



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS-UFAM
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
PATOLOGIA TROPICAL**

**MONITORAMENTO DE FUNGOS TOXIGÊNICOS
EM PLANTAS MEDICINAIS COMERCIALIZADAS NA CIDADE
MANAUS- AMAZONAS-BRASIL**

CARLA SILVANA DA SILVA SANTOS

**MANAUS-AMAZONAS
2005**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS-UFAM
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA
TROPICAL**

**MONITORAMENTO DE FUNGOS TOXIGÊNICOS
EM PLANTAS MEDICINAIS COMERCIALIZADAS NA CIDADE
DE MANAUS-AMAZONAS-BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Tropical da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Patologia Tropical, na área de concentração Diagnóstico e Controle.

Orientadora: Prof^a Doutora Maria Francisca Simas Teixeira

**MANAUS-AMAZONAS
2005**

Ficha Catalográfica
Catlogação da fonte pela Biblioteca Central
da Universidade Federal do Amazonas

SANTOS, Carla Silvana da Silva

**Monitoramento de fungos toxigênicos em plantas
medicinais comercializadas na cidade de Manaus-Amazonas-
Brasil.**

**Dissertação de Mestrado em Patologia Tropical. Universidade
Federal do Amazonas.**

51p. ilust.

**1. Plantas medicinais 2. Fungos 3 Micotoxinas I. Maria Francisca
Simas Teixeira II. Título**

CARLA SILVANA DA SILVA SANTOS

MONITORAMENTO DE FUNGOS TOXIGÊNICOS EM PLANTAS MEDICINAIS COMERCIALIZADAS NA CIDADE DE MANAUS-AMAZONAS-BRASIL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Tropical da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Patologia Tropical, na área de concentração Diagnóstico e Controle.

Aprovado em 10 de outubro de 2005

Banca Examinadora

**Prof^a Doutora Maria Francisca Simas Teixeira
Universidade Federal do Amazonas**

**Prof^a Doutora Maria Ivone Lopes da Silva
Universidade Federal do Amazonas**

**Prof^a Doutora Waldireny Caldas Rocha
Centro de Biotecnologia do Amazonas**

Aos meus pais, João Santos e Zaira da Silva Santos, pelo amor dedicado, incentivo e confiança em minhas atitudes. Às minhas irmãs Catia Simone e Carolynne Said por acreditarem em mim. Essas pessoas são a razão da minha existência, amo vocês e obrigada por tudo!

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela oportunidade e a graça de concluir mais um dos meus objetivos.

À Universidade Federal do Amazonas pela realização deste Curso de Mestrado em Patologia Tropical, promovendo desta forma, aperfeiçoamento de pessoal e benefícios para região Amazônica.

À CAPES por financiar através da Universidade Federal do Amazonas o Curso de Mestrado de Patologia Tropical.

A minha orientadora e amiga, Maria Francisca Simas Teixeira, que através dos seus conhecimentos técnico-científicos e exemplos profissionais mostrou-me que é mais importante construir uma vida do que ganhá-la e que não existe sacrifício quando se trabalha para ajudar a humanidade.

Aos professores doutores da Universidade Federal do Amazonas, José Raimundo e Conceição Oliveira pela orientação estatística; Maria Ivone Lopes e Fulgência Bandejas pela orientação quanto ao projeto.

Aos profissionais que estiveram no laboratório de micologia que me prestaram apoio profissional: Tereza Alarcón Castillo, Karla Barroso Feitosa, Elineide Cristina de Lucena Santos, Ormezinda Celeste Fernandes e a Miriam de Souza Lucena.

As pessoas que me ajudaram de forma direta e indireta para a conclusão desse mestrado.

Carla Silvana

RESUMO

As plantas medicinais são consumidas mundialmente como remédio caseiro e matéria prima na indústria farmacêutica. Nas últimas décadas, o uso de ervas medicinais, o valor econômico e social tem aumentado significativamente. A ausência de estudos para verificar a presença de fungos em plantas medicinais na Amazônia contribuiu para realização deste estudo que tem como objetivo verificar a ocorrência de fungos, detectar e analisar a presença de biocompostos extracelulares com características de micotoxinas de espécies de *Aspergillus* spp, *Penicillium* spp e *Fusarium* spp. Nas feiras e mercados de grande porte comercial das zonas Norte, Sul, Leste, Oeste, Centro-Oeste e Centro-Sul da cidade de Manaus, Amazonas-Brasil foi adquirida, aleatoriamente, uma amostra composta de cada planta medicinal [cidreira (*Melissa officinalis* L.), crajirú (*Arrabidaea chica* Verl), mirantã (*Pthychipetalum olacoides* Benth) e sacaca (*Croton cajucara* Benth)]. De cada amostra triturada, retirou-se um grama para ser misturado com 49 mL de água destilada esterilizada adicionada de polissorbato 80 0,5% (p/v). Da diluição 10^{-3} foi retirado 1mL para ser semeado na superfície de ágar Sabouraud com cloranfenicol (0,05g) e Rosa Bengala 0,025% (p/v), em triplicata. O crescimento dos fungos a 25 °C foi acompanhado, a cada 24 horas, por cinco dias. Ocorrido crescimento dos fungos, realizou-se a técnica de microcultivo em lâmina. E a identificação das espécies foi fundamentada na morfologia macroscópica das colônias e no estudo dos órgãos vegetativos e de frutificação, utilizando lactofenol azul de algodão como corante. O quantitativo de unidades formadoras de colônia (UFC) foi determinado por grama de produto. Das 24 amostras comerciais de sacaca, cidreira, crajirú e mirantã resultaram no isolamento de 758×10^3 UFC/g de produto. Em média, o quantitativo de UFC/g de produto variou entre 1 a 346×10^3 . Crajirú (45, 65%) e sacaca (13,2%), da Zona Leste e Oeste apresentaram maior porcentagem de contaminação. Das plantas medicinais foram isolados, *Aspergillus* sp. (41,6%), *Penicillium* sp. (41,6%), *Paecilomyces* sp. (5,90%), *Cladosporium* sp. (4,8%), *Trichoderma* sp. (1,2%), não ocorrendo *Fusarium* sp. *Eupenicillium* sp. (1,2%) foi o único representante dos Filo Ascomycota. *Penicillium janthinellum* (14,3%) e *Aspergillus flavus* (10,7%) foram os contaminantes de maior frequência. *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus* são aflatoxigênicas, em condições *in vitro*. Outros micotoxigênicos e respectivas micotoxinas foram *A. niger* var. *niger* (ocratoxina A), *A. niger* (ocratoxina A e citrinina), *A. versicolor* (citrina e zearalenona), *P. canescens* (ocratoxina A), *P. janthinellum* (citrinina), *P. melinii* (ocratoxina A), *P. miczynskii* (ocratoxina A), *P. simplicissimum* (ácido penicílico). As plantas medicinais analisadas apresentaram qualidade higiênica inadequada para consumo humano devido a presença do quantitativo de esporos de fungos, a presença de *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus* produtores de aflatoxinas.

ABSTRACT

The medicinal plants are consumed world-widely as house-hold medicine and raw material in the pharmaceutical industry. In the last decades the use of medicinal plants the economic and social value has increased significantly. The absence of studies to verify the presence of moulds in this product in the Amazonian contributed for accomplishment of this study whose objective to verify was to verify the occurrence of moulds to detect and to analyze the presence of extracellular extrolites with characteristics of mycotoxins of species of *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium*. In the fairs and markets of great commercial capacity of the zones North, South, East, West, Center-West and Center-South of the city of Manaus, Amazon-Brazil were acquired, random, a composed sample of each medicinal plant [cidreira (*Melissa officinalis* L.), crajirú (*Chica arrabidaea* Verl), mirantã (*Pthychipetalum olacoides* Benth) and sacaca (Croton cajucara Benth)]. Of each triturated sample, one gram left to be mixed 49 mL of added distilled water sterilized of Tween 80 0.5% (w/v). Of dilution 10^{-3} 1 mL was inoculated in dishes with Sabouraud dextrose agar with Chloramphenicol (0.05g) and Dichloran Rose Bengal 0.025% (w/v). The growth of the moulds was observed to each 24 hours per five days. After the growth in colonies of fungus, microcultive in lamina was made having blue lactophenol of cotton as ink. Identification of species of fungus was based on macroscopic morphology of colonies in the study of vegetative organs and of fructification of microcultive cultivated fungus. The quantitative of UFC was determined by gram sample. Of the 24 samples of sacaca, cidreira, crajirú and mirantã resulted in the isolation of 758×10^3 UFC/g sample. In average, the quantitative of UFC/g sample was between 1 to 346×10^3 . Crajirú (45.65%) and sacaca (13.2%), of the Zone East and West had presented greater contamination percentage. Of the medicinal plants they had been isolated *Aspergillus* sp. (41.6%), *Penicillium* sp. (41.6%), *Paecilomyces* sp. (5.90%), *Cladosporium* sp. (4.8%), *Trichoderma* sp. (1.2%), not occurring *Fusarium* sp. *Eupenicillium* sp. (1.2%) was the only representative of the Filo Ascomycota. *Penicillium janthinellum* (14.3%) and *Aspergillus flavus* (10.7%) had been the contaminate of greater frequency. Other mycotoxigenics and respective micotoxinas had been to *A. niger* var. *niger* (ocratoxina), *A. niger* (ocratoxina and the citrinina), *P. versicolor* (citrinina and zearalenona), *P. canescens* (ocratoxina), *P. janthinellum* (citrinina), *P. melinii* (ocratoxina), *P. miczynskii* (ocratoxina), *P. simplicissimum* (penicflico acid). The analyzed medicinal plants had presented inadequate hygienical quality for human consumption which had the presence of the quantitative of spores of moulds, the *Aspergillus flavus* presence and the *A. parasiticus* aflatoxin producers.

SUMÁRIO

	Pg
INTRODUÇÃO.....	10
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
2.1 Considerações sobre plantas medicinais.....	12
2.2 Ocorrência de fungos e micotoxinas em plantas medicinais.....	17
2.3 Características botânicas, classificação e distribuição geográfica das seguintes plantas medicinais.....	26
3 METODOLOGIA.....	30
3.1 Amostragem.....	30
3.1.1 Estruturas Vegetais.....	30
3.1.2 Procedimentos das amostras e isolamento dos fungos.....	30
3.1.3 Purificação das colônias isoladas.....	31
3.1.4 Identificação dos fungos.....	31
3.1.4.1 Microcultivo dos fungos filamentosos.....	31
3.1.4.2 Fixação e coloração da lâmina de microcultivo.....	32
3.1.4.3 Obtenção de macrocolônias.....	32
3.1.4.4 Análise morfológica das colônias fúngicas.....	32
3.2 Detecção de micotoxinas.....	32
3.2.1 Análise das micotoxinas em meio sólido (Técnica do <i>ágar plug</i>).....	32
3.2.2 Análise das micotoxinas pela Técnica de Cromatografia de Camada Delgada (CCD).....	33
3.2.2.1 Preparação das placas cromatográficas.....	33
3.2.2.2 Preparação do extrato bruto etanólico na placa cromatográfica.....	33
3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	34
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
5 CONCLUSÕES.....	47
6 REFERÊNCIAS.....	48

LISTA DE TABELAS

	Pg
Tabela 1 - Quantitativo de colônias, UFC e espécies de fungos isolados de amostras de plantas medicinais em ágar Sabouraud+cloranfenicol +Rosa Bengala, adquiridas em feiras e mercados de grande porte, localizadas nas diferentes zonas da cidade de Manaus-AM-Brasil.	36
Tabela 2 - Frequência e média de UFC/g amostra de planta medicinal de <i>Aspergillus flavus</i> e <i>A. parasiticus</i> isolados de cidreira, cajurú, mirantã e sacaca.....	43
Tabela 3 - Detecção de micotoxinas produzidas em YES a 25 °C por 70 isolados de <i>Aspergillus</i> e <i>Penicillium</i> obtidos de cidreira, cajurú, mirantã e sacaca adquiridas nas feiras e mercados de grande porte na cidade de Manaus-Amazonas-Brasil.....	46

LISTA DE GRÁFICOS

	Pg
Gráfico 1 - Porcentagem de fungos filamentosos isolados de drogas medicinais (cajurú, mirantã, cidreira e sacaca), usadas na medicina popular, na cidade de Manaus-Amazonas, Brasil.	38
Gráfico 2 – Porcentagem de gêneros de fungos filamentosos associados às drogas medicinais (cajurú, mirantã, cidreira e sacaca), usadas na medicina popular, na cidade de Manaus-Amazonas, Brasil.....	39
Gráfico 3 - Porcentagem de espécies de <i>Aspergillus</i> (A), <i>Penicillium</i> (B) e outros fungos (C) isolados de cidreira, cajurú, mirantã e sacaca, adquiridas nas feiras e mercados de grande porte na cidade de Manaus-Amazonas-Brasil.	40
Gráfico 4 – Frequência de espécies de <i>Aspergillus</i> e <i>Penicillium</i> contaminantes de cidreira, cajurú, mirantã e sacaca adquiridas nas feiras e mercados de grande porte na cidade de Manaus-Amazonas-Brasil.....	42
Gráfico 5 - Distribuição da produção de aflatoxina por espécies de <i>Aspergillus flavus</i> em meio de cultura sólido (YES), isolados de mirantã (Mir), sacaca (Sac) e cidreira (Cd).....	44

