

Efeitos do óleo de Neem (*Azadirachta indica*) sobre o crescimento *in vitro* e produção de ocratoxina A por cepas de *Aspergillus carbonarius*

Rodrigues, Mariana Paiva; Salvato, Lauranne Alves; Keller, Kelly Moura
rodrigues.mpaiva@gmail.com; lausalvato@gmail.com; kellykeller@ufmg.br

Escola de Veterinária
Universidade Federal de Minas Gerais

Resumo

Aspergillus carbonarius é um fungo sapróbio, deteriorante de alimentos e potencialmente produtor da micotoxina ocratoxina A (OTA). Neste trabalho foi avaliada a atividade antifúngica do óleo de Neem, sobre o crescimento de seis cepas deste fungo e a produção de OTA. Foram testados quatro diferentes concentrações de óleo de Neem, além de três regimes de incubação. Dentre as quatro concentrações de óleo de Neem avaliadas, apenas a 0,3% inibiu completamente o crescimento do *A. carbonarius* em 98,4% \pm 1,0, enquanto a utilização de 0,5% e 1,0% de óleo de Neem mostrou menor atividade antifúngica uma vez que estas concentrações inibiram apenas 41,1% \pm 5,0 e 64,8% \pm 4,5, respectivamente. Houve a completa inibição da produção de OTA com a adição de 0,1% e 0,3% de óleo de Neem para quatro cepas isoladas, em laboratório, a partir uvas; enquanto que as duas cepas de referência testadas produziram baixos níveis médios de OTA em 10 dias de incubação. O presente estudo mostra que a utilização de óleos essenciais de Neem como método auxiliar para a redução de crescimento micelial e produção de OTA é viável desde que utilizado em concentrações e por tempo adequados.

Palavras-chave: micotoxinas, óleos essenciais, bolores, ecofisiologia

Introdução

Os membros do gênero *Aspergillus* spp. são organismos sapróbios e colonizam uma enorme diversidade de substratos; dentre os diversos fungos toxigênicos,

estes são relevantes devido à forte conexão ecológica que possuem com alimentos (Pitt, 2000). São comumente associados à alimentação humana e animal durante períodos de seca e de

estocagem e armazenamento, mas também ocorrem como patógenos de plantas. Os aspergilos negros, classificados como *Aspergillus* seção Nigri (Gams, Christensen, Onions, Pitt & Samson, 1985) são isolados de uma ampla variedade de alimentos de distribuição mundial, como: ração animal, cereais, cacau, café, frutas secas, entre outros, sendo considerados fungos comuns na deterioração de alimentos e na biodeterioração de outros materiais. Além disso, são importantes produtores de ocratoxina A (OTA). A espécie de maior relevância na biossíntese da OTA é o *Aspergillus carbonarius* e em menor número os isolados de *A. niger* agregados, um complexo de espécies intimamente relacionadas (Ferrara et al., 2016).

O aumento do reconhecimento e da importância das infecções fúngicas e das dificuldades encontradas nos tratamentos, tem estimulado a pesquisa por alternativas fungicidas, químicos sintéticos ou naturais. A preocupação dos consumidores quanto à qualidade e segurança alimentar está acarretando em uma maior demanda por alimentos frescos e minimamente processados, sem a adição de conservantes tóxicos. Devido à conscientização da população sobre os efeitos negativos do uso de certos conservantes sintéticos, a pesquisa por produtos naturais se mostra de extrema

relevância, despertando grande interesse nos óleos essenciais e seus componentes por possuírem o status de relativamente seguro, ampla aceitação pelos consumidores, e sua exploração com potencial para uso multifuncional (Cherrat et al., 2013; Calo, Crandall, O'Bryan & Ricke 2015; Pandey, Kumar, Singh, Tripathi & Bajpai, 2017).

A aplicação de óleos essenciais é um método bastante atrativo no controle do crescimento fúngico em grãos, frutas, bebidas e outros substratos. Acredita-se que a produção de óleos essenciais por plantas se dá por diferentes razões, como por exemplo, um mecanismo de defesa contra patógenos e subprodutos tóxicos do metabolismo. Além disso, sabe-se que os óleos essenciais possuem componentes antioxidantes e com características antimicrobianas (Tongnuanchan & Benjakul, 2014; Calo et al., 2015).

