






Comparación de técnicas de tamizaje de actividad antifúngica de aceites esenciales de especias frente cepas de *Aspergillus* aisladas de maní (*Arachis hypogaea*)

Comparison of screening techniques of antifungal activity of spices essential oils against *Aspergillus* strains isolated from peanuts (*Arachis hypogaea*)

Yessica Magaliz Reyes-Caballero^{1,2} , Maricel Cabrera² , Cinthia Carolina Cazal-Martínez² , Andrea Alejandra Arrúa-Alvarenga² , Juliana Moura-Mendes² 

¹ Instituto Paraguayo de Tecnología Agropecuaria, Centro de Investigaciones Capitán Miranda. Capitán Miranda, Paraguay.

² Universidad Nacional de Asunción, Centro Multidisciplinario de Investigaciones Tecnológicas. San Lorenzo, Paraguay.

Autor correspondiente: jmendes@rec.una.py

Resumen: La contaminación de los alimentos con hongos del género *Aspergillus*, representa un problema y amenaza para la seguridad e inocuidad alimentaria, estos microorganismos producen micotoxinas, metabolitos secundarios termoestables que causan intoxicaciones agudas o crónicas, inclusive muertes, en humanos y animales. Puede afectar diversos cultivos en condiciones de campo y almacenamiento, como el maní, que es muy susceptible a la contaminación por *Aspergillus*. Ante la creciente necesidad de desarrollar alternativas de control de estos patógenos principalmente en el almacenamiento y/o conservación, las búsquedas se han centrado y direccionado al desarrollo de tecnologías efectivas que representen un recurso sustentable y sostenible para el área alimentaria. El uso de aceites esenciales ha presentado resultados alentadores, además de su potencial antifúngico, ya que es una alternativa natural y biodegradable. Se propuso como objetivo de este estudio comparar dos técnicas de inoculación: siembra directa y medio inoculado en el método de tamizaje de actividad antifúngica - difusión en



agar - de aceites esenciales de especias y sus principales fitoconstituyentes contra cepas de *Aspergillus* aisladas de maní. Y a su vez, determinar el efecto antifúngico frente a las cepas de *Aspergillus* estudiadas. Los aceites esenciales de *Cinnamomum zeylanicum* (canela), *Eugenia caryophyllata* (clavo de olor), *Origanum vulgare* (orégano), y los fitoconstituyentes: carvacrol y eugenol presentaron potencial efecto antifúngico sobre las cepas de *Aspergillus flavus* y *Aspergillus* Sección *Nigri* aislados de maní. Además, considerando que la reproducibilidad y estandarización de las técnicas de los ensayos antifúngicos con productos naturales son cruciales, en este estudio no se observaron diferencias significativas en las técnicas de inoculación ensayadas. Concluimos que los aceites esenciales ensayados son recursos naturales promisorios que requieren investigación adicional para ser aplicados como alternativas en la conservación de alimentos.

Palabras clave: bioactivos, fungicida, inocuidad de alimentos, conservación de alimentos, micotoxinas.

Abstract: The contamination of food with fungi of the genus *Aspergillus*, represents a problem and threat to food safety and security, these microorganisms produce mycotoxins, thermostable secondary metabolites that can cause acute or chronic poisoning, including deaths, in humans and animals. It can affect various crops in both field and storage conditions, and peanuts are very susceptible to *Aspergillus* contamination. Given the growing need to develop alternatives to control these pathogens, mainly in storage and / or conservation, searches have been focused in the development of effective technologies that represent a sustainable resource for the foodstuffs. The use of essential oils has showed encouraging results, since its antifungal potential is linked to a natural and biodegradable alternative. The objective of this study was to compare two inoculation techniques: direct seeding and medium inoculated in the disk diffusion method to test essential oils of spices against *Aspergillus* strains isolated from peanuts. And in turn, to determine the antifungal effect and main phytoconstituents of tested oils against *Aspergillus* strains. The essential oils of *Cinnamomum zeylanicum* (cinnamon), *Eugenia caryophyllata* (cloves), *Origanum vulgare* (oregano), and the metabolites carvacrol and eugenol had a potential antifungal effect on the strains of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus* Section *Nigri* isolated from peanuts. Furthermore, considering that the reproducibility and standardization of antifungal assay techniques with natural products are crucial, in this study no significant differences were observed with both in the inoculation techniques tested. Thus, it is concluded that the essential oils tested are promising natural resources that require further evaluation to be applied as alternatives in food preservation.

Keywords: bioactive, fungicide, food preservation, food safety, mycotoxins.

1. INTRODUCCIÓN

Un grave problema asociado a la seguridad alimentaria es la contaminación con hongos filamentosos y sus micotoxinas. Esto puede darse como consecuencia de la presencia de patógenos como *Penicillium* sp., *Fusarium* sp., *Aspergillus* sp., que pueden afectar a los cultivos tanto en condiciones de campo y/o almacenamiento⁽¹⁻⁴⁾.

