

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA
Curso de Especialização em Microbiologia

PRESENÇA DE FUNGOS TOXIGÊNICOS E MICOTOXINAS EM PLANTAS
MEDICINAIS E CHÁS DE ERVAS CONSUMIDOS PELA SOCIEDADE
BRASILEIRA

WELLINGTON RODRIGUES DE LIMA

BELO HORIZONTE
2010

WELLINGTON RODRIGUES DE LIMA

PRESENÇA DE FUNGOS TOXIGÊNICOS E MICOTOXINAS EM PLANTAS
MEDICINAIS E CHÁS DE ERVAS CONSUMIDOS PELA SOCIEDADE
BRASILEIRA

Monografia apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Minas Gerais, como pré-requisito
para a obtenção do Grau de Especialista em Microbiologia
Ambiental e Industrial.

Orientador: Luiz Henrique Rosa
Laboratório de Ecologia e Biotecnologia de
Leveduras – ICB/UFMG

Co-orientadora: Rachel Bâsques Calligiorne
Laboratório de Micologia da Santa Casa de Belo
Horizonte

BELO HORIZONTE

2010

Aos meu pai, mãe e irmão,
pelo amor e por estarem presentes em minha vida sempre
acreditando em meu potencial.

A Agna,
pessoa admirável em essência, que colaborou com muito
carinho e apoio.

“As pessoas que vencem neste mundo são as que procuram as circunstâncias de que precisam e, quando não as encontram, as criam”.

(Bernard Shaw)

AGRADECIMENTOS

A Deus, o que seria de mim sem a fé que tenho nele.

À coordenação e a toda equipe do curso de Especialização em Microbiologia do Departamento de Microbiologia do ICB/UFMG - instituição que possibilitou a realização deste trabalho.

Ao orientador Prof. Luiz Henrique Rosa, pelo incentivo, simpatia e presteza que tornaram possível a conclusão desta monografia.

À co-orientadora Prof. Rachel Bâsques Calligiorne, por ter abraçado os meus ideais e contribuído para a minha formação acadêmica e profissional.

Aos amigos e colegas do curso de Especialização em Microbiologia, pela convivência e pelo carinho ao longo desta caminhada, pelos momentos de diversão e alegria.

À amiga Patrícia Sanches Carneiro, pelo incentivo e apoio.

E a todos os demais que colaboraram direta ou indiretamente para conclusão desta jornada.

Muito obrigado!

RESUMO

Micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por diferentes espécies de fungos e que apresentam, elevada toxicidade contra microrganismos, plantas e animais. As micotoxinas auxiliam os fungos na competição dentro de seu nicho ecológico, as quais aparentemente não são necessárias para o crescimento e desenvolvimento de todas as espécies. Os principais gêneros de fungos produtores de micotoxinas encontrados no Brasil são: *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium* e *Rhizopus*. Os efeitos toxilógicos da ingestão das micotoxinas podem ser agudamente tóxicos, carcinogênicos, mutagênicos, teratogênicos e/ou imunossupressores. Distintos segmentos da sociedade consomem plantas medicinais ou chá de ervas diariamente por diversos motivos, dentre eles para prevenir ou curar doenças. A identificação de fungos e seus metabólitos tóxicos representa um procedimento necessário para a segurança alimentar dos consumidores de plantas medicinais e chás de ervas. A presença de fungos micotoxigênicos pode resultar em efeitos prejudiciais à saúde da população. Sendo assim, o presente estudo objetivou-se apresentar dados relativos à presença de fungos e suas micotoxinas em plantas medicinais e chás de ervas consumidos pela sociedade. O presente estudo realizou um levantamento bibliográfico de trabalhos científicos publicados por pesquisadores brasileiros em revistas nacionais e internacionais entre os anos de 2001 e 2010. De acordo com os gêneros fúngicos detectados, *Aspergillus* foi encontrado em todas as análises, seguido por *Penicillium*, *Cladosporium*, *Rhizopus* e *Fusarium*. Quanto aos parâmetros identificação das espécies fúngicas é possível observar a predominância das espécies de *Aspergillus niger* e *A. flavus* em plantas medicinais e chás de ervas. Condições inadequadas da qualidade da matéria prima, processamento, distribuição, armazenamento e comercialização dos chás contribuem para a contaminação e aumento da micobiota produtora de micotoxinas, sendo necessário impor medidas apropriadas de controle higiênico-sanitário garantindo a qualidade e segurança deste tipo de produto.

Palavras-chaves: Micotoxinas, chás de ervas, Fungos, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium* e *Rhizopus*.

ABSTRACT

Mycotoxins are secondary metabolites produced by different species of fungi and

present, high toxicity against microorganisms, plants and animals. Mycotoxins aid the fungi on the competition within its ecological niche, which apparently are not necessary for growth and development of all species. The main genera of fungi that produce mycotoxins found in Brazil are: *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium* and *Rhizopus*. The toxicological effects of ingestion of mycotoxins can be acutely toxic, carcinogenic, mutagenic, teratogenic and/or immunosuppressants. Different segments of society consume medicinal herbs or herbal tea daily for various reasons, including to prevent or cure disease. The identification of fungi and their toxic metabolites is a necessary procedure for food safety for consumers of medicinal plants and herbal teas. The presence of fungi mycotoxigenic may result in adverse effects on health. Thus, this study aimed to provide data on the presence of fungi and their mycotoxins in medicinal plants and herbal teas consumed by society. This study performed a literature review of scientific papers published by Brazilian researchers in national and international journals between the years 2001 and 2010. According to the detected fungal genera, *Aspergillus* has been found in all analysis, followed by *Penicillium*, *Cladosporium*, *Rhizopus* and *Fusarium*. Regarding the parameters identification of fungal species can observe the predominance of species of *Aspergillus niger* and *A. flavus* in medicinal plants and herbal teas. Inadequate quality of raw material, processing, distribution, storage and marketing of teas contribute to contamination and increased mycotoxin-producing fungal species, being necessary to impose appropriate measures to control the sanitary-hygiene guaranteed quality and safety of this product.

Keywords: Mycotoxins, herbal teas, Fungi, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium* and *Rhizopus*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura química das principais aflatoxinas.....	22
Figura 2: Estrutura química da fumonisina B1.....	23
Figura 3: Estrutura química da ocratoxina A.....	24
Figura 4: Estrutura química da patulina.....	25
Figura 5: Estrutura química da citrinina.....	26
Figura 6: Estrutura química da zearalenona.....	27
Figura 7: Reação da aflatoxina B1 catalisada pela enzima mono-oxigenase do complexo citocromo P450 na formação do aduto de DNA.....	28
FIGURA 8 – Aspecto macroscópico de uma macrocolônia.....	29
FIGURA 9 – Aspectos das colônias fúngicas quanto à textura.....	30
FIGURA 10 – Características dos fungos quanto à pigmentação.....	30
FIGURA 11 – Características dos fungos quanto à pigmentação.....	31
FIGURA 12 – Etapas do microcultivo para identificação dos fungos.....	32
FIGURA 13 – ELISA competitivo direto.....	34
FIGURA 14 – ELISA competitivo indireto.....	35
FIGURA 15 – ELISA sanduíche.....	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Ocorrência de micotoxinas em plantas medicinais e chás de ervas em algumas cidades do Brasil.....	43
--	----

LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

ADAC	Association of Official Analytical Chemists
AF	Aflatoxina
AFB ₁	Aflatoxina B ₁
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATP	Adenosina trifosfato
BPFC	Boas Práticas de Fabricação e Controle
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CG-IV	Cromatografia Gasosa espectrometria Infravermelho
CL-EM	Cromatografia Líquida espectrometria de Massas
cm	Centímetro
cm ²	Centímetro ao quadrado
DLP	Dentro do limite permitido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
ELISA	Ensaio Imunoabsorvente Ligado a Enzima
FIG	Figura
FDA	Food and Drug Administration
g	Gramma
GC-MS	Cromatografia Gasosa espectrometria de Massas
mg/Kg	Miligrama por quilo grama
mL	Mililitro
mm	Milímetro
Nº	Número
ND	Não detectado

ng	Nanograma
OMS	Organização Mundial da Saúde
OTA	Ocratoxina A
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pg	Picograma
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RNA	Ácido ribonucléico
TAB	Tabela
UFC	Unidade Formadora de Colônias
UFC/g	Unidade Formadora de Colônias por grama
WHO	World Health Organization
%	por cento ou porcentagem
°C	graus Celsius
µg/L	Micrograma por litro
µg/Kg	Micrograma por quilograma

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
2. OBJETIVOS.....	17
2.1. Objetivo Geral.....	17
2.2. Objetivos Específicos.....	17
3. METODOLOGIA.....	18
4. REVISÃO DA LITERATURA.....	19
4.1. Considerações iniciais.....	19
4.2. Principais tipos de micotoxinas encontradas em alimentos e fungos produtores.....	21
4.2.1. Aflatoxinas.....	21
4.2.2. Fumonisinias.....	22
4.2.3. Ocratoxinas.....	23
4.2.4. Patulina.....	24
4.2.5. Citrinina.....	25
4.2.6. Zearalenona.....	26
4.3. Mecanismos de toxicidade das micotoxinas.....	27
4.4. Metodologias para identificação de fungos produtores de micotoxinas.....	29
4.4.1. Identificação morfológica.....	29
4.4.2. Imunoensaios.....	32
4.4.2.1. ELISA competitivo direto.....	33
4.4.2.2. ELISA competitivo indireto.....	34
4.4.2.3. ELISA sanduíche.....	35
4.4.3. Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	36

4.5. Metodologia para identificação de micotoxinas em alimentos.....	37
4.5.1. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	38
4.5.2. Ensaio imunoenzimáticos.....	39
4.6. Legislação brasileira e internacional para micotoxinas e fungos produtores de micotoxinas em plantas medicinais e chás de ervas.....	40
4.7. Ocorrência de micotoxinas e fungos produtores de micotoxinas em plantas medicinais e chás de ervas.....	41
5. CONCLUSÕES.....	45
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46
ANEXOS.....	53

1. INTRODUÇÃO

Fungos são organismos eucarióticos que apresentam capacidade de adaptação e crescimento em condições de elevada umidade e temperatura e são divididos em dois grandes grupos: unicelulares (leveduras) e pluricelulares ou filamentosos (conhecidos como bolores ou mofo) (BORGES et al., 2002; MADIGAN et al., 2010).