O Neem (*Azadirachta indica*) é uma árvore nativa das regiões áridas da Ásia e África e é considerada uma planta medicinal muito importante. Mais de 150 diferentes compostos químicos já puderam ser extraídos e isolados de diferentes partes da árvore de Neem, como casca, folhas, óleo e sementes. Estes compostos têm baixa toxicidade para mamíferos e eficácia contra um amplo espectro de pragas (insetos, fungos e vírus) (Roychoudhury, 2016).

Brahmachari (2004) e Chaube et al. (2014) descreveram alguns efeitos terapêuticos similares a inseticidas naturais, antimicrobianos, agente anti-malária e agroquímicos. Ademais a árvore de Neem é comumente utilizada na medicina ayurvédica indiana tradicional como antiparasitário, antipirético, antibacteriano e espermicida, no tratamento de leptospiroses, problemas oculares, problemas respiratórios e constipações, e atua como anti-inflamatório.

Os óleos essenciais (OE) são uma mistura complexa de compostos odoríferos voláteis. As concentrações de seus componentes nos OE são diferentes, sendo que os compostos principais podem constituir até 70% do total, já os outros componentes podem aparecer apenas como traços (Pavela, 2015). Alguns pesquisadores relataram que existe uma relação entre as estruturas químicas dos compostos mais abundantes nos óleos essenciais e a atividade antimicrobiana. Também existe evidência de que os componentes de menor concentração participam de forma crítica na atividade antimicrobiana, possivelmente através da produção de efeitos sinérgicos com os outros componentes (Burt, 2004; Perricone et al., 2015). De acordo com Pawar e Thaker (2007) a natureza física dos óleos essenciais, p.ex. baixo peso molecular combinado com pronunciadas

tendências lipofílicas permitem que penetrem na membrana celular mais rapidamente que outras substâncias. Conner e Beuchat (1984a,b) sugeriram que a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais ou seus constituintes como o timol, carvacrol, vanilina poderiam resultar em danos enzimáticos ao sistema celular, incluindo aquelas associados à produção de energia e síntese de compostos estruturais.

Diversos estudos focaram na possibilidade do uso de diferentes óleos essenciais como controle biológico contra fungos aflatoxigênicos (El-Nagerabi, Al-Bahry, Elshafie & AlHilali, 2012; Ferreira et al., 2013; Passone, Girardi, & Etcheverry, 2013; Manso, Pezo, Gómez-Lus, & Nerín, 2014), mas pouco se sabe sobre a efetividade destes produtos sobre o crescimento das espécies de *Aspergillus* e sua produção de OTA.

Objetivos

- a)** Avaliar a eficácia de diferentes níveis de concentração do óleo de Neem sobre parâmetros do crescimento: fase Lag e velocidade de crescimento de seis cepas ocratoxigênicas de *Aspergillus carbonarius*.
- b)** Avaliar o potencial do óleo de Neem no controle da produção de OTA pelas cepas de *A. carbonarius* cultivadas em ágar Czapek extrato de

levedura (CYA) em diferentes tempos de incubação.

Material e Métodos

Cepas fúngicas

As cepas de *Aspergillus carbonarius* utilizadas foram: duas cepas de referência (FRR5690 e A2034) do Centro de Coleção CSIRO (Austrália) e quatro cepas de *A. carbonarius* (RCG1, RCG2, RCG3 e RCG4) isoladas de uvas na Argentina, todas produtoras de OTA no meio YES (2% extrato de levedura, 15% sacarose) (Magnoli, Violante, Combina, Palacio, & Dalcerro, 2003). As cepas foram mantidas em glicerol (15%, Sigma-Aldrich) à -80°C.

Meios de cultura

Para este estudo foi utilizado óleo de Neem comercial. Soluções estoque de óleo de Neem foram preparadas em dimetilsulfóxido (DMSO, Merck) para se obter níveis de concentração a 0,1, 0,3, 0,5 e 1,0% resultando em soluções homogêneas, que posteriormente foram adicionados ao meio CYA previamente autoclavado. Placas contendo meio CYA sem adição do Neem foram utilizadas como controle.