Las especies de *Aspergillus* pueden infectar desde insectos hasta cultivos económicamente importantes, tales como maíz, café, maní, especias, hierbas medicinales y otros^(5,6,7,8). Este género fúngico incluye los más importantes productores de micotoxinas, que son metabolitos secundarios de bajo peso molecular, que pueden ocasionar trastornos denominados como micotoxicosis que se manifiestan en forma de diferentes cuadros clínicos (agudos y crónicos) tanto en humanos como en animales, y que hasta ocasiona la muerte en casos extremos^(4,9,10).

El maní (*Arachis hypogaea*), también conocido como *manduvi* (en guaraní), cacahuete, caguete y cacahuete en otras regiones. Es consumido en todos los estratos socioeconómicos para alimentación y son muy apreciados debido sus propiedades nutricionales. En Paraguay representa un cultivo de relevancia económica para el país, sin embargo, la calidad puede ser afectada debido su susceptibilidad a la contaminación por hongos productores de las micotoxinas, como *Aspergillus*^(11,12).

En los últimos años se ha incrementado el interés por métodos alternativos para control de estos patógenos, principalmente en el periodo de almacenamiento y/o conservación, como el uso de antioxidantes y aceites esenciales, que han presentado prometedores resultados por la capacidad de reducción y/o inhibición del crecimiento fúngico y por consiguiente la producción de micotoxinas^(2,13,14,15).

Los aceites esenciales por su origen natural y por ende biodegradable representan una alternativa sostenible para la conservación de los alimentos, sirviendo, como un soporte a la inocuidad alimentaria y alternativa de uso de plaguicidas sintéticos^(15,16,17,18).

Se estima que alrededor del 60% de los aceites esenciales presentes en plantas medicinales, hierbas y especias poseen propiedades antifúngicas^(19,20). Los aceites esenciales de *Cymbopogon martini*, *Eucalyptus globulus* y *Cinnamomum*

zeylanicum presentaron efectos prometedores en el control de *A. fumigatus* y *A. niger*⁽²¹⁾.

Otro compuesto propuesto con fuerte actividad antifúngica sobre cepas de *Aspergillus* es el aceite esencial de *Origanum vulgare* L. (orégano), que ha sido probado en el control de especies como *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. terreus*, *A. ochraceus*, *A. fumigatus* y *A. niger*^(22,23). Asimismo, Trajano et al.⁽²⁴⁾ demostró que el aceite esencial de canela y eugenol promueven la reducción en la pigmentación de las hifas, el número de conidióforos y la inhibición del proceso de formación de conidios de cepas de *Aspergillus flavus*.

También se ha demostrado que los aceites esenciales de canela y pimienta asociados con etilo decanoato (FES-C10) fueron eficiente para proteger *in vivo* el tomate de infecciones con hongos fitopatógenos como *Aspergillus niger* y *Fusarium oxysporum*, reforzando su potencial uso como conservantes de alimentos, prologando su vida útil⁽²⁵⁾.

Para evaluar la actividad antimicrobiana de productos naturales existen diversas técnicas, una de la más difundida y ampliamente utilizada es la de difusión en agar, siendo considerada como método de *screening* o cribado en la búsqueda de sustancias biológicamente activas^(26,27,28). La técnica de difusión en agar con disco de papel, es la estandarizada para realización de antibiogramas por CLSI (*Clinical & Laboratory Standards Institute*) y es aceptada por la FDA (*Food and Drug Administration*), siendo rutinariamente utilizada en laboratorios de microbiología clínica⁽²⁹⁾.

No obstante, no existen técnicas estandarizadas para los ensayos antifúngicos con extractos vegetales, lo que es fácilmente visualizado en la literatura con el uso del mismo ensayo con diferentes modificaciones dificultando la reproducibilidad y comparación de los resultados^(26,30).

Es relevante validar las técnicas teniendo en cuenta que cada microorganismo y extracto vegetal presentan particularidades que pueden ser o no observadas por la variación de las técnicas de enfrentamiento, siendo así se propuso como objetivo de este estudio comparar dos técnicas de inoculación en el ensayo de *screening* para actividad antimicrobiana –difusión en agar– de aceites esenciales de especias contra cepas de *Aspergillus* aisladas de maní. Y a su vez, determinar el efecto antifúngico y principales fitoconstituyentes de dichos aceites frente a las cepas de *Aspergillus*.

2. MATERIALES Y MÉTODO

Los experimentos fueron realizados en el Centro Multidisciplinario de Investigaciones Tecnológicas de la Universidad Nacional de Asunción (CEMIT - UNA), San Lorenzo – Paraguay.

