

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

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

MARIANA PAIVA RODRIGUES

BELO HORIZONTE
2019

MARIANA PAIVA RODRIGUES

**EFEITOS DO ÓLEO DE NEEM (*Azadirachta indica*) SOBRE O CRESCIMENTO
IN VITRO E PRODUÇÃO DE OCHRATOXINA A POR CEPAS DE *Aspergillus*
*carbonarius***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, como requisito parcial para a obtenção de grau de Mestre em Ciência Animal.

Área de concentração: Medicina Veterinária Preventiva

Orientadora: Profa. Dra. Kelly Moura Keller

Co-orientadora: Profa. Dra. Maria Isabel de Azevedo

Belo Horizonte
Escola de Veterinária da UFMG
2019

R696e Rodrigues, Mariana Paiva, 1990-
Efeitos do óleo de Neem (*Azadirachta indica*) sobre o crescimento *in vitro* e produção de ocratoxina A por cepas de *Aspergillus carbonarius* / Mariana Paiva Rodrigues. – 2019.
45 p. : il.

Orientadora: Kelly Moura Keller

Co-orientadora: Maria Isabel de Azevedo

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária.

Inclui bibliografia

1. Micotoxinas – Teses. 2. Neem – Teses. 3. Ecofisiologia – Teses. 4. Ocratoxinas – Teses.
5. Óleos essenciais – Teses. I. Keller, Kelly Moura. II. Azevedo, Maria Isabel de. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. IV. Título.

CDD – 615.952 92

FOLHA DE APROVAÇÃO

MARIANA PAIVA RODRIGUES

Dissertação submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA .

Aprovada em 30 de Janeiro de 2019, pela banca constituída pelos membros:

Kelly Moura Keller

Prof^ª. Kelly Moura Keller
Presidente - Orientador

Camila

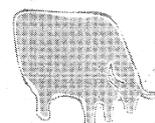
Prof^ª. Camila Stefanie Fonseca de Oliveira
Escola de Veterinária - UFMG

Marina

Prof^ª. Marina Guimarães Ferreira
Universidade Federal de Lavras - UFLA

Maria Isabel de Azevedo

Prof^ª. Maria Isabel de Azevedo
Escola de Veterinária - UFMG



DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Paulo César e Sayonara, pelo suporte, carinho, dedicação e amor ao longo de todos estes anos.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço aos meu pais Paulo César e Sayonara; meus irmãos Leonardo e Rafaela; meu namorado Daniel; meus avós e toda minha família, por terem me apoiado e incentivado nesta trajetória, sempre com muito amor, carinho, e, principalmente, pela compreensão e paciência pelos momentos difíceis e de ausência.

À Profa. Dra. Kelly Moura Keller, pelo aprendizado contínuo, paciência e dedicação constante, zelo e amizade ao longo de todos estes anos de orientação. Agradeço, também, por ter me apresentado à micologia e micotoxicologia.

À Profa. Dra. Maria Isabel de Azevedo pela co-orientação, ensinamentos, carinho e amizade durante estes dois anos de convívio.

A todos os colegas da Escola de Veterinária da UFMG, em especial, aos amigos do Laboratório de Micologia e Micotoxinas (LAMICO), sem vocês nada disso teria sido possível.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), pela bolsa de estudos que possibilitou a dedicação exclusiva ao programa de pós-graduação.

Aos meus cachorros Boca e Dóris; a todos os meus amigos de Sete Lagoas, BH, de congressos e viagens; e à todas as pessoas que me apoiaram, incentivaram ou contribuíram para a execução deste estudo.

A todos vocês, o meu mais sincero agradecimento!

RESUMO

Aspergillus carbonarius é uma espécie pertencente ao grupo dos *Aspergillus* negros (*Aspergillus* seção Nigri), de dispersão mundial, deteriorante de alimentos e importante produtor de ocratoxina A (OTA), sendo comum em regiões de clima tropical. A OTA é um metabólito secundário tóxico, detectado em todas as regiões do mundo, biossintetizado principalmente por esta espécie fúngica, que ao ser absorvida e metabolizada, afeta a saúde de seres humanos e animais, através de ação nefrotóxica, hepatotóxica, carcinogênica e imunossupressora. Os óleos essenciais são substâncias aromáticas complexas voláteis, constituídas por diversos compostos, que possuem inúmeras características positivas distintas como atividade antimicrobiana, antioxidante, anti-inflamatória. Os óleos essenciais e extratos da árvore de Neem se destacam devido à inocuidade e à efetividade que apresentam como produtos naturais antifúngicos, anti-micotoxinas, anti-inflamatórios e antioxidantes. Neste estudo foi avaliada a atividade antifúngica do óleo de Neem sobre o crescimento de seis cepas de *A. carbonarius* e sua ação anti-micotoxina sobre a produção de OTA. Foram testadas quatro concentrações, 0,1%, 0,3%, 0,5% e 1,0% (v/v) de óleo essencial de Neem em meio de cultivo, além de três tempos de incubação (2, 7 e 10 dias). Dentre as quatro concentrações avaliadas, apenas 0,3% inibiu completamente o crescimento de *A. carbonarius* em $98,4\% \pm 1,0$, enquanto a utilização de maiores concentrações (0,5% e 1,0%), mostrou menor atividade antifúngica, uma vez que inibiram apenas $41,1\% \pm 5,0$ e $64,8\% \pm 4,5$, respectivamente. A produção de OTA foi completamente inibida com a adição das menores concentrações de óleo de Neem (0,1% e 0,3%), para as quatro cepas isoladas, em laboratório, a partir de uvas; enquanto que as duas cepas de referência testadas produziram baixos níveis médios de OTA em 10 dias de incubação. O presente estudo demonstra que a utilização de óleos essenciais de Neem como método auxiliar para a redução do crescimento micelial e produção de OTA é viável desde que seja utilizado em concentrações e por tempo adequados.

Palavras-chave: micotoxinas, óleos essenciais, ecofisiologia

ABSTRACT

Aspergillus carbonarius is a species from the group of black Aspergilli (*Aspergillus* section *Nigri*), of world dispersion, regarded as common food spoilage fungi and an important producer of ochratoxin A (OTA). This species is a common contaminant of tropical climate regions. OTA is a toxic secondary metabolite, detected worldwide, mainly biosynthesized by this fungal species, which, when absorbed and metabolized, affects the health of humans and animals through nephrotoxic, hepatotoxic, carcinogenic and immunosuppressive action. Essential oils are volatile complex aromatic substances, constituted by several compounds, which have innumerable distinct positive characteristics like antimicrobial, antioxidant, anti-inflammatory activity; the essential oils and extracts extracted from the Neem tree stand out due to the harmlessness and effectiveness of natural antifungal, antimycotoxin, anti-inflammatory and antioxidant products. This study evaluated the anti-fungal activity of Neem oil, on the growth of six strains of *A. carbonarius* and the antimycotoxin activity on OTA production. Four concentrations, 0.1%, 0.3%, 0.5% and 1.0% (v/v) of Neem essential oil were added and tested in the culture medium in addition to three different incubation times (2, 7, 10 days). Among the four concentrations of Neem oil evaluated, only 0.3% completely inhibited the growth of *A. carbonarius* by $98.4\% \pm 1.0$, while the use of the highest tested concentrations of Neem oil, 0.5% and 1.0%, showed lower antifungal activity since these concentrations inhibited only $41.1\% \pm 5.0$ and $64.8\% \pm 4.5$, respectively. The OTA production was completely inhibited with the addition of the lowest concentrations of Neem oil evaluated, 0.1% and 0.3%, for the four strains isolated in the laboratory, from grapes; while the two reference strains tested produced low average levels of OTA in 10 days of incubation. The present study demonstrates that the use of Neem essential oils as an auxiliary method for the reduction of mycelial growth and OTA production is feasible if it is used in adequate concentrations and time.

Keywords: mycotoxins, essential oils, ecophysiology

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Macroscopia das colônias de <i>Aspergillus carbonarius</i> em meio de cultura CYA (A) e MEA (B). -----	5
Figura 2: Comparação do crescimento entre <i>Aspergillus carbonarius</i> (A) e <i>Aspergillus niger</i> (B) em meio MEA-B. -----	5
Figura 3: Microscopia de <i>Aspergillus carbonarius</i> . -----	6
Figura 4: Conídios de <i>Aspergillus carbonarius</i> em microscopia óptica (A) e em microscopia eletrônica de varredura (SEM) (B). -----	6
Figura 5: Estrutura química da ocratoxina A. -----	7
Figura 6: Vias metabólicas sugeridas para a ocratoxina A. -----	9
Figura 7: Fórmulas químicas dos principais compostos antimicrobianos encontrados em óleos essenciais. -----	13
Figura 8: Produtos utilizados para a extração do óleo de Neem: (A) Árvore de Neem, (B) Galho de Neem, (C) Folhas de Neem, (D) Frutos de Neem, (E) Sementes (com endocarpo) e (F) Sementes (sem endocarpo). -----	14
Figura 9: Estruturas químicas de compostos relevantes presentes no óleo de Neem -----	15
Figura 10: Modelo de avaliação da taxa de crescimento radial micelial -----	18
Figura 11: Porcentagens de inibição do crescimento de seis cepas de <i>Aspergillus carbonarius</i> em diferentes concentrações de óleo Neem. -----	20

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Duração da fase lag (horas) das seis cepas de *Aspergillus carbonarius* testadas em cinco concentrações diferentes de óleo de Neem. ----- 21

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 *Aspergillus carbonarius* (ST). ----- 21

Tabela 3: Concentração de ocratoxina A produzida pelas seis cepas de *Aspergillus carbonarius* em diferentes concentrações de óleo de Neem e tempos de incubação. ----- 23

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). ----- 25

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS	2
2.1. Objetivo geral	2
2.2. Objetivos específicos.....	2
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
3.1. Fungos micotoxigênicos.....	3
3.2. <i>Aspergillus</i> spp.	3
3.3. <i>Aspergillus carbonarius</i>	4
3.4. Ocratoxina A	7
3.5. Prevenção e controle.....	10
3.5.1. Métodos pré-colheita	10
3.5.2. Métodos pós-colheita	11
3.5.3. Óleos essenciais	12
3.5.4. Óleo de Neem	14
4. MATERIAL E MÉTODOS	17
4.1. Cepas fúngicas	17
4.2. Meios de cultura	17
4.3. Condições de inoculação e incubação	17
4.4. Avaliação do crescimento	17
4.5. Extração de ocratoxina A da cultura	18
4.6. Detecção e quantificação de ocratoxina A	19
4.7. Análises estatísticas	19
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
5.1. Efeitos do óleo de Neem sobre os parâmetros de crescimento das cepas de <i>Aspergillus carbonarius</i>	20
5.2. Efeitos do óleo de Neem sobre a produção de ocratoxina A pelas cepas de <i>Aspergillus carbonarius</i>	23
6. CONCLUSÕES.....	26
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	27
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28

1. INTRODUÇÃO

A contaminação fúngica nos alimentos pode ocasionar relevantes perdas econômicas devido a redução da qualidade, propriedades nutricionais e alterações organolépticas, como sabor, aroma e textura. Além disso, muitas destas espécies de fungos são capazes de produzir fatores alergênicos e metabólitos secundários tóxicos que são prejudiciais à saúde humana e animal.

Os principais gêneros produtores de micotoxinas são *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp. e *Penicillium* spp.. *Aspergillus* spp. possui grande relevância por ser encontrado em diversas regiões do mundo, mais frequentemente em países próximos à linha do Equador, e ser um importante colonizador de diversos substratos, principalmente alimentos, como grãos e cereais, frutas, forragens, entre outros. Possui relevância em países de clima tropical, como o Brasil, pois além de possuir clima favorável para o desenvolvimento fúngico, é um importante produtor de alimentos, como grãos, cereais, rações, etc.

Aspergillus carbonarius pertence à seção Nigri, dos chamados *Aspergillus* negros, sendo a espécie que apresenta maior relevância na biossíntese de ocratoxina A (OTA). Esta é sapróbia e ubíqua e comumente isolada como contaminante de vinhedos e cafeeiros. A OTA é uma micotoxina de extrema importância por já ter sido detectada em inúmeras variedades de alimentos em todo o mundo e acarretar efeitos tóxicos tanto à saúde humana como animal. Ao ser metabolizada apresenta propriedades principalmente nefrotóxicas, carcinogênicas, teratogênicas e hepatotóxicas, sendo classificada como possível carcinogênico para seres humanos (Grupo 2), pela Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC, 1993), e, além disso, já foi correlacionada à nefropatia endêmica dos Balcãs, uma doença progressiva caracterizada por redução da função renal e frequentemente fatal.

Devido aos inúmeros efeitos negativos sobre a saúde humana e animal e prejuízos econômicos que a contaminação por *A. carbonarius* e a OTA podem causar, o estabelecimento de métodos de prevenção e controle destes micro-organismos e toxinas nos alimentos é importante. Todavia, os métodos disponíveis atualmente não são totalmente eficientes na inibição de crescimento fúngico e produção de micotoxinas, e, além disso, muitos destes métodos possuem características negativas, inviabilizando a sua utilização, como alto custo, baixa efetividade, perdas nutritivas, toxicidade, ou alteração de características organolépticas e nutritivas do produto. Portanto, a busca por novos produtos antifúngicos naturais tem aumentado, com destaque para os óleos essenciais.