A utilização biotecnológica dos fungos é extensivamente difundida na indústria alimentícia e farmacêutica. Entretanto, algumas espécies podem causar transformações indesejáveis nos alimentos, alterando sabor e produzindo odores desagradáveis. Somando-se a isto, algumas espécies podem desencadear manifestações clínicas negativas no homem e animais como infecções ou doenças decorrentes de invasão de tecidos, alergias ou reações de hipersensibilidade, além de toxicoses, intoxicações decorrentes do consumo de alimentos ou rações contendo micotoxinas (BORGES et al., 2002).

A palavra micotoxina é derivada dos termos gregos "mykes", que significa fungo, e "toxikon", que significa toxina ou veneno. O termo micotoxina descreve um grupo bastante diversificado de componentes químicos, com diferentes estruturas, propriedades químicas, físicas e toxicológicas, tendo em comum o fato de serem produtos da biossíntese fúngica (AQUINO, 2007; MINAMI et al., 2004).

Micotoxinas são metabólitos secundários orgânicos, não protéicos, complexos, com elevada toxicidade, em pequenas quantidades, à microrganismos, plantas e animais. As micotoxinas auxiliam os fungos na competição dentro de seu nicho ecológico, não sendo necessárias para o crescimento e desenvolvimento de todas as espécies (BUGNO, 2006).

As micotoxinas ficaram mundialmente conhecidas em 1960, quando um surto de mortes inexplicáveis de aves no Reino Unido (especialmente perus) foi investigado. O surto ficou mundialmente conhecido como Turkey "X" disease (BUGNO, 2006; De IONGH et al., 1962; FREIRE et al., 2007). Os pesquisadores chegaram à conclusão que a contaminação ocorreu em decorrência da ingestão de ração. Na ração havia presença de amendoim, importado do Brasil e da África, contaminado com uma substância verde fluorescente produzida pelo fungo

Aspergillus flavus (BUGNO, 2006). Após 1962 mais estudos foram realizados e pesquisadores isolaram outros fungos produtores de substâncias tóxicas diferentes.

Atualmente, pesquisas relevantes demonstram que 25-50% de todos os produtos agrícolas produzidos no mundo apresentam níveis consideráveis de alguma micotoxina (FREIRE et al., 2007; ONO et al., 2004).

Os efeitos tóxicos da ingestão das micotoxinas podem ser agudamente tóxicos, carcinogênicos, mutagênicos, teratogênicos e/ou imunossupressores; e recebem interferência de vários fatores, como tipo e dose da micotoxina, forma e tempo de exposição e suscetibilidade da espécie, podendo ser afetada por fatores genéticos e fisiológicos, como idade, sexo, estado nutricional, estado de saúde, além de fatores ambientais como exposição a outras substâncias (BUGNO, 2006).

As plantas medicinais são aquelas capazes de aliviar ou curar enfermidades e têm tradição de uso como remédio em uma população ou comunidade. Quando a planta medicinal é industrializada para se obter um medicamento, tem-se como resultado o fitoterápico. O processo de industrialização evita contaminações por microorganismos, agrotóxicos e substâncias estranhas, além de padronizar a quantidade e a forma certa que deve ser usada, permitindo uma maior segurança de uso (BRASIL, 2004).

O chá de ervas é descrito na Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) 277 de 22 de setembro de 2005, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) como “produto constituído de uma ou mais partes de espécie(s) vegetal(is) inteira(s) fragmentada(s) ou moída(s), com ou sem fermentação, tostada(s) ou não, constantes de Regulamento Técnico de Espécies Vegetais para o Preparo de Chás. O produto pode ser adicionado de aroma e ou especiaria para conferir aroma e ou sabor” (BRASIL, 2005).

O consumo de plantas medicinais, matéria prima para fabricação de chá de ervas, vem aumentando nos últimos anos (BRANDÃO et al., 2002; JUNIOR; PINTO, 2005). Diferentes segmentos da sociedade consomem plantas medicinais ou chá de ervas diariamente por diversos motivos, dentre eles para prevenir ou curar doenças (BRAGA, CARDOSO, MACÊDO, 2002).

As plantas medicinais apresentam níveis consideráveis de microrganismos, uma parte proveniente da própria microbiota da planta e outra parte proveniente da microbiota que se desenvolve durante algum momento do cultivo,

colheita, secagem, processamento, período de armazenagem e transporte (BRAGA; CARDOSO; MACÊDO, 2002; BUGNO, 2006). As ervas ao serem colhidas, recebem o processo de secagem, normalmente em estufas a céu aberto, onde se expõem a influência de fungos filamentosos (CARVALHO et al., 2009).

No Brasil a RDC N°12 de 2001 que regulamenta os padrões microbiológicos para alimentos, não inclui a pesquisa de fungos filamentosos em chás ou em alimentos consumidos após adição de líquido com emprego de calor (CARVALHO, 2009).

A ingestão humana de micotoxinas em decorrência do consumo de alimento contaminado é questão de saúde pública no mundo inteiro (CALDAS; SILVA; OLIVEIRA, 2002). O aumento do consumo, associado à falta de fiscalização permanente desde o início da exploração racional dos recursos naturais empregados como matéria-prima, até a comercialização do produto acabado, contribui para a disponibilidade e acesso a produtos sem condições adequadas ao consumo, sem garantia da qualidade, segurança e eficácia, necessárias para a recuperação ou preservação da saúde do consumidor (BUGNO et al., 2005).

Sendo assim, a identificação de fungos filamentosos e seus metabólitos tóxicos é uma ferramenta essencial para a segurança alimentar dos consumidores de plantas medicinais e chás de ervas, já que a presença de microrganismos produtores de micotoxinas pode resultar em efeitos prejudiciais à saúde da população (CARVALHO et al., 2009).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Apresentar dados relativos à presença de fungos e suas micotoxinas em plantas medicinais e chás de ervas consumidos pela sociedade brasileira.

2.2. Objetivos Específicos

1. Descrever as principais micotoxinas citadas na literatura;
2. Relatar os riscos das micotoxinas à saúde humana e animal;
3. Citar o mecanismo de toxicidade das micotoxinas;
4. Apresentar a legislação vigente para pesquisa de fungos e micotoxinas em chás de ervas;
5. Descrever os métodos para identificação de fungos produtores de micotoxinas;
6. Apresentar os métodos utilizados para identificação de micotoxinas em alimentos;

3. METODOLOGIA

O presente estudo realizou um levantamento bibliográfico sobre a presença de fungos e suas micotoxinas em chás de ervas consumidos pela sociedade brasileira em bases de dados virtuais, tais como: Portal de Periódicos CAPES, PubMed, BIREME, LILACS, Mediline, SciELO e Banco de teses das Universidades Federais do Brasil.

Foram pesquisados trabalhos científicos publicados por pesquisadores brasileiros em revistas nacionais e internacionais na última década, 2001-2010. Os seguintes termos foram utilizados como palavras-chaves: aflatoxinas, Aspergillus, Brasil, chás de ervas, chás industrializados, contagem, contaminação fúngica, efeitos tóxicos, fumonisinas, fungos filamentosos, fungos micotoxigênicos, Fusarium, hábitos culturais, imunossupressora, legislação, metabólitos secundários, métodos de identificação, micotoxinas, micotoxicose, microbiota fúngica, ocratoxina, patulina, plantas medicinais, potencial, produtos naturais, ocorrência, zearalenona.

Foram encontradas aproximadamente 1.500 citações relacionadas aos termos citados e os artigos de maior interesse foram selecionados para a revisão bibliográfica. Como critério de exclusão foi utilizando o período de publicação dos artigos anteriores ao ano de 2001.

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1. Considerações iniciais

As micotoxinas são produzidas por fungos filamentosos em condições naturais e laboratoriais e podem ser encontradas nos esporos, micélios, ou tecidos do hospedeiro causando doenças graves (BORGES et al., 2002; WELKE; HOELTZ; NOLL, 2009b).

Aproximadamente 300 micotoxinas produzidas por cerca de 350 espécies de fungos já foram identificadas (BORGES et al., 2002). Segundo a literatura acredita-se que quase todos os fungos apresentam potencial para produção de metabólitos tóxicos e que todos os alimentos e rações podem ser potencialmente contaminados se expostos a condições ambientais apropriadas (BORGES et al., 2002; CARVALHO, 2009). Contudo Freire et al. (2007) cita a existência de cerca de 400 micotoxinas e ressalta que a definição do termo micotoxina não é fácil em detrimento da diversidade de sua estrutura química, das origens de sua biossíntese, de seu uso em produtos biológicos e de serem produzidas por uma vasta variedade de espécies fúngicas.

Os fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* (LINK, 1809; MICHELI; HALLER, 1768) são os produtores das principais micotoxinas (AQUINO, 2007; BORGES et al., 2002; FREIRE et al., 2007; WELKE; HOELTZ; NOLL, 2009b). Contudo, os principais gêneros de fungos produtores de micotoxinas encontrados no Brasil (ROCHA; SOARES; CORRÊA, 2004) são: *Cladosporium* (LINK, 1816), *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium* e *Rhizopus* (EHRENBERG, 1820).

Segundo Borges et al. (2002) e Carvalho (2009) as micotoxinas mais importantes podem ser divididas em três grupos: aflatoxinas (*A. flavus* e *A. parasiticus*), fusariotoxinas (*Fusarium* spp) representadas pela zearalenona, tricotecenos e fumonisinas e o último grupo descrita pelas ocratoxinas (*Aspergillus alutaceus*, e algumas espécies de *Penicillium*).

Braga, Cardoso e Macedo (2002) acrescentam outras toxinas aos fungos produtores de micotoxinas citados anteriormente: no gênero *Aspergillus* (aflatoxinas, ocratoxinas, citrina e ácido ciclopiazônico), as produzidas pelo gênero *Penicillium*

(ocrotaxinas, citrinina, patulina, e ácido ciclopiazônico), e ao gênero *Fusarium* (tricotecenos, zearalenona, fumonisinas, moniliforminase e beauvericina).

O potencial de produção das micotoxinas está sujeito a espécie fúngica, bem como determinadas condições: presença de esporos do fungo, substrato orgânico e níveis adequados de umidade, oxigênio, temperatura e acidez (SASSAHARA; YANAKA; NETTO, 2003;). Welke, Hoeltz e Noll (2009b) descrevem que o potencial micotoxigênico depende da linhagem, assim como a composição física e química da matriz e fatores ambientais.