2.1. Aislamiento e identificación de cepas de *Aspergillus*

Las cepas de *Aspergillus flavus* y *Aspergillus* Sección *Nigri* fueron aisladas y purificadas a partir de maní (*Arachis hypogaea*) comercializados en supermercado. Los granos de maní no dañados fueron desinfectados con hipoclorito de sodio al 3%, durante tres minutos, enjuagados tres veces con agua destilada esterilizada, secados en papel de filtro estéril y posteriormente sembrados en placas de Petri de 9 cm de diámetro con medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA) (OXOID®) sintético e incubados a 25±2 °C por 7 días⁽³¹⁾. Las cepas de *Aspergillus* fueron identificadas evaluando sus características macro y micromorfológicas mediante la clave de identificación de Klich, 2002⁽³²⁾. Las cepas seleccionadas fueron purificadas y conservados en agar MEA y depositados en la Colección de Cultivos de Microorganismos de la Universidad Nacional de Asunción - CCM-UNA (FELACC, SI-70). Los códigos de las cepas son: *Aspergillus flavus*: CCM-AFMa01 y *Aspergillus* Sección *Nigri* CCM-ANiMa01.

2.2. Aceites esenciales utilizados

Los aceites esenciales de *Origanum vulgare* L. (orégano); *Eugenia caryophyllata* (clavo de olor); *Cinnamomum zeylanicum* (canela); eugenol y carvacrol fueron cedidos por la Dra. Edeltrudes de Oliveira Lima, del Laboratorio de Micología de la Universidade Federal da Paraíba, Brasil. Los tres primeros son provenientes de FERQUIMA® y los dos últimos de Sigma-Aldrich®, Brasil.

2.3. Preparación de inóculo de cepas de *Aspergillus*

Cultivos puros de *Aspergillus flavus* y *Aspergillus* Sección *Nigri* fueron cubiertos con 5 mL de agua destilada estéril, la superficie fue raspada suavemente con un asa estéril y la solución con elementos fúngicos fue transferida a un tubo estéril. Estas suspensiones fueron agitadas durante 2 min usando un vórtex, los inóculos fueron estandarizados al tubo número 0,5 de la escala de McFarland (10^6 UFC.mL⁻¹), por comparación de la turbidez.

2.4. Ensayo de la actividad antifúngica. Ensayo de difusión en agar

Se utilizó como medio de cultivo PDA que fue preparado según las instrucciones del fabricante, autoclavado a 121 °C por 15 minutos y fraccionado en 20mL por cada placa de Petri estéril de 9 cm de diámetro⁽²⁹⁾:

Se utilizaron dos variaciones en la inoculación en el medio de cultivo, a. medio inoculado, b. siembra directa, con el inóculo estandarizado en 10⁶ UFC.mL⁻¹:

a) *Medio inoculado*: se tomaron 1.000 µL de la solución del inóculo preparado previamente y se inoculó en la placa de Petri con PDA fundido a 45 °C y sembrado a profundidad.

b) *Siembra directa*: Después de solidificado el medio PDA, con auxilio de un hisopo estéril, se esparció el inóculo por todo el medio mediante estriados.

En ambas técnicas se emplearon discos de papel estéril (autoclavados a 121 °C por 15 minutos), en los cuales fueron impregnados 10 µL de los aceites esenciales y los metabolitos seleccionados. Los discos de papel impregnados con el aceite correspondiente fueron puestos en el centro de las placas inoculadas con las cepas de *Aspergillus* e incubados a 25 ±2 °C por 7 días. El grupo control consistió en el disco impregnado con agua destilada estéril. Los ensayos fueron realizados por duplicado para cada cepa de *Aspergillus* y por cada técnica empleada.

A continuación, se realizó la lectura, registrando el diámetro de los halos de inhibición con un calibre digital. La actividad antifúngica de las muestras ensayadas se consideró positiva cuando los halos de inhibición alcanzaron valores mayores o iguales a 10 mm de diámetro⁽³³⁾.

2.5. Análisis de Datos

Los resultados fueron expresados en medias ± desvío estándar y se utilizó el paquete estadístico GraphPad Prism versión 8.0.0 para Windows (GraphPad® Software, San Diego, California USA). El desempeño entre las muestras ensayadas se comparó mediante análisis de varianza (ANOVA) soportado por las múltiples comparaciones de Tukey y fue considerado significativo cuando $p < 0,05$. Para evaluar si había diferencia significativa entre los métodos de inoculación utilizados se realizó un ANOVA de 2 vías, seguido de la prueba de múltiples comparaciones de Bonferroni para cada aceite esencial.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Ensayos de inhibición de crecimiento *in vitro* de *Aspergillus flavus*

En la Figura 1 se observa los promedios de los halos de inhibición de los aceites esenciales evaluados sobre cepas de *A. flavus* (CCM-AFMa01), utilizando el método de siembra directa (A) y medio inoculado (B).