LISTA DE QUADROS

	Pg
Quadro 1 Fungos micotoxigênicos contaminantes de alimentos e respectivas micotoxinas.....	20
Quadro 2 Micotoxinas e os efeitos biológicos no homem e demais animais.....	23
Quadro 3 Temperaturas ótimas para produção das principais micotoxinas por fungos filamentosos.....	24
Quadro 4 Identificação de micotoxinas exposta a luz UV (* por reação com: fenilhidrazina a quente; ** vapores de amoníaco; *** anisoaldeido.	25
Quadro 5 Feiras e mercados de grande porte comercial das Zonas: Sul, Norte, Leste, Oeste, Centro-oeste, Centro Sul da cidade de Manaus, Amazonas-Brasil, locais nos quais foram adquiridas as plantas medicinais para análise dos fungos micotoxigênico.	30
Quadro 6 Plantas medicinais que foram adquiridas nas feiras e mercados de grande porte, nas zonas Norte, Sul, Leste, Oeste, Centro-Oeste e Centro-Sul, da cidade de Manaus, Amazonas-Brasil.	30

LISTA DE FIGURAS

	Pg
Figura 1. Características morfológicas do gênero <i>Aspergillus</i> spp.	21
Figura 2 Características morfológicas do gênero <i>Penicillium</i> spp.....	22
Figura 3 Aflatoxinas produzidas por <i>Aspergillus flavus</i> e Ocratoxina A.....	24
Figura 4 Planta cidreira	26
Figura 5 Planta mirantã	27
Figura 6 Planta sacaca	28
Figura 7 Planta Crajirú	29

1 INTRODUÇÃO

Pessoas no mundo inteiro consomem plantas medicinais praticamente todo o dia, para a prevenção, cura de doenças e desconfortos de modo geral. Essas plantas contêm um determinado número de microrganismos como bactérias e fungos que constituem a microbiota do próprio vegetal (Bastos *et al.*, 2000).

Na Amazônia são inúmeras as plantas medicinais usadas na medicina popular. Entre as quais, cidreira (*Lippia Alba* (Mill.) N. E. Brown), crajirú (*Arrabidaea chica* Verl), mirantã (*Ptychopetalum olacoides* Benth) e sacaca (*Croton cajucara* Benth) são comumente consumidas como calmante, antiinflamatório, afrodisíaco e emagrecimento, respectivamente (COSTA *et al.*, 1990; MARTINS; MARTINS, 1993; BORRÁS, 2003).

Embora as plantas medicinais sejam utilizadas como drogas vegetais são também susceptíveis a patologias microbianas no campo, pós colheita e no armazenamento. Dentre os fungos contaminantes de maior frequência nos vegetais, têm destaque *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* que também são comumente encontrados em alimentos e produtos de origem vegetal (PITT; BASÍLICO, 2000).

A microbiota sobre e dentro dos vegetais, predominantemente, afeta a qualidade do produto devido a formação de compostos tóxicos, denominados de micotoxinas. A formação de micotoxinas reflete o grau de diferenciação bioquímica, fisiológica e às vezes morfológica do fungo no habitat natural (CARRILLO, 2003).

As micotoxinas são metabólitos secundários sintetizados por certos fungos capazes de produzir efeitos tóxicos em animais e no homem dependendo dos níveis de consumo (GONÇALEZ; PINTO; FELÍCIO, 2001). Tais biocompostos podem ser detectados em vários tipos de produtos, semente oleaginosa, plantas medicinais e chá de ervas (PITT, 2000; BRAGA; CARDOSO; MACEDO, 2002).

As micotoxinas de importância médica são aflatoxinas, ocratoxinas A, fumonisinas, certos tricotecenos e zearalenona. Dentre estas, as aflatoxinas são relevantes para a saúde pública devido às propriedades carcinogênicas, mutagênicas e teratogênicas. Ocratoxinas A, as produzidas por *Penicillium verrucosum*, *Aspergillus ochraceus* e *A. carbonarius*, têm atividade nefrótica; os tricotecenos e a zearalenone produzidas por *Fusarium graminearum* são imunossupressoras (PITT, 2000; BRAGA; CARDOSO; MACEDO, 2002).

A ausência de estudos relacionados com ocorrência de fungos em plantas medicinais, associada à importância social e econômica contribuiu para realização deste estudo que tem como objetivo verificar a ocorrência desses microrganismos em plantas medicinais adquiridas em feiras e mercados de grande porte na cidade de Manaus-AM, assim como, detectar e analisar a produção *in vitro* de biocompostos com características de micotoxinas por *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. e *Fusarium* spp.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Considerações sobre plantas medicinais

Uso de plantas medicinais está cada vez mais difundido, não só no Brasil, como também em outros países, especialmente da Europa (COSTA *et al.*, 1992). O interesse pelas plantas medicinais é muito antigo na Amazônia, e sempre veio disfarçado de “Viagens Filosóficas” ou “Expedição Naturalista”, onde cientistas europeus buscavam novos medicamentos entre os nativos. As primeiras substâncias a serem encontradas e contrabandeadas para a Europa foram os “Curares”, cuja ação bloqueadora neuromuscular ou “paralisante” serviu de base para os famosos experimentos de Claude Bernard, fisiologista e farmacologista francês, em 1865 (BORRÁS, 2003).

Tornou-se um costume bastante arraigado em várias camadas da população brasileira o uso de plantas sob várias formas de preparações populares (chá, abafado, garrafada etc.) Tal hábito está relacionado à percepção de que as plantas utilizadas, além de possuírem atividade terapêutica, são desprovidas de efeitos tóxicos (BRAGA; CARDOSO; MACEDO, 2002).

As plantas medicinais podem conter microrganismos que constituem a microbiota vegetal ou estes podem ser incorporados durante a colheita, o transporte e o armazenamento. Durante o processo de fabricação, alguns microrganismos são removidos e destruídos, entretanto, dependendo do tratamento outra parte da micobiota pode permanecer, inclusive os metabólitos como as micotoxinas (BRAGA, CARDOSO; MACEDO, 2002).

A colheita, o transporte e a transformação são fatores que limitam bastante a sobrevivência de microrganismo, principalmente daqueles originários dos vegetais, a exemplo de *Penicillium*, *Aspergillus* e *Fusarium*. O armazenamento também propicia, através da formação do vapor atmosférico nos ambientes, a multiplicação de outros fungos anemófilos

adaptados a condições ambientais adversas (*Rhizopus*, *Mucor*, *Absidia*, *Trichoderma* e *Rhodotorula*) (MARTINS, 2001; FRANCO, 1996; OGA, 1996; ARAÚJO, 1995).

A atividade de água também interfere na multiplicação dos fungos nos produtos, este fator favorece o crescimento de diversos gêneros, entre os quais *Trichoderma*, *Trichotecium*, *Cephalosporium*, *Monascus*, *Basipetospora*, *Chrysosporium*, *Eremascus*, *Wallemia* e *Seromyces*, são citados por Franco; Landgraf (1996). Esses fungos, em função dessa característica fisiológica, possuem adaptação para crescer em produtos com atividade de água inferior a 0,85, são os denominados xerofílicos.

Bastos; Rodrigues (2000) descreve que os produtos de origem vegetal utilizados popularmente como medicamentos devem ser submetidos ao controle da qualidade tanto a matéria-prima, quanto o produto tecnologicamente acabado. Esse controle contribui, sem dúvida, para o tripé eficácia, segurança e qualidade, refletindo por consequência no binômio custo-benefício. Esses princípios são necessários ao desenvolvimento científico e tecnológico dos fitoterápicos e asseguram a melhor aceitação pela classe médica que os prescreve e propiciam confiabilidade ao consumidor.

Considerando que o consumo de plantas medicinais tem se expandido, provavelmente estimulado pela procura de produtos que conforme se supõe não possuem efeitos indesejáveis a saúde, como aqueles usados na medicina tradicional. Em relação a fitoterápicos tradicionais, dentre outras exigências no Brasil, a AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA, solicita a apresentação de levantamento etnofarmacológico e de utilização em documentações técnicas científicas ou publicações indexadas que serão avaliados em alguns critérios, dentre eles a ausência de substâncias tóxicas (BRAGA; CARDOSO; MACEDO, 2002; ANVISA, 2000).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) apontou um roteiro básico para analisar a qualidade de plantas medicinais abrangendo tópicos que vão desde a classificação e identificação da espécie botânica, doseamento de princípios ativos até as possíveis e prováveis contaminações radioativas provenientes dos processos de esterilização do produto ou de suas contaminações ambientais. Os controles físico-químico, químico e microbiológico são apontados no documento da WORLD HEALTH ORGANIZATION-WHO Pharm 92.559/1992 como relevantes e imprescindíveis. Assim, os seguintes procedimentos básicos devem ser considerados:

Devido às características peculiares e específicas dos materiais de plantas, como por exemplo, a baixa homogeneidade do conteúdo, os processos de manuseio durante a colheita requerem cuidados especiais para o preparo da amostragem a ser ensaiada. Assim, os seguintes procedimentos básicos devem ser considerados:

1. Exame macroscópico: inspeção cuidadosa do "container" e embalagem, características organolépticas (cor, textura, odor), apresentação (em estado bruto, "in natura", cortado, prensado, rasurado, moído), presença de corpos ou materiais estranhos (areia, terra, partículas ou pedaços de vidros, poeira) e presença de insetos ou suas partes.
2. Exame microscópico: as plantas medicinais a serem submetidas a este exame podem ou não serem preparadas, de acordo com a finalidade a atingir. O preparo implícita, em alguns casos, clarificar o material com solução com cloral hidratado ou hipoclorito de sódio. A desintegração dos tecidos permitirá obter dados, por exemplo, sobre o conteúdo das paredes do vegetal, importante na sua classificação.
3. Colheita da amostra: para realização correta dos testes acima as amostras devem ser observadas levando-se em consideração o grau da fragmentação, identidade e nível de impurezas (as Farmacopéias Brasileira e Internacional permitem 2% de impurezas), grau de umidade, conteúdo em cinzas. No procedimento experimental

devem ser consideradas as partes do vegetal a ser trabalhada bem como a quantidade, em gramas, a ser ensaiada. O documento da OMS indica para raízes, rizomas e cascas - 50 g, folhas, flores, frutos e sementes - 250 g, e a planta toda (de cada parte 0,5 g) - 50 g.

4. Ensaio químico e físico-químico: a cromatografia, em seus diversificados tipos: coluna, camada fina, papel, gasosa, líquida de alta eficiência são as técnicas laboratoriais mais versáteis e mais utilizadas nas determinações. Os fenômenos físico-químicos norteadores são adsorção, partição, troca iônica envolvendo parâmetros como a constante dielétrica, polaridade, solubilidade, volatilidade e pH. Dependendo da natureza e da complexidade das misturas a serem separadas diferentes adsorventes (sílica, alumina, biogel e sephadex), tipos de fases (normal, lobar, reversa, *spinflash*, distribuição por corrente, etc) podem ser utilizados. A escolha do eluente (solvente de desenvolvimento) para o cromatógrafo líquido ou gasoso deve se basear na escala eluotrópica e gases inertes, elementos interdependentes das constantes físico-químicas que orientam o fenômeno e técnicas utilizadas. Após a separação da substância segue-se sua detecção ou revelação. Os reveladores classicamente usados - gerais ou específicos - incluem lâmpadas de curto e longo comprimento de ondas, iodo, solução de ácido sulfúrico, sulfato cérico, ninhidrida (aminoácidos) Dragendorff (alcalóides), Liebermann (esteróides), etc. Esta detecção muitas vezes é facilitada pela presença de indicadores fluorescentes. A técnica de cromatografia fornece dados qualitativos e quantitativos quando se dispuser de padrões de referência para os princípios ativos.

5. Testes para avaliação de contaminações radioativas: as irradiações podem ser usadas para descontaminação microbiana, esterilização de plantas, embalagens e produtos intermediários. Incluem-se também as ocorrências naturais de contaminações do solo e da atmosfera. Atenções especiais devem ser dirigidas para a presença de estrôncio 90, iodo 130, cério 137 e plutônio 239.

6. Determinação de resíduos de pesticidas: esta avaliação deve ser efetuada em face as práticas agrícolas realizadas para controle de pragas e insetos nas lavouras. Os

pesticidas de utilização mais frequentes são: rodenticidas, inseticidas, herbicidas e fungicidas. Normalmente utilizam-se técnicas cromatográficas (gasosa e líquida de alta eficiência) para detecção dessas substâncias.

7. Determinação de arsênio e metais pesados: a poluição ambiental é a maior responsável pela contaminação com esses elementos às plantas medicinais. Os limites estipulados pela OMS e FAO para cada grama de planta são de 1 µg de arsênio, 10 ppm de chumbo e 0,3 ppm de cádmio.

8. Determinações da atividade hemolítica: as plantas das famílias Caryophyllaceae, Araliaceae, Sapindaceae, Primulaceae e Dioscoreaceae contêm saponinas, que são substâncias capazes de lisar os eritrócitos. Assim, devem-se utilizar métodos clássicos de hemólise (% de eritrócitos lisados/g da planta) para detecção destes tipos de substâncias.