A identificação de fungos toxigênicos, em alimentos, não implica obrigatoriamente risco imediato para consumo (FERREIRA et al., 2006). Bem como, o não isolamento e detecção de fungos potenciais produtores de micotoxinas em alimentos não determina a ausência de micotoxinas, uma vez que a toxina pode estar presente e ativa (FERREIRA et al., 2006; GOMES et al., 2008). O poder de termo-resistência das micotoxinas durante o processo de industrialização é elevado, sendo que alguns tipos de micotoxinas são decompostas somente a 220°C, contudo as micotoxinas são sensíveis a radiação gama (AQUINO, 2003; PRADO et al., 2009). Rocha, Soares e Corrêa (2004) ressaltam que as aflatoxinas produzidas pelo *Aspergillus* apresentam alto ponto de fusão, próximo de 269°C.

A exposição a pequenas quantidades de micotoxinas, a longo prazo, poderia provavelmente ser levado para o organismo humano se acumulando no fígado e causando intoxicações agudas ou crônicas (OLIVEIRA et al., 2002). Apesar das plantas medicinais e os chás de ervas sofrerem processo de infusão, estes alimentos podem apresentar níveis consideráveis de micotoxinas, devido a capacidade de termoestabilidade das micotoxinas (ROCHA; SOARES; CORRÊA, 2004).

Caldas, Silva e Oliveira (2002) descrevem que a exposição humana a micotoxinas por meio do consumo de alimento contaminado, vem sendo discutido nos últimos tempos e tornou-se questão de saúde pública em todo o mundo.

O quantitativo de artigos (128 artigos) sobre micotoxinas publicados por pesquisadores brasileiros em 1991-2000 ultrapassou o número de artigos (85 artigos) publicados nas três décadas anteriores (1961-1990). O aumento do número de investigações reflete as atuais preocupações internacionais com os problemas que as micotoxinas podem causar a saúde animal e do homem (AMAYA; SABINO, 2002).

4.2. Principais tipos de micotoxinas encontradas em alimentos e fungos produtores

4.2.1. Aflatoxinas:

As aflatoxinas foram descobertas em 1960 e atualmente são conhecidos 17 compostos similares designados pelo termo aflatoxina (AF), porém, os principais tipos de interesse médico-sanitários são identificados como B₁, B₂, G₁, e G₂ (FIG. 1). Estes compostos são caracterizados pela alta toxicidade. A aflatoxina B₁ (AFB₁) é a que apresenta maior poder toxigênico, seguida de G₁, B₂ e G₂ (AQUINO, 2007; BRAGA; CARDOSO; MACÊDO, 2002; CARVALHO, 2009). Produzidas por espécies de *Aspergillus* principalmente *A. flavus*, *A. parasiticus* e *A. nominus* (BRAGA; CARDOSO; MACÊDO, 2002; BUGNO, 2006; FERREIRA et al., 2006). Estas micotoxinas são encontradas principalmente em amendoins e seus derivados, além de feijão, arroz, trigo, entre outros (AMAYA; SABINO, 2002; FERREIRA et al., 2006; FREIRE et al., 2007).

A literatura aponta as aflatoxinas como uma das micotoxinas contaminantes de alimentos com maior potencial tóxico e carcinogênico para a indústria alimentícia (SEKIYAMA et al., 2005; VECCHIA, FORTES, 2007). Braga, Cardoso e Macêdo (2002) ressaltam que a ingestão de aflatoxinas tem apresentado efeitos hepatocarcinogênicos, além de causar acúmulo de gordura neutra (ácidos graxos) no fígado e rins, pequeno aumento do triglicérido no soro e inflamação hepatorenal intensificada, necrose e proliferação do canal da biliar (a obstrução do canal leva a proliferação do canal biliar).

De acordo com Aquino (2007) o poder de toxicidade da AFB₁ é em decorrência da sua rápida absorção pelo sistema gastrointestinal, facilitando a sua entrada na circulação sanguínea, utilizando o viaportal, assim chegando ao fígado. O fígado é o órgão de sítio de biotransformação da AFB₁, onde surge a ativação metabólica dos componentes tóxicos e carcinogênicos, e imediatas reações com macromoléculas (ácido desoxirribonucléico DNA, ácido ribonucléico RNA e proteínas) organelas celulares.

As aflatoxinas são as únicas micotoxinas que apresentam níveis máximos em alimentos previstos na legislação brasileira (30 Zg/Kg AFB₁ + AFG₁ em alimentos

de consumo humano e 20 Zg/Kg de aflatoxinas totais para matérias-primas de alimentos e rações (CALDAS; SILVA; OLIVEIRA, 2002).

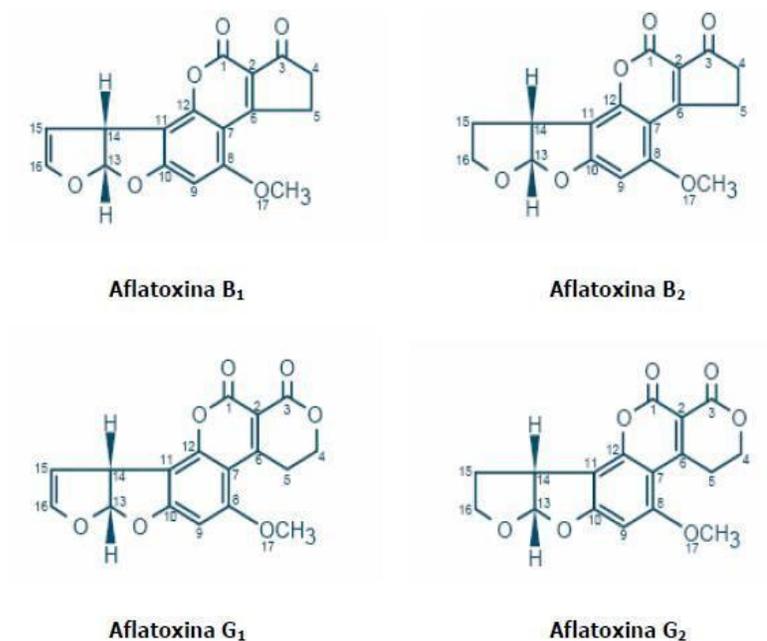


FIGURA 1—Estrutura química das principais aflatoxinas.
Fonte: BUGNO, 2006, p. 40.

4.2.2. Fumonisinas:

Descritas e caracterizadas em 1988, são constituídas em um grupo que contempla 16 substâncias, sendo a B₁ (FB₁, FB₂, FB₃, FB₄) a mais produzida entre as demais (FREIRE et al., 2007; POZZI et al., 2002). Entretanto Ono et al. (2004) ressaltam a existência de 28 análogos de fumonisinas, com destaque para B₁. A FIG. 2 apresenta a estrutura química da fumonisina B₁.

As fumonisinas são produzidas por várias espécies de *Fusarium*, destacando *F. verticillioides* (anteriormente classificado como *F. moniliforme*), *F. proliferatum* e *F. nygamai*, além da *Alternaria alternata* (BUGNO, 2006; FREIRE et al., 2007). Grãos de milho representam o alimento de maior ocorrência das fumonisinas (FREIRE et al., 2007; Pozzi et al., 2002).

As fumonisinas estão relacionadas com eventos de leucoencefalomácia em equinos e coelhos, edema pulmonar em porcos e efeito tóxico no sistema

nervoso, fígado, rins, pâncreas e pulmão de diversas espécies de animais. Nos humanos, há relação com a ocorrência de cânceres do esôfago, devido à ingestão de alimentos contendo fumonisinas (BUGNO, 2006; FREIRE et al., 2007; ONO et al., 2004; POZZI, et al., 2002).

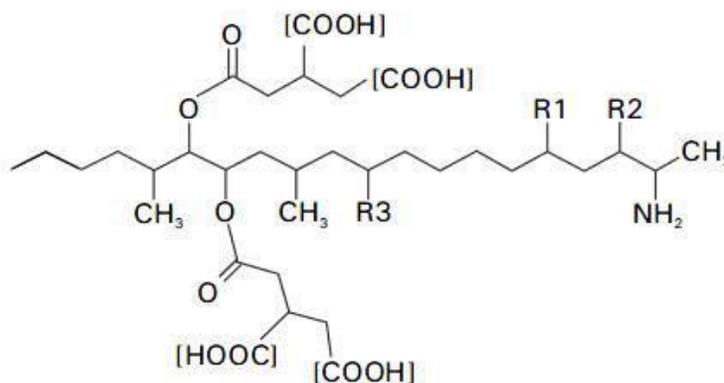


FIGURA2–Estrutura química da fumonisina B₁: R₁=OH; R₂=OH; R₃=OH
 Fonte: FREIRE et al., 2007, p. 15.

4.2.3. Ocratoxinas:

São o segundo grupo de toxinas mais estudadas perdendo apenas para aflatoxinas (BUGNO, 2006). A Ocratoxina A (OTA) é a micotoxina com maior potencial tóxico deste grupo, que constitui cerca de seis compostos descritos na literatura, apresentando atividades nefrotóxicas, hepatotóxicas, imunotóxicas, teratogênica, citotóxica e possivelmente carcinogênicas e genotóxica (BRAGA; CARDOSO; MACÊDO, 2002; BUGNO, 2006; FUJII; ONO; HIROOKA, 2002; WELKE; HOELTZ; NOLL, 2009b) (FIG. 3). A OTA foi descoberta em 1965 e é formada por uma isocoumarina ligada a uma molécula de L6fenilalanina (BRAGA; CARDOSO; MACÊDO, 2002; FREIRE et al., 2007; FUJII; ONO; HIROOKA, 2002; WELKE; HOELTZ; NOLL, 2009b).

A OTA é produzida principalmente por espécies do gênero *Penicillium*, destacando-se *P. verrucosum* em climas temperados ou frios. Em climas tropicais o gênero produtor é *Aspergillus*, principalmente *A. ochraceus* (BUGNO, 2006; FUJII; ONO; HIROOKA, 2002), além das espécies *A. alliaceus*, *A. auricomus*, *A. carbonarius*, *A. glaucus*, *A. melleus*, *A. niger* e *P. nordicum* (FREIRE et al., 2007). A OTA tem sido detectada em diversos tipos de alimentos, incluindo trigo, milho, aveia,

cevada, centeio, pão, uva, vinhos e sucos de uva (FREIRE et al., 2007; FUJII; ONO; HIROOKA, 2002; WELKE; HOELTZ; NOLL, 2009b).

A ocratoxina A apresenta mecanismo de formação de complexos com o ferroliberador radical hidroxila, que por sua vez irá gerar a lipoperoxidação. O dano renal é descrito por atrofia do túbulo proximal, fibrose e esclerose, e perda da capacidade funcional da função tubular (BUGNO, 2006).