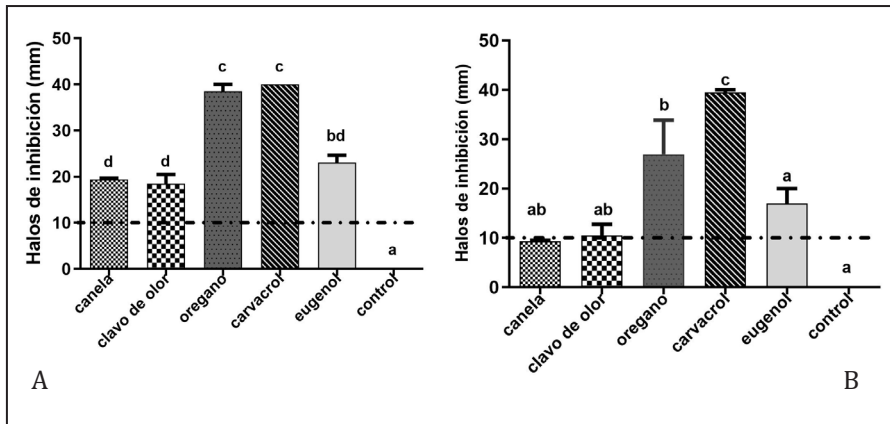


Figura 1. Promedio en milímetros de los halos inhibición del crecimiento fúngico producidos por los aceites esenciales y fitoconstituyentes sobre la cepa de *Aspergillus flavus* (CCM-AFMa01). A. Método de siembra directa. B. Método de medio inoculado. ANOVA post-test Tukey. Medias con una letra en común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

El aceite esencial de *Origanum vulgare* (orégano) y su constituyente mayoritario carvacrol demostraron los mayores promedios de halos de inhibición: 38,5 y 40 mm, seguidos del eugenol, y los aceites de canela y clavo de olor con 23, 19 y 18 mm respectivamente. Todos los aceites esenciales al ser comparados con el control demostraron inhibir el crecimiento fúngico de forma significativa, y pueden ser considerados con potencial actividad antifúngica, ya que los extractos vegetales son considerados prometedores cuando el halo de inhibición es igual o mayor a 10 m^(27,33). A su vez también presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$) los aceites de orégano y carvacrol al compararlos con los demás aceites (Figura 1) coincidiendo con lo informado por Abbaszadeh et al.⁽³⁴⁾, que demostraron el efecto antifúngico de carvacrol y eugenol, *in vitro* frente a once especies fúngicas contaminantes de alimentos, entre ellas cepas de *Aspergillus*, afirmando su potencial como conservantes.

En cuanto al eugenol (23 mm), son varios los mecanismos de acción reportados frente a células fúngicas, tales como que alteran la permeabilidad de la membrana de forma no-específica; afectan el transporte de iones ATP; produce especies reactivas de oxígeno intracelular, convergiendo en la muerte celular⁽³⁵⁾. El aceite del clavo de olor, que mostró un halo de inhibición de 18 mm, es reportado por sus propiedades antioxidantes, además de su acción antimicrobiana, lo que incrementa su potencial como alternativa para su uso en la industria para prevenir el crecimiento de microorganismos bacterianos y fúngicos y la degradación de los alimentos⁽³⁶⁾.

El aceite esencial de orégano comparado con el carvacrol no presentó diferencias significativas ($p > 0,05$) sobre el control de *A. flavus*. A su vez, no se observa diferencia significativa entre el eugenol, conocido fitoconstituyente del aceite esencial de canela y el clavo de olor con el aceite de estos en su efecto antifúngico. El eugenol es el principal compuesto volátil de los botones y hojas de clavo de olor (*Eugenia caryophyllata* Thunb.) y de varias plantas pertenecientes a las familias Lamiaceae, Lauraceae, Myrtaceae, y Myristicaceae⁽³⁵⁾. En nuestro trabajo no observamos diferencia significativa en el efecto inhibitorio fúngico del aceite esencial de clavo de olor y del eugenol (Figura 1 - A), coincidiendo con lo reportado por Mahboubi & Mahboubi⁽³⁶⁾, que atribuyen el efecto antimicrobiano del aceite esencial de clavo de olor al alto contenido de eugenol.

En cuanto al método de medio inoculado, se observó el mismo perfil de inhibición, sin embargo, con menores dimensiones de los halos de inhibición: carvacrol (39 mm) y el aceite de orégano (27 mm), seguido de eugenol (16 mm), y los aceites de clavo de olor (10 mm) y canela (9 mm) (Figura 1-B).

Se puede observar que el método de inoculación influyó en las dimensiones de los halos de inhibición de los aceites esenciales y fitoconstituyentes estudiados frente los aislados *Aspergillus flavus*

3.2. Ensayos de inhibición de crecimiento fúngico *Aspergillus* Sección *Nigri*

En los ensayos realizados sobre la cepa de *Aspergillus* sección *Nigri* (CCM-ANiMa01), todas las muestras mostraron inhibición del crecimiento del hongo, utilizando los dos métodos: siembra directa y medio inoculado, tal como se observa en las Figuras 2 A y B.

