.; ZANETTI, S.; KSOURI, R.; BAKHROUF, A. Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of the essential oil of five tunisian aromatic plants. **Italian Journal of Food Science**. v. 22. n. 3. p. 320-329. 2010.

HANTAO, L. W.; ALEME, H. G.; PEDROSO, M. P.; SABIN, G. P.; POPPI, R. J.; AUGUSTO, F. Multivariate curve resolution combined with gas chromatography to enhance analytical separation in complex samples: A review. **Analytica Chimica Acta**. v. 731. p. 11-23. 2012. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2012.04.003>

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. p. 1677-1692. 2007. <http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.2007/007641-0>

HERNANDEZ-OCHOA, L.; VILAREM, G.; MOULOUNGUI, Z.; MEDINA-GONZALEZ, Y. Comparing the effect of utilization of ethyl heptanoate as co-solvent during extraction of essential oil of *Inula helenium* in a hydrodistillation process. **Chemistry of Natural Compounds**. v. 47. n. 6. p. 995-997. 2012. <http://dx.doi.org/10.1007/s10600-012-0127-2>

HOJNIK, N.; CVELBAR, U.; TAVCAR-KALCHER, G.; WALSH, J. L.; KRIZAJ, I. Mycotoxin decontamination of food: cold atmospheric pressure plasma versus “classic” decontamination. **Toxins**. v. 9. n. 151. p. 1-19. 2017. <http://dx.doi.org/10.3390/toxins9050151>

HOLETZ, F. B.; PESSINI, G. L.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A. G.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 97. n. 7. p. 1027-1037. 2002. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762002000700017>

HU, Y.; ZHANG, J.; KONG, W.; ZHAO, G.; YANG, M. Mechanisms of antifungal and anti-aflatoxigenic properties of essential oil derived from turmeric (*Curcuma longa* L.) on *Aspergillus flavus*. **Food Chemistry**. v. 220. p. 1-8. 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.179>

HUSSAIN, I. Aflatoxin measurement and analysis. 364 p. In: I. Torres- Pacheco. *Aflatoxins – detection, measurement and control*, Rijeka, Ed. Intech, 2011.

ISHIDA, K.; MELLO, J. C. P.; CORTEZ, D. A. C.; DIAS FILHO, B. D.; UEDA-NAKAMURA, T.; NAKAMURA, C. V. Influence of tannins from *Stryphnodendron adstringens* on growth and virulence factors of *Candida albicans*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 58. p. 942-949. 2006. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkl377>

JALALI- HERAVI, M.; MOAZENI, R. S.; SERESHTI, H. Analysis of Iranian rosemary essential oil: Application of gas chromatography-mass spectrometry combined with chemometrics. **Journal of Chromatography A**. v. 1218. p. 2569-2576. 2011. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2011.02.048>

JANTAPAM, K.; POAPOLATHEP, A.; IMSILP, K.; POAPOLATHEP, S.; TANHAN, P.; KUMAGAI, S.; JERMNAK, U. Inhibitory effects of thai essentials oils on potentially aflatoxigenic *Aspergillus parasiticus* and *Aspergillus flavus*. **Biocontrol Science**. v. 1. n. 22. p. 31-40. 2017. <http://dx.doi.org/10.4265/bio.22.31>

KALEMBRA, D.; KUNICKA, A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. **Current Medicinal Chemistry**. v. 10. p. 813-829. 2003.

KARLOVSKY, P. Enzymatic detoxification of mycotoxins for health food. **New Food**. v. 17. 2014.

KARLOVSKY, P.; SUMAN, M.; BERTHILLER, F.; MEESTER, J.; EISENBRAND, G.; PERRIN, I.; OSWALD, I. P.; SPEIJERS, G.; CHIODINI, A.; RECKER, T.; DUSSORT, P. Impact of food processing and detoxification treatments on mycotoxin contamination. **Mycotoxin Research**. v. 32. p. 179-205. 2016. <http://dx.doi.org/10.1007/s12550-016-0257-7>

KATSURAYAMA, A. M.; TANIWAKI, M. H. Fungos e aflatoxinas no arroz: ocorrência e significado na saúde do consumidor. **Brazilian Journal of Food Technology**. v. 20. p. 1-13. 2017. <http://dx.doi.org/10.1590/1981-6723.0617>

KEDIA , A.; DWIVEDY, A. K.; JHA, D. K.; DUBEY, N. K. Efficacy of *Mentha spicata* essential oil in suppression of *Aspergillus flavus* and aflatoxin contamination in chickpea with

particular emphasis to mode of antifungal action. **Protoplasma**. v. 253. p. 647-653. 2016. <http://dx.doi.org/10.1007/s00709-015-0871-9>

KEDIA, A.; PRAKASH, B.; MISHRA, P. K.; DUBEY, N. K. Antifungal and antiaflatoxic properties of *Cuminum cyminum* (L.) seed essential oil and its efficacy as a preservative in stored commodities. **International Journal of Food Microbiology**. v. 168-169. p. 1-7. 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.10.008>

KLICH, M. A. *Aspergillus flavus*: the major producer of aflatoxin. **Molecular Plant Pathology**. v. 8. n. 6. p. 713-722. 2007. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1364-3703.2007.00436.x>

KLICH, M. A.; PITY, J. I. **A Laboratory Guide to the Common Aspergillus Species and Their Teleomorphs**. 116 p. CSIRO - Division of Food Processing, Austrália, 2002.

KOHIYAMA, C. Y.; RIBEIRO, M. M. Y.; MOSSINI, S. A. G.; BANDO, E.; BOMFIM, N. S.; NERILO, S. B.; ROCHA, G. H. O.; GREPAN, R.; MIKCHA, J. M. G.; MACHINCKI JÚNIOR, M. Antifungal properties and inhibitory effects upon aflatoxin production of *Thymus vulgaris* L. by *Aspergillus flavus* Link. **Food Chemistry**. v. 173. p. 1006-1010. 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.10.135>

KOSEGARTEN, C. E.; RAMÍREZ-CORONA, N.; MANI-LOPÉZ, E.; PALOU, E.; LOPÉZ-MALO, A. Description of *Aspergillus flavus* growth under the influence of different factors (water activity, incubation temperature, protein and fat concentration, pH, and cinnamon essential oil concentration) by kinetic, probability of growth, and time-to-detection models. **International Journal of Food Microbiology**. v. 240. p. 115-123. 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.04.024>

KOSHIMA, C. C.; CAPELLINI, M. C.; GEREMIAS, I. M.; ARACAVALA, K. K.; GONÇALVES, C. B.; RODRIGUES, C. E. C. Fractionation of lemon essential oil by solvent extraction: Phase equilibrium for model system at T=298.2 K. **Journal of Chemical Thermodynamics**. v. 54. p. 316-321. 2012. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jct.2012.05.011>

LAGO, S.; RODRÍGUEZ, H.; ARCE, A.; SOTO, A. Improved concentration of citrus essential oil by solvent extraction with acetate ionic liquids. **Fluid Phase Equilibria**. v. 361. p. 37-44. 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fluid.2013.10.036>

LAN, W.; ZHANG, H. P.; WANG, Y.; JIANG, M.; LI, Q.; AN, D. Antihypertensive effect of piperitenone oxide on spontaneously hypertensive rat by regulating calcium balance and reducing endothelin-1 secretion. **Journal of Bangladesh Pharmacological Society**. v. 12. p. 341-347. 2017. <http://dx.doi.org/>

LEAL, T. T. B.; OLIVEIRA, F. E. R.; OLIVEIRA, V. C.; GONZALEZ, S. D. P.; SILVA, R. M.; REIS, A. S.; SILVA, F. Extrato de Pimenta dioica no controle *in vitro* de *Aspergillus niger*, patógeno da cultura do sisal. **Magistra**. v. 28. n. 2. p. 254-260. 2016.

LI, Y.; CHANG, W.; ZHANG, M.; YING, Z.; LOU, H. Natural product solasodine-3-O- β -D-glucopyranoside inhibits the virulence factors of *Candida albicans*. **FEMS Yeast Research**. v. 15. n. 6. p. 1-8. 2015. <http://dx.doi.org/>

LI, Z.; NJATENG, G. S. S.; HE, W.; ZHANG, H.; GU, J.; CHEN, S.; DU, Z. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil from the edible aromatic plant *Aristolochia delavayi*. **Chemistry & Biodiversity**. v. 10. n. 11. p. 2032-2041. 2013. <http://dx.doi.org/10.3329/bjp.v12i3.32413>

LIANG, D.; XING, F.; SELVARAJ, J. N.; LIU, X.; WANG, L.; HUA, H.; ZHOU, J.; 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. 12. n. 80. p. 2917-2924. 2015. <http://dx.doi.org/10.1111/1750-3841.13144>

LIMA, A. E. F.; CASTRO, E. A.; FERREIRA, D. A.; ABREU, C. M. W. S.; COLEHO, E. L.; SÁ, D. M. A. T. Rendimento, caracterização química e atividade antibacteriana do óleo essencial de capim limão coletado em diferentes horários. **Magistra**. v. 28. n. 3-4. p. 369-378. 2016.

LIMA, I. O.; OLIVEIRA, R. A. G.; LIMA, E. O.; FARIAS, N. M. P.; SOUZA, E. L. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 16. n. 2. p. 197-201. 2006. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2006000200011>

LINDE, J. H.; COMBRINCK, S.; REGNIER, T. J. C.; VIRIJEVIC, S. Chemical composition and antifungal activity of the essential oil of *Lippia rehmannii* from South Africa. **South Africa Journal of Botany**. v. 76. p. 37-42. 2010. <http://dx.doi.org/10.1016/j.sajb.2009.06.011>

LLANA-RUÍZ-CABELLO, M.; PICHARDO, S.; JIMÉNEZ-MORILLO, N.; BERMÚDEZ, J. M.; AUCEJO, S.; GONZÁLEZ-VILA, F. J.; CAMEÁN, A. M.; GONZÁLEZ-PÉREZ, J. A. Molecular characterisation of a bio-based active packaging containing *Origanum vulgare* L. essential oil using pyrolysis gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v. 96. p. 3207-3212. 2016. <http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.7502>

LUCENA, B. F. F.; TINTINO, S. R.; FIGUEREDO, F. G.; OLIVEIRA, C. D. M.; AGUIAR, J. J. S.; CARDOSO, E. N.; AQUINO, P. E. A.; ANDRADE, J. C.; COUTINHO, H. D. M.; MATIAS, E. F. F. Avaliação da atividade antibacteriana e moduladora de aminoglicosídeos do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. **Acta Biológica Colombiana**. v. 20. n. 1. p. 39-45. 2015. <http://dx.doi.org/10.15446/abc.v20n1.41673>

MACHADO, T. F.; BORGES, M. F.; BRUNO, L. M. Aplicação de antimicrobianos naturais na conservação de alimentos. **Embrapa Agroindústria Tropical Fortaleza, CE**. 2011. Disponível em < www.cnpat.embrapa.br/download_publicacao.php?id=341 >. Acesso em 26 de agosto de 2017.