Os óleos essenciais (OE) são uma mistura de compostos odoríferos voláteis, extraídos de diversas partes de plantas, podendo ser folhas, sementes, casca e raízes, que possuem propriedades particulares e positivas, como atividade antimicrobiana, antioxidante, anti-inflamatória, entre outras. Devido à estas características, a utilização de óleos essenciais vem demonstrando ser uma alternativa natural e eficaz no controle de fungos e conseqüentemente na produção de micotoxinas.

O Neem (*Azadirachta indica*) é uma árvore da qual são obtidos óleos essenciais e extratos que são comumente utilizados como antimicrobiano, antiviral, antifúngico e anti-inflamatório. Estes extratos apresentam efeitos comprovados no uso como controle natural do crescimento de diversos gêneros fúngicos e, principalmente, como substância antimicotoxinas. É importante ressaltar que estes óleos essenciais de Neem possuem baixa toxicidade para mamíferos, o que os caracteriza como seguros para a utilização em alimentos.

Neste contexto, torna-se imprescindível encontrar novos métodos de prevenção e controle da contaminação por *Aspergillus carbonarius*, bem como da produção de OTA, através da utilização de produtos naturais devido principalmente à sua segurança e baixo custo.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Investigar os efeitos do óleo de Neem sobre o crescimento *in vitro* e produção de ocratoxina A por cepas de *Aspergillus carbonarius*.

2.2. Objetivos específicos

a) Avaliar a eficácia de diferentes concentrações do óleo de Neem sobre parâmetros do crescimento *in vitro*: fase Lag e velocidade de crescimento em cepas ocratoxigênicas de *Aspergillus carbonarius*.

b) Avaliar o efeito do óleo de Neem em diferentes concentrações no controle da produção de OTA por cepas de *A. carbonarius* cultivadas em agar Czapek extrato de levedura (CYA) em diferentes tempos de incubação.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Fungos micotoxigênicos

Fungos filamentosos são organismos ubíquos, sapróbios, reconhecidos contaminantes e deteriorantes de alimentos. São quimio-heterotróficos e sua nutrição se dá pela produção de importantes enzimas que degradam diferentes substratos em nutrientes absorvíveis. Devido à ação deteriorante destas enzimas, a contaminação fúngica pode acarretar perdas nutricionais dos alimentos e, em consequência, perdas produtivas pelos animais, e econômicas pelos produtores; além disso, podem ocorrer alterações do sabor, aroma e textura dos alimentos, o que pode descaracterizar os mesmos (ROCHA et al., 2014).

De acordo com Samson et al. (2001), mais de 80 espécies fúngicas, pertencentes à cinco filos distintos, são contaminantes comuns de alimentos, podendo causar prejuízos e perdas aos produtores. Esta contaminação das matérias-primas e alimentos pode ocorrer durante qualquer etapa de produção, seja durante o plantio, colheita, secagem de grãos, etapas de fabricação dos alimentos processados e/ou estocagem (PITT; HOCKING, 2009). Importante salientar que certos gêneros fúngicos são mais propensos em contaminar durante a pré-colheita, e outros, durante a pós-colheita.

Além da deterioração causada por enzimas, algumas espécies fúngicas são capazes de produzir fatores alergênicos e/ou micotoxinas, que são prejudiciais à saúde de consumidores. Micotoxinas são metabólitos secundários tóxicos produzidos por certas espécies de fungos filamentosos, quando se encontram em situações de estresse oxidativo, como: baixa umidade, aumento ou redução de temperatura, presença de pragas competidoras na lavoura, estresse hídrico, entre outros fatores. De acordo com o Conselho de Ciência Agrícola e Tecnológica (CAST - do inglês - *Council for Agricultural Science and Technology*) (2003), os principais gêneros produtores de micotoxinas são *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. e *Fusarium* spp., sendo as principais classes de micotoxinas, produzidas por estes gêneros, as aflatoxinas, fumonisinas, ocratoxinas, zearalenona e tricotecenos (deoxinivalenol, HT-2 toxina e T-2 toxina, principalmente).

3.2. *Aspergillus* spp.

Aspergillus spp. é um gênero de fungos anamorfos, que foi inicialmente descrito e nomeado no livro *Nova Plantarum Genera*, pelo clérigo e biólogo Micheli em 1729, devido à semelhança entre a microscopia dos fungos deste gênero e o *Aspergillum*, um objeto utilizado por sacerdotes. Este gênero fúngico é sapróbio, de dispersão mundial e aparece entre os fungos de maior incidência no mundo. Apesar de não possuir um grande número e diversidade de espécies como outros gêneros de grande dispersão, por exemplo, *Penicillium* spp., apresenta elevada capacidade de crescimento em uma ampla faixa de temperatura e são xerofílicos, ou seja, têm tolerância à baixa atividade de água (a_w) e umidade (BENNETT, 2010). Devido à estas características, os fungos deste gênero apresentam capacidade de colonizar um vasto número de substratos, sendo os principais grãos e cereais como amendoim, milho, soja, sorgo, café, além de frutas naturais e secas (PITT; HOCKING, 2009).

Aspergillus spp. possui grande importância econômica tanto positiva como negativa, a primeira se dá devido à utilização como método “verde” de biossíntese de partículas e compostos químicos (ácido cítrico), na produção e extração de diversas enzimas, como amilases, que são utilizadas em aplicações industriais e a utilização como fermentadores de alimentos (BENNETT, 2010; HOUBRAKEN; VRIES; SAMSON, 2014). O impacto negativo, ocorre devido à

contaminação e deterioração de alimentos, além do potencial patogênico que algumas espécies apresentam e a produção de micotoxinas por certas cepas (BENNETT, 2010; CAST, 2003).

O gênero *Aspergillus* é tradicionalmente identificado por características morfológicas microscópicas, através da visualização da vesícula que dá origem às células conidiogênicas. Entretanto, os fungos são atualmente identificados através da utilização de taxonomia polifásica, que permitiu novas identificações e reclassificações de *Aspergillus* spp. e, de acordo com Houbraeken, Vries e Samson (2014), este gênero é subdividido em quatro subgêneros (*Aspergillus*, *Circumdati*, *Fumigati* e *Nidulantes*), 19 seções e diferentes clados.

A temperatura ótima de crescimento de *Aspergillus* spp. varia conforme a espécie, todavia, à 25°C todas apresentam crescimento pleno, logo, países de clima tropical têm uma maior ocorrência de contaminação por estes fungos (PITT; HOCKING, 2009). Isso demonstra a importância de países como o Brasil, que têm o clima ideal para o desenvolvimento deste fungo, e grande parte da economia baseada no agronegócio, e/ou, através da influência direta pela produção e qualidade de insumos cultivados e comercializados pelo país.

3.3. *Aspergillus carbonarius*

Aspergillus carbonarius se encontra no subgênero *Circumdati*, sendo descrito por Gams et al. (1985) na seção Nigri, sendo esta, de extrema relevância, devido à certas espécies possuírem aplicações biotecnológicas importantes e também serem comumente isolados de uma ampla variedade de alimentos de distribuição mundial. São considerados fungos comuns na deterioração de alimentos e na biodeterioração de diversos outros materiais (SAMSON et al., 2001). Além disso, certas espécies desta seção são importantes produtoras de ocratoxina A, com destaque para o *A. carbonarius*, sendo a espécie de maior relevância na produção desta micotoxina, seguido pelos isolados de *A. niger* agregados, um complexo de espécies intimamente relacionadas (FERRARA et al., 2016).

Aspergillus carbonarius apresenta crescimento ótimo à temperatura média de 30°C, sendo a máxima tolerada em média de 40°C e a mínima em média de 8°C, já a atividade de água (a_w) ótima para crescimento é de 0,96-0,98. O binômio temperatura e atividade de água ótimos para a produção de OTA é de 15°C e 0,95-0,97 ou 20°C e 0,98-0,99. Devido à estas características, é um fungo contaminante comum de diversos tipos de alimentos, sendo principalmente encontrado em uvas e seus derivados, frutas secas e café. De acordo com Pitt e Hocking (2009), esta espécie já foi isolada de uvas e vinhedos em diversas regiões do mundo, como América do Sul, Mediterrâneo e Europa, sendo alguns dos países: a Espanha (ABARCA et al., 2003), Grécia (TJAMOS et al., 2004), Itália (BATTILANI et al., 2004) e Argentina (ROMERO et al., 2005; MAGNOLI et al., 2004). No Brasil, além do isolamento e identificação de *A. carbonarius* em uvas e vinhos (ROSA et al., 2002), esta espécie também já foi identificada em grãos de café (TANIWAKI et al., 2003; TANIWAKI et al., 2014). É importante salientar que os estudos descritos anteriormente corroboram a afirmação de que *A. carbonarius* é um fungo de grande importância na biossíntese de OTA.

As características macroscópicas de *A. carbonarius*, em meio de cultura agar Czapek extrato de levedura (CYA) à 25°C, são colônias medindo 60 mm de diâmetro ou mais, de coloração escura com micélio branco superficial, com cabeças conidiais visíveis a olho nu (Fig. 1 A) e de reverso amarelo pálido. Em meio de cultura agar extrato de malte (MEA) as colônias possuem características similares medindo 60 mm de diâmetro ou mais, no entanto, são menos densas, de coloração negra com micélio branco sub-superficial discreto, cabeças conidiais geralmente visíveis a olho nu (Fig. 1 B), sendo o reverso da colônia incolor (SAMSON et al., 2007; PITT; HOCKING, 2009).

Figura 1: Macroscopia das colônias de *Aspergillus carbonarius* em meio de cultura CYA (A) e MEA (B).

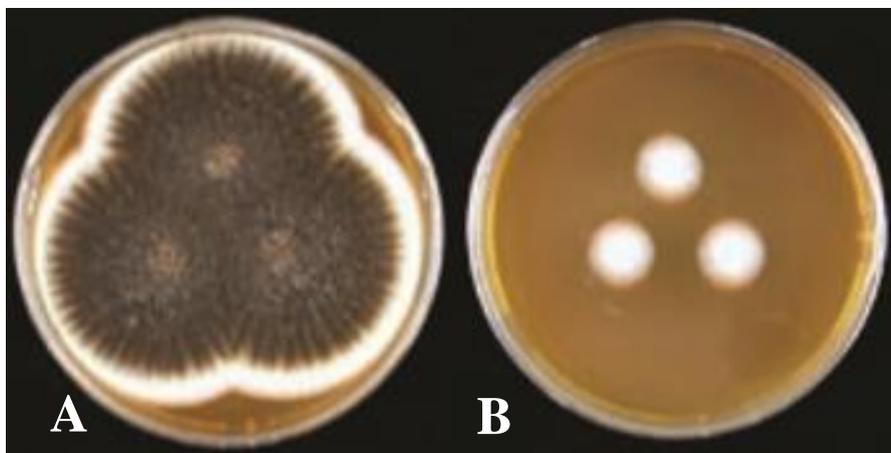


Fonte: Samson et al. (2007)

As colônias de *A. carbonarius* em meio de cultura agar 25% glicerol nitrato (G25N) apresentam 8-25 mm de diâmetro, cabeças conidiais espaçadas e negras, reverso pálido. Já em meio de cultura CYA à 37°C, também, apresentam crescimento, sendo o diâmetro de colônia de 15-35 mm, com micélio branco amarelado denso, margens irregulares e esporulação esparsa; já em CYA à 5°C não apresentam germinação (PITT; HOCKING, 2009). No entanto, de acordo com Samson et al. (2007), *A. carbonarius* é a única espécie de aspergilos negros que cresce à 9°C. Estas características macroscópicas são utilizadas na execução e identificação por chave taxonômica de *Aspergillus* spp.

Além dos meios de cultura já citados, o agar extrato de malte suplementado com boscolid (MEA-B) é utilizado como um meio de cultura semi-seletivo e de diferenciação para os fungos ocratoxigênicos e para *A. carbonarius*, já que este apresenta crescimento e esporulação normal enquanto outros aspergilos negros como *A. niger*, *A. brasiliensis* e *A. piperis*, não apresentam esporulação neste meio (Fig. 2) (SAMSON et al., 2007).

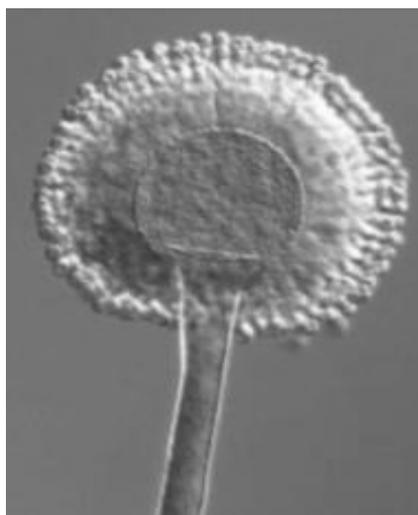
Figura 2: Comparação do crescimento entre *Aspergillus carbonarius* (A) e *Aspergillus nigri* (B) em meio MEA-B.