El aceite esencial de orégano y el carvacrol presentaron mayores halos de inhibición, 40 mm con relación a los demás aceites evaluados (Figura 2 A y B). Ambos presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$) cuando fueron

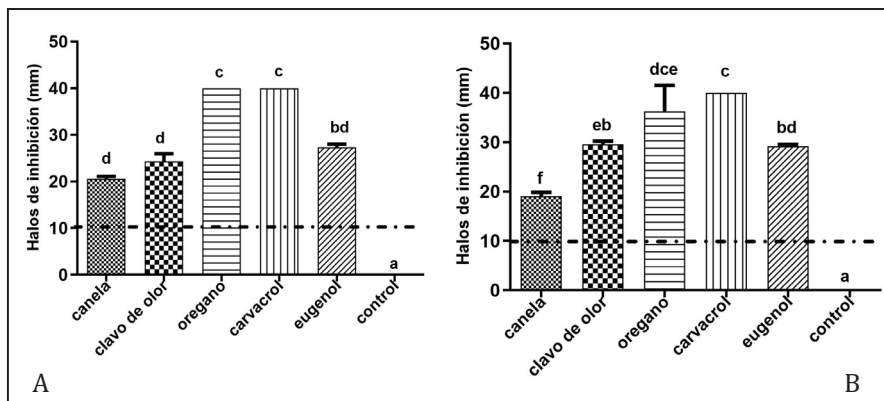


Figura 2: Promedio en milímetros de los halos inhibición del crecimiento fúngico producidos por los aceites esenciales y fitoconstituyentes sobre la cepa de *Aspergillus* sección *Nigri* (CCM-ANiMa01). A. Método de siembra directa. B. Método de medio inoculado. ANOVA post-test Tukey. Medias con una letra en común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$).

comparados con el eugenol y los aceites esenciales de canela y clavo de olor, resultados similares a los efectos sobre la cepa de *A. flavus* evaluada en este estudio. Carvacrol es el fitoconstituyente mayoritario del aceite esencial de orégano y de otras plantas aromáticas como *Thymus pulegioides* que posee efecto antifúngico frente diferentes especies de *Aspergillus*, como se demostró en este trabajo con *A. flavus* y *Aspergillus* sección *Nigri*, y lo publicado por Lima et al.⁽¹⁵⁾ y frente a otras especies, como *Candida* sp y dermatofitos⁽³⁷⁾. Además, Mateo et al.⁽³⁸⁾ probaron un sistema de embalajes de copolímeros asociados con aceite esencial de orégano y carvacrol, y ambos demostraron eficiencia en controlar el crecimiento de *A. flavus* y *A. parasiticus*, así como sobre la producción de aflatoxinas por los mismos.

El eugenol, que también está presente en el aceite esencial de canela (*Cinnamomum zeylanicum*), mostró en nuestras evaluaciones de medio inoculado frente *Aspergillus* sección *Nigri* diferencia significativa en el efecto antifúngico, como tal y en el aceite esencial de canela en comparación con las demás muestras evaluadas y se puede atribuir al eugenol el efecto inhibitorio de la canela, coincidiendo con las observaciones de Trajano et al.⁽²⁴⁾ y Abbaszadeh et al.⁽³⁴⁾.

El aceite esencial de clavo de olor - *Eugenia caryophyllata* se mostró prometedor con promedios de halos de inhibición que variaron de 10 mm hasta 30 mm, siendo la cepa de *Aspergillus* sección *Nigri* más sensible en nuestros ensayos (Figura 3 A y B); similares resultados fueron descritos en la literatura^(21,36,39).