MAIA, T. F.; DONATO, A.; FRAGA, M. E. Atividade antifúngica de óleos essenciais de plantas. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**. v. 17. n.1. p. 105-116. 2015.

MANSO, S.; PEZO, D.; GÓMEZ-LUS, R.; NERÍN, C. Diminution of aflatoxin B₁ production caused by an active packaging containing cinnamon essential oil. **Food Control**. v. 45. p. 101-108. 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.04.031>

MARÓSTICA JÚNIOR, M. R.; PASTORE, G. M. Biotransformação de limoneno: uma revisão das principais rotas metabólicas. **Química Nova**. v. 30. n. 2. p. 382-387. 2007. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422007000200027>

MARTINS, L. M.; SANT'ANA, A. S.; IAMANAKA, B. T.; BERTO, M. I.; PITT, J. I.; TANIWAKI, M. H. Kinetics of aflatoxin degradation during peanut roasting. **Food Research International**. v. 97. p. 178-183. 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2017.03.052>

MEDEIROS, R. T. S.; GONÇALEZ, E.; FELICIO, R. C.; FELICIO, J. D. Evaluation of antifungal activity of *Pittosporum undulatum* L. essential oil against *Aspergillus flavus* and aflatoxin production. **Ciência e Agrotecnologia Lavras**. v. 35. n. 1. p. 71-76. 2011. <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542011000100008>

MERCIER, B.; PROST, J.; PROST, M. The essential oil of turpentine and its major volatile fraction (α - and β -pinenes): a review. **International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health**. v. 22. n. 4. p. 331-342. 2009. <http://dx.doi.org/10.2478/v10001-009-0032-5>

MIRA DE BONA, E. A.; PINTO, F. G. S.; FRUET, T. K.; JORGE, T. C. M.; MOURA, A. C. Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de extratos vegetais aquosos e etanólicos. **Arquivos do Instituto de Biologia**. v. 81. n. 3. p. 218-225. 2014. <http://dx.doi.org/10.1590/1808-1657001192012>

MIRANDA, C. A. S. F.; CARDOSO, M. G.; BATISTA, L. R.; RODRIGUES, L. M. A.; FIGUEIREDO, A. C. S. Óleos essenciais de folhas de diversas espécies: propriedades antioxidantes e antibacterianas no crescimento espécies patogênicas. **Revista Ciência Agronômica**. v. 47. n. 1. p. 213-220. 2016. <http://dx.doi.org/10.5935/1806-6690.20160025>

MISHRA, P. K.; SHUKLA, R.; SINGH, P.; PRAKASH, B.; KEDIA, A.; DUBEY, N. K. Antifungal, anti-aflatoxigenic, and antioxidant efficacy of Jaromsa essential oil for preservation of herbal raw materials. **International Biodeterioration & Biodegradation**. v. 74. p. 11-16. 2012. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2012.06.026>

MORAES, A. M. L.; PAES, R. A.; HOLANDA, V. L. Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde: volume 4. **Fundação Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro. 2010. Disponível em < <http://www.epsjv.fiocruz.br/sites/default/files/cap4.pdf> >. Acesso em 23 de agosto de 2017.

MORAIS, L. A. S. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. **Horticultura Brasileira**. v. 27. n. 2. 2009. Disponível em: < http://www.abhorticultura.com.br/eventosx/trabalhos/ev_3/P_4_Palestra_Resumo_Lilia_Ap.pdf >. Acesso em: 11 de fevereiro de 2018.

MOOSAVI-NASAB, M.; JAMALIAN, J.; HESHMATI, H.; HAGHIGHI-MANESH, S. The inhibitory potential of *Zataria multiflora* and *Syzygium aromaticum* essential oil on growth and aflatoxin production by *Aspergillus flavus* in culture media and Iranian white cheese. **Food Science and Nutrition**. v. 6. p. 318-342. 2018. <http://dx.doi.org/10.1002/fsn3.557>

NAKAMURA, Y.; HASEGAWA, Y.; SHIROTA, K.; SUETOME, N.; NAKAMURA, T.; CHOMNAWANG, M. T.; THIRAPANMETHEE, K.; KHUNTAYAPORN, P.; BOONYARITTHONGCHAI, P.; WONGS-AREE, C.; OKAMOTO, S.; SHIGETA, T.; MATSUO, T.; PARK, E. Y.; SATO, K. Differentiation-inducing effect of piperitenone oxide, a fragrant ingredient of spearmint (*Mentha spicata*), but not carvone and menthol, against human colon cancer cells. **Journal of Functional Food**. v. 8. p. 62-67. 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2014.03.005>

NASCIMENTO, A. M. D.; MAIA, T. D. S.; SOARES, T. E. S.; MENEZES, L. R. A.; SCHER, R.; COSTA, E. V.; CAVALCANTI, S. C. H.; CORTE, R. Repellency and larvicidal activity of essential oils from *Xylopi laevigata*, *Xylopi frutescens*, *Lippia pedunculosa*, and their individual compounds against *Aedes aegypti* Linnaeus. **Neotropical Entomology**. v. 46. p. 223-230. 2017. <http://dx.doi.org/10.1007/s13744-016-0457-z>

NIKBAKHT NASRABADI, E.; JAMALUDDIN, R.; ABDUL MUTALIB, M. S.; KHAZA'AI, H.; KHALESI, S.; MOHD REDZWAN, S. Reduction of aflatoxin level in aflatoxin-induced rats by the activity of probiotic *Lactobacillus casei* strain Shirota. **Journal of Applied Microbiology**. v. 114. p. 1507-1515. 2013. <http://dx.doi.org/10.1111/jam.12148>

NOGUEIRA, M. A.; DIAZ, G.; SAKUMO, L. Caracterização química e atividade biológica do óleo essencial de *Lippia alba* cultivada no Paraná. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**. v. 28. n. 3. p. 273-278. 2007

OLIVEIRA, L. B. S.; BATISTA, A. H. M.; FERNANDES, F. C.; SALES, G. W. P.; NOGUEIRA, N. A. P. Atividade antifúngica e possível mecanismo de ação do óleo essencial de folhas de *Ocimum gratissimum* (Linn.) sobre espécies de *Candida*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v. 18. n. 2. p. 511-523. 2016. http://dx.doi.org/10.1590/1983-084X/15_222

OLIVEIRA, A. R. M. F. Morfoanatomia, composição química e atividade biológica do óleo essencial de espécies nativas de *Lippia*. 116 f. Tese (Doutorado) – **Universidade Estadual de Feira de Santana**. 2014.

OLIVEIRA, D. R.; LEITÃO, G. G.; FERNANDES, P. D.; LEITÃO, S. G. Ethnopharmacological studies of *Lippia origanoides*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 24. p. 206-214. 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjp.2014.03.001>

OLIVEIRA, L. S. F.; KOLLER, F. F. C. Ocorrência de *Aspergillus* spp. e aflatoxinas em amostras de amendoim in natura e paçocas. **Revista de Ciências Ambientais, Canoas**. v. 5. n. 1. p. 57-68. 2011. <http://dx.doi.org/10.18316/137>

OLIVEIRA, D. R.; LEITÃO, G. G.; SANTOS, S. S.; BIZZO, H. R.; LOPES, D.; ALVIANO, C. S.; ALVIANO, D. S.; LEITÃO, S. G. Ethnopharmacological study of two *Lippia* species from Oriximiná, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 108. p. 103-108. 2006. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2006.04.018>

OSTROSKY, E. A.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E. L.; KANEKO, T. M.; NISHIKAWA, S. O.; FREITAS, B. R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de**

Farmacognosia. v. 18. n. 2. p. 301-307. 2008. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2008000200026>

OUMZIL, H.; GHOULAMI, S.; RHAJAOU, M.; ILIDRISSI, A.; FKIH-TETOUANI, S.; BENJOUAD, J. Antibacterial and antifungal activity of essential oils of *Mentha suaveolens*. **Phytotherapy Research**. v. 16. n. 8. p. 727-731. 2002. <http://dx.doi.org/10.1002/ptr.1045>

PANDEY, A. K.; SONKER, N.; SINGH, P. Efficacy of some essential oils against *Aspergillus flavus* with special reference to *Lippia alba* oil as an inhibitor of fungal proliferation and aflatoxin B₁ production in green gram seeds during storage. **Journal of Food Science**. v. 81. n. 4. p. 928-934. 2016. <http://dx.doi.org/10.1111/1750-3841.13254>

PANKAJ, S. K.; SHI, H.; KEENER, K. M. A review of novel physical and chemical decontamination technologies for aflatoxins in food. **Trends in Food Science and Technology**. v. 71. p. 73-83. 2018. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2017.11.007>

PARANAGAMA, P. A.; ABEYSEKERA, K. H. T.; ABEYWICKRAMA, K.; NUGALIYADDE, L. Fungicidal and anti-aflatoxigenic effects of the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. (lemon grass) against *Aspergillus flavus* Link. isolated from stored rice. **Letters in Applied Microbiology**. v. 37. p. 86-90. 2003. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1472-765X.2003.01351.x>

PARIKH, J. K.; DESAI, M. A. Hydrodistillation of essential oil from *Cymbopogon flexuosus*. **International Journal of Food Engineering**. v. 7. n. 1. p. 1-9. 2011. <http://dx.doi.org/10.2202/1556-3758.2067>