9. Controle microbiológico:

9.1. Principais agentes de descontaminação e/ou esterilização: os processos de descontaminação e/ou esterilização de plantas medicinais podem ser efetuado por radiação, calor, microondas e fumigação (gás de óxido de etileno). Faz-se necessário informar que o calor, aquecimento em estufas, pode ser aplicado em casos de espécies vegetais que não contenham compostos voláteis ou termo-lábeis devido à temperatura elevada ocasionar a decomposição e degradação dos constituintes químicos. A aplicação de microondas deve ser acompanhada de testes com cromatografia em camada fina para observar se há decomposição ou degradação. A exposição às microondas deve ser intercalada e cuidadosa. A fumigação com óxido de etileno deve ser realizada com a planta seca devido a umidade propiciar a formação de etileno glicol que é tóxico. Esse método deve ser acompanhado de rigorosa aeração. A legislação brasileira permite até 1 ppm de etileno glicol em 100 g de material da planta esterilizada.

9.2. Ensaio para detecção de microorganismos: as plantas medicinais podem ter considerável número de bactérias, fungos e aflatoxinas, geralmente provenientes do solo ou de contaminações por manuseio e ambiental. Os procedimentos adotados pela OMS para os ensaios envolvem pré-tratamento do material, ensaios para estudo de bactérias Gram negativas e Enterobacteriaceae (detecção, identificação e avaliação quantitativa). Deve se preocupar principalmente com microorganismos potencialmente patogênicos e patogênicos, a exemplo de *Escherichia coli*, *Salmonella* sp, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*.

10. Testes para detecção e determinação de aflotoxinas: devem ser investigadas as aflotoxinas B1, B2, G1 e G2. Devem ser atentados cuidados especiais na preparação da amostra, metodologia e interpretação dos resultados.

11. Avaliações quantitativas da presença de princípios ativos: Estas avaliações podem ser realizadas na matéria-prima vegetal quando a quantidade for estabelecida diretamente ou quando fornecida dentro de uma faixa que corresponda a um valor definido de princípios ativos terapêuticos conhecidos. Como exemplo pode-se citar a matéria-prima *Sennae folium* (folhas) 900 mg ou a *S. folium* 830 - 1000 mg, correspondendo a 25 mg de glicosídeos hidroxiantracênicos calculados como senosídeo B, e outros constituintes de *S. folium* correspondendo a faixa de 0 - 170 mg. No caso de preparação fitoterápica deve ser estabelecido tanto pela quantidade equivalente ou a relação de matéria prima medicinal vegetal para o produto (por exemplo, 8:1) - não deve ser utilizado para óleos graxos ou essenciais, e pela quantidade de preparações de planta expressa dentro de uma quantidade definida dos princípios ativos com atividades terapêuticas conhecidas (WHO, 1992).

2.2 Ocorrência de fungos e micotoxinas em plantas medicinais

Enquanto pesquisas são realizadas visando identificar e sanar o grave problema da contaminação de alimentos e ração animal com fungos e os respectivos metabólitos tóxicos,

pouca atenção tem sido voltada a outro tipo de produto agrícola igualmente susceptível a esse tipo de contaminação: os fitoterápicos (BRAGA; CARDOSO; MACEDO, 2002).

Os fungos são organismos que revelam notável capacidade de adaptação e crescimento sob condições de umidade e temperatura extremamente variáveis. São poucos exigentes quanto aos nutrientes disponíveis, razões pela qual o crescimento pode ocorrer praticamente em qualquer tipo de produto (PITT, 2005).

Estudos sobre contaminação de fungos em amostras de plantas medicinais *in natura* que foram submetidas à secagem ao sol, na Nigéria, constataram a presença de 28 espécies de fungos. Nessa pesquisa, as plantas *in natura*, dentre as espécies identificadas foi constatada a maior ocorrência tendo a maior ocorrência de *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *Fusarium moniliforme*, *Trichoderma viride*, *Penicillium expansum* e *Mucor fragilis*. Após a secagem das plantas a micobiota predominante estava constituída por *Rhizopus stolonifer* e *Absidia corymbira*. Com o referido resultado, o autor concluiu que as plantas medicinais a venda para a população na Nigéria são potencialmente nocivas a saúde humana e preconiza um rígido controle de qualidade (EFUNTOYE, 1996)

Borges, Pimentel (2002), em outros estudos realizados com objetivo de analisar as marcas de erva-mate comercializadas da cidade de Curitiba-PR, Brasil, comprovou a presença de *Rhizopus* spp. (5,52%) e de outros fungos micotoxigênicos, como *Aspergillus* spp. (62,13%) e *Penicillium* spp. (32,35%).

Os fungos são amplamente utilizados na produção de antibióticos, vitaminas e alimentos. Contudo, certas espécies podem causar transformações produzindo sabores e odores indesejáveis no produto colonizado. Também podem ocasionar manifestações clínicas no homem e nos animais como infecções ou doenças decorrentes da invasão de tecidos, alergias ou reações de hipersensibilidade, além de micotoxicoses, intoxicações resultantes da

ingestão de alimentos, fitoterápicos ou rações contendo micotoxinas (BORGES; PIMENTEL, 2002).

Os fungos micotoxigênicos são importantes não só pelo impacto negativo resultante da deterioração do produto, como também pelos problemas que podem causar do agricultor ao consumidor. Conseqüentemente estão associados tanto à pesquisa científica quanto às perspectivas econômicas (GONZALEZ, 2001; SANTOS, 1998; ARAUJO, 1995).

Os diferentes fungos produtores de micotoxinas têm distribuição mundial e crescem em diversos substratos (Quadro1). Esses microrganismos conseguem crescer em diferentes substratos e em condições adequadas de umidade, pH e temperatura. Por tanto, produtos como plantas medicinais e alimentícios são propensos à invasão por fungos e contaminação por micotoxinas no campo, durante e após a colheita, no processamento, no transporte, na estocagem e em condições deficientes de manuseio (OGA, 1996).

Entre os compostos tóxicos associados em produtos vegetais se encontram principalmente as micotoxinas sintetizadas por *Claviceps*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Pithomyces*, *Myrothecium*, *Stachybotrys*, *Phoma* e *Alternaria* (GOMPERTZ, 2001; BORGES; PIMENTEL, 2002).

No campo, as espécies que invadem os grãos antes e após a colheita, como os gêneros *Alternaria* e *Fusarium*, precisam de altos níveis de umidade (20-22%) a diferença de *Aspergillus* e *Penicillium*, espécies de armazenagem que precisam de níveis inferiores de umidade.

Vários fungos filamentosos e leveduras contaminantes de plantas medicinais podem também ser nocivos para o homem ou demais animais devido à habilidade deles em produzir metabólitos tóxicos conhecidos como micotoxinas, quando existem fatores biológicos e ambientais favoráveis. A maioria dos fungos não sobrevive ao processamento dos alimentos

enquanto que as micotoxinas não são destruídas (SABINO, 1996; BORGES; PIMENTEL, 2002).

As micotoxinas [(grego *mykos* = fungo); toxina = latim *toxicum* (veneno)] são, substâncias com estruturas químicas com atividades biológicas diferentes, metabólitos secundários (extrólitos) produzidas por fungos durante o crescimento. Em contraste com as toxinas bacterianas, as quais são principalmente proteínas com propriedades antigênicas (BASTOS, 1987). As micotoxinas possuem efeitos tóxicos proporcionais aos níveis consumidos pelos animais e pelo homem. Simultaneamente, uma espécie de fungo pode sintetizar diferentes tipos de micotoxinas, dessa forma a dieta diária pode ser contaminada com vários tipos de micotoxinas (GONÇALEZ, *et al.*, 2001; PITT, 2000; BRAGA, CARDOSO; MACEDO, 2002; SABINO, 1996).

Fungo micotoxigênico	Alimentos (substrato)	Micotoxinas
<i>Aspergillus flavus</i> <i>Aspergillus parasiticus</i>	Amendoim, nozes, cereais, amêndoas, castanha do Pará, coco, sementes de algodão e plantas medicinais	B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂
<i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Fusarium roseum</i> , <i>Fusarium lacteritium</i> , <i>Fusarium tricinctum</i> , <i>Fusarium moniliforme</i> .	Milho, trigo	Zearalenona
<i>Aspergillus e</i> <i>Penicillium expansum</i>	Frutas em geral, maçã, trigo, cevada germinada.	Patulina
<i>Fusarium tricinctum</i> , <i>Fusarium roseum</i> , <i>Fusarium poae</i> , <i>Stachybotrys</i>	Cereais, amendoim, feno, rações, <i>corn flakes</i>	Tricotecenos
<i>Fusarium graminearum</i> , <i>Trichotecium</i> , <i>Trichoderma</i>	Cereais	Desoxynivalenol, Nivalenol, Zearalenona
<i>Myrothecium</i> , <i>Trichotecium</i>	Cereais	Nivalenol
<i>Cephalosporium</i>	Cereais	Toxina T ₂
<i>Aspergillus alutaceus e Penicillium viridicatum</i>	Cereais, café, milho, centeio, aveia, cevada, farinha de mandioca, ração animal.	Ocratoxina
<i>Penicillium</i>	Cereais	Ácido penicílico
<i>Aspergillus nidulans</i> , <i>Aspergillus versicolor</i>	Cereais, frutas, sucos e queijos.	Esterigmatocistina
<i>Penicillium</i>	Cereais	Rubratoxina A e B
<i>Penicillium</i>	Arroz	Citroveridina
<i>Fusarium moniliforme</i> , <i>Fusarium proliferatum</i> , <i>Fusarium nygamai</i> .	Milho e arroz	Fumonisinias
<i>Aspergillus e Penicillium</i>	Amendoim, milho, farinha de milho.	Citrinina

Quadro 1 Fungos micotoxigênicos contaminantes de alimentos e respectivas micotoxinas.

Fonte: Pitt *et al*(2000); Carrillo (2003).

Aspergillus sp. e *Penicillium* sp. são os deuteromycetes mais freqüentes nas plantas medicinais e são reconhecidos na literatura especializada pelas características descritas a seguir: (RAPPERT; THOM, 1968; RAPPER ; FENNELL, 1977; DOMSCH; GAMS; ANDERSON, 1980; PITT, 1985; SAMSON *et al*/1995; SAMSON; FRISVAD, 2004).

- *Aspergillus* spp.

Aspecto da Colônia: Formadas por denso micélio de cor branca, amarela, amarelo-marrom, marrom a negro ou verde (Figura 1).

Aspecto Microscópico: Micélio septado, hialino. As estruturas características são: a) conidióforos com ou sem septos e com ápice dilatado (vesícula); b) as fiálides nascem diretamente da vesícula (unisseriada) ou em metula (bisseriada), nas quais são produzidos os conídios. Vesícula, fiálides, metula (se presente) e conídio em cadeia formam a cabeça conidial (característica própria do gênero) (Figura 1).



Figura 1. Características morfológicas do gênero *Aspergillus* spp.

- *Penicillium* spp.

Aspecto da Colônia: O micélio se apresenta com aspecto aveludado, flocoso, fasciculado, sinematoso e crustoso (Figura 2).

Aspecto Microscópico: no micélio septado, hialino forma-se conidióforo simples e/ou ramificados, dessa estrutura tem origem as fiálides, que são dispostas na forma de pincel onde são formados os conídios em cadeia. A morfologia do conidióforo determina a classificação do gênero (Figura 2).

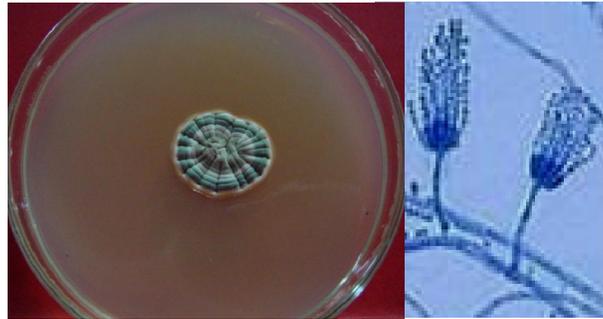


Figura 2 Características morfológicas do gênero *Penicillium* spp.

As micotoxicoses são doenças causadas pelas micotoxinas que se manifestam em animais quando ocorre ingestão de alimentos contaminados com essas toxinas. No homem, retardam o crescimento, afetando as funções do organismo e desenvolvendo tumores, podendo inclusive ser letal. Os órgãos mais freqüentemente afetados são: fígado, rins, cérebro, músculos e sistema nervoso. Os sintomas vão desde náuseas e vômitos até a falta de coordenação dos movimentos (ataxia) e morte (BORGES; PIMENTEL, 2002).

As micotoxicoses são classificadas em primárias ao consumir vegetal contaminado e secundário ao ingerir carne ou leite de animais que ingeriram ração contaminadas por micotoxinas (CARRILLO, 2003).