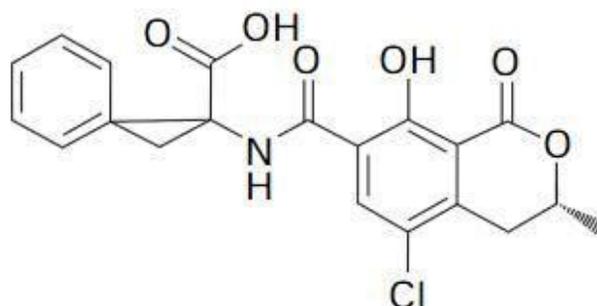


FIGURA3—Estrutura química da ocratoxina A.
FONTE: FREIRE et al., 2007, p.24.

4.2.4. Patulina:

Os primeiros isolados da patulina ocorreram por volta de 1940. Hoje é conhecida como “bolor azul”, associado à maçã, pêra, cereja e em outros frutos, produzida principalmente pelo fungo *P. expansum* (FREIRE et al., 2007; OLIVEIRA; BANDO; JUNIOR, 2007). WELKE et al. (2009a) acrescenta aos gêneros *Penicillium*, *Aspergillus* e *Byssoschlamys* também como produtores de patulina (FIG.4).

A patulina apresenta efeito antibiótico, entretanto não é utilizada como antibacteriano devido aos seus efeitos tóxicos em humanos, animais e plantas (BRAGA; CARDOSO; MACÊDO, 2002; FREIRE et al., 2007; WELKE et al., 2009a). A ingestão da micotoxina patulina pode desencadear distúrbios respiratórios e motores, espasmos, asfixia, hemorragia no pulmão e cérebro (BRAGA; CARDOSO; MACÊDO, 2002). Outros autores relatam a promoção de mutagênese, carcinogênese e teratogênese (OLIVEIRA; BANDO; JUNIOR, 2007). Estes efeitos possivelmente são resultados da capacidade da patulina em apresentar efeitos que incluem rompimento da membrana de células plasmáticas e inibição da síntese de DNA. A micotoxina inibe o crescimento e a síntese de proteína em cultura de tecido

hepático, devido ao bloqueio da captação dos aminoácidos por meio da membrana e também a agregação da patulina à proteína (WELKE et al., 2009a).

Diante dos efeitos tóxicos da patulina descrito nas literaturas, a Organização mundial da Saúde (OMS) estabeleceu a dose diária máxima de 0,4 mg/kg de peso corporal como limite máximo de absorção para essa micotoxina (FREIRE et al., 2007). Outros autores retratam que para os produtos derivados da maçã a OMS e o Food and Drug Administration (FDA) estabelecem o limite de 50 Zg/L⁶¹ em suco de maçã (CELLI et al., 2009; OLIVEIRA; BANDO; JUNIOR, 2007; WELKE et al., 2009a). No Brasil ainda não há legislação vigente que determine o limite de patulina em alimentos.

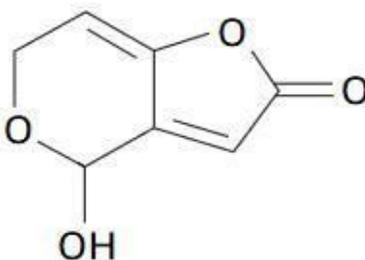


FIGURA4–Estrutura química da patulina.
FONTE:FREIRE et al., 2007,p.21.

4.2.5. Citrinina:

Foi inicialmente isolada a partir do fungo *P. citrinum*, anteriormente a Segunda Guerra Mundial. Em seguida outras espécies foram identificadas como produtoras de citrinina: *Penicillium* (*P. expansum*, *P. viridicatum* e *P. camemberti*), *Aspergillus* (*A. niveus*, *A. terreus* e *A. oryzae*) e mais recentemente *Monascus ruber* e *M. purpureus*, espécies industrialmente empregadas na produção de pigmentos vermelhos (BUGNO, 2006; FREIRE et al., 2007).

A citrinina (FIG. 5) encontra-se presente em grãos de aveia (mofados), centeio, cevada, milho e trigo (CARVALHO; FERNANDES; FREIRE, 2005; FREIRE et al., 2007). E segundo Braga, Cardoso e Macêdo (2002) o queijo também é um substrato para os fungos produtores dessa micotoxina.

Carvalho, Fernandes e Freire (2005) relatam que o consumo de pequenas doses de citrinina, por animais sensíveis às micotoxinas, pode desencadear

episódios de intoxicações agudas ou crônicas, afetando, principalmente animais criados sob regime de confinamento, como aves e suínos, podendo levar à morte em poucas horas. A citrinina também apresenta capacidade nefrotóxica em diversas espécies de animais, além de agir modulando a resposta inflamatória em aves e mamíferos (BRAGA; CARDOSO; MACÊDO, 2002; BUGNO, 2006; CARVALHO; FERNANDES; FREIRE, 2005; FREIRE et al., 2007;). Até o momento não consta na literatura a descrição dos riscos à saúde humana causados pela ingestão de citrinina (FREIRE et al., 2007).

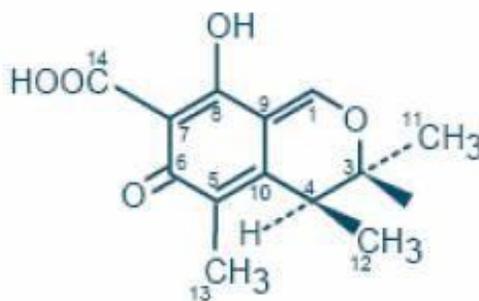


FIGURA 5—Estrutura química da citrinina.
FONTE: BUGNO, 2006, p. 46.

4.2.6. Zearalenona:

É descrita na literatura como uma micotoxina produzida por diferentes espécies de fungos do gênero *Fusarium*, principalmente as espécies *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. equiseti* e *F. crookwellense* (BUGNO, 2006; FREIRE et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2009; SEIKYAMA, 2005). A estrutura química da zearalenona é apresentada na Fig. 6.

A zearalenona apresenta efeito estrogênico e anabolizante em diversos animais, levando a alteração no processo de reprodução (BRAGA; CARDOSO; MACÊDO, 2002; BUGNO, 2006; FREIRE et al., 2007; SEIKYAMA et al., 2005).

Sassahara, Yanaka e Netto (2003) citam que o consumo de alimentos contendo traços de zearalenona leva a um quadro de hiperestrogenismo nas espécies domésticas, qualificado pela diminuição da produção de leite, repetição de cio, diminuição da taxa de concepção e episódios de abortamento. Freire et al.

(2007) relatam que estudos com animais não comprovaram ainda a capacidade carcinogênica da zearalenona.

No Brasil, essa micotoxina foi encontrada em cereais e em aveia em flocos (OLIVEIRA et al., 2002).

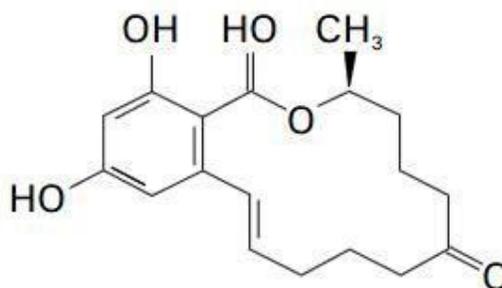


FIGURA 6 – Estrutura química da zearalenona.
FONTE: FREIRE et al., 2007, p. 19.

4.3. Mecanismos de toxicidade das micotoxinas

A intoxicação crônica por micotoxinas é chamada de micotoxicose (BORGES et al., 2002; AQUINO, 2007). Ainda segundo Borges et al. (2002) a micotoxicose pode desencadear ao organismo do animal ou do ser humano danos no crescimento, alterando funções do organismo e evoluindo para tumores. Os sintomas são náusea e vômitos, também podendo causar ataxia e morte.

A micotoxicose pode ser classificada em primária ou secundária, sendo a secundária de difícil identificação, em decorrência dos baixos níveis de toxinas na amostra e também pela ausência de um quadro clínico específico de micotoxicose e presença de um quadro de suscetibilidade exacerbada a infecções intercorrentes da imunossupressão desencadeada pela toxina (FERREIRA et al., 2006).

A principal via de exposição de micotoxinas é a via oral, por meio do consumo de alimentos contaminados, existindo também o risco de exposição por via dérmica e inalatória (BUGNO, 2006).

Devido a diversidade de sua estrutura química, das origens de sua biossíntese, de seus amplos efeitos biológicos as micotoxinas podem causar danos agudos e crônicos a animais e humanos, principalmente no fígado, rins e cérebro,

bem como alojamento destas nos músculos esqueléticos (BRAGA; CARDOSO; MACÊDO,2002;CARVALHO,2009)

As propriedades toxicológicas de algumas micotoxinas devem-se ao mecanismo de modificação da estrutura do DNA (BUGNO,2006;CELLI et al., 2009; FREIRE et al., 2007;WELKE et al., 2009a). A exemplo, as aflatoxinas apresentam biotransformação pela ação de enzimas microsossomais pertencentes à superfamília de enzimas do citocromo P450, resultando em um composto reativo 8,9-epóxido, com potencial de reagir, via ligações covalentes, com sítios nucleofílicos de macromoléculas como DNA, RNA e proteínas. O epóxido liga-se com guaninas da molécula de DNA, na posição N7, formando adutos, que representam a lesão bioquímica primária produzida pelas aflatoxinas, assim alterando a estrutura e atividade biológica do DNA e gerando efeitos mutagênicos e carcinogênicos (BUGNO,2006;JARDIM;CALDAS,2009)(FIG.7).

Fujii, Garcia, Hirooka (2004) citam que as micotoxinas provocam redução na síntese protéica, levando a paralisação na atividade de fenilalanina 6RNA 6 sintetase, além de inibição de respiração mitocondrial com depleção de síntese de ATP (Adenosina Trifosfato) e aumento na peroxidação lipídica. Somando-se aos efeitos primários ocorre formação de intermediários reativos instáveis, surgindo como elemento cooperativo na genotoxicidade e mutagenicidade.

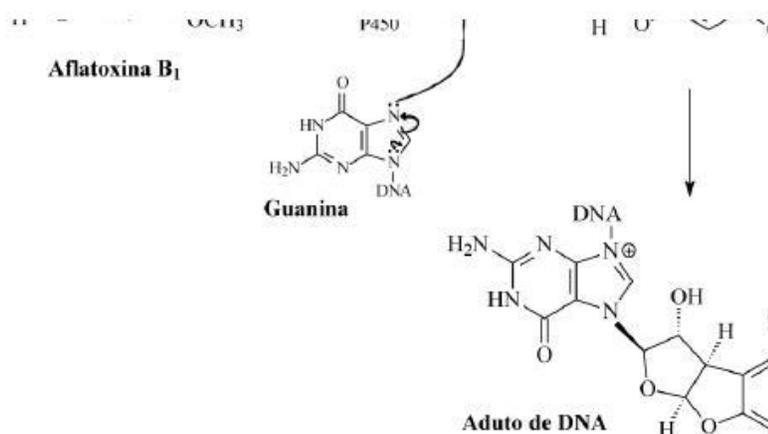


FIGURA 7 6 Reação da aflatoxina B, catalisada pela enzima mono6oxigenase do complexo citocromo P450 na formação do aduto de DNA.
 FONTE: JARDIM; CALDAS, 2009, p. 1903.