PEREIRA, N. L. F.; AQUINO, P. E. A.; SILVA, M. R.; NASCIMENTO, E. M.; GRANGEIRO, A. R. S.; OLIVEIRA, C. D. M.; TINTINO, S. R.; FIGUEIREDO, F. G.; VERAS, H. N. H.; MENEZES, I. R. A. Efeito antibacteriano e anti-inflamatório tópico do extrato metanólico de *Chenopodium ambrosioides* L. **Revista Fitos**. v. 9. n. 2. p. 101-112. 2015. <http://dx.doi.org/10.5935/2446-4775.20150009>

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, Lavras**. v. 30. n. 4. p. 731-738. 2006. <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542006000400020>

PRAKASH, B.; KEDIA, A.; MISHRA, P. K.; DUBEY, N. K. Plant essential oils as food preservatives to control moulds, mycotoxin contamination and oxidative deterioration of agricultural commodities – potentials and challenges. **Food Control**. v. 47. p. 381-391. 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.07.023>

PRAKASH, B.; SINGH, P.; KEDIA, A.; DUBEY, N. K. Assessment of some essential oils as food preservatives based on antifungal, anti-aflatoxin, antioxidant activities and *in vivo* efficacy in food system. **Food Research International**. v. 49. p. 201-208. 2012. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2012.08.020>

PÉRINO-ISSARTIER, S.; GINIES, C.; CRAVOTTO, G.; CHEMAT, F. A comparison of essential oils obtained from lavender via different extraction processes: Ultrasound,

microwave, turbohydrodistillation, steam and hydrodistillation. **Journal of Chromatography A**. v. 1305. p. 41-47. 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2013.07.024>

QUEIROZ, M. R. A.; ALMEIDA, A. C.; ANDRADE, V. A.; LIMA, T. S.; MARTINS, E. R.; FIGUEIREDO, R. S.; CARELI, R. T. Avaliação da atividade antibacteriana do óleo essencial de *Lippia origanoides* frente à *Staphylococcus aureus* sp. isolados de alimentos de origem animal. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v. 16. n.3. p. 737-743. 2014. http://dx.doi.org/10.1590/1983-084X/13_083

RAMÍREZ, M. L.; CENDOYA, E.; NICHEA, M. J.; ZACHETTI, V. G. L.; CHULZE, S. N. Impact of toxigenic fungi and mycotoxins in chickpea: a review. **Current Opinion in Food Science**. v. 23. p. 32-37. 2018. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cofs.2018.05.003>

RAOTA, C. S.; GIOVANELA, M. Análise quantitativa de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ em ração para aves de corte por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência. **Scientia cum Industria**. v. 4. n. 3. p. 148-153. 2016. <http://dx.doi.org/10.18226/23185279.v4iss3p148>

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. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.05.055>

REIS, G. M. Variabilidade genética de cepas de *Aspergillus flavus* isoladas de amendoim. 41 f. Dissertação (Mestrado). **Universidade de São Paulo**. 2009.

RIOS, J. L.; RECIO, M. C.; VILLAR, A. Screening methods for natural products with antimicrobial activity: a review of the literature. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 23. p. 127-149. 1988. [http://dx.doi.org/10.1016/0378-8741\(88\)90001-3](http://dx.doi.org/10.1016/0378-8741(88)90001-3)

RITTER, A. C. Potencial toxigênicos de *Aspergillus flavus* testado em diferentes meios e condições. 72 f. Dissertação (Mestrado). **Universidade Federal do Rio Grande do Sul**. 2007.

ROCHA, M. E. B.; FREIRE, F. C. O.; MAIA, F. E. F.; GUEDES, M. I. F.; RONDINA, D. Mycotoxins and their effects on human and animal health. **Food Control**. v. 36. p. 159-165. 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.08.021>

RUMIATO, A. C.; MONTEIRO, I. Contaminantes em alimentos e orientação nutricional: Reflexão teórica. **Revista de Saúde Pública**. v. 19. p. 574-577. 2017. <http://dx.doi.org/10.15446/rsap.v19n4.41939>

SALES, G. W. P.; BATISTA, A. H. M.; OCHA, L. Q.; NOGUEIRA, N. A. P. Efeito antimicrobiano e modulador do óleo essencial extraído da casca de frutos da *Hymenaea courbaril* L. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**. v. 35. n. 4. p. 709-715. 2014.

SANTOS, A. C. B.; NUNES, T. S.; COUTINHO, T. S.; SILVA, M. A. P. Uso popular de espécies medicinais da família Verbenaceae no Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, Campinas**. v. 17. n. 4. p. 980-991. 2015. http://dx.doi.org/10.1590/1983-084X/14_083

SARRAZIN, S. L. F.; SILVA, L. A.; OLIVEIRA, R. B.; RAPOSO, J. D. A.; SILVA, J. K. R.; SALIMENA, F. R. G.; MAIA, J. G. S.; MOURÃO, R. H. V. Antibacterial action against food-borne microorganisms and antioxidant activity of carvacrol-rich oil from *Lippia origanoides* Kunth. **Lipids in Health and Disease**. v. 14. n. 145. p. 2-8. 2015a. <http://dx.doi.org/10.1186/s12944-015-0146-7>

SARRAZIN, S. L. F.; SILVA, L. A.; ASSUNÇÃO, A. P. F.; OLIVEIRA, R. B.; CALAO, V. Y. P.; SILVA, R.; STASHENKO, E. E.; MAIA, J. G. S.; MOURÃO, R. H. V. Antimicrobial and seasonal evaluation of the carvacrol-chemotype oil from *Lippia origanoides* Kunth. **Molecules**. v. 20. n. 2. p. 1860-1871. 2015b. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules20021860>

SCAGLIONI, P. T.; BECKER-ALGERI, T.; DRUNKLER, D.; BADIALE-FURLONG, E. Aflatoxin B1 and M1 in milk. **Analytica Chimica Acta**. v. 829. p. 68-74. 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2014.04.036>

SCHATZMAYR, G.; STREIT, E. Global occurrence of mycotoxins in the food and feed chain: facts and figures. **World Mycotoxin Journal**. v. 6. n. 3. p. 213-222. 2013. <http://dx.doi.org/10.3920/WMJ2013.1572>

SCHNEIDER, S.; MORSCHHAUSER, J. Induction of *Candida albicans* drug resistance genes by hybrid zinc cluster transcription factors. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 59. n. 1. p. 558-569. 2015. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.04448-14>

SCOTTO, C.; BURGER, P.; MICHEL, T.; KHIL, M. K.; GINOUVES, M.; PREVOT, G.; BLANCHET, D.; DELPRETE, P.G.; FERNANDEZ, X. Antifungal activities and chemical composition of the essential oil of *Lippia micromera* (Verbenaceae) cultivated in French Guiana. **Planta Medica**. v. 82. suppl. 1. p. S1-S381. 2016. <http://dx.doi.org/10.1055/s-0036-1596570>

SHAFREEN, B.; MOHAMED, R.; SUBRAMANIAN, M.; SHUNMUGIAH, K. P. Inhibition of *Candida albicans* virulence factors by novel levofloxacin derivatives. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 8. p. 6775-6785. 2014. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-014-5719-2>

SILVA, F. C.; CHALFOUN, S. M.; SIQUEIRA, V. M.; BOTELHO, D. M. S.; LIMA, N.; BATISTA, L. R. Evaluation of antifungal activity of essential oils against potentially mycotoxigenic *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 22. n. 5. p. 1002-1010. 2012. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2012005000052>

SILVA, N. A.; OLIVEIRA, F. F.; COSTA, L. C. B.; BIZZO, H. R.; OLIVEIRA, R. A. Caracterização química do óleo essencial da erva cidreira (*Lippia alba* (Mill.) N. E. Br.) cultivada em Ilhéus na Bahia. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v. 8. n. 3. p. 52-55. 2006.

SILVEIRA, L. M. S.; OLEA, R. S. G.; MESQUITA, J. S.; CRUZ, A. L. N.; MENDES, J. C. Metodologias de atividade antimicrobiana aplicadas a extratos de plantas: comparação entre duas técnicas de ágar difusão. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 90. n. 2. p. 124-128. 2009.

SNIGDHA, M.; HARIPRASAD, P.; VENKATESWARAN, G. Transport via xylem and accumulation of aflatoxin in seeds of groundnut plant. **Chemosphere**. v. 119. p. 524-529. 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.07.033>

SOARES, C.; MORALES, H.; FARIA, J.; FIGUEIREDO, A. C.; PEDRO, L. G.; VENÂNCIO, A. Inhibitory effect of essential oils on growth and on aflatoxins production by *Aspergillus parasiticus*. **World Micotoxin Journal**. v. 9. n. 4. p. 525-534. 2016. <http://dx.doi.org/10.3920/WMJ2015.1987>

SOTTO, A.; GIACOMO, S.; ABETE, L.; BOZOVIC, M.; PARISI, O. A.; BARIEL, F.; VITALONE, A.; IZZO, A. A.; RAGNO, R.; MAZZANTI, G. Genotoxicity assessment of piperitenone oxide: An *in vitro* and *in silico* evaluation. **Food and Chemical Toxicology**. v. 106. p. 506-513. 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2017.06.021>

SRIVIDYA, N.; DAVIS, E. M.; CROTEAU, R. B.; LANGE, B. M. Functional analysis of (4S)-limonene synthase mutants reveals determinants of catalytic outcome in a model monoterpene synthase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 112. n. 11. p. 3332-3337. 2015. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1501203112>

TAHEUR, F. B.; FEDHILA, K.; CHAIEB, K.; KOUIDHI, B.; BAKHROUF, A.; ABRUNHOSA, L. Adsorption of aflatoxin B1, zearalenone and ochratoxin A by microorganism isolated from Kefir grains. **International Journal of Food Microbiology**. v. 251. p. 1-7. 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.03.021>

TELES, N. S. B.; FECHINE, F. V.; VIANA, F. A. C.; VIANA, I. O. L.; NASCIMENTO, D. F.; LEITE, A. L. A. S.; BEZERRA, F. A. F.; MORAES, M. O.; MORAES, M. E. A. Evaluation of the therapeutic efficacy of *Mentha crispata* in the treatment of giardiasis. **Contemporary Clinical Trials**. v. 32. p. 809-813. 2011. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cct.2011.08.005>

THE UNIVERSITY OF ADELAIDE. **Mycology Online**. 2016. Disponível em <http://www.mycology.adelaide.edu.au/descriptions/hyphomycetes/aspergillus/>. Acesso em 23 de agosto de 2017.