Fonte: Samson et al. (2007)

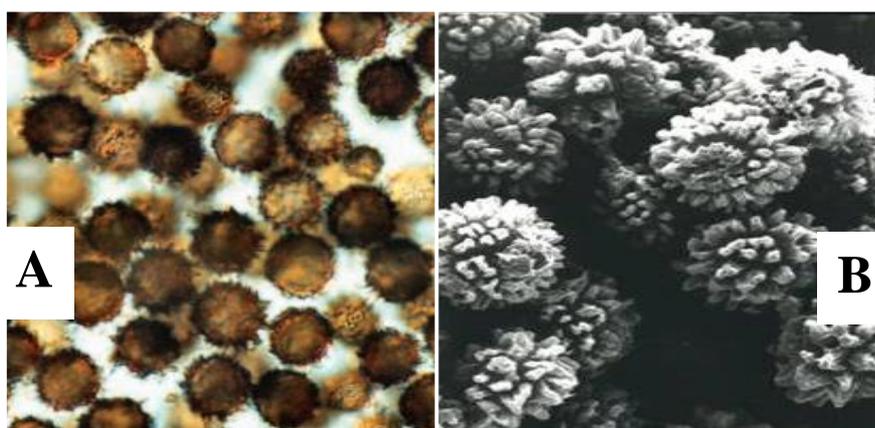
As características microscópicas de *A. carbonarius* são conidióforos longos de 2 a 3 μm de comprimento e paredes lisas, vesículas globosas negras medindo geralmente de 60 a 90 μm de diâmetro, bisseriadas, contendo métulas longas (12-18 μm) e fiálides longas (9-12 μm) cobrindo amplamente toda a superfície da vesícula (Fig. 3). Além disso, *A. carbonarius* é facilmente distinguível dos outros aspergilos negros, pela microscopia, pois possui conídios grandes entre 7-9 μm , rugosos à espinhosos e negros. Devido à coloração escura que apresentam, estes conídios possuem resistência à luz ultravioleta, o que os tornam mais resistentes e adaptados à regiões tropicais com grande incidência solar (Fig. 4) (SAMSON et al., 2007; PITT; HOCKING, 2009).

Figura 3: Microscopia de *Aspergillus carbonarius*.



Fonte: Pitt e Hocking (2009)

Figura 4: Conídios de *Aspergillus carbonarius* em microscopia óptica (A) e em microscopia eletrônica de varredura (SEM) (B).



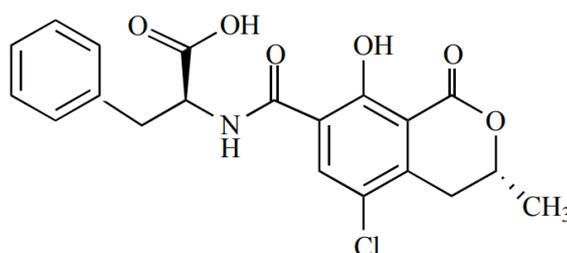
Fonte: Samson et al. (2007); www.bcbrc.firdi.org.tw/fungi

Além das diferenças nos crescimentos e características macro e microscópicas, a capacidade de produzir diferentes metabólitos como a piranogigrina A, naphtho- γ -pyrones (aurasperone B) e principalmente as ocratoxinas (A, B, α , β); facilitam a distinção entre os diferentes aspergilos negros (SAMSON et al., 2007; PITT; HOCKING, 2009).

3.4. Ocratoxina A

A ocratoxina A é um metabólito secundário tóxico (Fig. 5) produzido por certos fungos dos gêneros *Penicillium* spp. e *Aspergillus* spp., sendo o primeiro de maior importância em países de clima temperado e o segundo em países de clima tropical. Devido estes gêneros fúngicos serem de dispersão mundial e sapróbios, a ocratoxina A já foi detectada em diversos tipos de alimentos por todo o mundo (CAST, 2003). A espécie de maior importância na biossíntese desta micotoxina é *A. carbonarius*, isolados de uvas e derivados e grãos de café (e.g. ROSA et al., 2002; ABARCA et al., 2003; TJAMOS et al., 2004; ROMERO et al., 2005; TANIWAKI et al., 2014).

Figura 5: Estrutura química da ocratoxina A.



Fonte: Wu et al. (2011)

A ocratoxina A acarreta em efeitos tóxicos à saúde humana e de diversas espécies animais. Esta micotoxicose pode ser aguda ou crônica, e varia de acordo com a quantidade de OTA absorvida, o tempo de exposição, a idade e a espécie afetada, os suínos, por exemplo, são bastante sensíveis à pequenas quantidades de OTA; o limite máximo tolerado de OTA na alimentação destes animais é de 50 ng/g (= ppb - partes por bilhão), de acordo com a legislação estabelecida pela união europeia (UE, 2006). Dentre os efeitos tóxicos destaca-se a nefrotoxicidade, hepatotoxicidade, teratogenicidade, enterites e carcinogênese (CAST, 2003). A OTA é classificada como Grupo 2B, ou seja, possível carcinógeno para seres humanos, pela Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC, 1993). Além disso, a OTA, já foi correlacionada à nefropatia endêmica dos Balcãs (NEB), inicialmente descrita na década de 50 em três países da região dos Balcãs, a antiga Iugoslávia, Bulgária e Romênia, se caracterizando por degeneração tubular, fibrose intersticial e hialinização dos glomérulos, podendo acarretar em falência renal e até mesmo a morte (PFOHL-LESZKOWICZ et al., 2002).

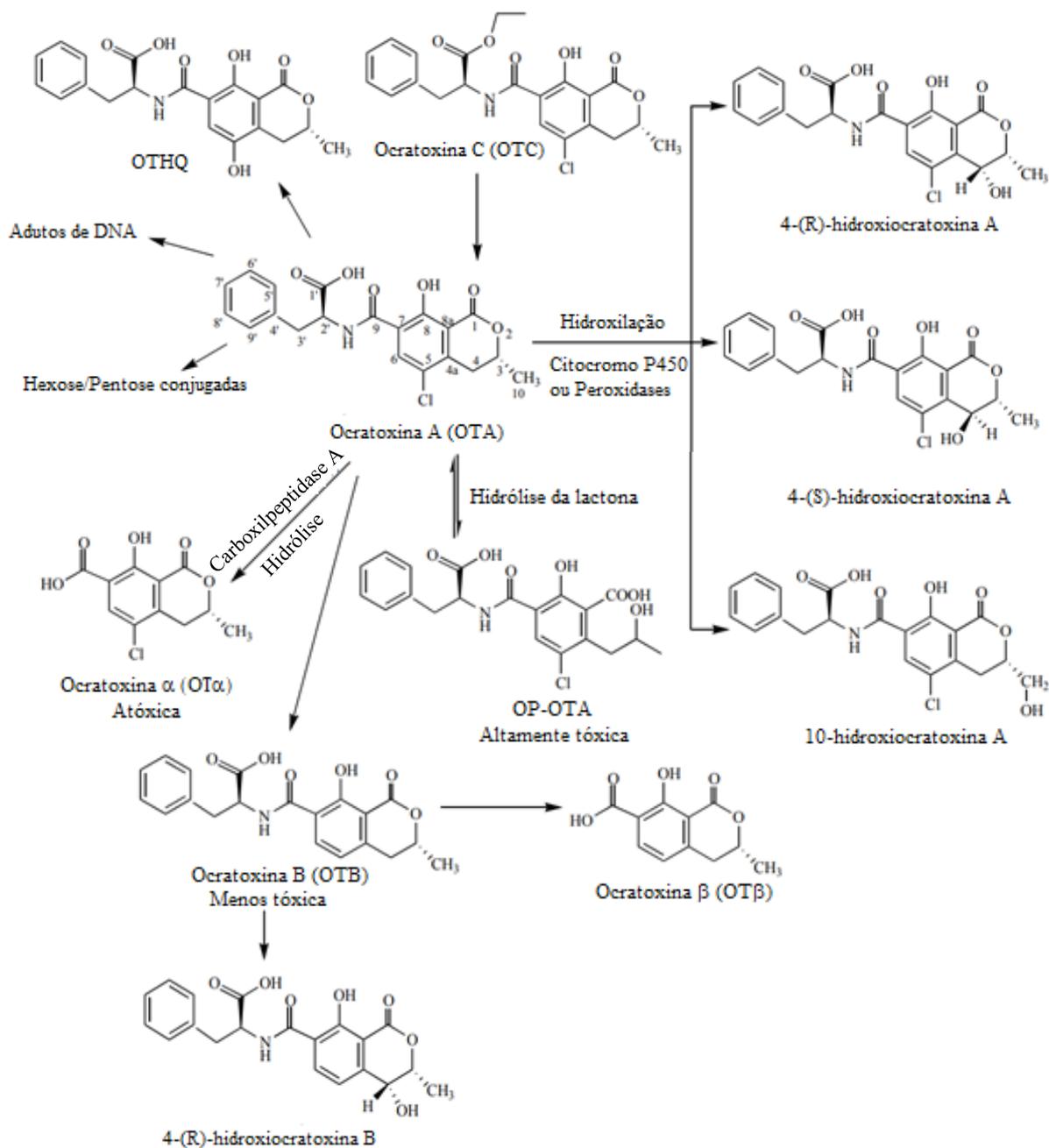
A OTA é absorvida pelo trato gastrointestinal e posteriormente entra na circulação, podendo ser excretada e reabsorvida. Pode se ligar às proteínas plasmáticas, como a albumina, o que aumenta a meia-vida da toxina nos tecidos e circulação sanguínea. Seres humanos e animais bio-transformam a OTA, sendo esta metabolização e eliminação dos compostos acarreta na toxicidade e especificidade de órgãos alvo. Essa bio-transformação da ocratoxina A varia conforme a espécie acometida, no entanto, o metabolismo detalhado da OTA ainda não foi

totalmente elucidado. Em todas as espécies sabe-se que as vias de excreção renal e gastrointestinal têm papel relevante no *clearance* desta micotoxina (RINGOT et al., 2006). A eliminação da OTA através de filtração glomerular é insignificante, sendo a reabsorção desta toxina considerada parcialmente responsável pela acumulação intracelular.

Uma possível via de biotransformação da OTA é através da microbiota intestinal que a converte em um metabólito atóxico, a ocratoxina α (OT α). Outras vias de metabolização da OTA são pelos sistemas microssomais hepático e renal. A OTA, através do sistema microssomal hepático e catalisada pelo citocromo P450, é metabolizada dando origem aos diferentes isômeros (4R)- e (4S)-4-hidroxiocratoxina A e ao metabólito 10-OH-OTA (compostos de baixa toxicidade). No sistema hepático, também, pode ocorrer a biotransformação de ocratoxina B (OTB) em 4-OH-OTB, e essa, na presença de NADPH, pode ser metabolizada em ocratoxina β (OT β) (WU et al., 2011).

No sistema microssomal renal também é possível detectar os metabólitos (4R)-4-OH-OTA e 10-OHOTA. Ademais, OTB é transformada a partir da decloração da OTA, ocratoxina esta que é menos genotóxica. A OTA pode ser convertida, através da abertura do anel de lactona quando se encontra sob condições alcalinas em ocratoxina A lactona-aberta (OP-OTA), um composto altamente genotóxico (WU et al., 2011; KŐSZEGI; POÓR, 2016). A atividade genotóxica da OTA não é a única explicação para a atividade carcinogênica, este metabólito além de todas estas vias de transformação, pode ainda facilitar a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), que causam uma oxidação indireta do ácido desoxirribonucleico (DNA); e a OTA também atua na formação de adutos de DNA (PFOHL-LESZKOWICZ; MANDERVILLE, 2012). As principais vias metabólicas sugeridas e principais metabólitos biotransformados se encontram descritas na figura 6.

Figura 6: Vias metabólicas sugeridas e principais metabólitos biotransformados da ocratoxina A.



Fonte: Adaptado de Wu et al. (2011).

Alguns dos mecanismos de ação da ocratoxina A são a indução de produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), o que acarreta na indução de citotoxicidade, redução de viabilidade

celular, além de atuar na peroxidação de lipídios (RAHIMTULA et al., 1988; PETRIK et al., 2003). Já a indução da morte celular dos túbulos proximais aparentemente se dá principalmente pela disfunção mitocondrial, através da redução e inibição dos sítios respiratórios I e II das mitocôndrias (ALEO; WYATT; SCHNELLMANN, 1991).

3.5. Prevenção e controle de micotoxinas

Devido à extensa distribuição mundial dos fungos contaminantes de alimentos e potencialmente produtores de micotoxinas, o estabelecimento de métodos de prevenção e controle de micotoxinas, se mostra de extrema importância. Dentre esses estão a implementação de boas práticas de agricultura durante a pré-colheita, boas práticas de estocagem e boas práticas durante a pós-colheita, e/ou a utilização de aditivos orgânicos e inorgânicos nas culturas (CAST, 2003; BRASIL, 2003).