Outra doença, o micetismo é uma intoxicação devido a ingestão de fungos micotoxigênicos macroscópicos (Basidiomycetos toxígenos), como *Amanita muscaria* e *A. verna*. Os Basidiomycetos alucinógenos (Ex.: *Lycoperdon*, *Psilocybe* e *Panaeolus*) são capazes de determinar “micetismo cerebral” devido sintetizarem substâncias psicotrópicas (bufotenina, ácido lisérgico e outras), que causam sintoma comparável a manifestações encontradas, por exemplo, em pacientes portadores de esquizofrenia. (LACAZ *et al.*, 2001; TEIXEIRA; MATSSURA; SOARES, 1999).

No quadro 2 e figura 3, estão relacionadas as micotoxinas mundialmente importantes para a saúde do homem, aflatoxinas, ocratoxinas A, fumonisinas, certos tricotecenos ,

zearalenona e ácido penicílico que causam diferentes efeitos (BASTOS; RODRIGUES, 2002).

A presença dos fungos micotoxigênicos em plantas medicinais não significa automaticamente a presença de micotoxinas, contudo há um potencial para produção desses metabólitos secundários. Por outro lado, à ausência de fungos toxigênicos, em qualquer substrato, não assegura a ausência de micotoxinas considerando-se que as toxinas permanecem no substrato após a inviabilização do microrganismo e existem cepas dentro de uma mesma espécie que não possuem a capacidade para a síntese de micotoxinas, e sugerem a avaliação do potencial de síntese de metabólitos tóxicos por esses fungos (PITT, 2000; FARIAS, 2000).

Micotoxinas	Efeitos biológicos em animais	Efeitos biológicos no homem
Aflatoxinas (B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂ e M ₁)	Hepatotoxicidade, epatocarcinoma e hemorragia.	Hepatocarcinogênese, cirrose em crianças, síndrome de Reye, degeneração da gordura de vísceras
Ochratoxina A	Nefrotóxico e hepatóxico.	Nefropatia de Balkan, tumor renal
Patulina	Hepatotóxico, afeta rins, baço e cérebro	Provável ação carcinogênica, mutagênica, teratogênica e fetotóxica
Tricotecenos (deoxinivalenol, nivalenol, toxina T ₂)	Vômito, diarreia, perda de peso, descamação da pele e hemorragia	ATA (aleucia tóxica alimentar)
Zearalenona	Efeitos estrogênicos, infertilidade.	Câncer cervical
Fumonisinias	Leucoencefalomalácia equina (LEME), edema pulmonar em suínos	Câncer de esôfago
Alcalóides do Ergot	Gangrena nas extremidades, convulsões	Ergotismo (gangrenas membros)
Ácido Penicílico	Tremores e convulsões	Não identificado

Quadro 2 - Micotoxinas e os efeitos biológicos no homem e demais animais.
 Fonte: González; Pinto; Felício (2001).

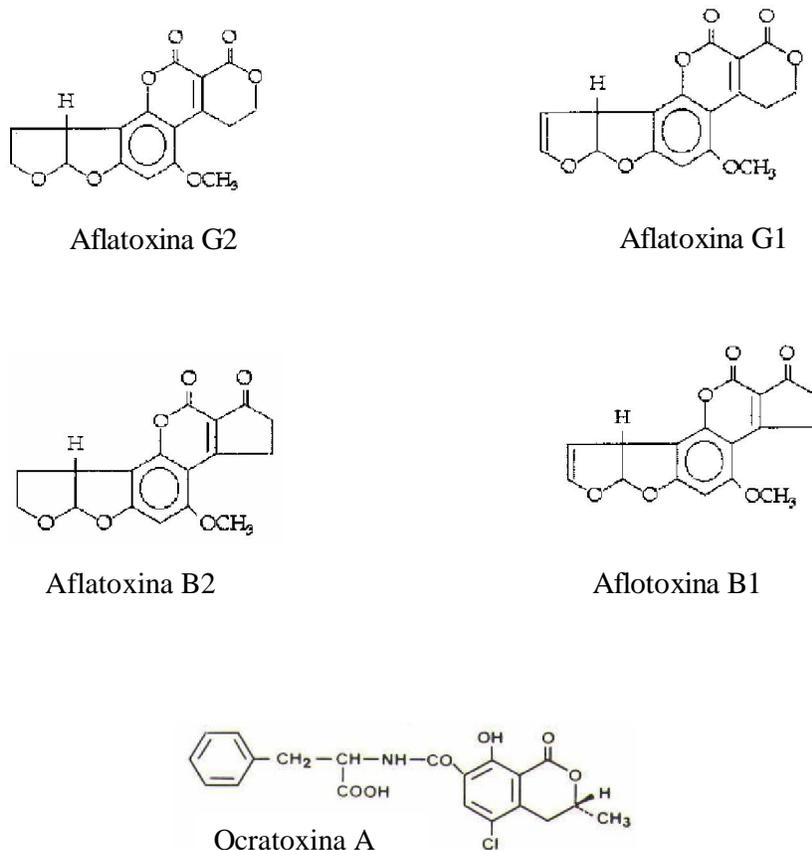


Figura 3 Estrutura molecular da Ocratoxina A e das Aflatoxinas produzidas por *Aspergillus flavus*

Entre os fatores ambientais que favorecem o crescimento dos fungos, a produção de toxina e em consequência, a contaminação do produto por micotoxina têm destaque à temperatura. De acordo com Sabino (1996), as temperaturas ótimas para produção das principais micotoxinas estão citadas no quadro 3.

Micotoxinas	Temperatura
Aflatoxinas	27 °C
Ocratoxina	28 °C
Zearalenona	12 °C - 14 °C
Patulina	20 °C - 25 °C

Quadro 3 Temperaturas ótimas para produção das principais micotoxinas por fungos filamentosos.

Desde a descoberta das micotoxinas diversas metodologias têm sido desenvolvidas que permitem a detecção em produtos alimentares (Quadro 4). Apesar dos procedimentos de purificação e limpeza, os processos de separação e detecção são apenas presuntivos, pois outros metabólitos não tóxicos podem apresentar comportamentos semelhantes a micotoxinas. Para confirmação de micotoxinas em alimentos torna-se necessário à realização de testes precisos, do tipo espectrofotometria (SANTOS; VENÂNCIO; LIMA, 1998).

Comumente, entre as técnicas usuais para análise de micotoxinas, como alternativa utilizam-se técnicas químicas simples que se fundamentam em reações específicas de identificação. Através desse método, o produto e o padrão da micotoxina suspeita são expostos ao mesmo tratamento químico e os respectivos produtos de reação são comparados por cromatografia. A presença da micotoxina se confirma sempre que os perfis cromatográficos coincidirem (SANTOS; VENÂNCIO; LIMA, 1998).

As micotoxinas adsorvem luz UV e emite essa energia sob a forma de luz fluorescente, característica comum a diversas micotoxinas que permite a detecção e identificação quando são utilizados métodos de quantificação confiáveis, pois esses dependem das propriedades físico-químicas desses metabólitos. No quadro 4 estão citadas micotoxinas e as respectivas colorações citadas na literatura (SCOTT; LAWRENCE; WALBEEK,1970; SANTOS; VENÂNCIO; LIMA, 1998; BENITEZ, 2003).

Toxina	Cor a luz visível	$\lambda = 365 \text{ nm}$
Aflatoxina B1	Não visível	Azul
Aflatoxina B2	Não visível	Azul
Aflatoxina G1	Não visível	Verde
Aflatoxina G2	Não visível	Verde
Aflatoxina M1	-	Azul
Aflatoxina M2	-	Azul
Ácido penicílico	Amarelo*	amarelo brilhante**
Citrinina	-	Amarelo
Esterigmatocistina	-	vermelho acastanhado
Ocratoxina A	-	azul esverdeado/azul brilhante
Patulina	Amarelo*	azul clara
Toxina T-2	Rosa cinzento***	
Zearalenona	Azul-verde	azul clara
Rubratoxina B	-	Escura

Quadro 4 Identificação de micotoxinas exposta a luz UV (* por reação com: fenilhidrazina a quente; ** vapores de amoníaco; *** solução de ácido anisoaldeído.

2.3 Características botânicas, classificação e distribuição geográfica das seguintes plantas medicinais

Nas citações de Costa *et al.* (1990); Martins (1993); Borrás (2003) cidreira, crajirú, mirantã e sacaca são descritas como:

a) CIDREIRA

Sinonímia Popular: celine, chá-da França, cidrila, citronade, grama-cidreira, maliteira, melissa, melissa-Romana, salva-limão.



- Nome Científico: *Lippia Alba* (Mill.) N. E. Brown
- Família: Lamiaceae (Labiatae)
- Ocorrência Geográfica: Originária da Europa, Norte da África e Oriente; cultivada no Amazonas, Brasil.
- Habitat: Terrestre

Figura 4 Planta cidreira

Planta arbustiva de um pouco ou mais de 1m de altura, caule quadrangular, muito ramosa; folhas pecioladas, ovais, denteadas, de cheiro agradável e sabor característico; flores brancas ou róseas. É uma erva que se renova o ano inteiro com brotos flexíveis. Os talos têm quatro cantos, muito manifestos, porém rombudos, com as faces percorridas por um sulco pouco profundo, e alternativamente com pêlos. Esse caule cortado transversalmente, observa-se que essa secção em sua maior parte está ocupada pela medula muito branca, que contrasta com o verde do resto da planta e com o desenho reticulado que recorda o aspecto de uma pele de serpente. As folhas se dispõem uma em frente à outra, acopladas, grandes, de até 8 cm ou mais flexíveis ou precoces, incluindo o pecíolo; ovadas, festoneadas nos bordos, ligeiramente amolgadas na face superior, com nervura em ressaltado na inferior e com alguns pequenos

pêlos muito menos abundantes que no talo, ou completamente lisas. A cidreira exala um aroma agradável que relembra o do limão. É facilmente cultivada em vasos e hortos.

As partes usadas da erva-cidreira são as folhas, ramo folhado, ramo florido e o broto seco. É útil no tratamento dos embaraços gástricos e inapetência; excitante (por isso aplicada nos casos de gastralgia), estimulante, antiespasmódica, digestiva; usada nos casos de histeria; contra vômito de mulheres grávidas, menstruações difíceis, dor de cabeça, contra as obscurações passageiras; contra o ruído dos ouvidos; contra a vertigem conseqüente do trabalho individual, contra as afecções do coração; acalma as palpitações. As ervas-cidreiras são usadas na forma de infusão tisana, vinho, lambedor.

b) MIRANTÃ (MUIRAPUAMA)



- Sinonímia Popular: Muirapuama, marapuama, muitatan e mirantã.
- Nome Científico: *Pthychipetalum olacoides* Benth.
- Família: Olaceae
- Ocorrência Geográfica: Amazônia
- Habitat: Lugares húmidos da mata de terra-firme.
- Hábito: Arbusto.

Figura 5 Planta mirantã

É um arbusto atingindo a altura de 2 metros, de hastes ereta e coroada por pequenos e raros galhos, quase despedidos de folhagem; de folhas ovolanceoladas, glabras; flores em racemos e fruto drupáceo. A raiz e a haste apresentam coloração branco-palha; são bastantes fortes e resistentes.

As partes usadas da planta são as cascas, estas podem ser mascadas ou fervidas como decocção; as raízes (geralmente triturada) e as hastes são usadas como tintura, extrato fluído,

vinho, macerado, decocção e linimento. O seu uso popular é como tônico neuromuscular de primeira ordem, contra a ataxia locomotriz, paralisia facial, neurastenia sexual, astenias circulatórias e gastro-intestinal, gripe em particular a circulatória (astenia cardíaca) e gastro-intestinal. Os efeitos fisiológicos da muirapuama perduram por algum tempo; a sua eliminação não é rápida, e possivelmente se dá pela urina e pelo suor.

c) SACACA



- Sinonímia Popular: Sacaca, muirassacaca, casca-sacaca, sacaquinha.
- Nome Científico: *Croton cajucara* Benth
- Família: Euphorbiaceae Hábito: Arbusto
- Ocorrência Geográfica: Amazônia.

Figura 6 Planta sacaca

É um arbusto de folhas lanceoladas, dotadas de pecíolo, de até 14cm de comprimento por 5cm de largura, de coloração verde ou pardacenta e suas flores em racimos terminais de 6 a 9cm de comprimento. Esta planta é muito conhecida na Amazônia e a palavra sacaca significa feitiçaria.

As partes do arbusto mais usadas são as cascas e folhas em decocção. O uso popular é indicado para febre, inflamações hepáticas e gastrintestinais, emagrecimento, hipercolesterolemia e atividade hipoglicemiante.

d) CRAJIRÚ



Figura 7 Planta crajirú

- Sinonímia Popular: Cipó-cruz, carajuru, côa-pyranga, guajuru, guarajuru-piranga, oajuru, pyranga, pariri.
- Nome Científico: *Arrabidaea chica* Verl
- Família: Bignoniaceae
- Ocorrência Geográfica: Amazônia.
- Hábito: Arbusto-trepadeira

É um arbusto-trepadeira com folhas lanceoladas verde-escura, gavinhas (folhas modificadas). Contém saponinas, compostos flavonóides, taninos, terpenos, cálcio e ferro. São utilizadas as flores secas ou frescas.