TIAN, J.; BAN, X.; ZENG, H.; HE, J.; HUANG, B.; WANG, Y. Chemical composition and antifungal activity of essential oil from *Cicuta virosa* L. var. *latisecta* Celak. **International Journal of Food Microbiology**. v. 145. p. 464-470. 2011. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.01.023>

TOMAZONI, E. Z.; PANSERA, M. R.; PAULETTI, G. F.; MOURA, S.; RIBEIRO, R. T. S.; SCHWAMBACH, J. *In vitro* antifungal activity of four chemotypes of *Lippia alba* (Verbenaceae) essential oils against *Alternaria solani* (Pleosporaceae) isolates. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. v. 88. n. 2. p. 999-1010. 2016. <http://dx.doi.org/10.1590/0001-3765201620150019>

TONGNUANCHAN, P.; BENJAKUL, S. Essential oils: Extraction, bioactivities and their uses for food preservation. **Journal of Food Science**. v. 79. n. 7. p. 1231-1249. 2014. <http://dx.doi.org/10.1111/1750-3841.12492>

TRANCHIDA, P. Q.; ZOCCALI, M.; BONACCORSI, I.; DUGO, P.; MONDELLO, L.; DUGO, G. The off-line combination of high performance liquid chromatography and

comprehensive two-dimensional gas chromatography-mass spectrometry: A powerful approach for highly detailed essential oil analysis. **Journal of Chromatography A**. v. 1305. p. 276-284. 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2013.07.042>

TRIPATHI, A. K.; PRAJAPATI, V.; AHMAD, A.; AGGARWAL, K. K.; KHANUJA, S. P. S. Piperitenone oxide as toxic, repellent, and reproduction retardant toward malarial vector *Anopheles stephensi* (Diptera: Anophelinae). **Journal of Entomology**. v. 41. n. 4. p. 691-698. 2004. <http://dx.doi.org/10.1603/0022-2585-41.4.691>

TRUCKSESS, M. W.; STACK, M. E.; NESHEIM, S.; ALBERT, R. H.; ROMER, T. R. Multifunctional column coupled with liquid chromatography for determination of aflatoxins B1, B2, G1, G2 in corn, almonds, Brazil nuts, peanuts and pistachionuts: collaborative study. **Journal of AOAC International**. v. 6. p.1512-1521. 1994.

UDOMKUN, P.; WIREDU, A. N.; NAGLE, M.; MULLER, J.; VANLAUWE, B.; BANDYOPADHYAY, R. Innovative technologies to manage aflatoxins in foods and feeds and the profitability of application - A review. **Food Control**. v. 76. p. 127-138. 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.01.008>

VALGAS, C.; SOUZA, S. M.; SMÂNIA, E. F. A.; SMÂNIA JÚNIOR, A. Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 38. p. 369-380. 2007. <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822007000200034>

VIEGAS, E. C. Emprego de óleos essenciais de plantas medicinais no controle de *Aspergillus* spp. em sementes de amendoim (*Arachis hypogaea* L.). 78 f. Tese (Doutorado). **Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro**. 2004.

VIEGAS JÚNIOR, C. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. **Química Nova**. v. 26. n. 3. p. 390-400. 2003. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422003000300017>

WANG, X.; LIU, W.; XIN, C.; ZHENG, Y.; CHENG, Y.; SUN, S.; LI, R.; ZHU, X.; DAI, S. Y.; RENTZEPIS, P. M.; YUAN, J. S. Enhanced limonene production in cyanobacteria reveals photosynthesis limitations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 113. n. 50. p. 14225-14230. 2016. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1613340113>

WANG, S. H.; CHEN, P. F.; CHANG, S. T. Antifungal activities of essential oils and their constituents from indigenous cinnamon (*Cinnamomum osmophloeum*) leaves against wood decay fungi. **Bioresource Technology**. v. 96. p. 813-818. 2005. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2004.07.010>

ZAIN, M. E. Impact of mycotoxins on human and animals. **Journal of Saudi Chemical Society**. v. 15. p. 129-144. 2011. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jscs.2010.06.006>

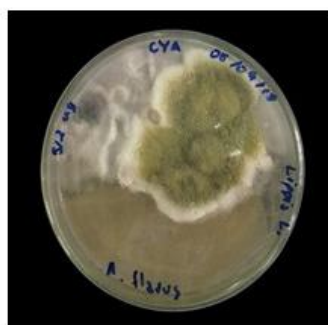
APÊNDICES

APÊNDICE A. CONCENTRAÇÃO FUNGICIDA MÍNIMA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Lippia lasiocalycina*.