3.5.1. Métodos pré-colheita

As boas práticas de agricultura englobam a adoção de medidas de manejo e de planejamento, como descrito por Cole et al. (1985). A utilização de manejo correto de irrigação, planejamento de datas de plantio e colheita são importantes para que se reduza a produção de micotoxinas, devido à baixa umidade e alta temperatura serem pontos críticos de estresse para os fungos durante a pré-colheita. Outro ponto crítico é a manutenção do campo livre de pragas, pois a ação destes insetos e artrópodes acarreta em danos físicos e eliminação das barreiras protetoras dos alimentos, o que facilita a penetração e contaminação fúngica. Além disso, as pragas são também responsáveis pela disseminação dos fungos nas lavouras e propagação da contaminação no campo (MILLER, 1995; ALDRED; MAGAN, 2004), sendo, portanto, preconizado como maneira preventiva, o uso de culturas resistentes, rotação de culturas e utilização de métodos de controle de pragas, sejam eles químicos ou não (CLEVELAND et al., 2003; WILLIAMS et al., 2010). Também é importante o uso de maquinário adequado ao campo e à cultura, pois a ação mecânica desajustada pode causar danos aos alimentos, assim como os insetos o fazem. Apesar de aparentemente serem medidas simples e de fácil adoção, a utilização de irrigação, culturas resistentes e rotação de culturas são métodos de difícil implementação em certas localidades e terrenos, pois muitos produtores apresentam resistência à mudança de hábitos; e estas técnicas não são economicamente viáveis para pequenos e médios produtores. Além do mais, métodos como a utilização de produtos químicos para controle de pragas podem ser prejudiciais ao meio ambiente, aos trabalhadores que fazem a aplicação destes compostos tóxicos, e aos consumidores finais do produto (BRASIL, 2003)

A utilização de aditivos fungicidas e/ou fungistáticos apresenta-se como uma alternativa de controle e prevenção destes fungos, seja através do uso de produtos biológicos, químicos ou naturais. Outra alternativa de controle biológico é a inoculação de micro-organismos competidores no ambiente, como a utilização de cepas fúngicas não-toxígenas, que atuam como competidoras contra cepas selvagens toxígenas ambientais. Entretanto, para que a utilização dos isolados possa ser segura e eficaz, é necessário que a cepa fúngica selecionada seja feita de forma correta, sendo primordial saber qual a espécie e micotoxina está acometendo a lavoura. Também é de extrema relevância que as cepas escolhidas para o controle biológico sejam preferencialmente isoladas do ambiente, apresentando, assim, maior capacidade competitiva e segurança ambiental. Também é importante que apresentem como características, não ter a capacidade de produzir micotoxinas e de reverter sua toxicidade, e serem geneticamente estáveis. Todavia, o emprego

desta técnica é restrito, uma vez que apresenta alto custo agregado à compra de esporos da cepa escolhida, pois é necessário a inoculação de grande quantidade destes por área, além de dificuldade operacional e de segurança de inoculação, pois fungos como os do gênero *Aspergillus* spp. são potencialmente patogênicos à seres humanos e apresentam risco à saúde de trabalhadores rurais que manipulam estes inóculos (PITT; HOCKING, 2009).

Devido às dificuldades de implementação de medidas eficazes no controle de fungos e micotoxinas, aos prejuízos à saúde de trabalhadores e ambientais que certos componentes tóxicos acarretam, a pesquisa e utilização de produtos naturais têm sido intensificadas na tentativa de se encontrar produtos naturais eficazes para o controle natural de fungos e micotoxinas.

3.5.2. Métodos pós-colheita

Devido às características fisiológicas dos fungos produtores de micotoxinas é possível se estabelecer parâmetros ideais de prevenção e controle de ambiência pós-colheita, ou seja, durante o período de estocagem dos grãos. Armazenar apenas grãos limpos e íntegros, através da seleção de grãos por métodos de separação mecânicos ou separação por densidade é um método pós-colheita bastante utilizado, contudo a simples seleção de grãos não é capaz de retirar todos os grãos contaminados com fungos e/ou micotoxinas. Controlar a umidade ou atividade de água (a_w) no recebimento dos grãos é medida importante, sendo 12% de umidade o limite máximo para recebimento de grãos. A umidade pode ser reduzida através da secagem dos cultivos, porém este processo demora dias, não sendo ágil o bastante para prevenir eficientemente a produção de micotoxinas (KABAK; DOBSON; VAR, 2006). Manter a temperatura dos locais de estocagem menor do que 20°C, abaixo da temperatura ótima de produção de micotoxinas, preservar o local de armazenagem sempre limpo, seco e livre de roedores e artrópodes, também são medidas recomendadas para a prevenção e controle de fungos e micotoxinas. Conservar a atmosfera controlada com redução de O₂ e aumento de CO₂, ou através do uso do gás dióxido de enxofre, podem, também, ser realizados na tentativa de se reproduzir um ambiente seguro com baixa contaminação fúngica (MAGAN; ALDRED, 2007; TORRES et al., 2014). Porém, a manutenção de padrões excelentes de estocagem é difícil e onerosa aos produtores, além disso, outras medidas preventivas como a dedetização se feita de maneira inapropriada e por pessoal não qualificado, pode acarretar em risco aos trabalhadores que estão fazendo aplicação dos produtos e a contaminação dos alimentos.

Os aditivos fungicidas e/ou fungistáticos químicos são compostos inorgânicos sintéticos que levam à redução do crescimento fúngico e/ou produção de micotoxinas. O uso destes compostos fungicidas e agrotóxicos não é preconizado devido à possibilidade de levar à intoxicação de trabalhadores e animais bem como contaminações ambientais. Antioxidantes sintéticos, como o hidroxibutilanisol (BHA) e o hidroxibutiltolueno (BHT) podem ser empregados com a finalidade de retardar o crescimento fúngico e a produção de micotoxinas; no entanto, sua utilização é controversa, devido à natureza carcinogênica destas substâncias (CHANG; BRANEN, 1975; NESCI; RODRIGUEZ; ETCHEVERRY, 2003).

Devido aos efeitos negativos do uso de determinados conservantes sintéticos e aos prejuízos ambientais que componentes tóxicos acarretam, a busca por produtos naturais que possam atuar como conservantes, tem aumentado. Nesse sentido se destacam os óleos essenciais e seus componentes, que por possuírem o status de relativamente seguros, ampla aceitação pelos consumidores, e exploração com potencial para uso multifuncional, têm sido alvo de diversas pesquisas de aplicação antifúngica e anti-micotoxinas (CHERRAT et al., 2014; CALO et al., 2015; PANDEY et al., 2017).

3.5.3. Óleos essenciais

Assim como nas aplicações pré-colheita, os produtos naturais, como os óleos essenciais (OE), têm sido pesquisados por serem inertes à saúde humana, animal e ambiental, sua capacidade antimicrobiana e anti-oxidante; o que confere à estes produtos características ideais para aplicação como aditivos antifúngicos e anti-micotoxinas naturais alimentícios. Óleos essenciais são misturas complexas de compostos odoríferos voláteis de baixo peso molecular (principalmente mono- e sesquiterpenos, benzoides, fenilpropanoides, etc.); extraídos de plantas, através do uso de métodos físicos (destilação ou pressão). Acredita-se que a produção de óleos essenciais por plantas se dê por diferentes razões, como por exemplo, mecanismo de defesa contra patógenos, atrativo para insetos polinizadores e/ou formação de subprodutos tóxicos do metabolismo (BASER; BUCHBAUER, 2010; TONGNUANCHAN; BENJAKUL, 2014; CALO et al., 2015).

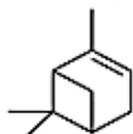
A composição dos OE varia principalmente conforme a genética, espécie e a parte da planta da qual é feita a extração, podendo ser raízes, sementes, caule, flores e folhas, e a distinção na composição dos OE se dá por diferenças nas condições nas quais as plantas foram cultivadas, como por exemplo, a localização e adubação. A caracterização química dos OE é muito importante para o entendimento de suas propriedades biológicas; estes possuem diferentes componentes e concentrações; os principais compostos podem constituir até 70% do total, já os outros componentes aparecem em menores porcentagens, podendo aparecer apenas como traços (BASER; BUCHBAUER, 2010; PAVELA, 2015). Existe uma relação entre as estruturas químicas dos compostos mais abundantes nos óleos essenciais e a atividade antimicrobiana; já os compostos presentes em menores concentrações participam de forma essencial, possivelmente, através de efeitos sinérgicos com os componentes de maior porcentagem (BURT, 2004; PERRICONE et al., 2015).

A natureza física dos OE, por exemplo, baixo peso molecular combinado com pronunciadas tendências lipofílicas permite que penetrem na membrana celular mais rapidamente que outras substâncias (PAWAR; THAKER, 2007), evidenciando assim características antimicrobianas positivas para uso como um agente antimicrobiano, ou seja, um bom método de controle natural. Outra hipótese que explica sua atividade antimicrobiana são danos enzimáticos ao sistema celular, incluindo aquelas funções associadas à produção de energia e síntese de compostos estruturais, causados por componentes antioxidantes como timol, carvacrol, vanilina (CONNER; BEUCHAT, 1984a,b). A presença de substâncias antioxidantes nos OE evidencia também a possibilidade do uso destes produtos como um método antioxidante natural, sendo um excelente substituto para os antioxidantes sintéticos como BHA e BHT. Na figura 7 estão representadas fórmulas químicas dos principais compostos antioxidantes e antimicrobianos, encontrados em óleos essenciais.

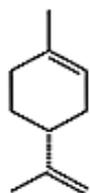
Figura 7: Fórmulas químicas dos principais compostos antimicrobianos encontrados em óleos essenciais.

Terpenos

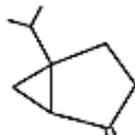
Monoterpenos



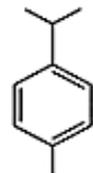
α -Pínenos



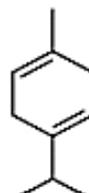
Limoneno



Sabineno

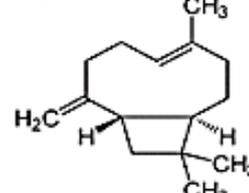


P-cimeno



γ -Terpineno

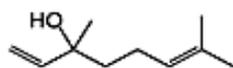
Sesquiterpenos



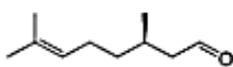
β -Cariofileno

Terpenóides

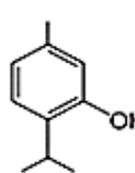
Monoterpenóides



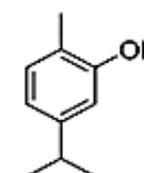
Linalol



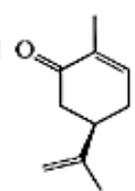
Citronelol



Timol



Carvacrol

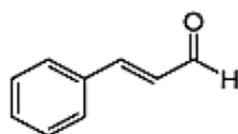


Carvona

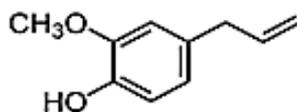


Borneol

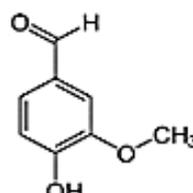
Fenilpropanóides



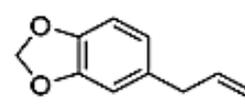
Cinamaldeído



Eugenol

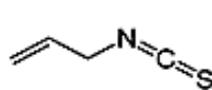


Vanilina

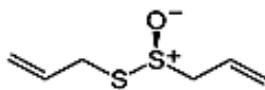


Safrol

Outros



Isotiocianato de alila



Alicina

Fonte: Hyldgaard, Mygind e Meyer (2012)

Diversos estudos verificaram o uso de diferentes óleos essenciais com atividade antibacteriana (GALLUCCI et al., 2009; PEI et al., 2009) e antifúngica; além disso, demonstram a ação como controle biológico contra fungos aflatoxigênicos (PAWAR; THAKER, 2007; EL-NAGERABI et al., 2012; FERREIRA et al., 2013; PASSONE et al., 2013; MANSO et al., 2014). É importante ressaltar que óleos essenciais e seus componentes possuem status de relativamente seguro e ampla aceitação pelos consumidores por serem produtos naturais (CHERRAT et al.,

2014; CALO et al., 2015; PANDEY et al., 2017). Assim, a aplicação de óleos essenciais se mostra como um método bastante atrativo no controle biológico de fungos e micotoxinas, seja para aplicação em grãos, frutas, bebidas, alimentação animal e outros substratos.

3.5.4. Óleo de Neem

O Neem (*Azadirachta indica*) é uma árvore nativa das regiões áridas da Ásia e África, atualmente já dispersa no território nacional como planta exótica; sendo considerada uma planta medicinal muito importante, utilizada em mais de 700 preparações herbais, na medicina ayurvédica indiana tradicional como pesticida (SCHMUTTERER, 1990), antiparasitário (MULLA; SU, 1999; QUELEMES et al., 2015), antibacteriano (QUELEMES et al., 2015), antiviral (FACCIN-GALHARDI et al., 2012), anticoncepcivo (SAIRAM et al., 2000; CHAUBE et al., 2014), anti-inflamatório (KAUR; ALAM; ATHAR, 2004) e também no tratamento de leptospiroses, problemas oculares, problemas respiratórios e constipações (BRAHMACHARI, 2004). Da árvore de Neem já foram extraídos e classificados mais de 150 compostos químicos, de diferentes partes como casca, folhas, flores, raízes e sementes (Fig. 8).

Figura 8: Produtos utilizados para a extração do óleo de Neem: (A) Árvore de Neem, (B) Galho de Neem, (C) Folhas de Neem, (D) Frutos de Neem, (E) Sementes (com endocarpo) e (F) Sementes (sem endocarpo).