4.4. Metodologias para identificação de fungos produtores de micotoxinas

Os métodos de detecção e quantificação de fungos em produtos destinados ao consumo humano e animal são necessários para o controle de qualidade de alimentos.

4.4.1. Identificação morfológica

As colônias de um determinado microrganismo geralmente apresentam morfologias típicas, quando estes são semeados em meios com a mesma composição química. Os aspectos macroestruturais de uma colônia representam o primeiro passo para identificação microbiana (SIDRIM; ROCHA, 2004) (FIG. 8).

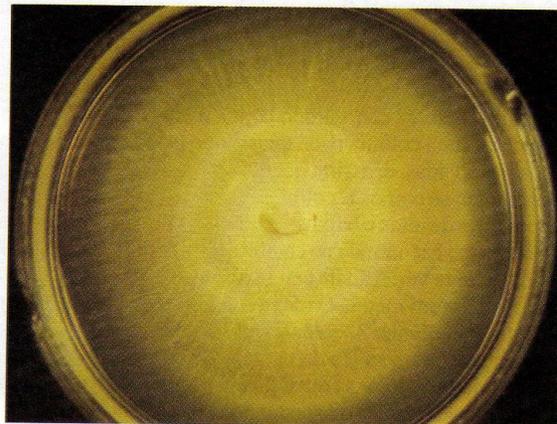


FIGURA 8 – Aspecto macroscópico de uma macrocolônia
FONTE: SIDRIM; ROCHA, 2004, p. 83.

Na observação das culturas de fungos filamentosos, devem ser ressaltadas as seguintes características: tamanho da colônia, características das bordas, textura, relevo, pigmentação, coloração do verso e reverso, entre outras (SIDRIM; ROCHA, 2004) (FIG. 9, 10 e 11). Entretanto, a caracterização de uma colônia compõe um conjunto de características as vezes subjetivas, de expressão fenotípica, encontradas em uma determinada espécie. Podendo, tais aspectos deixarem de se manifestar e apontarem direção a uma espécie fúngica distinta, não correlacionado aos achados (SIDRIM; ROCHA, 2004). Portanto, a caracterização

micromorfológica se torna fundamental para complementar a identificação morfológica.

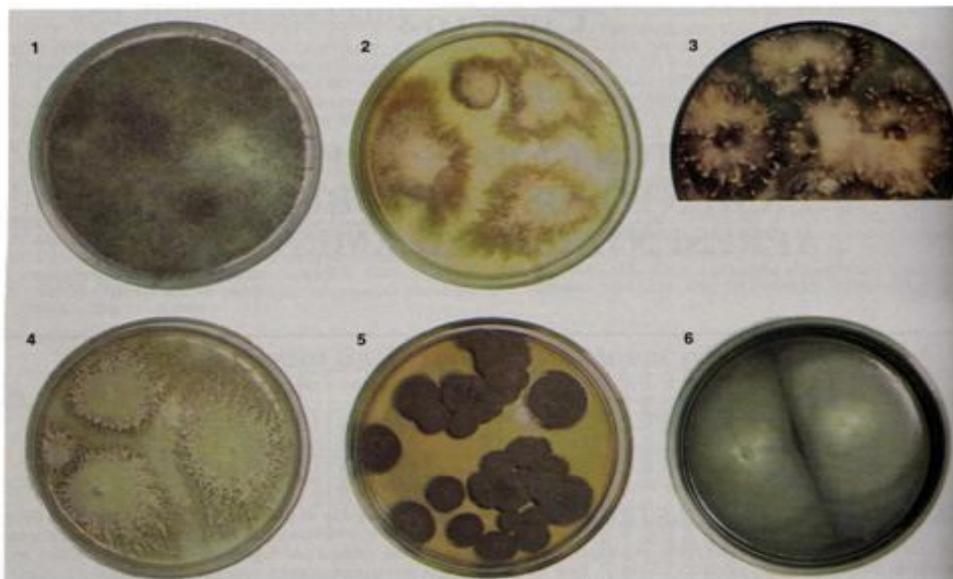


FIGURA 9 – Aspectos das colônias fúngicas quanto à textura: 1. Colônias algodonosas; 2. Colônias furfuráceas; 3. Colônias penugentas; 4. Colônias arenosas; 5. Colônias veludas; 6. Colônias glabrasas.

FONTE: SIDRIM; ROCHA, 2004, p.84

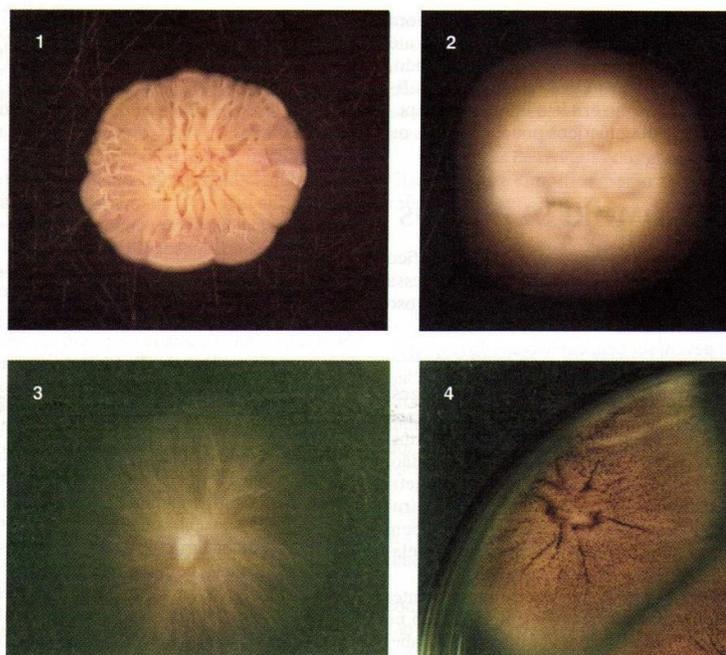


FIGURA 10 – Aspectos das colônias fúngicas quanto ao relevo: 1. Colônias cerebriformes; 2. Colônias rugosas; 3. Colônias apiculadas; 4. Colônias crateriformes.

FONTE: SIDRIM; ROCHA, 2004, p.85

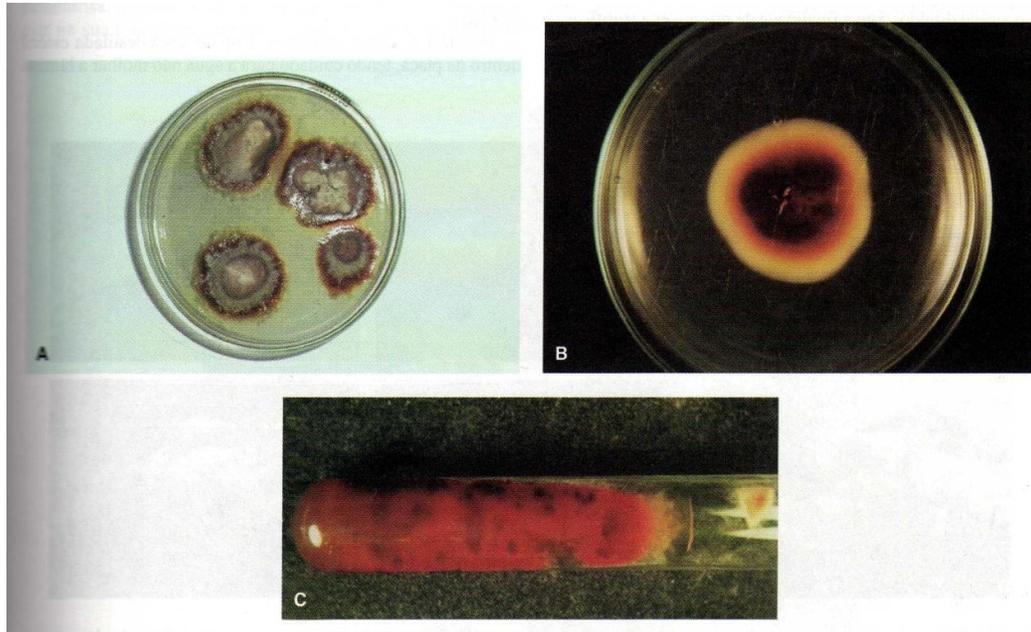


FIGURA11–Característicasdosfungosquantoàpigmentação: A.pigmentonoversodacolônia; B.pigmentonoreversodacolônia;C.pigmentodifusívelnomeiodecultura.
 FONTE:SIDRIM;ROCHA,2004,p.85

A identificação de um fungo filamentosos abrange a caracterização de suas estruturas microscópicas. Observando estruturas como de frutificação e de ornamentação. Para tal observação faz-se necessário utilizar a técnica de microcultivo em lâminas (RIDDELL, 1950) (FIG. 12).

A primeira etapa da identificação é composta pela preparação de placas de Petri contendo uma lâmina apoiada sobre um suporte de vidro. Todo o material utilizado deve ser esterilizado de forma adequada (RIDDELL, 1950; SIDRIM; ROCHA, 2004).

Após montagem do aparato, inicia-se a técnica propriamente dita de “microcultivo para fungos filamentosos”; utiliza-se uma placa contendo ágar batata, tendo este meio espessura de aproximadamente 465 mm. Com o auxílio de uma lâmina de bisturi esterilizada, retiram-se dessa placa blocos retangulares de meio, com aproximadamente 1 cm². Esses blocos devem ser dispostos de forma asséptica sobre a lâmina que se encontra na placa de Petri. Em seguida a colônia a ser analisada é repicada nas quatro faces do retângulo de ágar batata, que será posteriormente coberto com uma lâmina asséptica (RIDDELL, 1950; SIDRIM; ROCHA, 2004).

Montada a cultura, adicionando-se 1 mL de água destilada esterilizada sobre um fragmento de algodão hidrofílico. A placa de Petri é então incubada à temperatura ambiente até o crescimento fúngico (5 a 10 dias) sob lâmina.