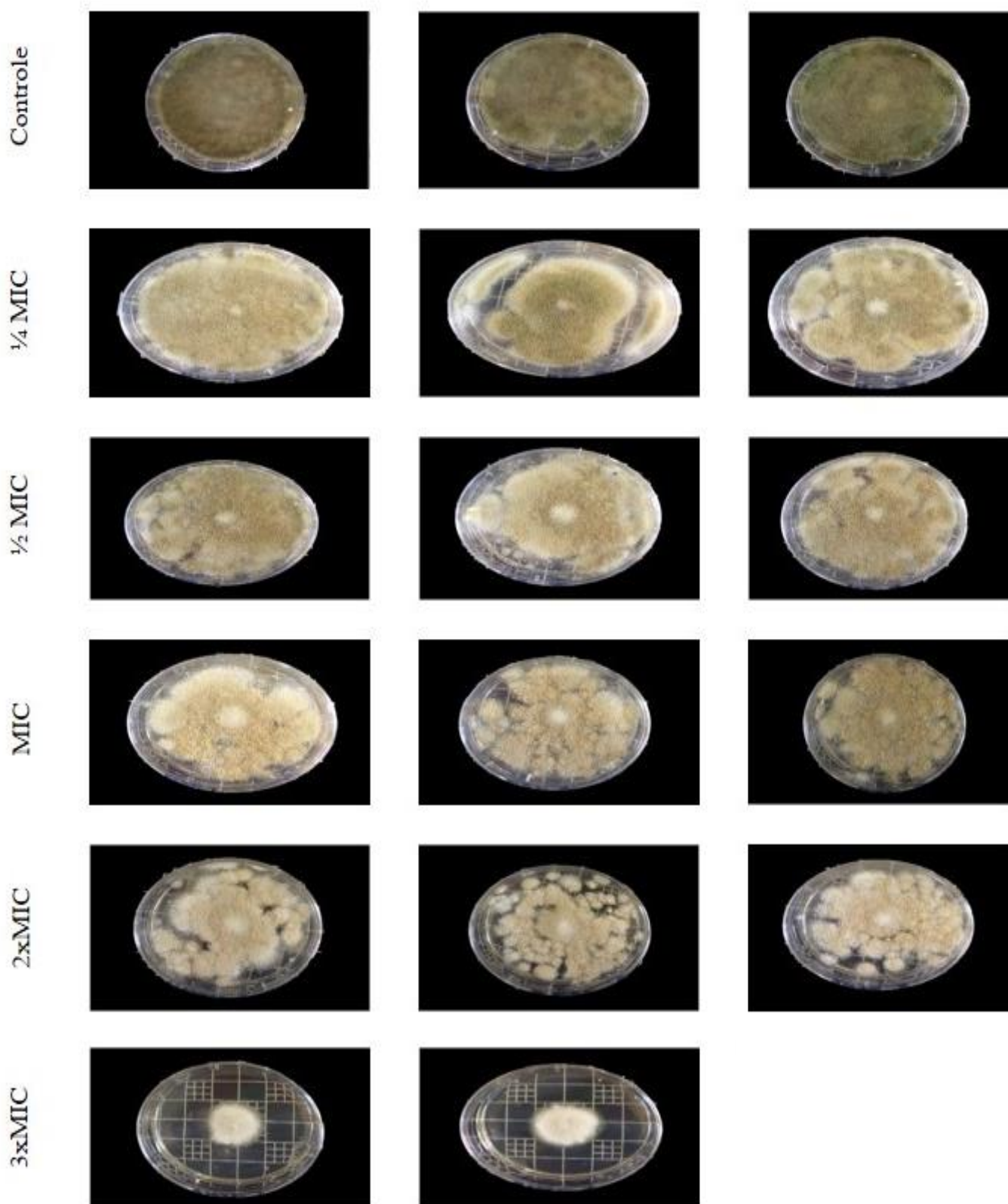
256 µg



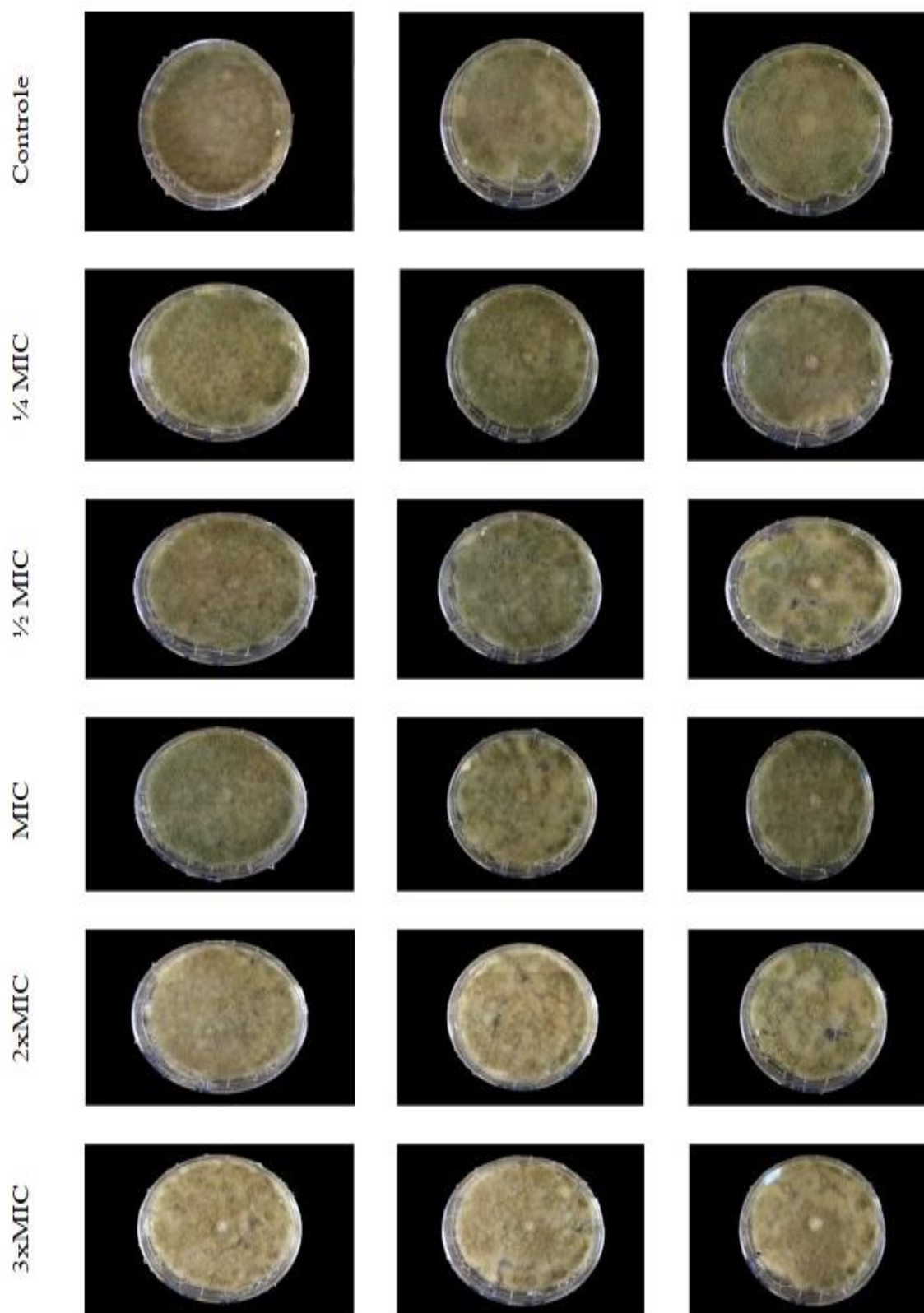
512 µg



APÊNDICE B. ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Lippia lasiocalycina* POR CONTATO DIRETO.



APÊNDICE C. ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Lippia lasiocalycina* POR AÇÃO DOS COMPOSTOS VOLÁTEIS.





Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Lippia lasiocalycina* Cham. (Verbenaceae)



Wanessa Sales de Almeida^{a,*}, Sidney Gonçalo de Lima^d, Humberto Medeiros Barreto^b,
Leila Maria de Sousa Andrade^b, Lorena Fonseca^d, Candido Athayde Sobrinho^c,
Ananda Rosa Beserra Santos^c, Maria Christina Sanches Muratori^a

^a Food and Nutrition Postgraduate Program, Federal University of Piauí, Campus Ministro Petrônio Portela, 64049-550, Teresina, PI, Brazil

^b Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Piauí, Campus Ministro Petrônio Portela, 64049-550 Teresina, PI, Brazil

^c Brazilian Agricultural Research Corporation, Av. Duque de Caxias, no. 5650 CEP: 64008-780, Teresina, PI, Brazil

^d Laboratory of Organic Geochemistry, Postgraduate Program in Chemistry, Federal University of Piauí, Campus Ministro Petrônio Portela, 64049-550 Teresina, PI, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Piperitenone oxide

Candida albicans

Limonene

Lippia

ABSTRACT

The use of plant species of the genus *Lippia* in the treatment of diseases is an old practice, however, some species still needs studies. Thus, the present work aimed to characterize chemically and to evaluate the antimicrobial activity of the essential oil of *Lippia lasiocalycina*. The oil was extracted by hydrodistillation and the analysis of the chemical constituents done using gas chromatography coupled to the mass spectrometer. Minimum inhibitory concentrations were determined by microdilution method against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Candida albicans* strains. The constituents present were identified (90.09%) and piperitenone oxide was defined as the major compound (57.55%) followed by limonene (20.69%). The essential oil of *Lippia lasiocalycina* presented activity against *C. albicans* strain, signaling for a potential application in the treatment of infections caused by this yeast.

1. Introduction

The use of medicinal plants has been constant since the origin of mankind. (Boukhatem et al., 2014). Among the substances of natural origin, essential oils are very important both economically and scientifically, being versatile products with applicability in the most varied sectors (Bernardos et al., 2015).

Essential oils are rich in bioactive substances (Medeiros et al., 2011). Its chemical composition is complex and presents a wide variety of constituents like monoterpenes, sesquiterpenes, and their derivatives such as aldehydes and phenols. This composition varies between plant species and seasons of the year. (Hajlaoui et al., 2010). In plants, the essential oils are directly related to the processes of pollination, dissemination of seeds, and in defense against attacks of herbivores as well as fungi and bacteria (Costa et al., 2015; Li et al., 2013).

The Verbenaceae family has approximately 36 genera of plants and 1000 plant species distributed in pantropical regions. Brazil is the country with the greatest diversity of taxon with 16 genera and about 290 species. The plants of this family usually present in the form of herbs, shrubs, sub-shrubs and lianas (Costa et al., 2017). Among the

genus belonging to this family, we can highlight *Lippia*, constituted by 200 species that exhibits a striking appearance and pleasant odor (Oliveira et al., 2006). The genus *Lippia* is widely used in folk medicine in gastrointestinal disorders and respiratory diseases. The infusion and the essential oil of various parts of plants is used as antifungal, antimicrobial, larvicide, and anesthetic agents (Linde et al., 2010).

In recent years, we have seen the emergence of a problem that permeates the treatment of various diseases, the phenomenon of microbial resistance. This resistance has rapidly proliferated by involving Gram-positive and Gram-negative bacteria, such as *Staphylococcus* and *Escherichia coli* (Silveira et al., 2006) and opportunistic fungal species like *Candida albicans* (Casto and Lima, 2011).

Although the advances in research on the chemical and pharmacological properties of the *Lippia* genus, there are still species that needs clarifying studies such as *Lippia lasiocalycina*. To the best of our knowledge, there have been just one literature sources reporting the preliminary study of the chemical constituents of *L. lasiocalycina* alcohol extract (Funari et al., 2012). No information on the biological activities or chemical composition of the essential oil is available. Therefore, the chemical characterization and determination of the

* Corresponding author.

E-mail address: wanessa.salmeida@yahoo.com.br (W.S. de Almeida).

antimicrobial activity of the essential oil of *Lippia lasiocalycina* was the objective of the present study.

2. Experimental

2.1. Plant material

The plant material was collected at 9:00 am in the Gilbués city, Piauí State, Brazil, in April 2016. The region presents subhumid tropical climate with high temperatures and low rainfall index being located in the semi-arid region of northeastern Brazil.

Plant material was made available by the Brazilian Agricultural Research Company - EMBRAPA Meio-Norte (-5.036410, -42.797898). Voucher specimen was deposited in the Embrapa Herbarium Genetic Resources and Biotechnology - CEN under the number CEN92437.

2.2. Essential oil extraction

Lippia lasiocalycina essential oil (LLEO) was obtained from fresh leaves of the plant by hydrodistillation using Clevenger type distillation apparatus for approximately 3 h. The essential oils yields ranged from 0.40 to 0.52%. At the end of the process, the resulting oil was collected, dried with sodium sulphate, weighed, and stored under refrigeration. The oil was solubilized in $H_2C_2Cl_2$ for gas chromatography and mass spectrometry analysis.

2.3. Chromatography conditions

For the characterization of the chemical composition of the volatile compounds of LLEO, a gas chromatograph, coupled to the mass spectrometer (GC–MS) was used. A Shimadzu® Chromatograph, model CGMS-QP2010 SE equipped with AOC-5000 automatic injector and SLB-5 ms column (30 m x 0.25 mm x 0.25 μ m) was used. The conditions for the GC–MS analysis were as follows: Helium as carrier gas at a flow rate of 1 mL min^{-1} , a temperature of 250 °C in the injector; a temperature program, starting at 60 °C (3 min), at a rate of 3 °C / min until reach 240 °C (for 10 min); the detector temperature was 250 °C. Previously the essential oil was diluted into dichloromethane (1:10) and so 1 μ L was injected. The MS conditions were triple quadrupole type of ion detector operating by electronic impact (70 eV, 45–450 Da).

Identification of the essential oil components was performed by comparing their GC–MS retention indices. The spectra were considered coincident if the similarity index was equal to or greater than 90%. The Kovats index was estimated by comparison between some known compounds in the chromatogram and the compatible Kovats indices of the database records (WILEY, NIST, PHEROBASE).

2.4. Microbial strains

Evaluation of the antimicrobial activity of EOLL was performed against standard strains *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Candida albicans* ATCC 10231, as well as, against a multidrug-resistant *S. aureus* strain (SA-1199B). Bacterial strains were maintained on Brain Heart Infusion Agar (BHIA, Himedia, India) slant at 4 °C, and prior to assay the cells were grown overnight at 37 °C in Brain Heart Infusion (BHI, Himedia, India). The yeast strain was maintained on Sabouraud Dextrose Agar (SDA, Himedia, India) slant at 4 °C and prior to assay the cells were grown for 24 h at 37 °C in Sabouraud Dextrose Broth (SDB, Himedia, India).

2.5. Determination of the minimum inhibitory concentration

The determination of the minimum inhibitory concentration (MIC) was performed according to the microdilution method (CLSI, 2003). In this assay, 96-well microplates (12 columns and 8 lines) with flat bottom were used. A stock solution of the test product was previously

prepared by dissolving 10.000 μ g of the product in 1 mL⁻¹ of dimethylsulfoxide (DMSO). This initial solution was then diluted in sterile distilled water to a concentration of 1024 μ g mL⁻¹. MIC of the LLEO was determined by microdilution in BHI with microbial suspensions of 10⁵ CFU mL⁻¹ and with LLEO at concentrations 8, 16, 32, 64, 128, 256, 512 μ g mL⁻¹. Microplates were incubated at 37 °C for 24 h. MIC was defined as the lowest concentration of the drug in which no microbial growth is observed. All experiments were done in triplicate. The control group used in this study consisted of culture medium and inoculum without the addition of essential oil. The control of the inoculum and the control of the sterility of the culture medium were made.