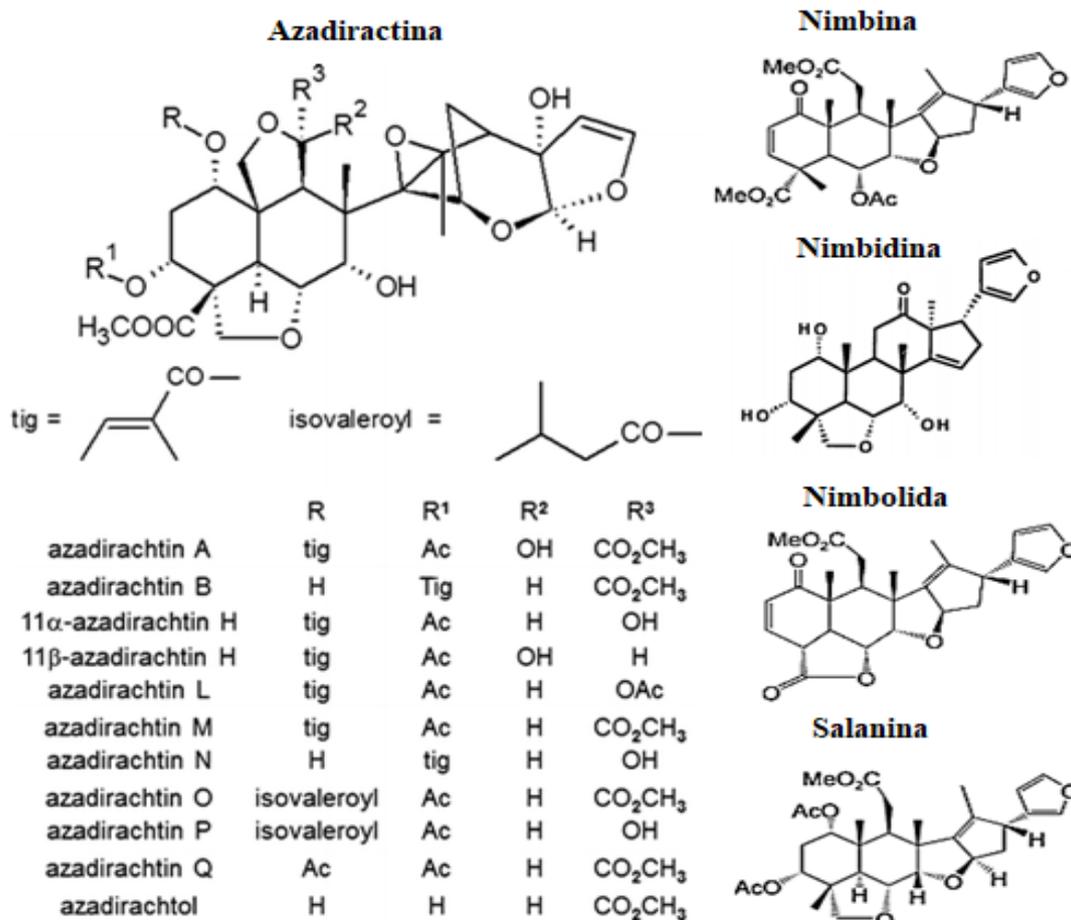


Fonte: Girish e Shankara (2008)

Os compostos extraídos da árvore de Neem estão basicamente divididos em dois grupos: os isoprenoides e os não-isoprenoides, os primeiros compreendem os diterpenoides e triterpenoides (limonoides, azadirona e derivados, salanina, nimbina, a azadiractina, entre outros); já os segundos abrangem as proteínas, aminoácidos, carboidratos, compostos poli-

fenólicos (flavonoides, cumarina, taninos, compostos alifáticos, entre outros) (BRAHMACHARI, 2004); as estruturas químicas de alguns compostos presentes no óleo de Neem que possuem importância e atividades antimicrobiana e antioxidante, se encontram na figura 9.

Figura 9: Estruturas químicas de compostos relevantes presentes no óleo de Neem.



Fonte: Adaptado de Brahmchari (2004); Warra (2012).

A azadiractina (AZ) é um composto triterpenoide polar, que aparece em maior concentração nos extratos de óleo de Neem, esta pode ser extraída de qualquer parte da árvore de Neem, sendo de maior ocorrência nas sementes da planta; esta substância possui muitas moléculas de oxigênio na estrutura química (JOHNSON; MORGAN; PEIRIS, 1996), além de quatro radicais (R, R¹, R² e R³) que vão configurar outras moléculas análogas (isômeros) de AZ, como exposto, anteriormente, na figura 9. Foi inicialmente detectada como um importante inseticida natural atuando através da regulação de crescimento e inibição de apetite de diferentes insetos (ISMAN et al., 1990), já, Quelemes et al. (2015), a identificou como um dos mais relevantes compostos de atividade antimicrobiana extraídos de folhas de Neem, através da comprovação da atuação do óleo desta planta sobre a inibição da formação de biofilmes, agregação planctônica de MRSA (*Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina). AZ e Nimbolida são, também,

considerados os dois limonoides de maior potencial anticarcinogênico, sendo relacionado à constituintes de supressão tumoral, ação anti-proliferativa e indução de apoptose de células cancerosas (KUMAR et al., 2010; ALZOHAIKY, 2016).

Além destas características, a Azadiractina apresenta atividade antifúngica, assim como pode ser concluído no trabalho de Govindachari, Suresh e Gopalakrishnan (1998), no qual é possível notar que esta substância acarreta em redução de crescimento para os fungos *Drechslera oryzae*, *Alternaria tenuis* e *Fusarium oxysporum*; Mossini, Arrotéia e Kimmelmeier (2009) avaliaram a atividade antifúngica de óleo e extratos de Neem e concluíram que o primeiro apresentava maior atividade provavelmente devido à maior presença de AZ nas sementes de Neem em relação às folhas. Estes autores também descrevem que a ação antifúngica deste composto está ligada ao possível sinergismo que apresenta em relação aos diversos compostos.

A Salanina é um limonoide polar e aparece como um dos compostos de maior concentração assim como o AZ, e possui atividade intermediária espermicida, antiúlcera (BISWAS et al., 2002). Govindachari, Suresh e Gopalakrishnan (1998), identificaram o potencial antifúngico deste composto através da inibição de *D. oryzae*, *A. tenuis* e *F. oxysporum*. De acordo com Murthy e Sirsi (1957) a Nimbidina, outro triterpenoide de importância, também possui atividade antifúngica e antibacteriana, tendo sido eficaz na utilização contra *Trichophyton rubrum* e *Mycobacterium tuberculosis*, respectivamente. Além de possuir atividade anti-inflamatória, antipirética, efeitos antiúlcera e através de administração oral já foi demonstrado o efeito significativamente hipoglicêmico (BISWAS et al., 2002).

Diversos estudos já demonstraram efeitos positivos do uso do óleo e extratos de Neem como controle biológico do crescimento de diversos gêneros fúngicos, como, *Alternaria* spp., *Fusarium* spp., *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp., *Microsporum* spp., *Rhizopus* spp. e principalmente como substância antimicotoxina (e.g. BHATNAGAR; MCCORMICK, 1988; ZERINGUE; BHATNAGAR, 1990; MOSSINI; OLIVEIRA; KEMMELMEIER, 2004; SITARA et al., 2008). A atividade antimicotoxinas do óleo e dos extratos de Neem pode ser explicada pela capacidade antioxidante que este possui, atuando através da neutralização, da estabilização e desativação de radicais livres (ALZOHAIKY, 2016).

Óleos essenciais de Neem são compostos que possuem eficácia comprovada contra um amplo espectro de pragas (insetos, fungos e vírus), e possuem baixa toxicidade para mamíferos, o que os caracteriza como seguros para a utilização em alimentos (ROYCHOUDHURY, 2016).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Cepas fúngicas

Foram utilizadas seis cepas de *Aspergillus carbonarius*. Duas cepas de referência (FRR5690 e A2034) do Centro de Coleção do Conselho Consultivo da Ciência e da Indústria (CSIRO, Austrália - do inglês *Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation*); e quatro cepas de *A. carbonarius* isoladas de uvas secas (sem sementes) de diferentes variedades, na Argentina (RCG1, RCG2, RCG3 e RCG4). Todas produtoras de OTA no meio de cultura extrato de levedura sacarose (YES), composto por 2% extrato de levedura e 15% sacarose (MAGNOLI et al., 2004). As cepas foram mantidas em criotubos contendo glicerol 15% à -80°C.

4.2. Meios de cultura

Para este estudo foi utilizado óleo vegetal emulsionado extraído de sementes da árvore de Neem (*Azadirachta indica*) obtido comercialmente (Base Fértil Agrícola, São Paulo/SP), sendo 0,12% p/p (=1200 ppm - partes por milhão) de princípio ativo, de acordo com o fabricante. A partir deste, quantidade suficiente do óleo de Neem foi adicionado ao meio de cultivo CYA à ~45°, seguida de agitação em vórtex e plaqueamento para obtenção das concentrações 0,1%, 0,3%, 0,5%, 1,0% (v/v); para cada concentração foram feitas três placas (triplicata) e para o estabelecimento do controle negativo, placas sem adição de óleo de Neem, apenas com meio de cultura CYA, também foram preparadas em triplicata.

4.3. Condições de inoculação e incubação

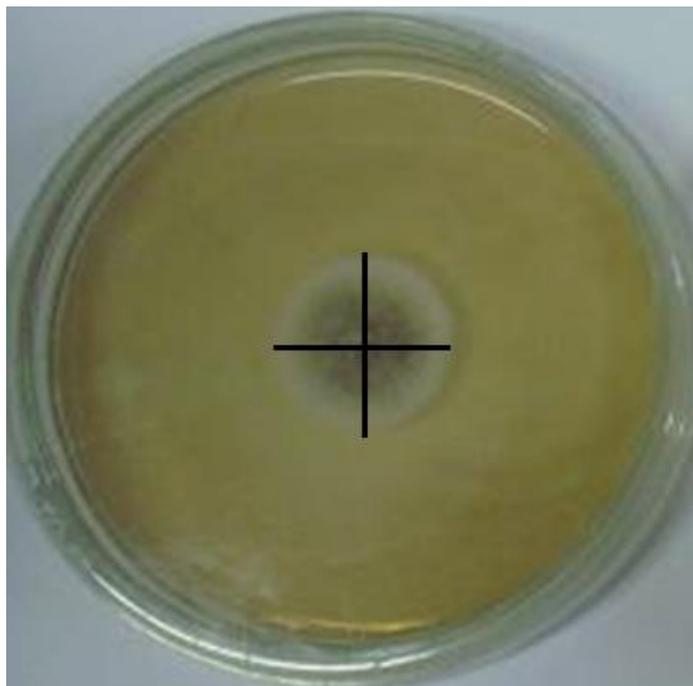
Primeiramente foi realizada a inoculação das cepas *Aspergillus carbonarius* em meio ágar extrato de malte 2% (MEA) à temperatura de 25°C, durante 7 dias, até que as colônias apresentassem boa conidiogênese. Para a preparação do inóculo, com o auxílio de uma alça estéril, conídios foram desprendidos das colônias e transferidos para um tubo contendo 10 mL de água destilada estéril suplementada com 0,1% de Tween 20. A solução foi homogeneizada e lida em espectrofotômetro (530 nm), com a finalidade de se obter absorvância entre 0,09 e 0,13, o que corresponde à 2–5 x 10⁶ unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL). A suspensão preparada foi diluída 1:10 em água destilada estéril a fim de se obter uma concentração final de 2–5 x 10⁵ UFC/mL. Com o auxílio de uma alça estéril foram realizadas inoculações centrais de 10 µL em todas as placas de Petri contendo diferentes concentrações do óleo de Neem. A incubação foi feita realizada em temperatura de 25°C ± 2 durante 14 dias.

4.4. Avaliação do crescimento

A avaliação do crescimento fúngico foi feita através da obtenção da velocidade de crescimento radial e da fase lag. A primeira foi realizada através da avaliação da taxa de crescimento radial micelial em milímetros por dia (mm/dia), da seguinte forma; duas medições perpendiculares diárias dos diâmetros das colônias em crescimento foram realizadas, sempre nos mesmos ângulos, até que as colônias atingissem o crescimento pleno, ou seja, as bordas das placas

(Fig. 10). Através da comparação entre o diâmetro alcançado em cada tratamento, em relação ao controle, foi feita a análise e estabelecimento da relação entre concentrações e porcentagens de inibição do crescimento micelial. A obtenção da fase lag, foi definida como o tempo (em horas), para atingir 5 mm de diâmetro, o raio das colônias foi plotado contra o tempo e uma regressão linear foi aplicada (BLUMA; AMAIDEN; ETCHEVERRY, 2008).

Figura 10: Modelo de avaliação da taxa de crescimento radial micelial.



Fonte: Arquivo pessoal

4.5. Extração de ocratoxina A da cultura

A produção de OTA foi realizada através de metodologia adaptada de Bragulat, Abarca e Cabañes (2001) após dois, sete e 10 dias de incubação. Foram retirados três plugues de pontos equidistantes das colônias para um microtubo, seguida da 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 (filtros de seringa com membrana de nylon, de 17 mm de diâmetro e 0,45 μm de tamanho dos poros), 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).