Possui atividade cicatrizante e antiinflamatório, sendo considerado um imunomodulador, em testes realizados *in vivo* e *in vitro*.

Atividade antianêmica discutível, com resultados contraditórios.

São utilizados como chá para lavagem vaginal (folhas secas); chá (uso interno) e tinturas.

3 METODOLOGIA

3.1 Amostragem

As plantas analisadas foram as comercializadas nas feiras e mercados de grande porte comercial das zonas Norte, Sul, Leste, Oeste, Centro-Oeste e Centro-Sul da cidade de Manaus, Amazonas-Brasil, citadas no quadro abaixo.

Área Geográfica	Mercados e Feiras Municipais
Zona Sul	Mercado Adolpho Lisboa
Zona Norte	Feira Cidade Nova I
Zona Centro-Oeste	Feira Alvorada II
Zona Oeste	Feira Compensa II (MODELO)
Zona Centro-Sul	Mercado Durval Porto
Zona Leste	Feira do Mutirão

Quadro 5 Feiras e mercados de grande porte comercial das Zonas: Sul, Norte, Leste, Oeste, Centro-oeste, Centro Sul da cidade de Manaus, Amazonas-Brasil, locais nos quais foram adquiridas as plantas medicinais para análise dos fungos micotoxigênicos.

3.1.1 Estruturas Vegetais

Para se determinar a ocorrência de fungos toxigênicos foram analisados os seguintes vegetais: mirantã, cidreira, sacaca, crajirú. Em cada estabelecimento comercial, na área geográfica selecionada foram adquiridas três amostras de cada tipo de planta. Essas três amostras vegetais foram homogeneizadas para obtenção de uma amostra composta.

VEGETAL	CLASSIFICAÇÃO	ESTRUTURA OU PRODUTO BENEFICIADO
MIRANTÃ	<i>Ptychopetalum olacoides</i> Benth	Raiz em Pó
CIDREIRA	<i>Lippia Alba</i> (Mill.) N. E. Brown	Casca e folhas
SACACA	<i>Croton cajucara</i> Benth	Folhas
CRAJIRÚ	<i>Arrabidaea chica</i> Verl.	Folhas

Quadro 6 Plantas medicinais adquiridas nas feiras e mercados de grande porte, nas zonas Norte, Sul, Leste, Oeste, Centro-Oeste e Centro-Sul, da cidade de Manaus, Amazonas-Brasil.

3.1.2 Processamento das amostras e isolamento dos fungos

De cada amostra composta, tanto de pó como das folhas após trituração, foi retirado 1,0 g para ser misturada com 49 mL de água destilada esterilizada adicionada polissorbato 80

0,5% (p/v) (diluição 10^{-1}). A partir da primeira diluição foram preparadas diluições seriadas decimais até 10^{-3} em água destilada esterilizada (FISCHER *et al.*, 1993). Da última diluição (10^{-3}) foi retirado 1 mL da suspensão para ser semeado na superfície de ágar Sabouraud adicionado de cloranfenicol (0,05 g/L) e Rosa Bengala 0,025% (p/v) (SANTOS *et al.*, 1998; MARTINS; MARTINS, 2001). O crescimento dos fungos foi acompanhado a cada 24 horas por cinco dias. O quantitativo de unidades formadoras de colônia (UFC) foi determinado por grama de amostra (planta medicinal).

3.1.3 Purificação das colônias isoladas

Após crescimento no meio de cultura usado para o isolamento primário, as colônias foram submetidas a purificação em meio de cultura seletivo, considerando-se as características macro e micromorfológica de cada taxon. Assim, fragmentos das colônias de *Aspergillus* spp. foram repicados, centralmente, na superfície de ágar Czapek (Cz), *Penicillium* spp. para ágar Czapek-extrato de levedura (CYA) e os demais para ágar Malte (MEA).

Os cultivos em placa de Petri, de 15x 100 mm foram incubados 25 °C por cinco dias. Tratando-se de colônias fúngicas associadas com bactérias, a separação do isolado fúngico foi realizada em ágar Sabouraud, o mesmo utilizado no isolamento primário (item 3.3.1) (RAPER; FENNELL, 1977; PITT, 1985; ROBERTS; KONEMAM, 1985; FISCHER; OHARA; SAITO, 1998).

3.1.4 Identificação dos fungos

3.1.4.1 Microcultivo dos fungos filamentosos

Para obtenção dos microcultivos, fragmentos de cada cultura pura de *Aspergillus* spp. e os da família Dematiaceae foram semeados na superfície de ágar Czapek (Cz), *Penicillium* spp. e *Eupenicillium* em ágar Czapek-extrato de levedura (CYA), *Trichoderma* e

Paecilomyces em ágar Malte. Após semeadura dos esporos, em polos opostos da placa de Petri, uma lamínula foi superposta sobre o inóculo. Os microcultivos foram incubados a 25 °C, por cinco dias.

3.1.4.2 Fixação e coloração da lâmina de microcultivo

Após o período de desenvolvimento característico das estruturas fúngicas, a lamínula e o fragmento do meio de cultura foram retirados sem danificar o cultivo obtido (item 3.1.5.1). Em seguida, as lamínulas foram submetidas a ação de um fixador (álcool 70%) e coradas com azul de lactofenol para observação sob microscópio óptico.

3.1.4.3 Obtenção de macrocolônia

Para obtenção de macrocolônias, um fragmento de cultura pura (item 3.1.4) foi inoculado no centro da superfície do meio de cultura seletivo, contido em placa de Petri. O cultivos foram mantidos a 25 °C, durante cinco dias.

3.1.4.4 Análise morfológica das colônias fúngicas

Após o período de crescimento, as culturas fúngicas obtidas no item 3.3.3.3 foram observadas para determinação das características macroscópicas, tais como, coloração e textura do micélio, diâmetro e topografia da colônia, para comparação com características das chaves de identificação.

Para o reconhecimento em nível de espécie foram utilizados os trabalhos de Rapper; Thom (1968), Rapper; Fennell (1977), Domsch *et al* (1980), Fischer; Ohana; Saito (1998), Pitt (1985)

3.2 Detecção de micotoxinas

3.2.1 Análise das micotoxinas em meio sólido (Técnica do *ágar plug*)

A análise para se detectar a síntese de micotoxinas por fungos filamentosos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* foi realizada pela técnica do *ágar plug*. Os fungos isolados foram mantidos em ágar malte inclinado e mantidos a 25 °C por sete dias. Para as análises de metabólitos secundários extracelulares, os fungos foram cultivados em ágar extrato de levedura sacarose (YES) contido em placa de Petri (15x 95 mm). Após 7 dias de crescimento a 25 °C foi observada a alteração da cor do reverso da colônia. Para confirmar a produção de aflatoxinas, mantendo-se a placa de Petri invertida, em cada cultivo, foi adicionado, lateralmente, 0,2 ml solução de amônio 25% (p/v). O resultado positivo foi observado pela intensificação da coloração rosa no reverso da colônia (SAITO; MACHITA, 1999).

3.2.2 Análise das micotoxinas pela técnica de Cromatografia de Camada Delgada (CCD)

Para a análise das micotoxinas pela técnica de CCD utilizou-se cromatoplaça de camada delgada em sílica gel sílica gel 60, com indicador de fluorescência F₂₅₄, suporte em alumínio com 0,2 mm de espessura medindo 5x10 cm, marca MERCK.

3.2.2.1 Preparação das placas cromatográficas

Em uma das extremidades das placas cromatográficas, traçou-se uma linha a 2 cm com lápis grafite, determinando-se o ponto de partida das substâncias (extratos e padrão). Na extremidade oposta ao ponto de partida das substâncias, marcou-se outra linha registrando-se o limite da corrida da fase móvel. As cromatoplaças foram tratadas com metanol P.A., em cuba cromatográfica, seguindo-se a evaporação do solvente à temperatura ambiente (25 °C). **AUTOR**

3.2.2.2 Aplicação do extrato bruto etanólico na placa de cromatografia

Para análise das micotoxinas, de cada colônia, foram retirados três fragmentos em forma de círculo (*plug*), com auxílio de um furador com diâmetro igual a 4 mm. Cada *plug* foi inoculado em 2 mL etanol e deixado durante 24 horas para extração das micotoxinas. Seguindo esse procedimento em cada cromatoplaça utilizada para análise foi aplicado 3 µL do padrão (griseofulvina dissolvida em clorofórmio/metanol, 2:1, p/v) e do extrato bruto etanólico, a uma distância de um centímetro entre cada amostra. Para visualização das micotoxinas, cada cromatoplaça foi eluída com tolueno-acetado de etila-ácido fórmico 90% (5:4:1; v/v/v) e, para manter a saturação no recipiente foi colocado papel de filtro Whatman nº 1 medindo 15x15 cm. Após a evaporação dos solventes a 25 °C, as placas foram examinadas com luz branca (normal) e luz ultravioleta 365 nm.

Os resultados foram expressos em valores de R_f e de acordo com a coloração dos compostos Razak *et al*(1999).

$$R_f = \frac{\text{Distância de migração da micotoxina (cm)}}{\text{Distância de migração da frente do solvente (cm)}}$$

3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística descritiva (frequência e média) utilizando-se o programa estatístico SAS versão 8.6 (SAS, 2001).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A avaliação da qualidade micológica das 24 amostras comerciais de sacaca, cidreira, crajirú e mirantã resultou no isolamento de 758×10^3 UFC/g de produto (Tabela 1). O desenvolvimento de fungos nas amostras vegetais revelou que, em média, o quantitativo de UFC/g de produto variou entre 1 a 346×10^3 .

De acordo com a tabela 1, as amostras de plantas medicinais adquiridas nas diferentes áreas geográficas da cidade de Manaus-Amazonas, apresentavam níveis diferenciados de esporos de fungos cuja porcentagem de colonização variou entre 0,13% a 45,65%. Dessas, as que apresentaram maior porcentagem de contaminação foram às oriundas da Zona Leste e Oeste, crajirú (45, 65%) e sacaca (13,2%), respectivamente (Tabela 1). Os níveis de contaminação dessa amostra de crajirú contra-indica o uso dessa amostra segundo as determinações legais (WHO 1992; BRASIL, Portaria SVS nº 123/94), e as recomendações disponíveis na literatura brasileira (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988; AMARAL *et al.*, 2001).

A contaminação de produtos de origem vegetal por fungos provavelmente esteja relacionada com as condições inadequadas de colheita, pós-colheita, armazenamento, expondo o material vegetal a calor, umidade, poeira e produtos de outra natureza que concorrem para a efetivação da colonização adicional do produto (BASTOS; RODRIGUES *et al.*, 2000; AMARAL *et al.*, 2001)

Amaral *et al.* (2001), cita que a contaminação de drogas vegetais por fungos pode levar a alteração e/ou destruição dos princípios ativos, ocasionando a perda da segurança e eficácia na utilização; além de representarem risco pela produção de substâncias tóxicas (micotoxinas), tornando-as, assim, impróprias para o consumo, independente do nível de contaminação.

Segundo Gomes *et al* (2004), embora exista um mercado mundial promissor para as plantas medicinais, há também carência de estudos que se reflete na freqüente falta de qualidade do produto oferecido, tornando-o menos competitivo comercialmente

Área da Coleta	Amostras (Planta Medicinal)	colônias/g produto		UFC/g produto
		n ^o	(%)	
Zona Norte	sacaca	15	1,98	15 x 10 ³
	crajirú	7	0,92	7 x 10 ³
	mirantã	1	0,13	1 x 10 ³
	cidreira	2	0,26	2 x 10 ³
Sub-total 1.....		25	3,30	25 x 10 ³
Zona Sul	sacaca	41	5,41	41 x 10 ³
	crajirú	60	7,91	60 x 10 ³
	mirantã	15	1,98	15 x 10 ³
	cidreira	36	4,75	36 x 10 ³
Sub-total 2.....		152	20,05	152 x 10 ³
Zona Oeste	sacaca	100	13,2	100 x 10 ³
	crajirú	5	0,66	5 x 10 ³
	mirantã	7	0,92	7 x 10 ³
	cidreira	9	1,19	9 x 10 ³
Sub-total 3.....		121	15,96	121 x 10 ³
Zona Leste	sacaca	19	2,51	19 x 10 ³
	crajirú	346	45,65	346 x 10 ³
	mirantã	24	3,17	24 x 10 ³
	cidreira	24	3,17	24 x 10 ³
Sub-total 4.....		413	54,50	413 x 10 ³
Zona centro- oeste	sacaca	13	1,71	13 x 10 ³
	crajirú	1	0,13	1 x 10 ³
	mirantã	1	0,13	1 x 10 ³
	cidreira	1	0,13	1 x 10 ³
Sub-total 5.....		16	2,10	16 x 10 ³
Zona Centro Sul	sacaca	28	3,69	28 x 10 ³
	crajirú	1	0,13	1 x 10 ³
	mirantã	1	0,13	1 x 10 ³
	cidreira	1	0,13	1 x 10 ³
Sub-total 6.....		31	4,09	31 x 10 ³
TOTAL		758	100,00	758 x 10 ³

Tabela 1 - Quantitativo de colônias, UFC e espécies de fungos isolados de amostras de plantas medicinais em ágar Sabouraud+cloranfenicol +Rosa de Bengala, adquiridas em feiras e mercados de grande porte, localizadas nas diferentes zonas da cidade de Manaus-AM-Brasil.