Para a observação final, é adicionado uma gota do corante Lactofenol Azul de Algodão sobre uma lâmina, retira-se a lamínula que está cobrindo o microcultivo, utilizando-se a para cobrir a lâmina que está com o Lactofenol Azul de Algodão (RIDDELL, 1950; SIDRIM; ROCHA, 2004). A preparação é observada em microscopia óptica para visualização das microestruturas (SIDRIM; ROCHA, 2004).

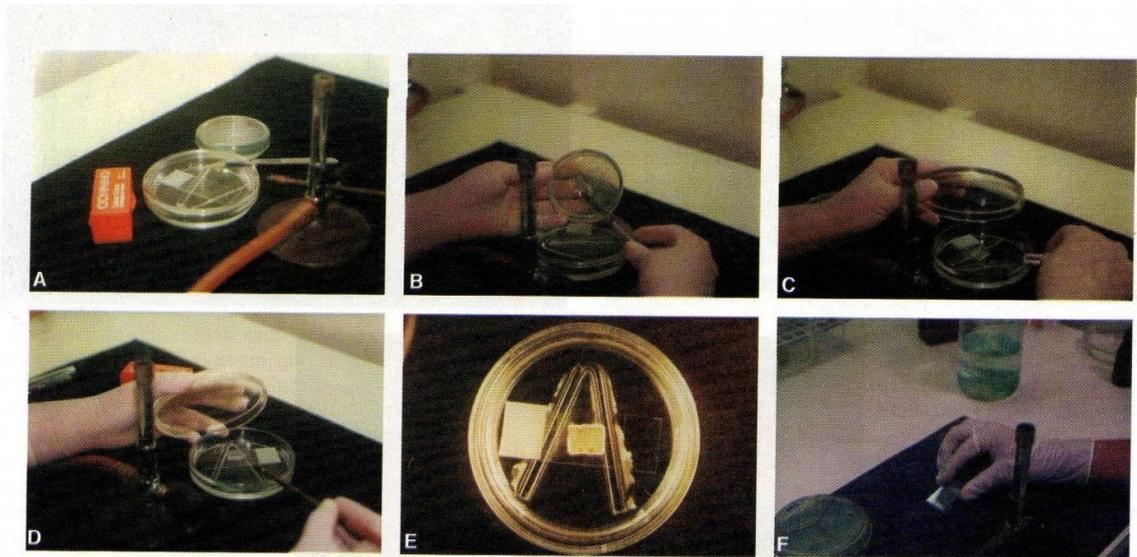


FIGURA 12 – Etapas do microcultivo para identificação dos fungos. (A) placa montada e esterilizada; (B) placa com meio para micromorfologia; (C) montagem da lâmina; (D) semeadura; (E) crescimento; (F) confecção de lâminas para microscopia.
 FONTE: SIDRIM; MOREIRA, 2004, p. 86.

4.4.2. Imunoensaios

Os métodos imunológicos apresentam diversas vantagens quando comparados com os demais métodos, dentre elas a rapidez na obtenção de resultados, alta sensibilidade, especificidade e facilidade na execução, contudo apresentam custo elevado e necessitam de pessoal técnico qualificado. Dentre os tipos de ensaios imunoenzimáticos (ELISA 6 Ensaio Imunoabsorvente Ligado a Enzima), os que utilizam o antígeno são os mais utilizados no diagnóstico taxonômico, detecção e identificação de fungos toxigênicos (MEIRELLES et al., 2006; THORNTON et al., 2002).

Exoantígenos são moléculas imunogênicas solúveis, secretadas por fungos nomeiodecultura. Muitos fungos produzem antígenos que são específicos para um gênero e/ou espécie, podendo ser utilizados para identificação, expondo grande aplicabilidade na imunoidentificação de fungos patogênicos e na resolução de problemas taxonômicos (MEIRELLES et al., 2006).

Imunoensaios são procedimentos analíticos baseados na ligação não covalente entre antígeno e anticorpo. Para detecção de fungos em alimentos, os imunoensaios utilizados são baseados na pesquisa de antígenos e podem empregar anticorpos policlonais, monoclonais ou anticorpos recombinantes (MEIRELLES et al., 2006).

A marcação enzimática de anticorpos foi adaptada para a detecção de fitopatógenos com alta sensibilidade, originando a metodologia de ELISA. Um dos reagentes é adsorvido na superfície de uma fase sólida, como uma placa de poliestireno com 96 poços. A reação é baseada na ligação reversível e não covalente do antígeno com o anticorpo específico. Determinada enzima (frequentemente peroxidase ou fosfatase alcalina) conjugada a um anticorpo reage com um substrato incolor para formar um produto colorido ou quimioluminescente, permitindo assim detectar o antígeno.

A detecção de fungos em alimentos através do método de ELISA pode ser realizada em alimento submetido a tratamento térmico, filtração ou irradiação gama, permitindo avaliar a contaminação em alimentos processados. Os ELISAs mais utilizados para a detecção de fungos toxigênicos em alimentos são o competitivo direto, competitivo indireto e o ELISA sanduíche (MEIRELLES et al., 2006; ONO et al., 2004).

4.4.2.1. ELISA competitivo direto

A microplaca é sensibilizada com anticorpo (FIG. 13). O antígeno marcado com a enzima é misturado com a amostra contendo o antígeno, que compete pelo anticorpo de quantidade limitada, portanto quanto maior a quantidade de antígeno na amostra, menor quantidade de antígeno marcado ligar-se-á ao anticorpo. Assim, a absorbância após a adição do substrato será inversamente

proporcional à concentração do antígeno presente na amostra (MEIRELLES et al., 2006;ONOet al., 2004).

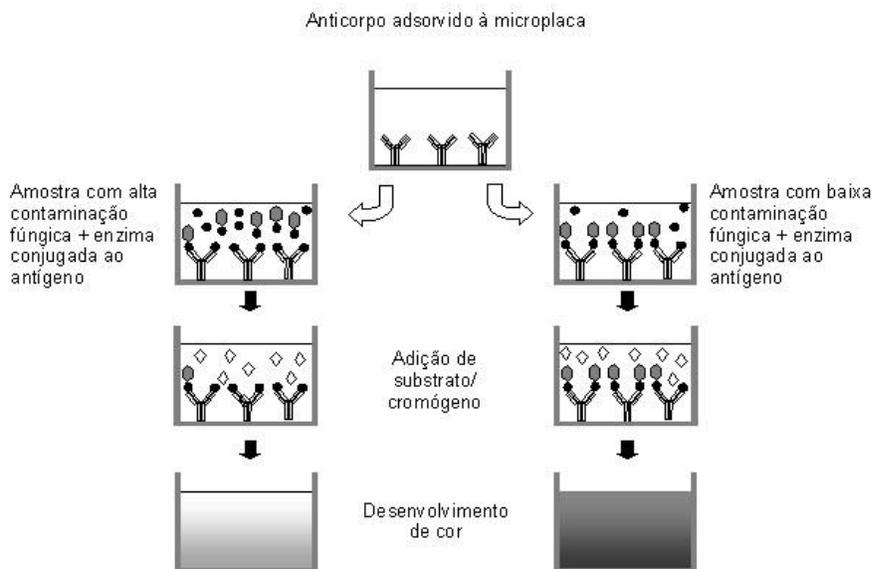


FIGURA13–ELISAcompetitivodireto
 FONTE:AdaptadadeONOet al., 2004,p.71

4.4.2.2. ELISA competitivo indireto

A sensibilização da microplaca é realizada com o antígeno (micotoxina) (FIG. 14). Na etapa seguinte, a amostra contendo o antígeno e o anticorpo é adicionada à microplaca. Quanto maior a quantidade de antígeno presente na amostra, menor a quantidade de anticorpo livre estará disponível para o antígeno fixado à microplaca. A adição de um anticorpo secundário marcado com enzima, específico para o anticorpo primário, pode determinar a quantidade de anticorpo primário ligado à placa. Assim, quanto maior a concentração de antígeno na amostra, menor a absorbância (MEIRELLES et al., 2006; ONO et al., 2004). Os métodos de detecção e quantificação de fungos em produtos destinados ao consumo humano e animal são necessários para o controle de qualidade de alimentos.

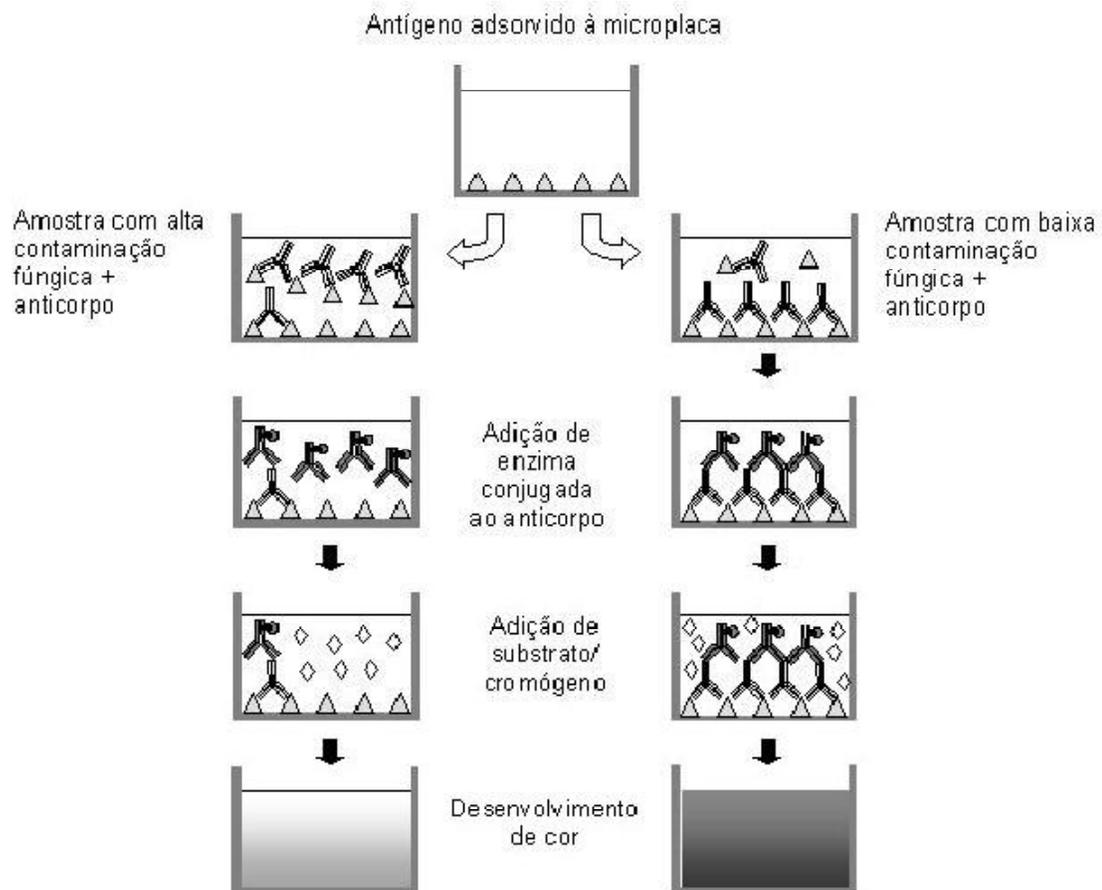


FIGURA14–ELISAc competitivo indireto
 FONTE: Adaptada de ONO et al., 2004, p.72

4.4.2.3. ELISA sanduíche

OELISAsanduícheapresentaduas etapas de complexação (FIG. 15). Na primeira etapa os anticorpos não marcados são fixados na microplaca e reagem com o antígeno presente na amostra, promovendo sua captura e imobilização. Na segunda etapa, um segundo anticorpo marcado com a enzima e específico para um epítipo diferente no antígeno é adicionado para reagir como antígeno ligado. Após remoção de qualquer anticorpo secundário livre, o substrato é adicionado e com a ação da enzima ocorrerá uma mudança na cor. A intensidade da cor é diretamente proporcional à ligação do anticorpo marcado e, conseqüentemente à quantidade de antígeno presente na amostra (MEIRELLE Set al., 2006; ONO et al., 2004).