4.6. Detecção e quantificação de ocratoxina A

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 μ m tamanho de partícula), conectada a uma pré-coluna (Supelguard LC-ABZ, Supelco; 20 x 4,6 mm, 5 μ m 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 μ L e o tempo de retenção obtido para a ocratoxina A de 4 ± 1 minutos. O limite de detecção das análises foi 1 ng/g (SCUDAMORE; MCDONALD, 1998).

4.7. Análises estatísticas

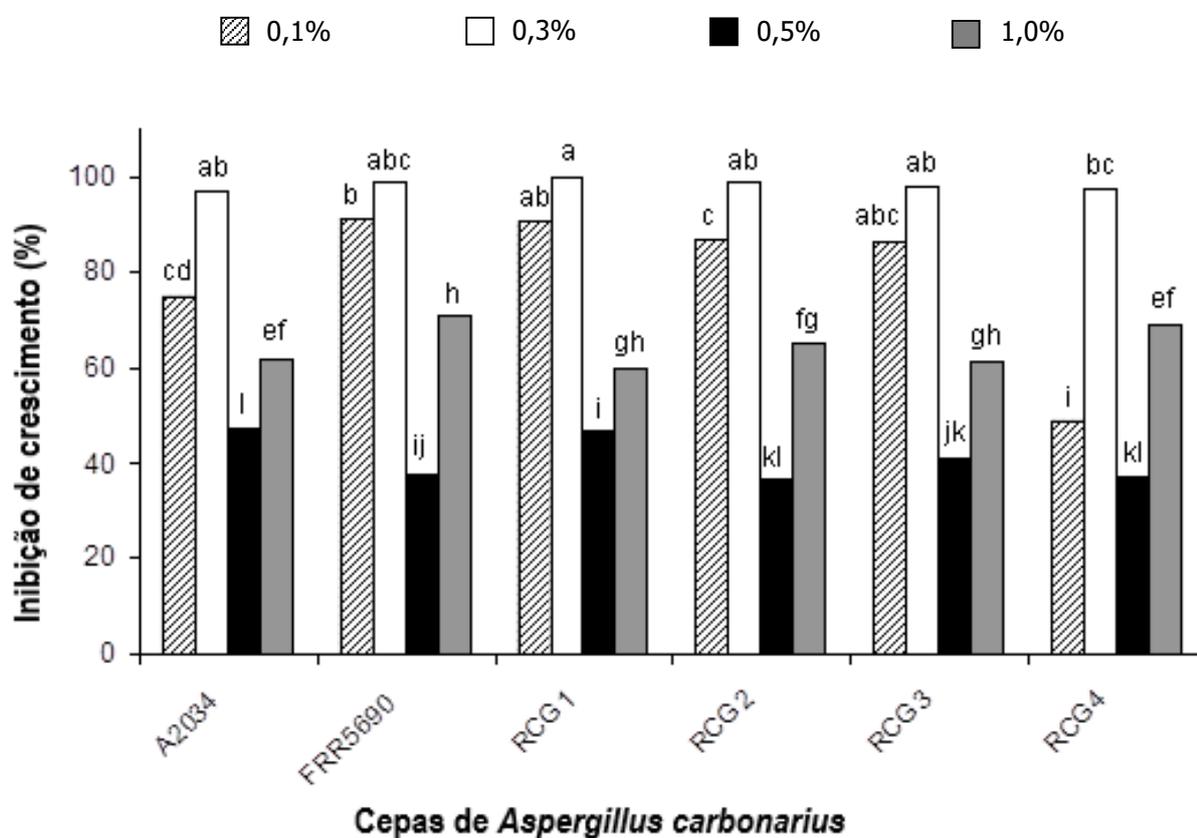
As análises estatísticas foram conduzidas usando o PROC GLM no programa SAS (SAS Institute Inc., Cary, North Carolina, USA). As diferenças entre a porcentagem de inibição de crescimento, fase lag e a produção de OTA, sob as diferentes concentrações de óleo de Neem, pelas seis cepas de *Aspergillus carbonarius* nos três tempos de incubação (2, 7 e 10 dias) foram analisadas estatisticamente por análise de variância (ANOVA). Os valores médios do percentual de inibição foram comparados através do Teste de Fisher (LSD) para determinar a influência do óleo de Neem sobre a ecofisiologia das seis cepas de *A. carbonarius* utilizadas neste estudo (QUINN; KEOGH, 2002).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. 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 seis cepas de *A. carbonarius*, analisadas em meio de cultura CYA, está evidenciado na figura 11.

Figura 11: Porcentagens de inibição do crescimento de seis cepas de *Aspergillus carbonarius* em diferentes concentrações de óleo Neem.



Dentre as quatro concentrações de óleo de Neem avaliadas, apenas a concentração de 0,3% inibiu completamente o crescimento das seis cepas de *A. carbonarius*, sendo a média de porcentagem de inibição obtida de $98,4\% \pm 1,0$, efeito antifúngico alto ($> 80\%$). A concentração de 0,5% teve efeito antifúngico baixo ($< 60\%$), sendo a inibição média, para as seis cepas, de apenas $41,1\% \pm 5,0$, já a concentração de 1,0% teve efeito antifúngico mediano (entre 60%-80%), inibindo em média, para as seis cepas, $64,8\% \pm 4,5$.

Diferentemente das concentrações 0,3%, 0,5% e 1,0%, a concentração de 0,1%, não apresentou porcentagem de inibição estável para as seis cepas, para a cepa de referência FRR5690

e as cepas isoladas em laboratório RCG1, RCG2 e RCG3 a porcentagem de inibição de crescimento foi eficiente, entre 80-90%; para a cepa de referência A2034 a inibição do crescimento foi mediana com a inibição abaixo dos 80%, já a cepa RCG4 apresentou inibição insatisfatória, abaixo dos 60%.

Diante destes resultados foi possível verificar que há dependência entre a concentração do óleo de Neem utilizada e a atividade antifúngica analisada; entretanto, esta dependência não apresenta relação positiva, pois, a completa inibição das colônias foi obtida através do uso da concentração de 0,3% e a maior concentração utilizada (1,0%) apresentou resultado mediano.

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.

Tabela 1: Duração da fase lag (horas) das seis cepas de *Aspergillus carbonarius* testadas em cinco concentrações diferentes de óleo de Neem.

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

DP: desvio padrão.

a,f Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa (P<0,001).

Valores similares da fase lag foram observados entre as seis cepas de *A. carbonarius* testadas e as concentrações de 0,5% e 1,0% de óleo de Neem, sem diferença significativa (P≤0,001). Entretanto, ao utilizar a menor concentração, 0,1%, a fase lag aumentou significativamente, sendo o aumento em média de 94,2 h, 47,6 h, 158,5 h, 79,2 h, 79,2 h, 66,5 h, para as cepas FRR5690, A2034, RCG1, RCG2, RCG3 e RCG4, respectivamente.

Já ao utilizar a concentração de 0,3% de óleo de Neem, a fase lag sofreu ampliação em mais de 240 horas para cinco cepas; o que explica a inibição do crescimento de FRR5690, A2034, RCG1, RCG2 e RCG3, evidenciado na figura 10. Para a concentração de 0,3% apenas uma cepa (RCG4) foi capaz de atingir a fase exponencial durante o período avaliado, tendo sido o tempo de fase lag desta cepa de 36±6,9 horas.

De acordo com a Tabela 2 é possível observar que os dois fatores (concentrações de óleo de Neem e cepas) tem um efeito significativo (P<0,001) sobre a inibição do crescimento e a fase lag das cepas estudadas de *Aspergillus carbonarius*.

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 *Aspergillus 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*

^a Graus de liberdade. ^b Quadrado médio. ^c F-Snedecor.

*Significância P<0,001.

Estudos anteriores sobre os efeitos de compostos naturais foram feitos avaliando o crescimento e produção de micotoxinas por diversos fungos; Gowda, Malathi e Suganthi (2004) estudaram os efeitos de compostos químicos e herbais sobre o crescimento de outras espécies toxigênicas, como o *Aspergillus parasiticus*, e observaram que o óleo de Neem a 0,5% tem boa atividade antifúngica (84% de redução em comparação ao grupo controle) e a 0,2% e 0,1% baixa atividade antifúngica, sendo respectivamente, 52% e 36% de redução. Este trabalho contradiz os resultados encontrados neste estudo, o que pode ser explicado pelas diferenças metabólicas entre as espécies fúngicas utilizadas para ambos os estudos, além da diferente composição dos óleos utilizados. Já Zeringue e Bhatnagar (1990) observaram uma menor porcentagem de redução de crescimento do *A. parasiticus* (51%), fato que pode ser elucidado devido ao estudo ter sido executado a partir de folhas de Neem submersas em culturas.

Sitara et al. (2008) concluíram que para a redução do fungo *Alternaria alternata*, as melhores concentrações seriam 0,1% e 0,15% de óleo de Neem extraído a partir de sementes, e não a maior concentração avaliada (0,5%). Estes resultados corroboram os dados encontrados neste estudo, no qual a melhor concentração para extensão de fase lag e, em consequência, redução da velocidade de crescimento fúngico, foi uma concentração moderada (0,3%) e não as concentrações mais altas utilizadas (0,5% e 1,0%). Fato que pode ser esclarecido pelo fato de ambos os estudos terem sido realizados com óleo extraídos a partir de sementes de Neem, o que poderia acarretar em composição e atividade similares.

Em contrapartida, Bhatnagar e McCormick (1988), estudaram os efeitos dos extratos de folhas de Neem nas concentrações 1%, 5%, 10%, 20% e 50% (v/v) sobre o crescimento de *A. parasiticus* e concluíram que não houve alterações significativas do crescimento micelial. Este resultado foi similar ao encontrado por Zeringue e Bhatnagar (1990), ao avaliar o efeito dos extratos de folha de Neem sobre o crescimento do *Aspergillus flavus*, estes encontraram redução de crescimento radial de apenas 4-7%, ou seja, também não foi detectada a redução significativa. A diferença entre estes resultados e o do presente estudo se dão provavelmente devido à ter sido utilizado extratos de folhas de Neem, e não óleo de sementes de Neem, em concentrações diferentes; e além disso apesar de ser o mesmo gênero *Aspergillus* spp. são espécies diferentes e que apresentam, portanto, metabolismos e reações diferentes frente à ação do Neem. Mossini, Oliveira e Kimmelmeier (2004) na avaliação do potencial de extrato de Neem à 50 mg/mL (0,005%) observaram não haver redução significativa sobre o crescimento de *Penicillium expansum*, um gênero fúngico diferente do pesquisado neste estudo.

Diferentemente dos resultados encontrados neste estudo e os trabalhos citados previamente, Razzaghi-Abyaneh et al. (2005) detectaram que extratos aquosos de Neem à 1,56% e 50% (v/v), menor e maior concentração avaliada, não inibem o crescimento fúngico, mas acarretam em modificações das hifas, sendo a vacuolização do citoplasma e danos à parede celular associado ao extravasamento do conteúdo citoplasmático. Mossini, Arrotéia e Kimmelmeier (2009) avaliaram o extrato de folhas de Neem e óleo de Neem sobre o crescimento de espécies de *Penicillium* sp. e encontraram resultados similares, concluindo que o extrato de folhas e o óleo de Neem acarretam em modificações nas características macroscópicas das colônias, e redução da esporulação fúngica; não obstante, o efeito do óleo de Neem se mostrou superior, possivelmente devido à maior concentração de AZ que as sementes possuem.

O trabalho realizado por Zeringue, Shih e Bhatnagar (2001), trouxe resultados ainda mais divergentes aos encontrados neste estudo, no qual foi concluído que a utilização do óleo de Neem clarificado sobre o crescimento em meio líquido e placas de cultura do fungo aflatoxigênico *Aspergillus* spp., resultou em aumento de 11-31% da massa micelial para as concentrações de 0,5 e 1,0 mL.

5.2. Efeitos do óleo de Neem sobre a produção de ocratoxina A pelas cepas de *Aspergillus carbonarius*.

O efeito dos diferentes tratamentos com óleo de Neem sobre a produção de OTA pelas seis 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 ($P < 0,001$).

Nas concentrações de 0,1% e 0,3% de óleo de Neem, houve uma completa inibição da produção de ocratoxina A pelas quatro cepas RCG1, RCG2, RCG3 e RCG4, isoladas em laboratório, a partir de amostras de uva. Estes resultados podem ser explicados pelo fato de ter ocorrido inibição do crescimento micelial para todas as quatro cepas à 0,3% e para as cepas RCG1, RCG2 e RCG3 à 0,1%; já a inibição da produção de OTA pela cepa RCG4 à 0,1%, em que não houve inibição efetiva do crescimento micelial, pode ser elucidado pelo fato do óleo de Neem apresentar efeitos comprovadamente antioxidantes (RAO; DEVI; THYAGARAJU, 1998; BISWAS et al., 2002). Já as duas cepas de referência (FRR5690 e A2034) ao serem testadas em 0,1% e 0,3% de concentração de óleo de Neem, obtiveram níveis não detectáveis e baixos de OTA; sendo as concentrações detectadas a 0,3% de 28,2 ng/g à 10 dias de incubação e de 13,8 e 22,1 ng/g a 0,1%, com 7 e 10 dias de incubação, respectivamente. A ausência da produção de OTA (abaixo do nível de detecção) também foi observada aos dois dias de incubação com a utilização de 1,0% de óleo de Neem nas cepas FRR5690 e RCG4.