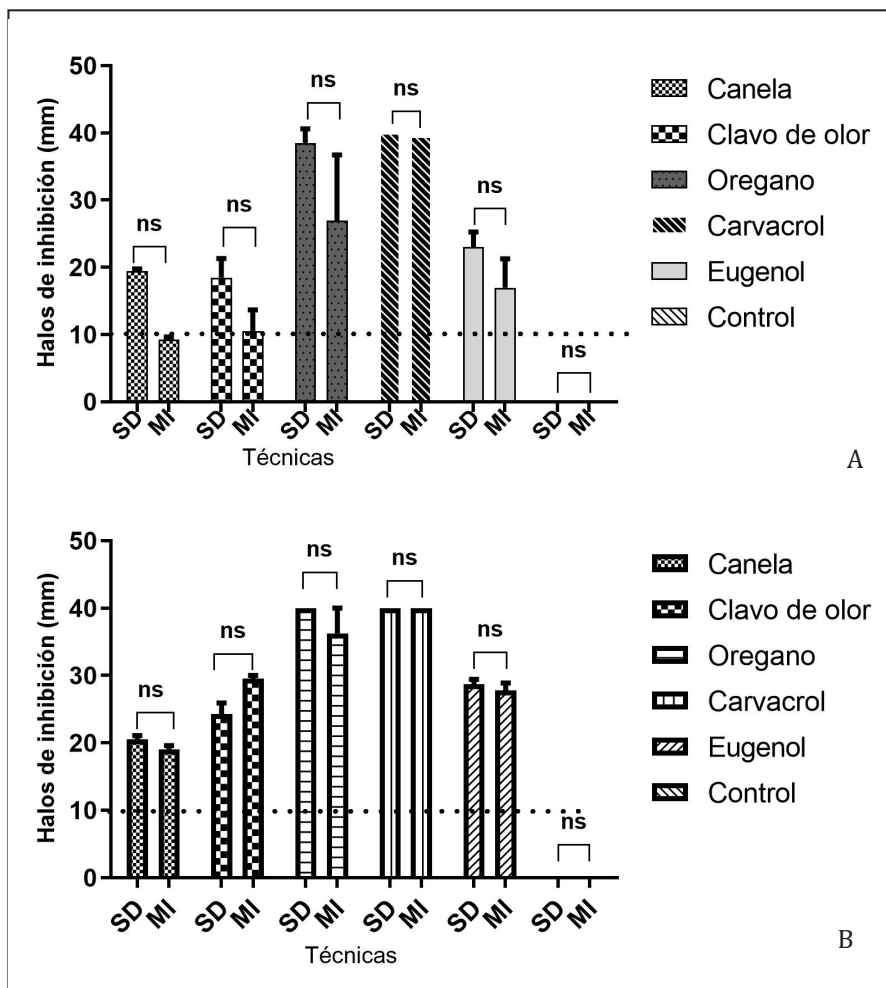


Figura 3. Comparación de los promedios de los halos de inhibición utilizando los dos técnicas de inoculación SD: siembra directa y MI: medio inoculado. A. contra la cepa de *A. flavus* (CCM-AFMa01). B. contra la cepa de *Aspergillus* sección *Nigri* (CCM-ANiMa01). ANOVA two-way, post-test Bonferroni múltiples comparaciones. ns: no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

En la evaluación del método de medio inoculado se observó similar perfil de inhibición de crecimiento de *Aspergillus* sección *Nigri* cuando comparado con el método de siembra directa, los mayores halos de inhibición se observaron con carvacrol (40 mm) y el aceite de orégano (36 mm) ver Figura 3-B.

El método de difusión en agar con discos de papel es considerado un test preliminar muy útil para probar la sensibilidad de microorganismos frente a los productos naturales, se considera el primer ensayo a ser realizado en la evaluación del potencial antimicrobiano, y para servir de guía y base para la elaboración de una secuencia de estudios más detallados^(28,30,40). En las Figuras 3 A y B se observa la comparación de los halos de inhibición entre las dos técnicas de inoculación: siembra directa y medio inoculado frente las dos cepas. No se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los métodos con las diferentes muestras analizadas.

Siendo así, se puede considerar que los aceites esenciales de *Cinnamomum zeylanicum*, *Eugenia caryophyllata*, *Origanum vulgare*, y los fitoconstituyentes carvacrol y eugenol poseen efecto antifúngico sobre las cepas de *A. flavus* y *Aspergillus* sección *Nigri* en las dos condiciones ensayadas.

4. CONCLUSIÓN

En este estudio se constató el efecto inhibitor de aceites esenciales y sus fitoconstituyentes mayoritarios sobre el crecimiento fúngico de especies vinculadas a la contaminación de alimentos, y la ausencia de diferencias en tal efecto por el uso de dos técnicas de inoculación en el ensayo de difusión en agar. Los aceites esenciales de canela, clavo de olor, orégano y los metabolitos carvacrol y eugenol ofrecen calidades promisorias para su aplicación en sistemas de conservación de alimentos, si bien se requieren ensayos adicionales, como su influencia en los caracteres organolépticos, para recomendar su empleo a escala productiva.

CONTRIBUCIÓN DE AUTORES

JMM: Conceptualización; CC, JMM: Curación de datos; CC, AA: Análisis formal; YMRC, MC: Investigación; JMM, MR: Metodología; JMM, AA: Recursos; JMM: Supervisión; YMCR, MC: Redacción; JMM, AA, CC: Edición y revisión; JMM, AA, CC: Aprobación de la versión final.