UFC = Unidade formadora de colônias.

Das 758 colônias de fungos filamentosos obtidas das plantas medicinais, 84 isolados estavam representados por deuteromycetes (98,8%) e Filo Ascomycota (1,2%). Segundo as citações de Guarro *et al* (1999), tornou-se dispensável conservar o termo deuteromycete, pelo

menos para os fins de identificação. Essa terminologia foi oficialmente mantida, mas sem o reconhecimento desses fungos particularizado em uma classe. O grupo deuteromycete representam a forma conidial dos Ascomycota e Basidiomycota, cujos corpos de frutificação raramente são formados na natureza ou ausente no ciclo vital.

Entre os deuteromycetes, nas plantas medicinais foi registrada a ocorrência de *Aspergillus* spp. (41,6%), *Penicillium* spp. (41,6%), *Paecilomyces* spp. (5,90%), *Cladosporium* spp. (4,8%), *Trichoderma* spp. (1,2%), *Eupenicillium javanicum* (1,2%) foi o único representante dos Ascomycota (Gráfico 1). Além desses, três foram classificados como Micelia sterilia (3,6%), definido por **Carlile; Watkinson** (1996), como fungos que não formam esporos, exceto clamidósporo. Resultados semelhantes foram obtidos por Bresler *et al*(1995); Abou-Arab *et al*(1999); Amaral *et al*(2001); Borges *et al*(2002); Braga *et al*(2002), ao analisarem diversas plantas medicinais.

As drogas medicinais, de modo geral, contêm microrganismo que são originários do próprio vegetal, no entanto essa microbiota pode ser alterada devido as práticas inadequadas realizadas durante os diferentes segmentos da cadeia produtiva (GOMES *et al.*, 2004).

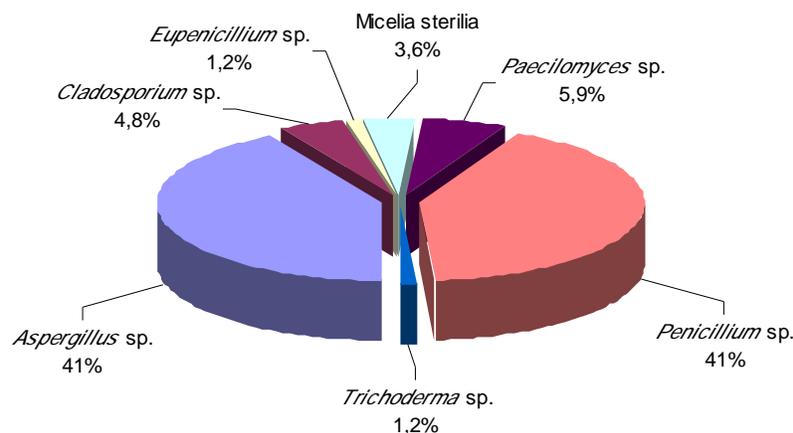


Gráfico 1 - Porcentagem de fungos filamentosos isolados de drogas medicinais (crajirú, mirantã, cidreira e sacaca), usadas na medicina popular, na cidade de Manaus-Amazonas, Brasil.

Os resultados relacionados no gráfico 2 estão evidenciando a diversidade de fungos filamentosos associados às plantas cajurú, mirantã, cidreira e sacaca. Nessas a frequência dos fungos foi diferenciada, observando-se a presença de três a cinco gêneros, por planta. Em sacaca foi registrada a maior diversidade de *Aspergillus* spp (20,24%), *Penicillium* spp (9,52%), *Cladosporium* spp (3,6%), *Trichoderma* spp (1,2%) e *Eupenicillium javanicum* (1,2%).

O gráfico 2 mostra também que nas amostras de cidreira (Cd) e do cajurú (cr) a diversidade de deuteromycetes foi semelhante, sendo os representantes, *Penicillium* (Cd;cr = 13,1%), *Aspergillus* (Cd = 5,9%; cr = 4,7%) e *Paecilomyces* (Cd = 2,4%; cr = 3,6%). Outro resultado observado foi a presença de *Penicillium* (5,9%), *Aspergillus* (10,7%), *Cladosporium* (1,2%) e Micelia sterilia (3,60%), no mirantã.

Entre os fungos identificados, *Penicillium melinii*, *P. raistrickii*, *P. roseopurpureum*, *P. simplicissimum* e *Eupenicillium javanicum* estão sendo uma nova citação, em plantas medicinais pois nos estudos já realizados, esses fungos predominam em outros substratos, a exemplo do solo, segundo as citações de Pitt (1985), Samson *et al*(2004) e Asan (2004) .

Com relação a diversidade de fungos em plantas medicinais, *Aspergillus* e *Penicillium* são os dominantes, independentemente da amostra e espécie vegetal (AZIZ *et al*,1998). Os produtos alimentícios contaminados por esses microrganismos, ao serem ingeridos, permitem que esses patógenos oportunistas ou respectivos extrólitos invadam os fluidos ou tecidos do hospedeiro causando doenças graves (BORGES *et al*, 2002).

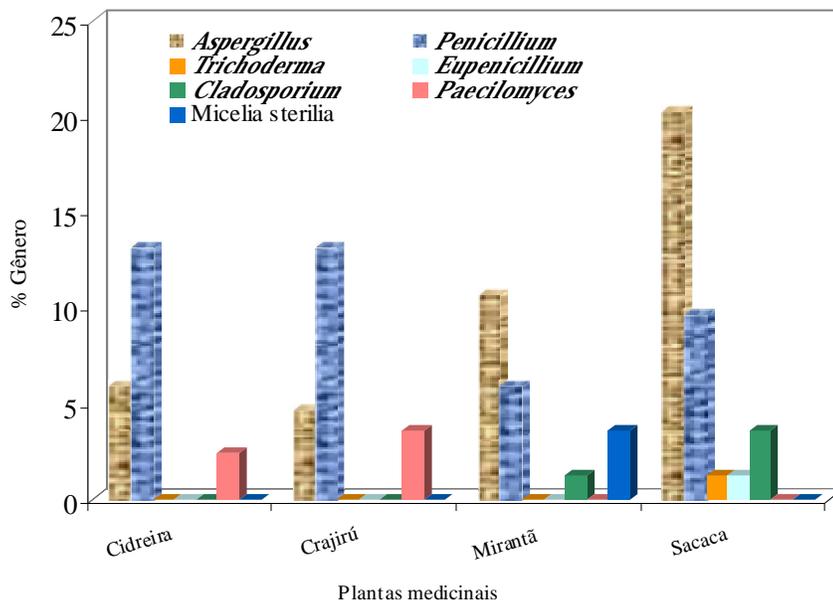


Gráfico 2 – Porcentagem de gêneros de fungos filamentosos associados às drogas medicinais (crajiurú, mirantã, cidreira e sacaca), usadas na medicina popular, na cidade de Manaus-Amazonas, Brasil.

Com relação as espécies identificadas, o Gráfico 3 evidencia que dos 84 isolados fúngicos obtidos de crajiurú, mirantã, cidreira e sacaca: 11 foram espécies de *Aspergillus* e 12 de *Penicillium*. Os cinco demais isolados, corresponderam a outras quatro espécies de deuteromycetes e Micelia sterilia. *Penicillium janthinellum* (14,3%) e *Aspergillus flavus* (10,7%) foram os contaminantes de maior frequência, destacando-se também a prevalência de *A. niger* (7,10%), *A. versicolor* (7,10%), *Penicillium simplicissimum* (7,10%). Esses dados estão em concordância com as publicações afins, as quais ressaltam a ocorrência de *A. flavus* como principal contaminante de amostras de plantas medicinais (BRESLER *et al.*, 1995; AZIZ, 1998; DORGE *et al.*, 2000; BASTOS, 2000; AMARAL *et al.*, 2001; CENTENO *et al.*, 2002; BORGES *et al.*, 2002; BRAGA *et al.*, 2002).

Das espécies fúngicas associadas às plantas medicinais, *Aspergillus flavus*, *A. niger* e *A. parasiticus* são as mais reportadas como agentes de infecções micóticas oportunistas. O desenvolvimento dessas infecções no hospedeiro depende da interação de três fatores: virulência do fungo, tipo, quantidade da exposição e o estado imunológico do paciente (PONTÓN *et al.*, 2000).

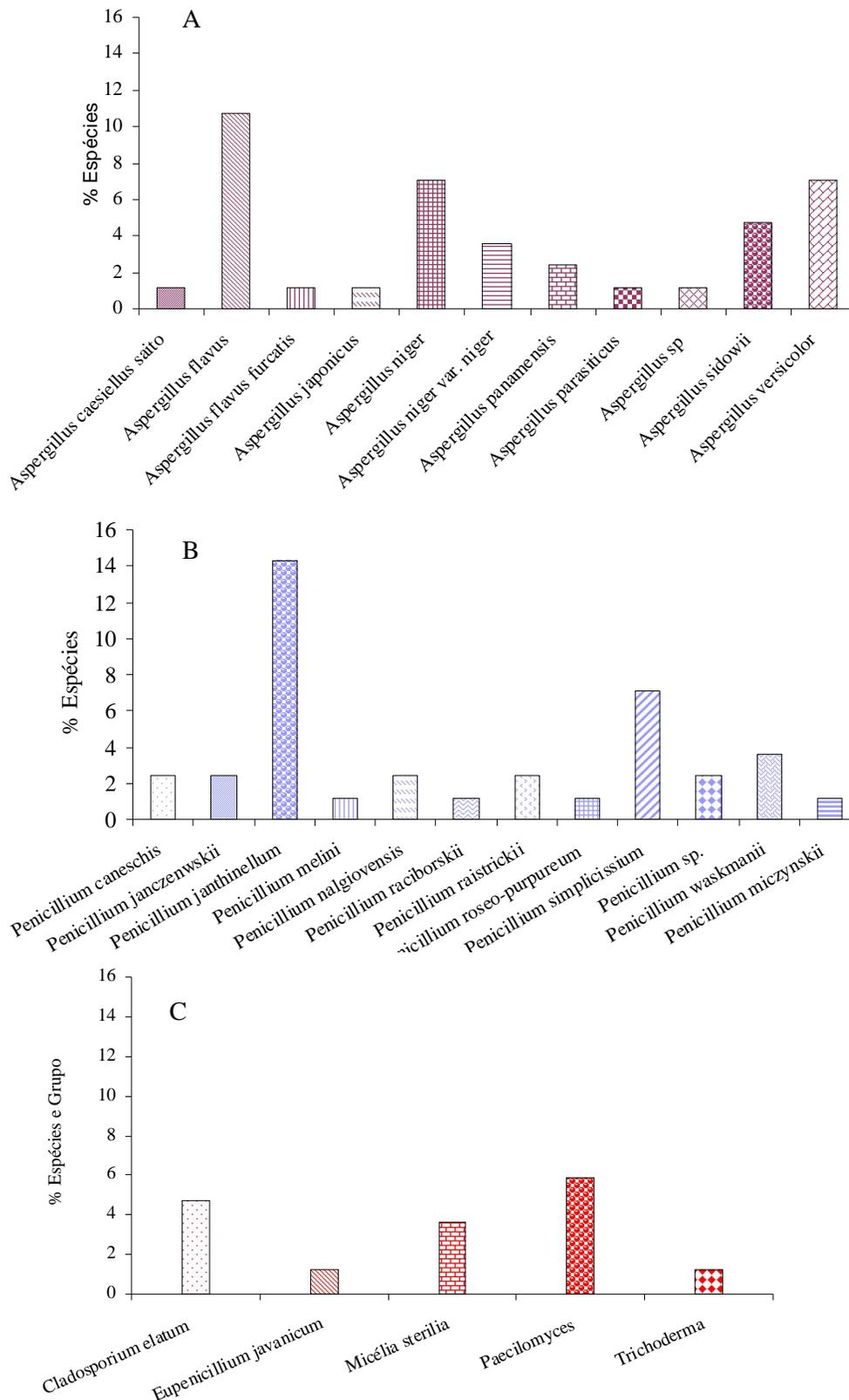


Gráfico 3 - Porcentagem de espécies de *Aspergillus*(A), *Penicillium*(B) e outros fungos (C) isolados de cidreira, cajarú, mirantã e sacaca, adquiridas nas feiras e mercados de grande porte na cidade de Manaus-Amazonas-Brasil.

Considerando a ocorrência e a relevância de *Aspergillus* e *Penicillium*, o gráfico 4 está demonstrando a frequência das espécies desses fungos nas amostras de cidreira, cajuí, mirantã e sacaca. Dessas plantas, as mais contaminadas foram cidreira, colonizada por 13 espécies (*Aspergillus flavus*, *A. niger*, *A. sydowii* e *A. versicolor*) e (*Penicillium canescens*, *P. janthinellum*, *P. melinii*, *P. nalgovensis*, *P. raciborskii*, *P. raistrickii*, *P. simplicissimum*, *Penicillium sp.*, *P. miczwyskii*). A sacaca, cuja contaminação correspondeu a 11 espécies (*Aspergillus caesiellus*, *A. flavus*, *A. flavus furcatis*, *A. japonicus*, *A. niger*, *A. parasiticus*, *Aspergillus sp.*, *A. versicolor*) e (*Penicillium janthinellum*, *P. simplicissimum* e *P. waksmanii*). Em cajuí e mirantã, a frequência de espécies foi similar (oito espécies/planta).