Condições de inoculação e incubação

Foi feita uma suspensão de conídios (1 x 10⁶ conídios/mL) a partir de colônias de 7 dias, cultivadas em meio ágar extrato de

malte 2% (MEA). Com o auxílio de uma seringa estéril foram realizadas inoculações centrais de 10 µL em cada placas de Petri. As placas de mesma concentração foram seladas em sacolas de polietileno. As triplicatas realizadas de cada tratamento foram incubadas em temperatura 25°C ± 2 durante 2 semanas.

Avaliação de crescimento

Foram feitas duas medidas perpendiculares diárias dos diâmetros das colônias em crescimento, sempre nos mesmos ângulos, até que as colônias atingissem as bordas das placas. A porcentagem de inibição do crescimento foi calculada de acordo com o diâmetro alcançado em cada tratamento em relação ao controle. O raio das colônias foi plotado contra o tempo e uma regressão linear foi aplicada para obter a fase lag, que foi definida como o tempo, em horas, para atingir 5 mm de diâmetro.

Extração de ocratoxina A da cultura

A produção de OTA foi analisada através de metodologia adaptada de Bragulat, Abarca, & Cabañes (2001) após 2, 7 e 10 dias de incubação. Foram retirados três plugues de pontos equidistantes das colônias para microtubo, e posteriormente foi realizada a extração com 1 mL de metanol. Os microtubos foram centrifugados a 14000 rpm (rotações por minuto) durante 10 minutos, e

posteriormente, esta solução foi filtrada (filtro de seringa, 17 mm, 0,45 µm, membrana de nylon), e evaporada até a secagem completa da fase líquida. Estes extratos foram então ressuspensos em 200 µL de fase móvel e injetados no sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

Detecção e quantificação de OTA

A OTA foi detectada e quantificada por CLAE de fase reversa com detector UV-Vis (λ_{exc} 330 nm; λ_{em} 460 nm), utilizando uma coluna C₁₈ (Supelcosil LC-ABZ, Supelco; 150 x 4,6 mm, 5 µm tamanho de partícula), conectada a uma pré-coluna (Supelguard LC-ABZ, Supelco; 20 x 4,6 mm, 5 µm tamanho de partícula). A fase móvel (acetonitrila : água : ácido acético, 57:41:2) foi bombeada a 1,0 mL/min. O volume de injeção foi de 100 µL e o tempo de retenção 4 ± 1 minutos. O limite de detecção das análises foi 1 ng/g (Scudamore & McDonald, 1998).

Análises estatísticas

As análises estatísticas foram conduzidas usando o PROC GLM no programa SAS (SAS Institute Inc., Cary, North Carolina, USA). As diferenças entre a porcentagem de inibição de crescimento, fase lag e a produção de OTA, sob as diferentes

concentrações de óleo de Neem, pelas seis cepas de *Aspergillus carbonarius* a 2, 7 e 10 dias foram analisadas estatisticamente por análise de variância (ANOVA). Os valores médios foram comparados com o teste LSD para determinar a influência do óleo de Neem sobre a ecofisiologia das cepas testadas (Quinn & Keogh, 2002).

Resultados e Discussão

Efeitos do óleo de Neem sobre os parâmetros de crescimento das cepas de *Aspergillus carbonarius*

O efeito de diferentes concentrações de óleo de Neem sobre a porcentagem de inibição de crescimento das cepas de *A. carbonarius* analisadas em meio de cultura CYA é evidenciado na Figura 1. Dentre as concentrações de óleo de Neem avaliadas, apenas a 0,3% inibiu completamente o crescimento das cepas de *A. carbonarius* ($98,4\% \pm 1,0$); a concentração de 1,0% inibiu $64,8\% \pm 4,5$, já a concentração de 0,5% teve efeito antifúngico baixo, inibindo apenas $41,1\% \pm 5,0$. Na concentração de 0,1% a porcentagem de crescimento foi variável dependendo da cepa analisada. A eficiência do óleo depende principalmente da concentração utilizada.