Antifungal assays were performed by the microdilution method in SDB double concentrated with a yeast suspension of 10⁵ CFU mL⁻¹ and LLEO solutions ranging from 8 to 512 μ g mL⁻¹. Microplates were incubated at 37 °C for 48 h.

2.6. Determination of the minimum microbicide concentration

Inhibition of the bacterial or fungal growth was confirmed transferring an aliquot of 10 μ L from each well of the MIC test microplates to a Petri dish containing BHIA (or SDA) and checking cell viability after incubation at 37 °C for 24 to 48 h. Minimal microbicide concentration (MMC) was defined as the lowest concentration of the drug in which no microbial growth was observed.

3. Results and discussion

In the last years we have seen a change in the habits of life of the population, a change that includes a greater concern with the quality of the food ingested as well as to the safety of the industrialized products. At the same time, the industry has been looking for options to reduce the amount of synthetic chemicals in its products, signaling a global trend towards adherence to more natural means of conservation and food production (Machado et al., 2011). In this scenario, essential oils appear as a promising alternative. One of the main factors that make them interesting for the food industry is the fact that these oils are mostly used routinely in cooking or in folk medicine, making their acceptability much higher when compared with synthetic additives (Pereira et al., 2006).

The volatile compounds of *L. lasiocalycina* essential oil were detected for the first time by GC–MS. Representing 90.09% of the essential oil fourteen constituents were identified of which the major ones, piperitenone oxide (57.55%) and limonene (20.69%), accounted for 78.24% (Table 1).

The chemical composition of species of the genus *Lippia* has been extensively studied. Gonçalves et al. (2015) and Guimarães et al. (2014)

Table 1
Constituents of *Lippia lasiocalycina* essential oil analyzed by GC–MS.

RT ^a	Compound	KI ^b	Area
3.677	Methylbenzene	770	0.31
7.121	α -pinene	939	1.17
8.816	Myrcene	991	0.20
10.195	<i>p</i> -Cimene	1026	0.47
10.399	Limonene	1031	20.69
10.986	<i>Trans</i> - β -ocimene	1050	1.01
11.538	γ -Terpinene	1062	0.18
19.849	Carvone	1242	0.26
21.998	<i>m</i> -Thymol	1290	0.83
22.354	Tridecane	1299	1.03
24.199	Piperitenone	1342	3.04
25.283	Piperitenone oxide	1365	57.55
31.175	Bicyclogermacrene	1494	2.67
31.597	β -Bisabolene	1509	0.68

^a Retention time.

^b Kovats index.

found carvacrol and 1,8-cineol as major components for *Lippia sidoides*. Costa et al. (2005) when analyzing the same species found thymol and α -phellandrene. Nogueira et al. (2007), in a study carried out in Paraná, Brazil, found citral and trans-dihydrocarvone while Silva et al. (2006) identified citral as the main component of *Lippia alba*. Previous researches verified that essential oil from aerial parts of *L. origanoides* collected in different Brazilian states showed carvacrol and thymol as major chemical components (Sarrazin et al., 2015a; Queiroz et al., 2014; Borges et al., 2012).

A variation of the essential oil composition is influenced by several factors, such as place of cultivation, soil type, climate, temperature, luminosity and collection time (Alencar-Filho et al., 2017; Bitu et al., 2015; Sarrazin et al., 2015b). The chemical profile may vary both between species and interspecies (Lima et al., 2016; Morais, 2009). In addition, some constituents appear as typical of certain species while others are considered as an exception.

Piperitenone oxide (PO) is a natural oxygenated monoterpene, also known as rotundifolone, used in different products such as detergents, creams, and lotions. In the food industry, it is usually used as a flavoring agent (Sotto et al., 2017). The growing market demand for exempt food products or with a reduction in the amount of synthetic chemicals used in their production and conservation has increased the industry's interest in alternatives that have better consumer acceptance (Galo et al., 2018). Thus, the presence of PO in high concentration in LLEO beckons to a new vegetable source of this substance commonly used in food flavoring, appearing as a more natural option to its synthetic analogues. Besides that, several pharmacological activities have been evidenced for PO including antiviral activity against herpesvirus type 1 (Civitelli et al., 2014), repellent action against *Aedes aegypti* (Tripathi et al., 2004), the vasodilatory effect in hypertensive rats (Lan et al., 2017), anticancer potential (Nakamura et al., 2014) and antiparasitic action (Teles et al., 2011). Piperitenone oxide is not a common occurring compound in the genus *Lippia* being. It is most common in different species of mint such as *Mentha spicata* and *Mentha rotundifolia*. Some *Lippia* species may exhibit piperitenone oxide as a minor component (Bozovic et al., 2015), but their presence as a major constituent is not a common finding.

Among the species of the genus *Lippia* the PO was recently identified in *Lippia pedunculosa* at a concentration higher than 70% (Nascimento et al., 2017). The presence of PO as the major constituent of the LLEO (57.55%) is an unprecedented discovery, indicating that it is a good source of this compound and signaling for a range of possible technological applications for the LLEO.

Terpenes are considered the secondary metabolites most produced by plants. This class of substances is often used in the pharmaceutical and solvent industries. (Wang et al., 2016). They have a great structural diversity and can exert crucial functions for plant development, being usually involved in defense mechanisms (Srividya et al., 2015; Viegas Júnior, 2003). Limonene, the second main compound found in the LLEO, is a monocyclic monoterpene present in more than 300 plant species. It is present in two possible conformations, *S*-(-)-limonene and *R*-(+)-limonene, and both are directly related to inhibition of growth of microorganisms, especially fungi (Duetz et al., 2003). In citrus essential oils the presence of the *R*-(+)-limonene isomer is more common, while *S*-(-)-limonene is more common herbs and some plant varieties as in species of the *Mentha* genus (Maróstica Júnior and Pastore, 2007). In the essential oil market, limonene is one of the most exported from Brazil to European Union countries with the main purposes being the use of cleaning products. From 2005 to 2008, 427 t of limonene were exported, generating millions of dollars of revenue (Bizzo et al., 2009).

Natural products from plants are considered as having a good inhibitory activity if they present MICs $\leq 100 \mu\text{g/mL}^{-1}$, a moderate inhibitory activity if they present MICs ranging from 100 to $500 \mu\text{g/mL}^{-1}$, a weak inhibitory activity if they present MICs ranging from 500 to $1000 \mu\text{g/mL}^{-1}$, and no inhibitory activity if they present MICs $> 1000 \mu\text{g/mL}^{-1}$ (Holetz et al., 2002). According to these

Table 2
MIC and MMC of *Lippia lasiocalycina* essential oil on microbial strains.

Strains	MIC ^a ($\mu\text{g/mL}^{-1}$)	MMC ^b ($\mu\text{g/mL}^{-1}$)	MMC/MIC	Inhibitory Effect
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	≥ 1024	–	–	No activity
<i>S. aureus</i> SA1199-B	≥ 1024	–	–	No activity
<i>E. coli</i> ATCC 25922	≥ 1024	–	–	No activity
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	512	512	1	Fungicide

^a Minimum inhibitory concentration.

^b Minimum microbicide concentration.

criteria, the results obtained from assays to evaluate the antimicrobial activity (Table 2) showed that LLEO was inactive against both Gram-positive and Gram-negative bacterial strains.

On the other hand, the oil was active against the yeast strain tested (Table 2), and although this activity, it is considered as weak, its inhibitory effect was fungicide. This result indicates that LLEO is a source of phytochemicals that could be used in the prevention or treatment of mycoses in human and animal hosts, as well as, they could be used for prevention of food contamination by fungal species. The antifungal activity of the LLEO could be attributed to the presence of hydrophobic monoterpenes, such as PO and limonene, as well as, other minor components which are able to cause lipid partitioning of cell membrane and increasing its permeability to essential electrolytes (Bakkali et al., 2008; Duetz et al., 2003; Oumzil et al., 2002).

Candida spp. are commensal yeasts commonly found in mucous membranes and epithelial tissues, however species of the genus *Candida* can lead to opportunistic fungal infections, being *Candida albicans* the most involved (Gullo et al., 2016; Castro and Lima, 2011). The low host immunity combined with the versatility of surviving in the most different environments and conditions is directly related to the transition from a harmless microorganism to an infectious one (Cassone, 2015; Li et al., 2015). Yeasts have several virulence factors such as the ability to adhere to tissues, the possibility of converting unicellular yeasts into filamentous forms, a hydrophobic cell wall and the production of some extracellular enzymes that help in the expression of their pathogenicity (Ishida et al., 2006; Calderoni and Fonzi, 2001).

Several drugs are used in the treatment of mycotic infections. Antiseptics such as iodine tincture and gentian violet are examples of some substances very employed as antimycotics. The development of pharmacological research has enabled the discovery and use of more modern antifungal drugs such as ketoconazole, miconazole, amphotericin B, and clotrimazole (Lima et al., 2006). However, extensive use has led to resistance to treatment and difficulties in combating opportunistic fungal infections (Barbosa et al., 2016). Protein mutations that reduce the ability of drugs to interact and bind to the cell wall and the active efflux of drugs out of the cell by means of membrane-expressed transporters, and pumps are some mechanisms developed by *Candida albicans* to circumvent the action of major antifungal agents (Schneider and Morschhauser, 2015; Shafreen et al., 2014).

Given the increasing occurrence of microorganisms that express resistance to drug therapies, alternatives should be sought to enable the treatment of these conditions efficiently. The use of plant products, such as essential oils, has been identified as one of the most promising sources, both for the discovery of new drugs and as an aid to existing ones (Guimarães et al., 2017; Oliveira et al., 2016; Lucena et al., 2015). The fact that they are a complex mixture of substances allied to action at multiple target sites makes the development of resistance to essential oils an unlikely event (Sales et al., 2014). In addition, the synergistic effect between essential oils and synthetic drugs can inhibit efflux pumps (Barreto et al., 2014) and eliminate plasmids that are involved in

antimicrobial resistance (Pereira et al., 2015).

4. Conclusion

The essential oil of *L. lasiocalycina* presented a high concentration of piperitenone oxide and fungicide activity on strains of *Candida albicans* being a good source for future research aimed at the development of new drugs and as a source of obtaining flavorings used in foods.

Funding

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Declarations of interest

None.