Com relação a colonização das espécies por planta, *A. niger* e *P. janthinellum* foram isolados da totalidade de plantas analisadas (cidreira, cajuí, mirantã e sacaca), gráfico 4.

Diversas das espécies de *Aspergillus* (*A. flavus*, *A. niger*, *A. parasiticus* e *A. versicolor*) isoladas de cidreira, cajuí, mirantã e sacaca são descritas como os micotoxigênicos predominantes em plantas medicinais (GRÁFICO 4). (BRESLER *et al.*, 1995; BRAGA *et al.*, 2002; BENÍTEZ, 2003).

Os dados obtidos nesta pesquisa indicam perigos potenciais devido a presença desses fungos filamentosos nas plantas medicinais analisadas, considerando que o efeito predominante das micotoxinas, além das micotoxicoses, são hepatotóxicos e carcinogênicos etc (BASTOS *et al.*, 2000; BRAGA *et al.*, 2002; RUNDBERGET *et al.*, 2004).

Micotoxinas classificadas como aflatoxinas (B1, B2 G1 e G2) são produzidas na natureza por *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus*. A designação “B” e “G” refere à fluorescência azul e verde desses extrólitos sob luz ultravioleta e o número 1 e 2 indica o tamanho da molécula (1 = maior; 2 = menor). Quando as aflatoxinas B1 e B2 são ingeridas por vacas lactantes ocorre hidroxilação e são excretadas no leite na forma de aflatoxinas M1 e

M2. Estas aflatoxinas são compostos de baixa toxicidade, mas de grande significância porque o leite bovino é um alimento humano de consumo mundial (PITT, 2002).

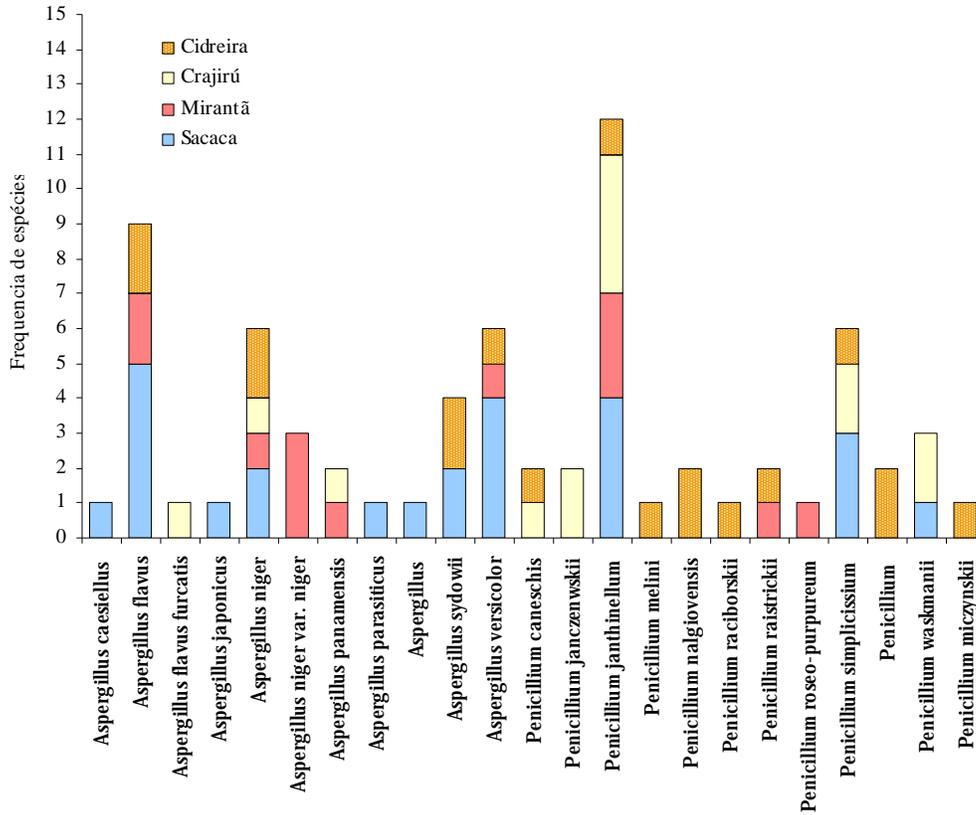


Gráfico 4 – Frequência de espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* contaminantes de cidreira, cajurú, mirantã e sacaca adquiridas nas feiras e mercados de grande porte na cidade de Manaus-Amazonas-Brasil.

Aspergillus flavus e *A. parasiticus* são as espécies mais perigosas à saúde humana devido a toxicidade de muitas linhagens. Neste estudo registrou-se, em média, elevada número de UFC de *Aspergillus flavus* em sacaca (38×10^3 UFC/g produto), mirantã (13×10^3 UFC/g produto) e cidreira (22×10^3 UFC/g produto). *A. parasiticus* foi detectado somente em sacaca (3×10^3 UFC/g de produto).

Segundo a Resolução- RDC 12, de 2 de janeiro de 2001 ANVISA, há exigência apenas para pesquisa de bactérias, não inclui o controle de fungos e micotoxinas em plantas medicinais. Contudo, essa legislação da ANVISA dispõe que, um produto torna-se impróprio para o consumo humano quando estiver contaminado com microrganismo patogênico ou toxina que representa perigo severo a saúde do consumidor.

De acordo com os resultados que constam na tabela 2, as plantas medicinais analisadas apresentaram qualidade higiênica inadequada para consumo humano devido a presença de *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus*. Os resultados indicam a necessidade da efetivação de inspeção e controle dos níveis de contaminação por fungos patógenos oportunistas e micotoxigênicos assim como do quantitativo de micotoxinas nas drogas medicinais comercializadas nas diversas feiras e mercados de grande porte da cidade de Manaus- Amazonas.

Planta	<i>A. flavus</i>	UFC/g produto	<i>A. parasiticus</i>	UFC
sacaca	5	38x10 ³	1	3x10 ³
mirantã	2	13x10 ³	0	0
cidreira	2	22x10 ³	0	0
crajiurú	0	0	0	0

Tabela 2 Frequência e média de UFC/g amostra de planta medicinal de *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus* isolados de cidreira, crajiurú, mirantã e sacaca.

Os resultados relacionados a produção de aflatoxinas obtidos pela técnica do *ágar plug* estão constando na gráfico 5. Dos 70 isolados, os *Aspergillus flavus* (12,87%), obtidos de mirantã, sacaca, cidreira e *A. parasiticus* (1,43%) de sacaca revelaram mudança de coloração do meio de cultura (YES) para cor-de-rosa, após pulverização com solução de amônio. Essa alteração da cor observada no reverso da colônia dessas espécies indica a produção de aflatoxinas.

Verificou que os dados obtidos pela técnica do *ágar plug*, citados no gráfico 5, estão em concordância com os obtidos por Saito; Mashida (1999), ao analisarem 55 linhagens

aflatoxigênicas de *Aspergillus flavus* e 13 de *A. parasiticus* entre as quais, 66 dessas linhagens, após o contato com o vapor de amônio expressaram a produção de aflatoxinas devido a alteração da cor do meio sintético.

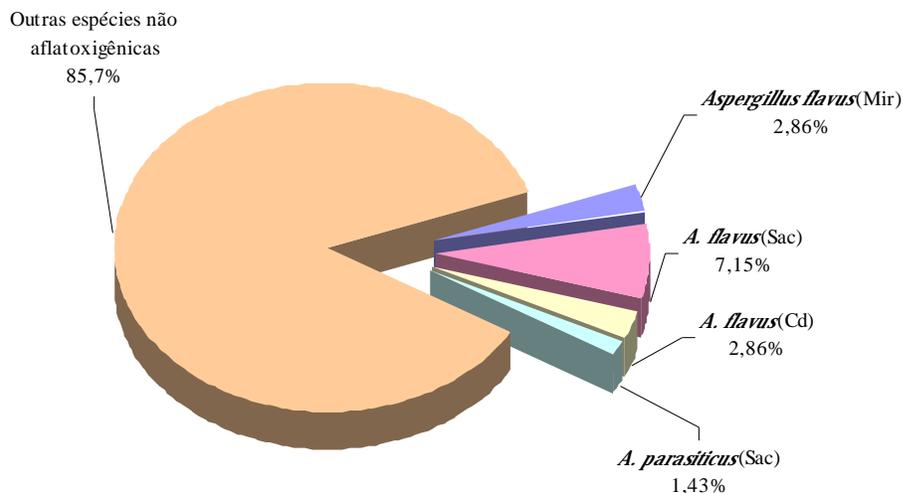


Gráfico 5 Distribuição da produção de aflatoxina por espécies de *Aspergillus flavus* em meio de cultura sólido (YES), isolados de mirantã (Mir), sacaca (Sac) e cidreira (Cd).

A tabela 3 está demonstrando 70 isolados referente a espécies do gênero *Aspergillus* e *Penicillium* analisadas quanto a detecção de micotoxinas por cromatografia de camada delgada (CCD). Os resultados da análise qualitativa dos compostos extracelulares em CCD mostraram que as 23 espécies apresentaram comportamentos diferentes quanto a produção de metabólitos secundários (Tabela 3). Do total de isolados, 21 (30%) produziram uma ou duas micotoxinas diferentes.

Quando as micotoxinas citadas na tabela 3 que foram reveladas pela UV (365nm) e a coloração comparada as tabelas de cores de Scott *et al*(1970) e Razak *et al*(1999), os dados

demonstraram a presença das seguintes micotoxinas: aflatoxina B1 e aflatoxina G2 produzidas pelos isolados de *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus*.

A tabela 3 revela que ainda que, além dessas, citrinina foi detectada em *A. versicolor*, *A. niger* e *P. janthinellum*. Enquanto, ocratoxina em *A. niger*, *A. niger* var. *niger*, *P. miczynskii*, *P. canescens* e *P. melinii*

Outras micotoxinas extracelulares também produzidas pelos isolados recuperados das plantas medicinais foram zearalenona e ácido penicílico produzidas por *A. versicolor* e *P. simplicissimum*, respectivamente (Tabela 3).

Os dados obtidos pela técnica de CCD descritos na tabela 3 expressam similaridades com as pesquisas feitas por Aziz *et al*(1998), Abou-Arab (1999), Bastos *et al*(2000), Braga *et al* (2002). Nos estudos realizados por Marinho et al (2005) está confirmada a produção de citrina por *Penicillium janthinellum* resultado semelhante foi obtido neste estudo.

Abarca et al (2000), afirma que apesar da pouca estabilidade observada na produção de uma micotoxina por uma espécie em condições *in vitro*, não se pode descartar a possibilidade dela ser micotoxigências no habitat natural.

O controle dos níveis de fungos em plantas medicinais torna-se necessário não somente pelos prejuízos financeiros e deterioração desse produto, mas principalmente pela produção de micotoxinas que são extrólitos nocivos à saúde do homem.

Espécie	Nº de isolados	Isolados produtores de micotoxinas %	Rf	Micotoxinas	Cor (λ = 365 nm)
			TEF		
<i>Aspergillus caesiellus</i>	1	0,0	ND	ND	ND
<i>A. flavus</i>	7	1 (1,43)	0,31	Aflatoxina B1	Azul
<i>A. flavus</i>	2	2 (2,86)	0,17	Aflatoxina G2	Verde
<i>A. flavus furcatis</i>	1	0,0	ND	ND	ND
<i>A. japonicus</i>	1	0,0	ND	ND	ND
<i>A. niger</i>	3	1 (1,43)	0,55	Ocratoxina A	Verde
<i>A. niger</i>	3	2 (2,86)	0,16-0,48	Citrinina	Amarela
<i>A. niger var niger</i>	3	1(1,43)	0,55	Ocratoxina A	Verde
<i>A. panamensis</i>	2	0,0	ND	ND	ND
<i>A. parasiticus</i>	1	1 (1,43)	0,17	Aflatoxina G2	Verde
<i>A. sydowii</i>	4	0,0	ND	ND	ND
<i>Aspergillus</i> sp ¹	1	0,0	ND	ND	ND
<i>A. versicolor</i>	5	1 (1,43)	0,16-0,48	Citrinina	Amarela
<i>A. versicolor</i>	1	1 (1,43)	0,78	Zearalenona	Azul
<i>Penicillium canescens</i>	2	1 (1,43)	0,55	Ocratoxina A	Verde
<i>P. janczewskii</i>	2	0,0	ND	ND	ND
<i>P. janthinellum</i>	12	7 (10)	0,16-0,48	Citrinina	Amarela
<i>P. melinii</i>	1	1 (1,43)	0,55	Ocratoxina A	Verde
<i>P. miczynskii</i>	1	1 (1,43)	0,55	Ocratoxina A	Verde
<i>P. nalgeovenssis</i>	2	0,0	ND	ND	ND
<i>P. rachorskii</i>	1	0,0	ND	ND	ND
<i>P. raistrickii</i>	2	0,0	ND	ND	ND
<i>P. roseopurpureum</i>	1	0,0	ND	ND	ND
<i>P. simplicissimum</i>	6	1(1,43)	0,47	Ácido penicílico	Verde
<i>P. walkmanii</i>	3	0,0	ND	ND	ND
<i>Penicillium</i> sp ¹	2	0,0	ND	ND	ND

Tabela 3 Detecção de micotoxinas produzidas em YES a 25 °C por 70 isolados de *Aspergillus* e *Penicillium* obtidos de cidreira, cajuiri, mirantã e sacaca adquiridas nas feiras e mercados de grande porte na cidade de Manaus-Amazonas-Brasil. TEF = Tolueno/acetato de etila /ácido Fórmico; UV= Ultra Violeta; ND= Não Detectado.