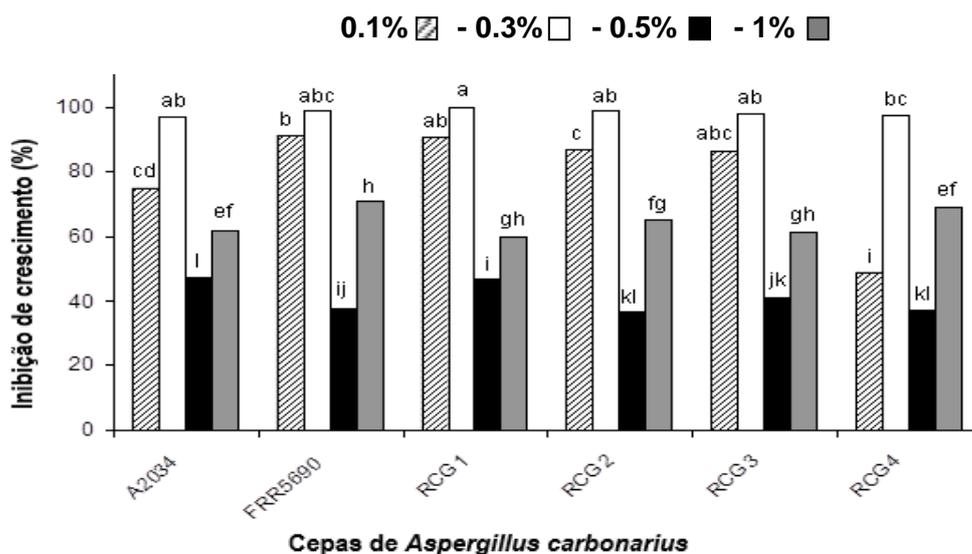


Figura 1: Percentagem de inibição do crescimento de seis cepas de *Aspergillus carbonarius* em diferentes concentrações de óleo Neem.

A média da fase lag (h) das seis cepas de *A. carbonarius* nos diferentes níveis de concentração de óleo de Neem pode ser observada na Tabela 1. Valores similares da fase lag foram observados entre as seis cepas testadas e os tratamentos de 0,5% e 1,0% de óleo de Neem, sem diferença significativa ($P \leq 0,0001$).

Entretanto ao utilizar 0,1%, a fase lag aumentou, variando de 53,2 para 171,7 horas para as cepas A2034 e RCG1, respectivamente. Na concentração de 0,3% houve aumento significativo na fase lag, tendo apenas uma cepa (RCG4) sido capaz de atingir a fase exponencial durante o período avaliado.

Tabela 1: Fase lag (horas) das seis cepas de *Aspergillus carbonarius* testadas a cinco concentrações diferentes de óleo de Neem.

Cepas	Níveis de concentração de óleo de Neem (%) \pm DP				
	0 (controle)	0,1	0,3	0,5	1,0
FRR5690	7,5 \pm 3,8 ^f	101,7 \pm 26,9 ^{cd}	$\geq 240^a$	29,6 \pm 1,3 ^{ef}	52,5 \pm 2,6 ^{def}
A2034	5,6 \pm 1,7 ^f	53,2 \pm 8,2 ^{def}	$\geq 240^a$	16,6 \pm 4,2 ^f	40,7 \pm 4,5 ^{ef}
RCG1	13,2 \pm 0,8 ^f	171,7 \pm 297,3 ^b	$\geq 240^a$	31,9 \pm 6,2 ^{ef}	40,5 \pm 6,7 ^{ef}
RCG2	8,4 \pm 1,9 ^f	87,6 \pm 4,1 ^{de}	$\geq 240^a$	26,5 \pm 2,0 ^f	45,8 \pm 3,3 ^{def}
RCG3	2,9 \pm 255,0 ^f	69,4 \pm 120,3 ^b	$\geq 240^a$	18,0 \pm 3,7 ^f	34,6 \pm 13,9 ^{ef}
RCG4	6,0 \pm 0,5 ^f	154,0 \pm 15,4 ^c	36,0 \pm 6,9 ^{ef}	15,7 \pm 3,6 ^f	47,9 \pm 0,7 ^{def}

DP: desvio padrão.

^{a,f} Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($P < 0,0001$).