Acknowledgments

We acknowledge the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), Laboratory of Geochemistry Analysis (LAGO) of the Federal University of Piauí, and EMBRAPA Meio-Norte.

References

- Alencar-filho, J.M.T., Araujo, L.C., Oliveira, A.P., Guemaraes, A.L., Pacheco, A.G.M., Silva, F.S., Calvacanti, L.S., Luchese, A.M., Almeida, J.R.G.S., 2017. E.C.C. Araujo. Chemical composition and antibacterial activity of essential oil from leaves of *Croton heliotropifolius* in different seasons of the year. *Rev. Bras. Farmacogn.* 27, 440–444. <https://doi.org/10.1016/j.bjbp.2017.02.004>.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M., 2008. Biological effects of essential oils – a review. *Food Chem. Toxicol.* 46, 446–475. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106>.
- Barbosa, C.S., Alves, E.F., Fortuna, J.L., Macena, W.G., 2016. Atividade antifúngica preliminar dos extratos de *Punica granatum* (Linnaeus) e *Psidium guajava* (Linnaeus) sobre *Candida albicans*. *Ver Saude Bio.* 11, 66–73.
- Barreto, H.M., Lima, I.S., Coelho, K.M.R.N., Osório, L.R., Mourão, R.A., Santos, B.H.C., Coutinho, H.D.M., Abreu, A.P.L., Medeiros, M.G.F., Cító, A.M.G.L., 2014. J.A.D. Lopes. Effect of *Lippia origanoides* H.B.K. essential oil in the resistance to aminoglycosides in methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Eur. J. Integr. Med.* 6, 560–564. <https://doi.org/10.1016/j.eujim.2014.03.011>.
- Bernardos, A., Marina, T., Zacek, P., Pérez-Esteve, E., Martínez-Mañez, R., Lhotka, M., Kourimska, L., Pulkrabek, J., Kloucek, P., 2015. Antifungal effect of essential oils components against *Aspergillus niger* when loaded into silica mesoporous supports. *J. Sci. Food Agric.* 95, 2824–2831. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7022>.
- Bitu, V.C.N., Costa, J.G.M., Rodrigues, F.F.G., Colares, A.V., Coutinho, H.D.M., Botelho, M.A., Portela, A.C., Santana, N.M., 2015. I.R.A. Menezes. Effect of collection time on composition of essential oil of *Lippia gracilis* Schauer (Verbenaceae) growing in Northeast Brazil. *J. Essent. Oil Bear Pl.* 18 <https://doi.org/10.1080/0972060X.2014.935043>. pp. 674–653.
- Bizzo, H.R., Hovell, A.M.C., Rezende, C.M., 2009. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. *Quim. Nova* 32, 588–594. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000300005>.
- Borges, A.R., Aires, J.R.A., Higino, T.M.M., Medeiros, M.D., Cító, A.M., Lopes, J.A., Figueiredo, R.C., 2012. Trypanocidal and cytotoxic activities of essential oils from medicinal plants of Northeast of Brazil. *Exp. Parasitol.* 132, 123–128. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2012.06.003>.
- Boukhatem, M.N., Ferhat, M.A., Kameli, A., Saidi, F., Kebir, H.T., 2014. Lemon grass (*Cymbopogon citratus*) essential oil as a potential anti-inflammatory and antifungal drugs. *Libyan J. Med.* 9, 1–10. <https://doi.org/10.3402/ljm.v9.25431>.
- Bozovic, M., Pirolli, A., Rigno, R., 2015. *Mentha suaveolens* Ehrh. (Lamiaceae) essential oil and its main constituent piperitenone oxide: biological activities and chemistry. *Molecules* 20, 8605–8633. <https://doi.org/10.3390/molecules20058605>.
- Calderone, R.A., Fonzi, W.A., 2001. Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends Microbiol.* 9, 327–335. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(01\)02094-7](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(01)02094-7).
- Cassone, A., 2015. Vulvovaginal *Candida albicans* infections: pathogenesis, immunity and vaccine prospects. *BJOG.* 122, 785–794. <https://doi.org/10.1111/1471-0528.12994>.
- Castro, R.D., Lima, E.O., 2011. Atividade antifúngica dos óleos essenciais de sassafrás (*Ocotea odorifera* Vell.) e alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) sobre o gênero *Candida*. *Rev. Bras. Pl. Med.* 13, 203–208. <https://doi.org/10.1590/S1516-05722011000200012>.
- Civitelli, L., Panella, S., Marcocci, M.E., Petris, A., Garzoli, S., Pepi, F., Vavala, E., Ragno, R., Nencioni, L., Palamara, A.T., Angioletta, L., 2014. *In vitro* inhibition of herpes simplex virus type 1 replication by *Mentha suaveolens* essential oil and its main component piperitenone oxide. *Phytomedicine.* 21, 857–865. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2014.01.013>.
- CLSI, 2003. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard M7-A6, 6rd ed. Clin. Lab. Stand. Inst., 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA.
- Costa, J.G.M., Rodrigues, F.F.G., Angélico, E.C., Silva, M.R., Mota, M.L., Santos, N.K.A., Cardoso, A.L.H., 2005. T.L.G. Lemos. Estudo químico-biológico dos óleos essenciais de *Hyptis martiusii*, *Lippia sidoides* e *Syzygium aromaticum* frente às larvas do *Aedes aegypti*. *Rev. Bras. Farmacogn.* 15, 304–309. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2005000400008>.
- Costa, L.C.B., Pinto, J.E.B.P., Bertolucci, S.K.V., Costa, J.C.B., Alves, P.B., Niculau, E.S., 2015. *In vitro* antifungal activity of *Ocimum selloi* essential oil and methylchavicol against phytopathogenic fungi. *Cienc. Agron.* 2, 428–435. <https://doi.org/10.5935/1806-6690.20150023>.
- Costa, P.S., Souza, E.B., Brito, E.H.S., Fontenelle, R.O.S., 2017. Atividade antimicrobiana e potencial terapêutico do gênero *Lippia sensu lato* (Verbenaceae). *Hoehnea.* 44, 158–171. <https://doi.org/10.1590/2236-8906-68/2016>.
- Duetz, W.A., Bouwmeester, H., Beilen, J.B., Witholt, B., 2003. Biotransformation of limonene by bacteria, fungi, yeasts, and plants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 61, 269–277. <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1221-y>.
- Funari, C.S., Gullo, F.P., Napolitano, A., Carneiro, R.L., Mendes-Giannini, M.J.S., Fusco-Almeida, A.M., Piacente, S., Pizza, C., 2012. D.H.S. Silva. Chemical and antifungal investigations of six *Lippia* species (Verbenaceae) from Brazil. *Food Chem.* 135, 2086–2094. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.06.077>.
- Galo, G.T., Lima, A.C.S., Machado, K.M., Vieira, L.B., Martins, V.C., Ferreira, N.L., Lucarini, A.C., 2018. Estudo da extração da quercetina a partir da cebola roxa (*Allium cepa* L.) e seu uso como conservante alimentar natural. *Int. J. Eng. Exact. Sci.* 4, 1–10. <https://doi.org/10.18540/jcecvl4iss1pp0153-0162>.
- Gonçalves, A.H., Pereira, A.S., Santos, G.R.S., Guimarães, L.G.L., 2015. Atividade fungitóxica in vitro dos óleos essenciais de *Lippia sidoides* Cham., *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf. e de seus constituintes majoritários no controle de *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii*. *Rev. Bras. Pl. Med.* 17, 1007–1015. https://doi.org/10.1590/1983-084X/14_166.
- Guimarães, L.G.L., Cardoso, M.G., Souza, R.M., Zacaroni, A.B., Santos, G.R., 2014. Óleo essencial de *Lippia sidoides* nativas de Minas Gerais: composição, estruturas secretoras e atividade antibacteriana. *Cienc. Agron.* 45 <https://doi.org/10.1590/S1806-66902014000200006>. pp. 264–245.
- Guimarães, C.C., Ferreira, T.C., Oliveira, R.C.F., Simioni, P.U., Ugrinovich, L.A., 2017. Atividade antimicrobiana in vitro do extrato aquoso e do óleo essencial do alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) e do cravo-da-índia (*Caryophyllus aromaticus* L.) frente a cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. *Rev. Bras. Biocienc.* 15, 83–89.
- Gullo, F.P., Fusco-Almeida, A.M., Mendes-Giannini, M.J.S., Martins, M.B.G., Camargo, F.R., Henrich, S.V., Martinez, V.B., 2016. R.R.D. Moreira. Essential oils and major compounds of *Hedychium coronarium* Koenig (Zingiberaceae) against pathogenic yeast of *Candida* and *Cryptococcus* genus. *Rev. Cienc. Farm. Básica. Apl.* 37, 1–5.
- Hajlaoui, H., Snoussi, M., Noumi, E., Zanetti, S., Ksouri, R., Bakhrouf, A., 2010. Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of the essential oil of five Tunisian aromatic plants. *Ital. J. Food Sci.* 22, 320–329.
- Holetz, F.B., Pessini, G.L., Sanches, N.R., Cortez, D.A., Nakamura, C.V., Dias Filho, B.P., 2002. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 97, 1027–1031. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762002000700017>.
- Ishida, K., Mello, J.C.P., Cortez, D.A.C., Dias Filho, B.D., Ueda-Nakamura, T., Nakamura, C.V., 2006. Influence of tannins from *Stryphnodendron adstringens* on growth and virulence factors of *Candida albicans*. *J. Antimicrob. Chemother.* 58, 942–949. <https://doi.org/10.1093/jac/dkl377>.
- Lan, W., Zhang, H.P., Wang, Y., Jiang, M., Li, Q., An, D., 2017. Antihypertensive effect of piperitenone oxide on spontaneously hypertensive rat by regulating calcium balance and reducing endothelin-1 secretion. *Bangladesh J. Pharmacol.* 12, 341–347. <https://doi.org/10.3329/bjpv.v12i3.32413>.
- Li, Z.-J., Njateng, G.S.S., He, W.-J., Zhang, H.-X., Gu, J.-L., Chen, S.-N., Du, Z.-Z., 2013. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil from the edible aromatic plant *Aristolochia delavayi*. *Chem. Biodivers.* 10, 2032–2041. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201300066>.
- Li, Y., Chang, W., Zhang, M., Ying, Z., Lou, H., 2015. Natural product solasodine-3-O-β-D-glucopyranoside inhibits the virulence factors of *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res.* 15, 1–8. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fov060>.
- Lima, I.O., Oliveira, R.A.G., Lima, E.O., Farias, N.M.P., Souza, E.L., 2006. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. *Rev. Bras. Farmacogn.* 16, 197–201. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2006000200011>.
- Linde, J.H., Combrinck, S., Regnier, T.J.C., Virjevic, S., 2010. Chemical composition and antifungal activity of the essential oil of *Lippia rehmannii* from South Africa. *S. Afr. J. Bot.* 76, 37–42. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2009.06.011>.
- Lucena, B.F.F., Tintino, S.R., Figueiredo, F.G., Oliveira, C.D.M., Aguiar, J.J.S., Cardoso, E.N., Aquino, P.E.A., Andrade, J.C., Coutinho, H.D.M., 2015. E.F.F. Matias. Avaliação da atividade antibacteriana e moduladora de aminoglicosídeos do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. *Acta Biolo. Colomb.* 20, 39–45. <https://doi.org/10.15446/abc.v20n1.41673>.
- Machado, T.F., Borges, M.F., Bruno, L.M., 2011. Aplicação de antimicrobianos naturais na conservação de alimentos. *Embrapa Agroindústria Tropical* Fortaleza, CE, 145, 1–31. (Accessed 26 August 2017). http://www.cnpat.embrapa.br/download_publicacao.php?id=341.
- Maróstica Júnior, M.R., Pastore, G.M., 2007. Biotransformação de limoneno: uma revisão das principais rotas metabólicas. *Quim. Nova* 30, 382–387. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000200027>.
- Medeiros, R.T.S., Gonzalez, E., Felício, R.C., Felício, J.D., 2011. Evaluation of antifungal activity of *Pittosporum undulatum* L. Essential oil against *Aspergillus flavus* and aflatoxin production. *Cienc. Agrotec.* 35, 71–76. <https://doi.org/10.1590/S1413-70542011000100008>.