CONFLICTO DE INTERÉS

Los autores declaran no tener ningún conflicto de interés con respecto al presente artículo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Arrua AA, Moura Mendez J, Fernández Ríos D. Aflatoxinas, un riesgo real. Reportes Científicos la FACEN. 2013;4:68-81.
2. Patriarca A, Fernandez Pinto V. Prevalence of mycotoxins in foods and decontamination. Curr Opin Food Sci. 2017;14:50-60.
3. Arrua Alvarenga AA, Cazal Martínez C, Fernández Ríos D, Moura Mendes J. Aspergillus y Micotoxinas. Rev UN Med. 2013;2(1):141-69.
4. Taniwaki MH, Pitt JI, Copetti M V, Teixeira AA, Iamanaka BT. Understanding mycotoxin contamination across the food chain in Brazil: Challenges and opportunities. Toxins (Basel). 2019;11(7):1-17.
5. Barros G, Torres A, Chulze S. Aspergillus flavus population isolated from soil of Argentina's peanut-growing region. Sclerotia production and toxigenic profile. J Sci Food Agric. 2005;85:2349-53.
6. Perrone G, Susca A, Cozzi G, Ehrlich K, Varga J, Frisvad JC, et al. Biodiversity of Aspergillus species in some important agricultural products. Stud Mycol. 2007;59:53-66.
7. Okoth S, De Boevre M, Vidal A, Di Mavungu JD, Landschoot S, Kyallo M, et al. Genetic and toxigenic variability within Aspergillus flavus population isolated from maize in two diverse environments in Kenya. Front Microbiol. 2018;9:1-14.
8. Costa J, Rodríguez R, Santos C, Soares C, Lima N, Santos C. Mycobiota in Chilean chilli Capsicum annum L. used for production of Merkén. Int J Food Microbiol [Internet]. 2020;334(April):108833. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108833>
9. Benkerroum N. Chronic and acute toxicities of aflatoxins: Mechanisms of action. Int J Environ Res Public Health. 2020;17(2):1-28.
10. Ostry V, Malir F, Toman J, Grosse Y. Mycotoxins as human carcinogens—the

IARC Monographs classification. Mycotoxin Res. 2017;33(1):65–73.

11. Torres AM, Barros GG, Palacios SA, Chulze SN, Battilani P. Review on pre- and post-harvest management of peanuts to minimize aflatoxin contamination. Food Res Int [Internet]. 2014;62:11–9. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2014.02.023>
12. Enciso Garay CR, Caballero Mendoza C, González JD, Santacruz Oviedo VR, Dueck Toews J, González Balbuena JM, et al. Evaluación agronómica de cinco variedades de maní de porte semi erecto en dos localidades del Chaco Central. Investig Agrar. 2017;19(1):9–15.
13. Chulze SN. Strategies to reduce mycotoxin levels in maize during storage: a review. Food Addit Contam Part A, Chem Anal Control Expo risk assessment. 2010;27(5):651–7.
14. de Medeiros CAC, Pinto A V, de Oliveira JC, Silva GS, Arrua JMM, Lima IO, et al. Evaluating the Antifungal Activity of α -Bisabolol in Association with NaCl on *Fusarium oxysporum* in Maize Grains. Curr Microbiol [Internet]. 2021;78(2):604–10. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s00284-020-02313-8>
15. Lima JC, Gomes SM, Lima EO, Pereira FO, Lima IO. Carvacrol and thymol as potential preservatives against aspergillus in maize grains. Emirates J Food Agric. 2019;31(11):825–9.
16. Negri M, Salci TP, Shinobu-Mesquita CS, Capoci IRG, Svidzinski TIE, Kioshima ES. Early state research on antifungal natural products. Molecules. 2014;19(3):2925–56.
17. Marín S, Sanchis V, Ramos AJ. Plant Products in the Control of Mycotoxins and Mycotoxigenic Fungi on Food Commodities. In: Natural Products in Plant Pest Management. CAB International; 2011. p. 21–41.
18. Prakash B, Mishra PK, Kedia A, Dwivedy AK, Dubey NK. Efficacy of Some Essential Oil Components as Food Preservatives Against Food Contaminating Molds, Aflatoxin B1 Production and Free Radical Generation. J Food Qual. 2015;38(4):231–9.
19. Lima I de O, Oliveira R de AG, Lima E de O, Farias NMP, Souza EL De. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. Brazilian J Pharmacogn. 2006;16(2):197–201.