Trabalhos anteriores sobre os efeitos de compostos naturais ou sintéticos foram feitos avaliando o crescimento e produção de aflatoxinas por espécies *Aspergillus* seção Flavi. Gowda, Malathi e Suganthi (2004) estudaram os efeitos de compostos químicos e herbais sobre o crescimento de outras espécies toxigênicas, como o *A. parasiticus*, e observaram que o óleo de Neem a 0,5% tem moderada atividade antifúngica (84% de redução em comparação ao grupo controle). Uma menor porcentagem de redução (51%) foi observada por Zeringue e Bhatnagar (1994), que estudaram os efeitos de folhas de Neem submersas em culturas

inoculadas com o *A. parasiticus*. Razzaghi-Abyaneh, Allameh, Tiraihi, Shams-Ghahfarokhi e Ghorbanian (2005) confirmaram os resultados obtidos pelos autores anteriormente mencionados uma vez que as folhas de Neem e os extratos de suas sementes podem causar alterações morfológicas nos micélios expostos e levar à destruição celular. Os dois fatores (concentrações de óleo de Neem e cepas) assim como as vias de interação tem um efeito significativo ($P < 0,0001$) sobre a inibição do crescimento e a fase lag das cepas estudadas de *Aspergillus* (Tabela 2).

Tabela 2: Análise de variância dos efeitos de diferentes concentrações (C) do óleo de Neem sobre a inibição do crescimento e a fase lag de seis cepas de *A. carbonarius* (ST).

Origem	GL ^a	Inibição do crescimento		Fase Lag	
		QM ^b	F ^c	QM ^b	F ^c
ST	5	322,28	25,85*	59483,50	46,73*
C	3	10974,36	880,21*	661501,00	519,68*
ST*C	15	288,03	23,10*	47610,54	37,40*

^aGraus de liberdade. ^bQuadrado médio. ^cF-Snedecor.

*Significância $P < 0,0001$.

Efeitos do óleo de Neem sobre a produção de OTA pelas cepas de *Aspergillus carbonarius*

O efeito dos diferentes tratamentos com óleo de Neem sobre a produção de OTA pelas cepas testadas de *A. carbonarius*

após 2, 7 e 10 dias de incubação, estão expostos na Tabela 3.

Tabela 3: Concentração de ocratoxina A produzida pelas seis cepas de *Aspergillus carbonarius* em diferentes concentrações de óleo de Neem e tempos de incubação.

Cepas	Tempo de Incubação (dias)	Concentração de OTA (ng/g)* \pm DP				
		0 %	0,1 %	0,3 %	0,5 %	1,0 %
FRR5690	2	62,5 \pm 4,7 ^g	nd	nd	368,8 \pm 34,3 ^e	nd
	7	235,1 \pm 65,8 ^f	nd	nd	637,7 \pm 35,4 ^d	2817,2 \pm 219,9 ^b
	10	334,3 \pm 7,4 ^{ef}	nd	28,2 \pm 3,2 ^g	986,3 \pm 86,0 ^c	2954,7 \pm 54,4 ^a
A2034	2	117,9 \pm 2,1 ^e	nd	nd	468,9 \pm 239,3 ^d	110,5 \pm 4,0 ^e
	7	225,4 \pm 10,1 ^d	13,8 \pm 0,0 ^{ef}	nd	624,4 \pm 18,4 ^b	454,5 \pm 4,5 ^c
	10	325,7 \pm 156,9 ^d	22,1 \pm 2,2 ^{ef}	nd	741,3 \pm 21,6 ^a	720,2 \pm 1,3 ^{ab}
RCG1	2	203,2 \pm 112,7 ^g	nd	SC	232,3 \pm 25,9 ^f	168,0 \pm 12,2 ^h
	7	278,8 \pm 10,8 ^d	nd	SC	258,0 \pm 8,0 ^c	268,1 \pm 0,7 ^{de}
	10	396,5 \pm 7,7 ^b	nd	SC	432,8 \pm 1,9 ^a	258,5 \pm 26,5 ^e
RCG2	2	102,6 \pm 6,4 ^{fg}	nd	nd	512,8 \pm 30,7 ^e	100,2 \pm 11,0 ^f
	7	573,2 \pm 19,2 ^e	nd	nd	2281,2 \pm 79,1 ^b	1808,3 \pm 50,4 ^c
	10	758,6 \pm 58,6 ^d	nd	nd	1784,9 \pm 10,2 ^c	6164,5 \pm 329,4 ^a
RCG3	2	282,6 \pm 19,4 ^{de}	nd	nd	297,7 \pm 28,7 ^{de}	280,1 \pm 54,1 ^{de}
	7	393,2 \pm 82,2 ^d	nd	nd	2066,2 \pm 179,2 ^b	1904,1 \pm 218,7 ^b
	10	528,6 \pm 268,3 ^d	nd	nd	1569,9 \pm 657,9 ^c	3054,8 \pm 1005,9 ^a
RCG4	2	86,4 \pm 7,5 ^f	nd	nd	542,9 \pm 41,1 ^c	nd
	7	160,7 \pm 6,1 ^e	nd	nd	183,5 \pm 5,5 ^e	1507,3 \pm 9,4 ^b
	10	203,8 \pm 6,8 ^e	nd	nd	278,6 \pm 16,5 ^d	2103,7 \pm 102,9 ^a