- Morais, L.A.S., 2009. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. *Hortic. Bras.* 27, 1–14. (Accessed 11 February 2018). http://www.abhorticultura.com.br/eventosx/trabalhos/ev_3/P_4_Palestra_Resumo_Lilia_Ap.pdf.
- Nakamura, Y., Hasegawa, Y., Shirota, K., Suetome, N., Nakamura, T., Chomnawang, M.T., Thirapanmethee, K., Khuntayaporn, P., Boonyariththongchai, P., Wongs-Aree, C., Okamoto, S., Shigeta, T., Matsuo, T., Park, E.Y., 2014. K. Sato. Differentiation-inducing effect of piperitenone oxide, a fragrant ingredient of spearmint (*Mentha spicata*), but not carvone and menthol, against human colon cancer cells. *J. Funct. Foods* 8, 62–67. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.03.005>.
- Nascimento, A.M.D., Maia, T.D.S., Soares, T.E.S., Menezes, L.R.A., Scher, R., Costa, E.V., Cavalcanti, S.C.H., Corte, R., 2017. Repellency and larvicidal activity of essential oils from *Xylopia laevigata*, *Xylopia frutescens*, *Lippia pedunculosa*, and their individual compounds against *Aedes aegypti* Linnaeus. *Neotrop. Entomol.* 46, 223–230. <https://doi.org/10.1007/s13744-016-0457-z>.
- Nogueira, M.A., Diaz, G., Sakumo, L., 2007. Caracterização química e atividade biológica do óleo essencial de *Lippia alba* cultivada no Paraná. *Rev. Cienc. Farm. Básica. Apl.* 28, 273–278.
- Oliveira, D.R., Leitão, G.G., Santos, S.S., Bizzo, H.R., Lopes, D., Alviano, C.S., Alviano, D.S., Leitão, S.G., 2006. Ethnopharmacological study of two *Lippia* species from Oriximiná, Brazil. *J. Ethnopharmacol.* 108, 103–108. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.04.018>.
- Oliveira, L.B.S., Batista, A.H.M., Fernandes, F.C., Sales, G.W.P., Nogueira, N.A.P., 2016. Atividade antifúngica e possível mecanismo de ação do óleo essencial de folhas de *Ocimum gratissimum* (Linn.) sobre espécies de *Candida*. *Rev. Bras. Pl. Med.* 18, 511–523. https://doi.org/10.1590/1983-084X/15_222.
- Oumzil, H., Ghoulami, S., Rhajaoui, M., Ildrissi, A., Fkih-Tetouani, S., Faid, M., Benjouad, A., 2002. Antibacterial and antifungal activity of essential oils of *Mentha suaveolens*. *Phytother. Res.* 16, 727–731. <https://doi.org/10.1002/ptr.1045>.
- Pereira, M.C., Vilela, G.R., Costa, L.M.A.S., Silva, R.F., Fernandes, A.F., Fonseca, E.W.N., Piccoli, R.H., 2006. Inibição do desenvolvimento fúngico através da utilização de óleos essenciais de condimentos. *Cienc. Agrotec.* 30 (2006), 731–738. <https://doi.org/10.1590/S1413-70542006000400020>.
- Pereira, N.L.F., Aquino, P.E.A., Silva, M.R., Nascimento, E.M., Grangeiro, A.R.S., Oliveira, C.D.M., Tintino, S.R., Figueiredo, F.G., Veras, H.N.H., 2015. I.R.A. Menezes. Efeito antibacteriano e anti-inflamatório tópico do extrato metanólico de *Chenopodium ambrosioides* L. *Rev. Fitos.* 9, 101–112. <https://doi.org/10.5935/2446-4775.20150009>.
- Queiroz, M.R.A., Almeida, A.C., Andrade, V.A., Lima, T.S., Martins, E.R., Figueiredo, L.S., 2014. R.T. Careli. Avaliação da atividade antibacteriana do óleo essencial de *Lippia organoides* frente à *Staphylococcus aureus* sp. isolados de alimentos de origem animal. *Rev. Bras. Pl. Med.* 16, 737–743.
- Sales, G.W.P., Batista, A.H.M., Ocha, L.Q., Nogueira, N.A.P., 2014. Efeito antimicrobiano e modulador do óleo essencial extraído da casca de frutos da *Hymenaea courbaril* L. *Rev. Cienc. Farm. Básica. Apl.* 35, 709–715.
- Sarrazin, S.L.F., Silva, L.A., Oliveira, R.B., Raposo, J.D.A., Silva, J.K.R., Salimena, F.R.G., Maia, J.G.S., Mourão, R.H.V., 2015a. Antibacterial action against food-borne microorganisms and antioxidant activity of carvacrol-rich oil from *Lippia organoides* Kunth. *Lipids Health Dis.* 14, 1–8. <https://doi.org/10.1186/s12944-015-0146-7>.
- Sarrazin, S.L.F., Silva, L.A., Assunção, A.P.F., Oliveira, R.B., Calao, V.Y.P., Silva, R., Stashenko, E.E., Maia, J.G.S., Mourão, R.H.V., 2015b. Antimicrobial and seasonal evaluation of the carvacrol-chemotype oil from *Lippia organoides* Kunth. *Molecules* 20, 1860–1871. <https://doi.org/10.3390/molecules20021860>.
- Schneider, S., Morschhauser, J., 2015. Induction of *Candida albicans* drug resistance genes by hybrid zinc cluster transcription factors. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59, 558–569. <https://doi.org/10.1128/AAC.04448-14>.
- Shafreen, B., Mohamed, R., Subramanian, M., Shunmugiah, K.P., 2014. Inhibition of *Candida albicans* virulence factors by novel levofloxacin derivatives. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 8, 6775–6785. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5719-2>.
- Silva, N.A., Oliveira, F.F., Costa, L.C.B., Bizzo, H.R., Oliveira, R.A., 2006. Caracterização química do óleo essencial da erva cidreira (*Lippia alba* (Mill.) N. E. Br.) cultivada em Ilhéus na Bahia. *Rev. Bras. Pl. Med.* 8, 52–55.
- Silveira, G.P., Nome, F., Gesser, J.C., Sá, M.M., Terenzi, H., 2006. Estratégias utilizadas no combate a resistência bacteriana. *Quim. Nova* 29, 844–855. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422006000400037>.
- Sotto, A., Giacomo, S., Abete, L., Bozovic, M., Parisi, O.A., Bariel, F., Vitalone, A., Izzo, A.A., Ragno, R., Mazzanti, G., 2017. Genotoxicity assessment of piperitenone oxide: an in vitro and in silico evaluation. *Food Chem. Toxicol.* 106, 506–513. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.06.021>.
- Srividya, N., Davis, E.M., Croteau, R.B., Lange, B.M., 2015. Functional analysis of (4S)-limonene synthase mutants reveals determinants of catalytic outcome in a model monoterpene synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 112, 3332–3337. <https://doi.org/10.1073/pnas.1501203112/-/DCSupplemental>.
- Teles, N.S.B., Fechine, F.V., Viana, F.A.C., Viana, I.O.L., Nascimento, D.F., Leite, A.L.A.S., Bezerra, F.A.F., Moraes, M.O., 2011. M.E.A. Moraes. Evaluation of the therapeutic efficacy of *Mentha crista* in the treatment of giardiasis. *Contemp. Clin. Trials* 32, 809–813. <https://doi.org/10.1016/j.cct.2011.08.005>.
- Tripathi, A.K., Prajapati, V., Ahmad, A., Aggarwal, K.K., Khanuja, S.P.S., 2004. Piperitenone oxide as toxic, repellent, and reproduction retardant toward malarial vector *Anopheles stephensi* (Diptera: Anophelinae). *J. Entomol.* 41, 691–698. <https://doi.org/10.1603/0022-2585-41.4.691>.
- Viegas Júnior, C., 2003. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. *Quim. Nova* 26, 390–400. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422003000300017>.
- Wang, X., Liu, W., Xin, C., Zheng, Y., Cheng, Y., Sun, S., Li, R., Zhu, X.-G., Dai, S.Y., Rentzepis, P.M., Yuan, J.S., 2016. Enhanced limonene production in cyanobacteria reveals photosynthesis limitations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 113, 14225–14230. <https://doi.org/10.1073/pnas.1613340113/-/DCSupplemental>.