Estes resultados encontrados são corroborados pelos estudos realizados por Bhatnagar e McCormick (1988) que estudaram o efeito do extrato de folhas de Neem sobre o crescimento do *A. parasiticus* e a produção de aflatoxinas, e obtiveram resultados positivos com inibição de mais de 98% de aflatoxinas, no entanto, a concentração necessária de extrato de folhas em meio de cultura foi de 10%. Já Allameh et al. (2002) concluíram que a concentração necessária para se atingir 90% de inibição de produção de aflatoxinas pelo *A. parasiticus* é de 50% de extratos de folhas (v/v meio de cultura); uma concentração quase 10 vezes maior do que a obtida neste estudo e cinco vezes maior que a obtida por Bhatnagar e McCormick (1988). Uma hipótese para a diferença das concentrações necessárias de óleo de Neem para se obter o mesmo efeito antimicotóxico de uma mesma espécie fúngica pode ser devido às diferentes composições entre os extratos de folhas, e principalmente, entre os componentes do óleo e extrato. Além do mais, foi comprovado por Bhatnagar e McCormick (1988) que o aumento de temperatura pode reduzir as propriedades anti-micotóxicas dos extratos de folha de Neem, o que poderia explicar a necessidade de uma maior concentração necessária. É importante salientar que Bhatnagar e McCormick (1998) também, constataram que a inibição da biossíntese da aflatoxina é irreversível e mesmo após o fim da exposição do micélio ao extrato de Neem, não houve reestabelecimento da síntese de aflatoxinas. Razzaghi-Abyaneh et al. (2005) também estudaram a interação de extrato aquoso de Neem, extraído de folhas e sementes em diferentes concentrações, sendo a mais baixa 1,56% e a mais alta, 50% (v/v), sobre a produção de aflatoxinas pelo *A. parasiticus* e encontraram redução de 91,3% e 65,4% na produção destas micotoxinas por μg de micélio, respectivamente. Já Mossini, Oliveira e Kimmelmeier (2004), trabalharam com cepas de *Penicillium expansum*, e concluíram que apesar do extrato de Neem ter efeito significativo sobre a inibição da síntese de patulina, esta redução e/ou inibição da produção de micotoxina não está relacionada à redução de crescimento micelial.

Diferentemente do esperado, todas as cepas mostraram um aumento na produção de OTA aos 7 e 10 dias de incubação nas concentrações 0,5% e 1,0%, com exceção da cepa RCG1 que à 1,0% e 10 dias de incubação apresentou redução da OTA. A estimulação exagerada da OTA pode se dar devido ao possível aumento de estresse oxidativo, causado pela maior concentração de óleo de Neem e maior tempo de exposição ao fator estressante, sofrido pelo fungo.

Os fatores concentrações do óleo de Neem, cepas e tempos de incubação tiveram um efeito significativo na produção de OTA pelas cepas de *A. carbonarius* estudadas ($P < 0,001$) (Tab. 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
TI	2	10,18	818,57
ST*C*TI	78	0,75	61,04

^a Graus de liberdade. ^b Quadrado médio. ^c F-Snedecor. *Significância P<0,001.

A cepa RCG1 à concentração de 1,0% apresentou redução na produção de ocratoxina A à 2 e 10 dias, sendo importante salientar que apenas esta cepa apresentou inibição de 34,8% com óleo de Neem com esta concentração; no entanto, ao utilizar 0,5% houve redução da produção de OTA apenas aos 7 dias. A RCG2 apresentou estimulação na produção de OTA na concentração de 0,5%, sendo o aumento médio de 410,2 ppb em 2 dias, 1708,0 ppb em 7 dias e 1785,5 ppb em 10 dias; já na concentração 1,0%, em 7 dias, houve aumento de 1235,1 ppb e em 10 dias de 1026,3 ppb. A cepa RCG3 apresentou aumento aos 7 e 10 dias à 0,5%, sendo 1673,0 ppb e 1026,3 ppb, respectivamente; e também aos 7 dias (1510,9 ppb) e 10 dias (2526,2 ppb) à 1,0%. Já a cepa RCG4 apresentou aumento na produção de OTA na concentração 0,5% aos 10 dias, 74,8 ppb, e aos 7 dias, 1346,6 ppb, e aos 10 dias, 1899,9 ppb, à 1,0% de óleo de Neem. Todas as outras combinações cepa X concentração X tempo de incubação, que não foram citadas acima, apresentaram redução ou manutenção da produção de ocratoxina A.

A maior concentração da OTA obtida entre as seis cepas, as quatro concentrações e os três tempos de incubação foi 6164,5±329,4 ppb para a cepa RCG2 à 1,0% de óleo de Neem com 10 dias de incubação, seguido por 3054,8±1005,9 ppb para a cepa RCG3 e a terceira maior produção, de 2281,2±79,1 ppb, também pela cepa RCG2 à 0,5% e 7 dias de incubação.

Garcia e Garcia (1990) encontraram resultados divergentes ao estudo e alguns trabalhos supracitados, pois concluíram que OE de Neem não inibe o crescimento micelial, e tampouco inibe a produção de aflatoxinas pelas cepas *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus*. Enquanto muitos compostos foram eficientes na inibição do crescimento e produção de aflatoxinas, outros 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.

6. CONCLUSÕES

- O uso do óleo de Neem em baixas concentrações como 0,1% e 0,3%, apresenta boa atividade antifúngica, aumentando a fase Lag e reduzindo a velocidade de crescimento micelial das cepas ocratoxigênicas de *Aspergillus carbonarius*.
- O uso do óleo de Neem em baixas concentrações como 0,1% e 0,3% resulta no controle da produção de OTA por cepas de *A. carbonarius* cultivadas em CYA em diferentes tempos de incubação.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A utilização de baixas concentrações de óleo de Neem, por períodos curtos, como método auxiliar de controle e prevenção natural sobre a redução do crescimento de *Aspergillus carbonarius* e produção de ocratoxina A, é viável. No entanto, devido à co-existência de diversas espécies fúngicas em um mesmo ambiente, a utilização ampla, em campo, deste óleo não deve ser preconizada, até que novos estudos sobre a ação deste produto sobre outros fungos e micotoxinas seja realizada. Devido à carência de estudos sobre o uso de óleos naturais como controle natural de fungos e micotoxinas, a execução de novas pesquisas com esta matéria prima serão feitos em estudos futuros.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABARCA, M.L.; ACCENSI, F.; BRAGULAT, M.R. et al. *Aspergillus carbonarius* as the Main Source of Ochratoxin A Contamination in Dried Vine Fruits from the Spanish Market. **Journal of Food Protection**, v. 66, n. 3, p. 504-506, 2003.

ALDRED, D.; MAGAN, N. Prevention strategies for trichothecenes. **Toxicology Letters**, v. 153, n. 1, p. 165–171, 2004.

ALEO, M.D.; WYATT, R.D.; SCHNELLMANN, R.G. Mitochondrial dysfunction is an early event in ochratoxin A but not oosporein toxicity to rat renal proximal tubules. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.107, n.1, p.73-80, 1991.

ALLAMEH, A.; RAZZAGHI-ABYANE, M.; SHAMS, M. et al. Effects of neem leaf extract on production of aflatoxins and activities of fatty acid synthetase, isocitrate dehydrogenase and glutathione S-transferase in *Aspergillus parasiticus*. **Mycopathologia**, v. 154, n. 2, p. 79-84, 2002.

ALZOHAIRY, M.A. Therapeutics Role of *Azadirachta indica* (Neem) and Their Active Constituents in Diseases Prevention and Treatment. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2016, n. 1, p. 1-11, 2016.

BASER, K.H.C; BUCHBAUER, G. **Handbook of essential oils: Science, technology and applications**. Boca Raton/London/New York: CRC Press, 2010.

BATTILANI, P.; LOGRIECO, A.; GIORNIET, P. et al. Ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* on some grape varieties grown in Italy. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 84, n. 13, p. 1736-1740, 2004.

BENNET, J.W. An Overview of the Genus *Aspergillus*. In: MACHIDA, M.; GOMI, M. *Aspergillus – Molecular Biology and Genomics*. Norfolk: Caister Academic Press, 2010. p. 1-17.

BHATNAGAR, D.; MCCORMICK, S.P. The Inhibitory Effect of Neem (*Azadirachta indica*) Leaf Extracts on Aflatoxin Synthesis in *Aspergillus parasiticus*. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 65, n. 7, p. 1166-1168, 1988.

BISWAS, K.; CHATTOPADHYAY, I.; BANERJEE, R.K. et al. Biological activities and medicinal properties of neem (*Azadirachta indica*). **Current Science**, v. 82, n. 11, p. 1336-1345, 2002.

BLUMA, R.; AMAIDEN, M.R.; ETCHEVERRY, M. Screening of Argentine plant extracts: Impact on growth parameters and aflatoxin B1 accumulation by *Aspergillus* section *Flavi*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 122, n. 1–2, p. 114-125, 2008.

BRAHMACHARI, G. Neem—An Omnipotent Plant: A Retrospection. **ChemBioChem**, v. 5, n. 4, p. 408-421, 2004.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 10, de 31 de julho de 2003. Aprova as Diretrizes Gerais do Plano Nacional de Segurança e Qualidade dos Produtos de Origem Vegetal – PNSQV. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 31 de julho de 2003.

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

CALO, J.R.; CRANDALL, P.G; O'BRYAN, C.A. et al. Essential oils as antimicrobials in food systems – A review. **Food Control**, v. 54, n. 1, p. 111-119, 2015.

CAST. **Mycotoxins: Risks in Plant, Animal, and Human Systems**. n. 139, Iowa: CAST, 2003. p. 199.

CHANG, H.C.; BRANEN, A.L. Antimicrobial effects of butylated hydroxyanisole (BHA). **Journal of Food Science**, v. 40, n. 2, p. 349-351, 1975.

CHERRAT, L; ESPINA, L; BAKKALI, M et al. 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**, v. 94, n. 6, p. 1197 – 1204, 2014.

CLEVELAND, T.E.; DOWD, P.F.; DESJARDINS, A.E. et al. United States Department of Agriculture - Agricultural Research Service research on pre-harvest prevention of mycotoxins and mycotoxigenic fungi in US crops. **Pest Management Science**, v. 59, n. 6-7, p. 629-642, 2003.

COLE, R.J.; SANDERS, T.H.; HILL, R.A. et al. Mean geocarposphere temperatures that induce preharvest aflatoxin contamination of peanuts under drought stress, **Mycopathologia**. v. 91, n. 1, p. 41-46, 1985.

CONNER, D. E.; BEUCHAT, L. R. Effects of essential oils from plants on growth of food spoilage yeast. **Journal of Food Science**, v. 49, n. 2, p. 429-434, 1984a

CONNER, D. E.; BEUCHAT, L. R. Sensitivity of heat-stressed yeast to essential oils of plant. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 47, n. 2, p. 229-233, 1984b.

EL-NAGERABI, S.A.F.; AL-BAHRY, S.N.; ELSHAFIE, A.E. et al. 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**, v. 25, n. 1, p. 59-63, 2012.

EU - EUROPEAN UNION. Commission Directive nº 576 of 17 August 2006. **Official Journal of the European Union**. L. 229, p. 7-9.

FACCIN-GALHARDI, L.C.; YAMAMOTO, K.A.; RAY, S. et al. The in vitro antiviral property of *Azadirachta indica* polysaccharides for poliovirus. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 142, n. 1, p. 86–90. 2012.

FERRARA, M.; PERRONE, G.; GAMBACORTA, L. et al. Identification of a Halogenase Involved in the Biosynthesis of Ochratoxin A in *Aspergillus carbonarius*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 82, n. 18, p. 5631-5641, 2016.

FERREIRA, F.D.; KEMMELMEIER, C.; ARROTÉIA, C.C.; COSTA, C.L. et al. Inhibitory effect of the essential oil of *Curcuma longa* L. and curcumin on aflatoxin production by *Aspergillus flavus* Link. **Food Chemistry**, v. 136, n. 2, p. 789-793, 2013.

GALLUCCI, M.N.; OLIVA, M.; CASERO, C. et al. Antimicrobial combined action of terpenes against the food-borne microorganisms *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus*. **Flavour Fragrance Journal**, v. 24, n. 6, p. 348-354. 2009.

GAMS, W.; CHRISTENSEN, M., ONIONS, A.H.S. et al. Infrageneric taxa of *Aspergillus*. In: SAMSON R.A.; PITT, J.I. (Eds.), **Advances in *Penicillium* and *Aspergillus* systematics**, p. 55-61. Plenum, New York, 1985.

GARCIA, R.P.; GARCIA, M.I. Laboratory evaluation of Neem derivatives against *Aspergillus* growth and aflatoxin formation. **Philippine Agriculturist**, v. 73, n. 3-4, p. 333-342, 1990.

GIRISH, K.; BHAT, S.S. Neem – A Green Treasure. **Electronic Journal of Biology**, v. 4, n. 3, p. 102-111, 2008.