* Níveis médios de OTA; DP: desvio padrão; SC: sem crescimento; nd: não detectado (limite de detecção 1 ng/g).

^{a,g} Letras minúsculas diferentes, na avaliação de cada cepa, indicam diferença significativa (P<0.0001).

Nas concentrações de 0,1% e 0,3% de óleo de Neem, houve uma completa inibição da produção de OTA nas quatro cepas argentinas, isoladas em laboratório, a partir de amostras de uva; já as duas cepas de referência testadas (FRR5690 e A2034) produziram baixos níveis médios de OTA (28,2 e 22,1 ng/g, respectivamente) a 10 dias de incubação. A ausência da produção de OTA também foi observada aos 2 dias de incubação e com a utilização de 1,0% de óleo de Neem nas cepas FRR5690 e RCG4; no entanto, aos 7 e 10 dias de incubação houve um estímulo exagerado sobre a produção desta toxina. Este aumento de produção da micotoxina também ocorreu com a utilização de 0,5% de óleo de Neem em todos os tempos de incubação. As cepas de referência (FRR5690 e A2034), em todos os tratamentos mostraram um aumento na produção da OTA, a medida que houve um aumento nos tempos de incubação. No entanto,

para a cepa RCG1 a 1,0%, e RCG2 e RCG3 a 0,5% a maior concentração da OTA ocorreu em 7 dias de incubação; já para a cepa RCG4 a maior foi com 2 dias de incubação.

Para os tratamentos de 0,5% e 1,0% houve um aumento na produção de OTA, em cinco de seis cepas, com exceção da cepa RCG1 que apresentou inibição de 34,8% com óleo de Neem a 1,0%. Em contrapartida, estas duas concentrações estimularam a produção de OTA ao final do período de incubação de 295,1 e 883,98%, 227,6 e 221,14%, 235,28 e 812,6%, 182,8 e 239,3%, 136,68 e 1032,31% para as cepas FRR5690, A2034, RCG2, RCG3 e RCG4, respectivamente.

Os fatores concentração do óleo de Neem, cepas e tempo de incubação, assim como as vias de interação tiveram um efeito significativo na produção de OTA pelas cepas de *A. carbonarius* estudadas ($P < 0.0001$) (Tabela 4).

Tabela 4: Análise de variância do efeito de diferentes concentrações (C) de óleo de Neem sobre a produção de ocratoxina A (OTA) pelas cepas de *Aspergillus carbonarius* (ST) nos três tempos de incubação (TI).

Fonte	GL ^a	–	Produção de OTA	
			QM ^b	F ^c
ST	5		1,12	89,97
C	4		98,45	7912,27
IT	2		10,18	818,57
ST*C*TI	78		0,75	61,04

^aGraus de liberdade. ^bQuadrado médio. ^cF-Snedecor. *Significância $P < 0,0001$.

Zeringue, Shih e Bhatnagar (2001) estudaram os efeitos do óleo de Neem clarificado sobre o crescimento em meio líquido e placas de cultura do fungo aflatoxigênico *Aspergillus* spp., que resultou em aumento de 11-31% da massa do micélio. Garcia e Garcia (1990) encontraram resultados concordantes com os autores previamente mencionados, visto que descreveram que o Neem não inibiu nem o crescimento nem a produção de aflatoxinas por *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus*.