CONCLUSÕES

Com os resultados demonstrados pode-se concluir que:

1 – Todas as amostras de cidreira, crajirú, mirantã e sacaca apresentaram esporos de fungos, das quais crajirú e sacaca adquiridas, respectivamente, na Zona Leste e Oeste são contra-indicadas para o uso como droga medicinal devido a elevada contaminação;

2 - Os fungos isolados das plantas medicinais são deuteromycetes e do Filo Ascomycota, representados por *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Paecilomyces* sp., *Cladosporium* sp., *Trichoderma* sp. e *Eupenicillium* sp., respectivamente;

3. Entre a diversidade de espécies, predominam *Penicillium janthinellum* e *Aspergillus flavus* e são citações novas em plantas medicinais, *Penicillium melinii*, *P. raistrickii*, *P. roseopurpureum*, *P. simplicissimum* e *Eupenicillium*,

4 - Todos os *Aspergillus flavus*, contaminante de mirantã, sacaca e cidreira, assim como *A. parasiticus* são espécies aflatoxigênicas, em condições *in vitro*,

5 - Outras espécies micotoxigênicas e as respectivas micotoxinas foram:

- *A niger* var. *niger* (ocratoxina A)
- *A. niger* (ocratoxina A e citrinina)
- *A. versicolor* (citrina e zearalenona)
- *P. canescens* (ocratoxina A)
- *P. janthinellum* (citrinina)
- *P. melinii* (ocratoxina A)
- *P. miczynskii* (ocratoxina A)
- *P. simplicissimum* (ácido penicílico)

5 REFERÊNCIAS

ABARCA, M. L.; BRAGULAT, M. R; CASTELLÁ, G. **Hongos produtores de micotoxinas emergentes**. Ver. Iberoam Micol, Espana, n.17, p. S63-S68, 2000.

ABOU-ARAB, A. A. K.; KAWTHER, M. S.; TANTAWY, BADEAA, R. I.; KHAYRIA, N. **Quatity estimation of some contaminants in commonly used medicinal plants in the gyptian market**. Food Chemistry, Egypt, v.67, p.357-363, feb. 1999.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA-ANVISA. Institui e normatiza o registro de produtos fitoterápicos junto ao Sistema de Vigilância Sanitária . Resolução RDC nº 17, de 24 de fevereiro de 2000

AMARAL, F. M. M. do; ROSA, L. M. V.; COUTINHO, D. F.; GONÇALVES, L. H.; RIBEIRO, M. N. Qualidade microbiológica das cascas de *Tabebuia avellanedae* Lor. Ex Griseb. comercializadas em São Luís – Maranhão. **Revista Visão Acadêmica, Curitiba, v.2, n.2, p.65-70, jul-Dez/2001.**

ARAÚJO, J.M.A. Química de Alimentos: Teoria e Prática. Imprensa Universitária UFV –MG. Brasil. **1995. 335 p.**

ASAN, A. *Aspergillus, Penicillium* and related species reported from Turkey. **Mycotaxon Journal, Turkey, v.89, n.1, p.155-7, 2004.**

AZIZ, N. H.; YOUSSEF, Y. A.; EL-FOULY, M. Z.; MOUSSA, L. A. Contamination of some common medical plant samples and spices by fungi and their mycotoxins. **Bot. Bull. Acad. Sin. n.39 p.279-285, 1998.**

BASTOS, D. H. M.; RODRIGUES, R. F. de O. Incidência de micotoxinas em fitoterápicos: revisão. **LECTA, Bragança Paulista, v.18, n.2, p.107-114, jul/dez. 2000.**

BENÍTEZ, E. M. Estúdio de espécies micotoxígenas del gênero *Penicillium verrucosum* Dierckx. **2003, 350folhas. Doutorado. Facultat de Veterinària. Universitat Autònoma de Barcelona, Espanha.**

BORGES, L. R.; PIMENTEL, I. C. Contagem de fungos no controle de qualidade da erva-mate e isolamento de gêneros potencialmente micotoxigênicos. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos, Curitiba, v.20, n.1, p.103-110, jan/jun. 2002.**

BORRÁS, M. R. L. Plantas da amazônia: medicinais ou mágicas? **Manaus: Valer Editora, 2003. 321p.**

BRAGA, S. M. L. F. M; CARDOSO, M. A. A.; MACEDO, R. O. **Micotoxinas em produtos naturais: alguns aspectos e perspectivas.** Brasileira de Toxicologia. Paraíba, v.15, n.1, p.53-68, 2002.

BRAGA, S. M. L.; CARDOSO, M. A. A.; MACEDO, R. O. Micotoxinas em produtos naturais: alguns aspectos e perspectivas. **Revista Brasileira de Toxicologia, Paraíba, v.15, n.1, p. 53-68, out. 2002.**

BRESLER, G., BRIZZIO, S. B.; VAAMONDE, G. Mycotoxin-producing potencial of fungi isolated from amaranth seeds in Argentina. **International Journal of Food Microbiology, Argentina, v.25, p. 101-08, 1995.**

CARRILLO, L. Micotoxinas. **Rev. Microbiologia Agrícola. Cap. 6, 2003**

CARVALHO, J.C.T.; SARTI, S.J. Produção de extratos vegetais para uso terapêutico e cosméticos. **Faculdade de Ciências e Ribeirão Preto – USP, 1995, 215p.**

COSTA, P. R. C. da, et al. Plantas medicinais nativas e aclimatizadas da região amazônica. **Manaus: Imprensa Oficial, 1990. p.65; p.105.**

DOMSCH, K. H.; GAMS, W.; ANDERSON, T. H. Compendium of soil fungi. **London: Academic Press, v.2, 1980, 859p.**

DÖRGE, T.; CARSTENSEN, J. M.; FRISVAD, J. C. Direct identification of pure *Penicillium* species using image analysis. **Journal of microbiological Methods, Denmark, v.41, p.122-33, 2000.**

EFUNTOYE, M. O. Fungi associated with herbal drug plants during storage. **Letters, Mycopathologia, 1996. p.115-8.**

FARIAS, A. X.; ROBBES, C. F.; BITTENCOURT, A. M.; ANDERSEN, P. M., CORRÊA, T. B. S. Contaminação endógena por *Aspergillus* spp. Em milho pós-colheita no estado do Paraná. **Revista de Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v.35, n.3, p. 617-621, mar. 2000.**

FARMACOPEIA BRASILEIRA. 4 ed. São Paulo. Atheneu, 1988. parte I.

FISCHER, D. C. H.; OHARA, M.T.; SAITO, T. **Contaminação microbiana em medicamentos fitoterápicos sob a forma sólida.** Farmácia Bioquímica Universidade São Paulo. São Paulo, v.29, n.2, p.81-88, jul-dez. 1993.

FRANCO, B.D; LANDGRAF, M. Microbiologia de Alimentos. **Reimpressão da 1ª. ed.**

São Paulo: Atheneu, 1996. 182 p.

GOMES, E. C.; RÜCKER, N. G. A.; NEGRELLE, R. R. B. Estudo prospectivo da cadeia produtiva do capi-limao-estado do Paraná. **Revista de Economia e Sociologia Rural, Brasília, v.42, n.4, p.1-15, out-dez/2004.**

GOMPERTZ, O; PINTO, M. M; FELICIO, J.D. Análise de Micotoxinas no instituto biológico de 1989 a 1999. **Divulgação Técnica: Biológico, São Paulo, v.63, n. 1-2, p.15-19. Dez. 2001.**

GONÇALEZ, E.; PINTO, M.M.; FELÍCIO, J. D. **Análise de Micotoxinas no Instituto Biológico de 1989 a 1999.** Biológico. São Paulo, v., n.1-2, p.15-19, jan-dez. 2001.

GUARRO, JOSEP; GENÉ, JOSEPA; STCHIGEL, A. Developments in fungal taxonomy. **Clinical Microbiology Reviews, Spain, v.12, n.3, p.454-500, july. 1999.**

LACAZ, C. S; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C. **Micologia Médica: fungos, actinomicetos e algas de interesse médico.** São Paulo: SARVIER, 2001.

MARINHO, A. M. R.; RODRIGUES-FILHO, E.; MOITINHO, M. da L.; SANTOS, L. S. Biologically active polyketides produced by *Penicillium janthinellum* Isolated as na endophytic fungus from fruits of *Melia azedarach*. **Paraná, v.16, n.2, p.280-283, 2005.**

MARTINS, H. M.; MARTINS, M. L. Qualidade micológica de rações para bovinos (Portugal: 1996-199). **Portuguesa de ciências Veterinárias. Lisboa. v.96, n.538, p.85-88, 2001**

MARTINS, J. E. C. Plantas Medicinais de uso na amazônia . **Pará: CEJUP Editora, 1993. 120p.**

OGA, S. Fundamentos de Toxicologia. **São Paulo: Atheneu, 1996. 515 p.**

PITT, J. I. A laboratory guide to Common *Penicillium* species, **Austria: CSIRO, 1985.182 p.**

PITT, J. I. Toxigenic *Aspergillus* and *Penicillium* species. **Disponível em:**
<http://www.fao.org/docrep/x0036e/X0036E08.HTM>, **acesso em 14.05.2005.**

PITT, J. I. **Toxigenic fungi: which are import?** Medical Mycology. Austrália, v.38, n.1, p.41-46, 2000.

PITT, J. I.; BASILICO, J. C. **Mycotoxins and toxigenic fungi.** Medical Mycology. Austrália, v.38, n.1, p.17-22, 2000.

PONTÓN, J.; CABAÑES, F. J. **Aspergillus y aspergilosis nosocomial.** Spain, n.17, p.S77-S78, 2000.

RAPPER, B.K.S.; THOM, C.A. 1968. Manual of the *Penicillium*. **Baltimore, Williams and Wilkins, 1968. 875 p.**

RAPPER, K.B.; FENNEL, D.I. 1977. The genes *Aspergillus*. **New York: Robert E. Krieger Co., 1977. p.334.**

RAZAK, A. A.; BACHMANN, G.; ALI, Th. M.; FARRAG, R. **Activities of microflora in soils of upper and lower egypt. The African Journal Mycology and Biotechnology.** Australia, v.7, n.1, p.1-19. 1999.

ROBERTS, G. D.; RONEMAN, E. W. Micologia practica de laboratório. **3 ed. Buenos Aires: Medica Panamericana, 1985. 221p.**

RUNDBERGET, T.; FLÅØYEN, A. The presence of *Penicillium* and *Penicillium* mycotoxins in food wastes. **International Journal of Food Microbiology, Norway, v.90, p.181-8, 2004.**

SABINO, M. Micotoxinas em alimentos. In: OGA, S. Fundamentos de Toxicologia. São Paulo:Atheneu, **1996. p. 463-471**

SAITO, M., MACHIDA, S. 1999. A rapid identification method for aflatoxin-producing strains of *Aspergillus flavus* and a parasiticus by ammonia vapor. **Mycoscience .n.40, p.205-208, 1999.**

SAMSON, R. A.; FRISVAD, J. C. *Penicillium* subgenus *Penicillium*. new taxonomic schemes and mycotoxins and other estrolites. **Studies Mycology, n.49, p.1-173, 2004.**

SAMSON, R. A.; FRISVAD, J. C.; FILTENBORG, O. Introduction to food-borne fungi. 4 ed. Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelcultures, **1995. 270-74p.**

SANTOS, I. M.; VENÂNCIO, A.; LIMA, N. Fungos Contaminantes na Indústria Alimentar. Ed. **Micoteca da Universidade do Minho. Centro de Engenharia Biológica. Edit. Sociedade Gráfica, S.A. Braga. 1998. 130 p.**

SCOTT, P.M.; LAWRENCE, J. W.; WALBEEK, W. V. Detection of Mycotoxins by Thin-Layer Chromatography: Application to Screening of Fungal Extracts. **Applied Microbiology, Canada, v.20, n.5, p.839-42, 1970.**

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEMS-SAS. Version 8.6 SAS Institute Inc. **2001. Cary, NC.**

SWITZERLAND. WORLD HEALTH ORGANIZACION - **WHO/PHARM/92.559/rev. 1, 1992. Quality control methods for medicinal plant materials.** Geneva, 1992

TEIXEIRA, M. F. S; MATSSURA, A. B. J.; SOARES, C. S. S. S. Micologia médica: manual de laboratório. **Manaus: Imprensa Universitária, 1999. 111p.**

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)