GOWDA, N.K.S.; MALATHI, V.; SUGANTHI, R.U. Effect of some chemical and herbal compounds on growth of *Aspergillus parasiticus* and aflatoxin production. **Animal Feed Science and Technology**, v. 116, p. 281-291, 2004.

HYLDGAARD, M.; MYGIND, T.; MEYER, R.L. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, n. 12, p. 1-24, 2012.

HOUBRAKEN, J.; VRIES, R.P.; SAMSON, R.A. Modern Taxonomy of Biotechnologically Important *Aspergillus* and *Penicillium* Species. **Advances in Applied Microbiology**, v. 86, p. 199-249, 2014.

IARC. **IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans**, v. 56, 1993. Disponível em: <https://monographs.iarc.fr/iarc-monographs-on-the-evaluation-of-carcinogenic-risks-to-humans-65/>. Acessado em: 18 dez. 2018.

ISMAN, M.B.; KOUL, O.; LUCZYNSKI, A. et al. Insecticidal and Antifeedant Bioactivities of Neem Oils and Their Relationship to Azadirachtin Content. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 38, n. 6, p. 1406-1411, 1990.

JOHNSON, S.; MORGAN, D.E.; PEIRIS, C.N. Development of the Major Triterpenoids and Oil in the Fruit and Seeds of Neem (*Azadirachta indica*). **Annals of Botany**, v. 78, n. 3, p. 383-388, 1996.

KABAK, B.; DOBSON, A.D.W.; VAR, I. Strategies to Prevent Mycotoxin Contamination of Food and Animal Feed: A Review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 46, n. 8, p. 593-619, 2006.

- KAUR, G.; ALAM, M.S.; ATHAR, M. Nimbidin Suppresses Functions of Macrophages and Neutrophils: Relevance to its Antiinflammatory Mechanisms. **Phytotherapy Research**, v. 18, n. 5, p. 419-24, 2004.
- KŐSZEGI, T.; POÓR, M. Ochratoxin A: Molecular Interactions, Mechanisms of Toxicity and Prevention at the Molecular Level. **Toxins**, v. 8, n. 111, p. 1-25, 2016
- KUMAR, G.H.; PRIYADARSINI, R.V.; VINOTHINI, G. et al. The neem limonoids azadirachtin and nimbolide inhibit cell proliferation and induce apoptosis in an animal model of oral oncogenesis. **Investigational New Drugs**, v. 28, n. 4, p. 392–401, 2010.
- MAGAN, N.; ALDRED, D. Post-harvest control strategies: Minimizing mycotoxins in the food chain. **International Journal of Food Microbiology**, v. 119, n. 1-2, p. 131–139, 2007.
- MAGNOLI, C.; ASTORECA, A.; PONSONE, L. et al. Survey of mycoflora and ochratoxin A in dried vine fruits from Argentina markets. **Letters in Applied Microbiology**, v. 39, n. 4, p. 326–331. 2004.
- MANSO, S.; PEZO, D.; GÓMEZ-LUS, R. et al. Diminution of aflatoxin B1 production caused by an active packaging containing cinnamon essential oil. **Food Control**, v. 45, n. 1, p. 101-108, 2014.
- MILLER, J.D. Fungi and Mycotoxins in Grain: Implications for Stored Product Research. **Journal of Stored Products Research**, v. 31, n. 1, p. 1-16, 1995.
- MOSSINI, S.A.G.; OLIVEIRA, K.P.; KEMMELMEIER, C. Inhibition of patulin production by *Penicillium expansum* cultured with neem (*Azadirachta indica*) leaf extracts. **Journal of Basic Microbiology**, v. 44, n. 2, p. 106–113, 2004.
- MOSSINI, S.A.G.; ARROTÉIA, C.C.; KEMMELMEIER, C. Effect of Neem Leaf Extract and Neem Oil on *Penicillium* Growth, Sporulation, Morphology and Ochratoxin A Production. **Toxins**, v. 1, n. 1, p. 3-13, 2009.
- MULLA, M.S., SU, T. Activity and biological effects of neem products against arthropods of medical and veterinary importance. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 15, n. 2, p. 133-152, 1999.
- MURTHY, P.S.; SIRSI, M. Pharmacological studies on *Melia azadirachta*, Linn. (n. o. Meliaceae). **Indian Journal of Psychological Medicine**, v. 2, n. 2, p. 387-396, 1957.
- NESCI, A.; RODRIGUEZ, M.; ETCHEVERRY, M. Control of *Aspergillus* growth and aflatoxin production using antioxidants at different conditions of water activity and pH. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, n. 2, p. 279-287, 2003.
- PANDEY, A. K.; KUMAR, P.; SINGH, P. et al. Essential Oils: Sources of Antimicrobials and Food Preservatives. **Frontiers in Microbiology**, v. 16, n. 7, p. 1-14, 2017.

- PASSONE, M.A.; GIRARDI, N.S.; ETCHEVERRYET, M.G. al. Antifungal and antiaflatoxigenic activity by vapor contact of three essential oils, and effects of environmental factors on their efficacy. **LWT- Food Science and Technology**, v. 53, n. 2, p. 434–444, 2013.
- PAVELA, R. Essential oils for the development of eco-friendly mosquito larvicides: A review. **Industrial Crops and Products**, v. 76, n. 1, p. 174-187, 2015.
- PAWAR, V. C.; THAKER, V. S. In vitro efficacy of 75 essential oils against *Aspergillus niger*. **Mycoses**, v. 49, n. 4, p. 316-323, 2007.
- PEI, R.; ZHOU, F.; JI, B. et al. Evaluation of Combined Antibacterial Effects of Eugenol, Cinnamaldehyde, Thymol, and Carvacrol against *E.coli* with an Improved Method. **Journal of Food Microbiology and Safety**, v. 74, n. 7, p. M379-M383, 2009.
- PERRICONE, M.; ARACE, E.; CORBO, M.R. et al. Bioactivity of essential oils: a review on their interaction with food components. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. 1, p. 1-76, 2015.
- PETRIK, J.; ZANIĆ-GRUBISIĆ, T.; BARISIĆ, K. et al. Apoptosis and oxidative stress induced by ochratoxin A in rat kidney. **Archives of Toxicology**, v. 77, n. 12, p. 685-93, 2003.
- PFOHL-LESZKOWICZ, A.; PETKOVA-BOCHAROVA, T.; CHERNOZEMSKY, I.N.; et al. Balkan endemic nephropathy and associated urinary tract tumours: a review on aetiological causes and the potential role of mycotoxins. **Food Additives and Contaminants**, v. 19, n. 3, p. 282+302, 2002.
- PFOHL-LESZKOWICZ, A; MANDERVILLE, R.A. An update on direct genotoxicity as a molecular mechanism of ochratoxin a carcinogenicity. **Chemical Research in Toxicology**, v. 25, n. 2, p. 252-262, 2012.
- PITT, J.I.; HOCKING, A.D. **Fungi and Food Spoilage**. 2nd ed. Cambridge: Chapman & Hall. 2009.
- QUELEMES, P.V.; PERFEITO, M.L.G.; GUIMARÃES, M.A. et al. Effect of neem (*Azadirachta indica* A. Juss) leaf extract on resistant *Staphylococcus aureus* biofilm formation and *Schistosoma mansoni* worms. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 175, n. 1, p. 287-294, 2015.
- RAHIMTULA, A.D.; BÉRÉZIAT, J.C.; BUSSACCHINI-GRIOT, V. et al. Lipid peroxidation as a possible cause of ochratoxin a toxicity. **Biochemical Pharmacology**, v. 37, n. 23, p. 4469-4477, 1988.
- RAO, A.D.; DEVI, K.N.; THYAGARAJU, K. Isolation of Antioxidant Principle from Azadrachta Seed Kernels: Determination of its Role on Plant Lipoxygenases. **Journal of Enzyme Inhibition**, v. 14, n. 1, p. 85-96, 2009.
- RAZZAGHI-ABYANEH, M.; ALLAMEH, A.; TIRAIHI, T. et al. Morphological alterations in toxigenic *Aspergillus parasiticus* exposed to neem (*Azadirachta indica*) leaf and seed aqueous extracts. **Mycopathologia**, v. 159, n. 4, p. 565-570, 2005.

RINGOT, D.; CHANGO, A.; SCHNEIDER, Y.J. et al. Toxicokinetics and toxicodynamics of ochratoxin A, an update. **Chemico-Biological Interactions**, v. 159, n. 1, p. 18-46, 2006.

ROCHA, M.E.B.; FREIRE, F.C.O.; MAIA, F.E.F. et al. Mycotoxins and their effects on human and animal health. **Food Control**, v. 36, n. 1, p. 159-165, 2014.

ROMERO, S.M.; COMERIO, R.M.; LARUMBE, G. et al. Toxicogenic fungi isolated from dried vine fruits in Argentina. **International Journal of Food Microbiology**, v. 104, n. 1, p. 43– 49, 2005.

ROSA, C.A.R.; PALACIOS, V.; COMBINA, M. et al. Potential ochratoxin A producers from wine grapes in Argentina and Brazil. **Food Additives and Contaminants**. v. 19, n. 4, p. 408-414. 2002.

ROYCHOUDHURY, R. Chapter 18 - Neem Products. In: **Ecofriendly Pest Management for Food Security**. Academic Press, p. 545-562, 2016.

SAIRAM, M.; ILAVAZHAGAN, G.; SHARMA, S.K. et al. Anti-microbial activity of a new vaginal contraceptive NIM-76 from neem oil (*Azadirachta indica*). **Journal of Ethnopharmacology**, v.71, n. 3, p.377-382, 2000.

SAMSON, R.A.; HOEKSTRA, E.S.; FRISVAD, J.C.; FILTENBORG, O. **Introduction to Food-And Airborne Fungi**. 6th ed. Utrecht: CBS. 2001.

SAMSON, R.A.; NOONIM, P.; MEIJER, M. et al. Diagnostic tools to identify black aspergilli. **Studies in Mycology**, v. 59, p. 129–145, 2007.

SCHAAF, G.J; NIJMEIJER, S.M.; MAAS; R.F.M. et al. The role of oxidative stress in the ochratoxin A-mediated toxicity in proximal tubular cells. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v.1588, n.2, p.149-158, 2002.

SCHMUTTERER, H. Properties and potential of natural pesticides from the Neem tree, *Azadirachta indica*. **Annual Review of Entomology**, v. 35, n. 1, p.271-297, 1990.

SITARA, U.; NIAZ, I.; NASEEM, J. et al. Antifungal effect of essential oils on in vitro growth of pathogenic fungi. **Pakistan Journal of Botany**, v. 40, n. 1, p. 409-414, 2008.

TANIWAKI, M.H.; PITT, J.I.; TEIXEIRA, A.A. The source of ochratoxin A in Brazilian coffee and its formation in relation to processing methods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 82, n. 2, p. 173–179, 2003.

TANIWAKI, M.H.; TEIXEIRA, A.A.; TEIXEIRA, A.R.R. et al. Ochratoxigenic fungi and ochratoxin A in defective coffee beans. **Food Research International**, v. 61, n. 1, p. 161–166, 2014.

TJAMOS, S.E.; ANTONIOU, P.P.; KAZANTZIDOU, A. et al. *Aspergillus niger* and *Aspergillus carbonarius* in Corinth Raisin and Wine-Producing Vineyards in Greece: Population Composition, Ochratoxin A Production and Chemical Control. **Journal of Phytopathology**, v. 152, p. 250–255, 2004.

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.

TORRES, A.M.; BARROS, G.G.; PALACIOS, S.A. et al. Review on pre- and post-harvest management of peanuts to minimize aflatoxin contamination. **Food Research International**, v. 62, n. 1, p. 11–19, 2014.

ZAICA, L. L.; BUCHANAN, R. L. Review of compounds affecting the biosynthesis or bioregulation of aflatoxins. **Journal of Food Protection**, v. 50, n. 8, p. 691-708, 1987.

ZERINGUE, H.J.; BHATNAGAR, D. Inhibition of Aflatoxin Production in *Aspergillus flavus* Infected Cotton Bolls After Treatment with Neem (*Azadirachta indica*) Leaf Extracts. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 67, n. 4, p. 215-216, 1990.

ZERINGUE, H.J.; SHIH, B.Y.; BHATNAGAR, D. Effects of clarified Neem oil on growth and aflatoxin B formation in submerged and plate cultures of aflatoxigenic *Aspergillus* spp. **Phytoparasitica**, v. 29, p. 1-4, 2001.

WARRA, A.A. Medicinal and Cosmetic Potential of Neem (*Azadirachta Indica*) Seed Oil: A Review. **Research and Reviews: Journal of Medicinal Chemistry**, V. 1, N. 1, P. 5-8, 2012.

WILLIAMS, W. P.; WINDHAM, G. L.; KRAKOWSKY, M. D. et al. Aflatoxin Accumulation in BT and Non-BT Maize Testcrosses. **Journal of Crop Improvement**. v. 24, n. 4, p. 392–399. 2010.

WU, Q.; DOHNAL, V.; HUANG, L. et al. Metabolic Pathways of Ochratoxin A. **Current Drug Metabolism**. v. 12, p. 1-10. 2011.