A estimulação exagerada na produção de OTA não foi observada por Razzaghi-Abyaneh et al. (2005) que encontraram 91,3% e 65,4% de redução na produção de aflatoxinas pelo *A. parasiticus* por µg de micélio, quando avaliado os efeitos das folhas e extratos de semente de Neem. Enquanto muitos compostos foram eficientes na inibição do crescimento e produção de aflatoxinas, outras apresentaram efeitos estimulantes afetando a biossíntese e bioregulação de aflatoxinas (Zaika & Buchanan, 1987). Atualmente as informações sobre os mecanismos de ação destes compostos sobre as espécies de *Aspergillus* spp. ainda são bastante limitadas.

Conclusão

Os resultados encontrados indicam que o uso do óleo de Neem em baixas

concentrações como 0,1% e 0,3%, é uma boa possibilidade como antifúngico para reduzir o crescimento micelial das seis cepas toxigênicas de *Aspergillus carbonarius* e inibição da produção de OTA.

Referências

- Bragulat, M. R., Abarca, M. L., & Cabañes, F. J. (2001). An easy screening method for fungi producing ochratoxin A in pure culture. *International Journal of Food Microbiology*, 71, 139-144.
- Brahmachari, G. (2004). Neem—An Omnipotent Plant: A Retrospection. *ChemBioChem*, 5, 408-421.
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antimicrobial properties and potential applications in foods – a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94, 223-253.
- Calo, J. R., Crandall, P. G., O'Bryan, C., & Ricke, A. S. C. (2015). Essential oils as antimicrobials in food systems – A review. *Food Control*, 54, 111-119.
- Chaube, S. K., Shrivastav, T. G., Tiwari, M., Prasad, S., Tripathi, A., & Pandey, A. K. (2014). Neem (*Azadirachta indica* L.) leaf extract deteriorates oocyte quality by inducing ROS-mediated apoptosis in mammals. *SpringerPlus*, 3. Disponível em: <http://www.springerplus.com/content/3/1/464>, acessado em: 10 jan 2018.

- Cherrat, L., Espina, L., Bakkali, M., García-Gonzalo, D., Pagán, R., & Laglaoui, A. (2014). Chemical composition and antioxidant properties of *Laurus nobilis* L. and *Myrtus communis* L. essential oils from Morocco and evaluation of their antimicrobial activity acting alone or in combined processes for food preservation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94, 6, 1197-1204.
- Conner, D. E., & Beuchat, L. R. (1984a). Effects of essential oils from plants on growth of food spoilage yeast. *Journal of Food Science*, 49, 429-434.
- Conner, D. E., & Beuchat, L. R. (1984b). Sensitivity of heat stressed yeast to essential oils of plant. *Applied and Environmental Microbiology*, 47, 229-233.
- El-Nagerabi, S. A. F., Al-Bahry, S. N., Elshafie, A. E., & AlHilali, S. (2012). Effect of *Hibiscus sabdariffa* extract and *Nigella sativa* oil on the growth and aflatoxin B1 production of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* strains. *Food Control*, 25(1), 59-63.
- Ferrara, M., Perrone, G., Gambacorta, L., Epifani, F., Solfrizzo, M., & Gallo, A. (2016). Identification of a Halogenase Involved in the Biosynthesis of Ochratoxin A in *Aspergillus carbonarius*. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(18), 5641-5641.
- Ferreira, F. D., Kimmelmeier, C., Arrotéia, C. C., Costa, C. L., Mallmann, C. A., Janeiro, V., Ferreira, F. M. D., Mossini, S. A. G., Silva, E. L., & Machinski, M. (2013). Inhibitory effect of the essential oil of *Curcuma longa* L. and curcumin on aflatoxin production by *Aspergillus flavus* Link. *Food Chemistry*, 136 (2), 789-793.
- Gams, W., Christensen, M., Onions, A.H.S., Pitt, J.I., & Samson, R.A. (1985). Infrageneric taxa of *Aspergillus*. In: Samson RA, Pitt JI. (Eds.), *Advances in Penicillium and Aspergillus systematics*, pp. 55-61. Plenum, New York.
- Garcia, R. P., & Garcia, M. I. (1990). Laboratory evaluation of *Neem* derivatives against *Aspergillus* growth and aflatoxin formation. *Philippine Agriculturist*, 73, 333-342.
- Gowda, N. K. S., Malathi, V., & Suganthi, R. U. (2004). Effect of some chemical and herbal compounds on growth of *Aspergillus parasiticus* and aflatoxin production. *Animal Feed Science and Technology*, 116, 281-291.
- Magnoli, C., Violante, M., Combina, M., Palacio, G., & Dalcero, A. (2003). Mycoflora and ochratoxin-producing strains of *Aspergillus* section *Nigri* in wine grapes in Argentina. *Letters in Applied Microbiology*, 37, 179-184.
- Manso, S., Pezo, D., Gómez-Lus, R., Nerín, C. (2014). Diminution of aflatoxin