20. Raut JS, Karuppaiyl SM. A status review on the medicinal properties of essential oils. *Ind Crops Prod* [Internet]. 2014;62:250–64. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.05.055>
21. Bansod S, Rai M. Antifungal activity of essential oils from Indian medicinal plants against human pathogenic *Aspergillus fumigatus* and *A. niger*. *World J Med Sci* [Internet]. 2008 [cited 2014 Aug 5];3(2):81–8. Disponible en: [http://idosi.org/wjms/3\(2\)08/7.pdf](http://idosi.org/wjms/3(2)08/7.pdf)
22. Carmo ES, Lima EDO, De Souza EL. The potential of *Origanum vulgare* L. (Lamiaceae) essential oil in inhibiting the growth of some food-related *Aspergillus* species. *Brazilian J Microbiol.* 2008;39(2):362–7.
23. Mitchell TC, Stamford TLM, Souza EL de, Lima E de O, Carmo ES. *Origanum vulgare* L. essential oil as inhibitor of potentially toxigenic *Aspergilli*. *Ciência e Tecnol Aliment* [Internet]. 2010 Sep [cited 2014 Aug 5];30(3):755–60. Disponible en: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612010000300029&lng=en&nrm=iso&tlng=pt
24. Trajano VN, Lima E de O, Souza FS de. Antifungal Activity of the Essential Oil of *Cinnamomum zeylanicum* Blume and Eugenol on *Aspergillus flavus*. *J Essent Oil Bear Plants* [Internet]. 2012 Jan 12 [cited 2015 May 18];15(5):785–93. Disponible en: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/0972060X.2012.10644121#.VVp8mnnburM.mendeley>
25. Muñoz Castellanos L, Amaya Olivas N, Ayala-Soto J, De La O Contreras CM, Zermeño Ortega M, Sandoval Salas F, et al. In Vitro and in Vivo Antifungal Activity of Clove (*Eugenia caryophyllata*) and Pepper (*Piper nigrum* L.) Essential Oils and Functional Extracts against *Fusarium oxysporum* and *Aspergillus niger* in Tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Int J Microbiol.* 2020;2020.
26. Ostrosky EA, Mizumoto MK, Lima MEL, Kaneko TM, Nishikawa SO, Freitas BR. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. *Brazilian J Pharmacogn.* 2008;18(2):301–7.
27. Lima EO, Gompertz OF, Giesbrecht AM, Paulo MQ. In vitro antifungal activity of essential oils obtained from officinal plants against dermatophytes. *Mycoses* [Internet]. 1993 [cited 2012 Nov 13];36(9–10):333–336. Disponible en: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1439-0507.1993.tb00777.x/abstract>

28. Balouiri M, Sadiki M, Ibsouda SK. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. J Pharm Anal [Internet]. 2016;6(2):71–9. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>
29. CLSI, ANVISA, OMS. Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-difusão: Norma Aprovada – Oitava Edição M2-A8. Vol. 23. 2008. p. 1–58.
30. Bubonja-Šonje M, Knezević S, Abram M. Challenges to antimicrobial susceptibility testing of plant-derived polyphenolic compounds. Arh Hig Rada Toksikol. 2020;71(4):300–11.
31. Pildain MB, Cabral D, Vaamonde G. Poblaciones de *Aspergillus flavus* en maní cultivado en diferentes zonas agroecológicas de la Argentina, caracterización morfológica y toxigénica. Rev Investig Agropecu. 2005;34(3):3–19.
32. Klich MA. Identification of common *Aspergillus* species. 2002.
33. Souza EL, Stamford TLM, Lima EO, Trajano VN. Effectiveness of *Origanum vulgare* L. essential oil to inhibit the growth of food spoiling yeasts. Food Control [Internet]. 2007 May [cited 2012 Nov 13];18(5):409–13. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713505002860>
34. Abbaszadeh S, Sharifzadeh A, Shokri H, Khosravi AR, Abbaszadeh A. Antifungal efficacy of thymol, carvacrol, eugenol and menthol as alternative agents to control the growth of food-relevant fungi. J Mycol Med [Internet]. 2014;24(2):e51–6. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mycmed.2014.01.063>
35. Marchese A, Barbieri R, Coppo E, Orhan IE, Daglia M, Nabavi SF, et al. Antimicrobial activity of eugenol and essential oils containing eugenol: A mechanistic viewpoint. Crit Rev Microbiol [Internet]. 2017;43(6):668–89. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1080/1040841X.2017.1295225>
36. Mahboubi M, Mahboubi M. Chemical Composition, Antimicrobial and Antioxidant Activities of *Eugenia caryophyllata* Essential Oil. J Essent Oil-Bearing Plants. 2015;18(4):967–75.
37. Pinto E, Pina-Vaz C, Salgueiro L, Gonçalves MJ, Costa-De-Oliveira S, Cavaleiro C, et al. Antifungal activity of the essential oil of *Thymus pulegioides*

on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. *J Med Microbiol.* 2006;55(10):1367-73.

38. Mateo EM, Gómez J V., Domínguez I, Gimeno-Adelantado J V., Mateo-Castro R, Gavara R, et al. Impact of bioactive packaging systems based on EVOH films and essential oils in the control of aflatoxigenic fungi and aflatoxin production in maize. *Int J Food Microbiol* [Internet]. 2017;254(2016):36-46. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.05.007>
39. Fu Y, Zu Y, Chen L, Shi X, Wang Z, Sun S, et al. Antimicrobial Activity of Clove and Rosemary Essential Oils Alone and in Combination. 2007;994(March):989-94.
40. Scorzoni L, Benaducci T, Almeida AMF, Silva DHS, Bolzani VS, Mendes-Giannini MJS. Comparative study of disk diffusion and microdilution methods for evaluation of antifungal activity of natural compounds against medical yeasts *Candida* spp and *Cryptococcus* sp. *Rev Ciencias Farm Basica e Apl.* 2007;28(1):25-34.