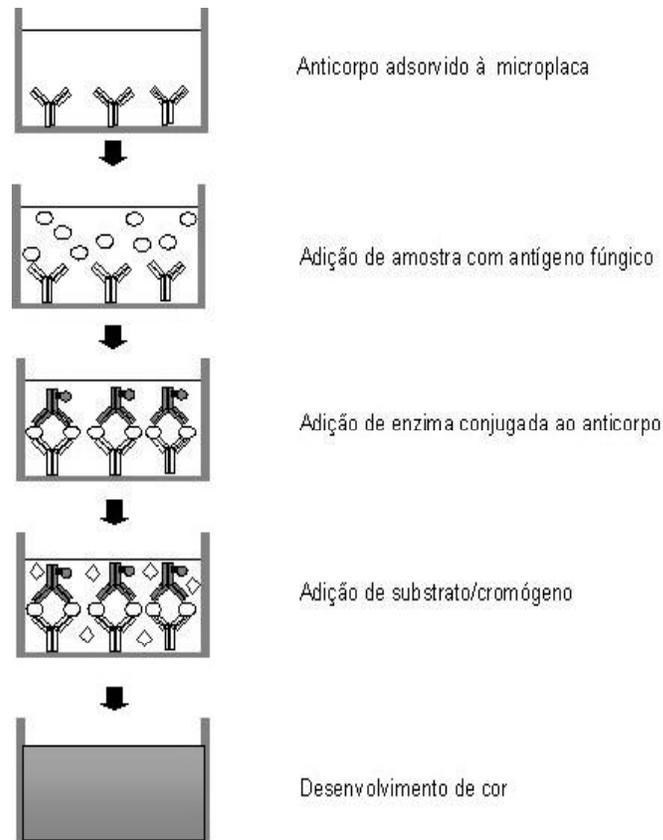


FIGURA15–ELISAsanduíche

FONTE: Adaptada de MEIRELLE Set al., 2006, p.619

4.4.3. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A PCR é uma técnica que foi relatada em meados da década de 1980, por Mullis e Faloona (1987), que permite obter *in vitro* diversas cópias de um determinado segmento de DNA. Obedecendo a seguinte etapa:

- Extração de DNA molde: apresenta a região a ser amplificada;
- Escolha do segmento a ser amplificado e obtenção de iniciadores específicos para o reconhecimento desse segmento;
- Amplificação que dará origem a várias cópias, utilizando-se de um ciclo térmico;
- Leitura do produto amplificado após eletroforese e coloração;
- Sequenciamento: após amplificada a região de interesse, compara-se a sequência disponível em bancos de dados de sequência de nucleotídeos. É possível a utilização de programas computacionais que permitem a comparação

destas seqüências de organismos alvo não alvos, além de permitir a definição de regiões apropriadas para a síntese de iniciadores a serem utilizados para detectar uma determinada espécie de fungo.

Devido à sua especificidade e sensibilidade, a PCR é um método relevante para a identificação de fungos. Existem vários exemplos de testes baseados em PCR desenvolvidos para a detecção de fungos em plantas, alimentos e em patologia médica. A PCR pode também ser utilizada para detectar grupos de linhagens, espécies ou taxass superiores (FUNGARO, 2000).

As técnicas tradicionais para a identificação de fungos toxigênicos em alimentos são pouco sensíveis, dependentes de cultivo e detectam apenas a presença de células viáveis. O uso da PCR permitiu diagnosticar, de forma sensível e específica, estes microrganismos, mesmo que se encontrem inviáveis. Recentemente, vários trabalhos vêm sendo realizados no sentido de viabilizar a detecção de fungos toxigênicos em alimentos através da PCR (GEISEN, 1998; FUNGARO, 2000).

Para fungos toxigênicos, os alvos a serem amplificados são, quando possível, seqüências de genes que codificam enzimas que participam da via biossintética das micotoxinas (genes estes ditos: genes da biossintese de micotoxinas). Entretanto, até o momento, somente alguns destes genes foram clonados e sequenciados. As únicas vias biossintéticas bem descritas são aquelas da biossintese de aflatoxinas, trichothecenos, patulina, toxina PR e da esterigmatocistina (GEISEN, 1998; FUNGARO, 2000).

4.5. Metodologia para identificação de micotoxinas em alimentos.

Para avaliar a exposição humana e animal e a qualidade de matérias primas é imprescindível o desenvolvimento de métodos analíticos com alta sensibilidade, especificidade, rapidez, reprodutibilidade e facilidade de uso, bem como a exatidão e precisão.

Inúmeros métodos foram desenvolvidos para proceder às análises quantitativas e qualitativas de toxinas de origem biológica incluindo cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), cromatografia gasosa e espectrometria de massas

(GC6MS), cromatografia líquida espectrometria de massas (CL6EM), cromatografia gasosa espectrometria infravermelho (CG6IV). Além de metodologia química, os imunoenaios, representados por ensaio imunológico ligado a enzima – ELISA, aglutinação de látex – RPLA, imunodifusão, imunoafinidade, imunohistoquímica, biosensores e separação imunomagnética vem se avançando pela praticidade associada à sensibilidade (FUJII; GARCIA; HIROOKA, 2004).

De acordo com Braga, Cardoso e Macêdo (2002) os métodos analíticos podem ser distribuídos em três grupos, os físico-químicos (cromatográficos, espectrofotométricos, fluorodensitométricos, detecção por minicoluna e blue-green-yellow fluorescence), biológicos (bioensaios) e por imunoenaios (radioimunoensaio e RIA e ELISA).

Para preparação de amostras sólidas é importante a redução do tamanho das partículas, aumentando a área da superfície. Misturando a amostra para torná-la homogênea e uma alíquota ser retirada. Para amostras líquidas e pastas é necessária uma correta homogeneização antes da retirada de uma alíquota.

A detecção e quantificação de pequenas quantidades de micotoxinas em produtos naturais exigem a retirada de interferentes, objetivando a purificação e concentração do extrato adquirido, sendo assim realiza-se etapa de limpeza ou “clean-up” para purificação da amostra (BRAGA; CARDOSO; MACÊDO, 2002).

4.5.1. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A cromatografia tem sido amplamente utilizada nos últimos tempos, contudo dentre os vários métodos cromatográficos, a CLAE é o mais recente e o principal método utilizado atualmente podendo ser considerada uma inovação na área de metodologia analítica para detecção de toxinas, anteriormente baseada em procedimentos químicos. O seu emprego em vários laboratórios é considerado atualmente indispensável (FUJII; GARCIA; HIROOKA, 2004; TORRES, 2009).

A CLAE utiliza equipamentos sofisticados que podem ser totalmente automatizados. É um tipo de cromatografia líquida que utiliza pequenas colunas, repletas de materiais especialmente preparados e uma fase móvel que é eluída sob pressões. Apresenta capacidade de realizar separação e análises quantitativas de uma grande quantidade de compostos presentes em vários tipos de amostras, em

escala de tempo de poucos minutos, com alta resolução, eficiência e sensibilidade (VALENTE; COLLINS; MANFREDI, 1983).

O método oficial descrito em “Association of Official Analytical Chemists” (AOAC) para análise quantitativa de micotoxinas é CLAE. Este método apresenta uma análise eficiente e sensível. Contudo, a execução de CLAE requer demanda considerável de reagentes de alto custo, tempo de análise relativamente longo e supervisão por técnicos especializados (FUJII; GARCIA; HIROOKA, 2004).

4.5.2. Ensaio imunoenzimático

Imunoensaios que utilizam antígeno ou anticorpo marcado com uma enzima são descritos como ensaios imunoenzimáticos, dentre os quais o mais empregado é o método de ELISA (ONO et al., 2004).

O ensaio imunoenzimático é uma técnica em que a reação antígeno-anticorpo é monitorada pela medida da atividade enzimática, empregando a conversão de um substrato (cromogênico, fluorescente ou quimioluminescente) por um antígeno ou anticorpo marcado com a enzima como meio de detecção/quantificação (ONO et al., 2004). O método de ELISA apresenta alta sensibilidade, capaz de detectar concentrações de um composto (ng/epg), pouca ou nenhuma necessidade de limpeza e/ou concentração de analítico, baixo custo após padronização, facilidade de operação e potencial de utilização no campo (FUJII; GARCIA; HIROOKA, 2004; ONO et al., 2004).

O ELISA constitui técnica analítica alternativa com grande potencial na análise de micotoxinas em alimentos (FUJII; GARCIA; HIROOKA, 2004). A principal desvantagem é o resultado de interação inespecífica entre componentes alimentares (proteínas, ácidos graxos) com anticorpo, podendo apresentar resultados falso-positivos ou superestimação da concentração de micotoxinas (ONO et al., 2004).

4.6. Legislação brasileira e internacional para micotoxinas e fungos produtores de micotoxinas em plantas medicinais e chás de ervas:

Os chás de ervas são comercializados no Brasil como alimentos e são tratados pela legislação brasileira de forma diferenciada dos fitoterápicos. Não sendo exigidos teores mínimos de constituintes químicos característicos de cada espécie vegetal, a exemplo da legislação para a comercialização da planta como medicamento (BRANDÃO et al., 2002).