- B1 production caused by an active packaging containing cinnamon essential oil. *Food Control*, v. 45, p. 101-108.
- Pandey, A. K., Kumar, P., Singh, P., Tripathi, N.N., & Bajpai, V. K. (2017). Essential Oils: Sources of Antimicrobials and Food Preservatives. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1-14.
- Passone, M. A., Girardi, N. S., Etcheverry, M. (2013). Antifungal and antiaflatoxigenic activity by vapor contact of three essential oils, and effects of environmental factors on their efficacy. *LWT - Food Science and Technology*, 53, 434-444.
- Pavela, R. (2015). Essential oils for the development of eco-friendly mosquito larvicides: A review. *Industrial Crops and Products*, 76, 174-187.
- Pawar, V. C., & Thaker, V. S. (2007), *In vitro* efficacy of 75 essential oils against *Aspergillus niger*. *Mycoses*, 49, 316-323.
- Perricone, M; Arace, E., Corbo, M. R., Sinigaglia, M., & Bevilacqua, A. (2015). Bioactivity of essential oils: a review on their interaction with food components. *Frontiers in Microbiology*, 6, 76.
- Pitt, J.I. (2000). Toxigenic fungi: which are important? *Medicine in Mycology*, 38, 17-22.
- Quinn, G. P., & Keough, M. J. (2002) (Eds). Experimental design data analysis for biologists. (pp 1-537). Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom.
- Raper, K. B., & Fennell, D. I. (1965). The Genus *Aspergillus*. (pp 1-686). Williams and Wilkins, Baltimore.
- Razzaghi-Abyaneh, M., Allameh, A., Tiraihi, T., Shams-Ghahfarokhi, M., & Ghorbanian, M. (2005). Morphological alterations in toxigenic *Aspergillus parasiticus* exposed to neem (*Azadirachta indica*) leaf and seed aqueous extracts. *Mycopathologia*, 159, 565-570.
- Roychoudhury, R. (2016). Chapter 18 - Neem Products, In Ecofriendly Pest Management for Food Security. *Academic Press*, 545-562.
- Scudamore, K. A., & MacDonald, S. J. (1998). A collaborative study of an HPLC method for determination of ochratoxin A in wheat using immunoaffinity column clean-up. *Food Additives and Contaminants*, 15, 401-410.
- Tongnuanchan, P., & Benjakul, S. (2014). Essential Oils: Extraction, Bioactivities, and Their Uses for Food Preservation. *Journal of Food Science*, 79, 7, 1231-1249.
- Zaika, L. L., & Buchanan, R. L. (1987). Review of compounds affecting the biosynthesis or bioregulation of aflatoxins. *Journal of Food Protection*, 50, 691-708.

Zeringue, H. J., & Bhatnagar, D. (1994). Effects of Neem leaf volatiles on submerged cultures of aflatoxigenic *Aspergillus parasiticus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 3543-3547.

Zeringue, H. J., Shih, B. Y., & Bhatnagar, D. (2001). Effects of clarified Neem oil on growth and aflatoxin B formation in submerged and plate cultures of aflatoxigenic *Aspergillus* spp. *Phytoparasitica*, 29, 1-4.