ARDC n° 12/01 exige apenas a pesquisa de *Salmonella* sp em amostras de chá. Esta resolução revoga a Portaria n° 451 de 19 de setembro de 1997 (BRASIL, 1998), a qual exigia a pesquisa de *Salmonella* sp, bactérias coliformes a 45°C, bolores e leveduras (GOMES et al., 2008). Sendo assim essa mudança pode gerar prejuízos em termos da qualidade do produto, além de expor a segurança alimentar do consumidor.

A falta de legislação brasileira específica dificulta a determinação do real potencial de um alimento causar ou não risco à saúde de humanos e animais. A resolução vigente (RDC N° 12/01) permite que alimentos que apresentem a presença de vários fungos (alguns com potencial para produção de micotoxinas) como os encontrados nos artigos apresentados na TAB. 1, possam ser consumidos pela população.

A ANVISA estabeleceu limites máximos para micotoxinas em 16 categorias de alimentos. Para isso, abriu uma Proposta de Regulamento Técnico sobre Limites Máximos Tolerados de Micotoxinas em Alimentos, divulgada em Consulta Pública n° 100, de 21 de dezembro de 2009 (BRASIL, 2009).

Na consulta pública citada não há determinação de limites máximos tolerados para micotoxinas em chás de ervas dentre os alimentos listados, não levando em consideração os estudos publicados que mostram a contaminação fúngica nestes alimentos, além do aumento do consumo brasileiro por chás de ervas.

De acordo com a legislação internacional, em fitoterápicos, o limite máximo permitido, pela OMS, para fungos filamentosos é de 5×10^2 UFC (Unidades Formadoras de Colônias) por grama (g) (WHO, 1998). Já para plantas pré-tratadas

com água quente (chá de ervas) o limite tolerável de fungos filamentosos é de 1×10^4 UFC/g, parâmetro também estipulado pela OMS (WHO, 1998).

A Farmacopéia Brasileira (1988) e a Farmacopéia Americana (2005) estabelecem especificações de 2×10^2 UFC/g de fungos, para fitoterápicos de uso oral. A Farmacopéia Brasileira (1988), além de determinar a contagem de fungos, indica pesquisas de outros parâmetros de maior risco para o consumidor como: os fungos *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*.

4.7. Ocorrência de micotoxinas e fungos produtores de micotoxinas em plantas medicinais e chás de ervas

Foram encontrados 13 artigos publicados por autores brasileiros, nos anos de 2001 a 2010, referentes ao tema fungos produtores de micotoxinas e isolamento de micotoxinas em plantas medicinais utilizadas para obter chá de ervas e chás de ervas comerciais, demonstrando que as pesquisas nestes produtos ainda são escassas.

É possível observar na Tabela 1 que apenas um dos trabalhos (7,7%) que analisaram amostras de plantas medicinais e chás de ervas encontraram níveis de contaminação de fungos filamentosos dentro do limite permitido sendo inferior a 10^4 UFC/g, de acordo com a Farmacopéia (2 x 10² UFC/g). Assim, 92,3% dos demais estudos apresentaram níveis de contaminação consideráveis.

De acordo com os gêneros fúngicos detectados, *Aspergillus* foi encontrado em todas as análises, seguido por *Penicillium*, *Cladosporium*, *Rhizopus* e *Fusarium*. Quanto ao parâmetro identificação da espécie fúngica é possível observar a predominância das espécies de *A. niger* e *A. flavus* em chás de ervas.

A pesquisa de micotoxina foi procedida em apenas 4 dos 13 trabalhos apresentados, sendo que Gomes, Negrelle e Elpo (2008) não detectaram a presença da micotoxina pesquisada (Aflatoxina B₁, B₂, G₁ e G₂). As micotoxinas predominantes foram Aflatoxinas B₁ e B₂ e ocratoxina A.

A predominância das aflatoxinas possivelmente está associada a grande presença de espécies de *Aspergillus*, gênero fúngico principal produtor das aflatoxinas, com destaque para o *A. flavus*.

Borges et al. (2002) analisaram cinco amostras de erva-mate: destas, duas apresentaram crescimento de fungos filamentosos $7,6 \times 10^3$ e $1,8 \times 10^3$ UFC/g.

Furlaneto, Marins e Endo (2003) analisaram a qualidade microbiológica de 10 espécies de plantas medicinais e detectaram presença de fungos em todas as amostras analisadas, porém apenas uma das amostras apresentou valor acima do limite permitido ($1,1 \times 10^4$ UFC/g).

Rocha, Soares e Corrêa (2004) procederam análise fúngica em 20 amostras de *Cassia acutifolia* Delile (sene) e 20 amostras de *Peumus boldus* (Molina) Lyons (boldo do Chile). De acordo com os resultados 92,5% das amostras apresentaram contaminação, sendo que 45% (18 amostras) apresentaram níveis acima do limite estipulado pela OMS para fitoterápicos (5×10^2 UFC/g).

Prado et al. (2009) verificou que 21,79% dos isolados fúngicos encontrados em plantas medicinais apresentaram capacidade para produzir aflatoxinas (42,9%), ocratoxina A (22,4%) e citrinina (34,7%).

Apesar da hipótese de que os chás de ervas não são adequados a produção de micotoxinas, a análise micotoxicológica realizada nos artigos analisados permite verificar o contrário. Bugno (2006) detectou uma amostra artificialmente contaminada com uma linhagem toxigênica de *A. flavus*. Ao expor a mesma a condições adequadas de umidade, temperatura e tempo verificou a produção de aflatoxina B₁, indicando a possibilidade da ocorrência de contaminação humana com micotoxinas, quando contaminantes fúngicos encontram condições favoráveis para seu desenvolvimento.

O monitoramento dos níveis fúngicos nos alimentos é primordial não apenas para evitar a deterioração dos mesmos, mas principalmente para reduzir a produção de micotoxinas.

Os métodos de detecção de micotoxinas apresentam alto custo e exigem pessoal capacitado. Sendo possível observar que estes fatores impedem uma análise completa dos chás de ervas. Dos estudos apresentados na TAB.1 apenas quatro procederam a análise de micotoxinas, não permitindo saber o real risco à saúde dos consumidores.

É importante ressaltar que os resultados dos trabalhos analisados foram alcançados em condições assépticas e condições controladas de tempo e temperatura. Não ocorrendo o mesmo no ambiente usual de consumo doméstico. Sendo assim, o risco contínuo de contaminação deve ser considerado.

Tabela 1 – Ocorrência de micotoxinas em plantas medicinais e chás de ervas em algumas cidades do Brasil.

Cidade/Local	Nº de amostras	Produto analisado	% de contaminação por fungos	Principais gêneros fúngicos detectados	Tipo de micotoxina	Referência
Curitiba	5	Erva-mate	40%	Aspergillus sp(62,13%), Penicillium sp(32,35%), Rhizopus sp(5,52%)	a	BORGES et al., 2002
Londrina	10	Plantas medicinais	10%	Aspergillus spp(47%), Penicillium spp(34%),	a	FURLANETO; MARINS; ENDO,2003
Campinas	40	Folhas de sene, boldo do Chile	45%	Aspergillus, Penicillium, Cladosporium, Rhizopus	a	ROCHA; SOARES; CORRÊA,2004
São Paulo	51	Chás comerciais (saches)	100%	Aspergillus niger (10,6%), Aspergillus flavus (9,2%), Fusarium moliforme (7,8%) entre outros	...	RUSSOMANNO et al., 2004
Pelotas	34	Erva-mate	41,18%	Aspergillus sp(70,59%), Penicillium sp(55,88%), Cladosporium sp (14,71%)	a	BERNARDI; CALDEIRA; NASCIMENTO, 2005
São Paulo	91	65 espécies de plantas medicinais	63,1%	Aspergillus niger (69,2%), Aspergillus ochraceus (33,8%) e outros Aspergillus spp (32,3%), Penicillium citrinum (43,1%), Penicillium chrysogenum (16,9%)	...	BUGNO et al., 2005
São Paulo	91	65 espécies de plantas medicinais	55%	Aspergillus flavus (32,4%), Aspergillus niger (29,1%), Aspergillus ochraceus (14,5%), Penicillium citrinum (70,5%) e Penicillium chrysogenum (29,5%)	ND	BUGNO,2006
São Paulo	91	65 espécies de plantas medicinais	54,9%	Aspergillus flavus (23,39%), Aspergillus niger (20,97%) e Penicillium citrinum (12,50%)	...	BUGNO et al., 2006
São Paulo	100	Sene, boldo, espinheira santa, chá verde, guaraná em pó	95%	Aspergillus spp (75%), Mucor spp (12%) Penicillium spp (4,8%), e Cladosporium spp (0,7%)	ND	AQUINO,2007
Curitiba	13	Chá de capim-limão	81,25%	Aspergillus niger	ND	GOMES; NEGRELLE ELPO,2008
Maringá	18	Planta medicinal "espinheira-santa"	DLP	...	a	CHIMINI et al., 2008
Belo Horizonte	5	Plantas medicinais:	80%	Aspergillus flavus, Aspergillus ochraceus,	Aflatoxinas (B ₁ ,B ₂) e	PRADO et al., 2009

		alcachofra, boldo, camomila, chapéude courosene		Aspergillus ostianus, Cladosporium cladosporioides, Rhizopus stolonifer, Penicillium citrinum	ocratoxinaA
Curitiba	3	Chásde camomila, erva6doce erva6mate	100%	Aspergillus sp (35,9%), Penicillium sp (9,4%)	... CARVALHOet al.,2009

DLP–Dentro do limite permitido (10^4);
... Não informado;
ND– Não detectado.

5. CONCLUSÃO

As micotoxinas em produtos naturais de origem vegetal integram sério risco à saúde pública do Brasil. A alteração na legislação brasileira pode desencadear prejuízos em termos da qualidade do produto, colocando em risco a segurança alimentar do consumidor. Sendo necessário impor medidas apropriadas de controle higiênico e sanitário garantido a qualidade e segurança deste tipo de produto.

Os resultados obtidos na literatura sugerem que condições inadequadas da qualidade da matéria prima, processamento, distribuição, armazenamento e comercialização das plantas medicinais e chás de ervas contribuem para a contaminação e aumento da microbiota dos produtos por fungos, sendo a aplicação do manual de Boas Práticas de Fabricação e Controle (BPFC) de suma importância para determinar a segurança alimentar dos consumidores destes produtos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMAYA, Delia B. R.; SABINO, Myrna. Mycotoxin research in Brazil: The last decade in review. *Brazilian Journal of Microbiology*, São Paulo, v. 33, n. 1, p. 1611, 2002.

AQUINO, Simone. Efeito da radiação gama no crescimento de *Aspergillus flavus* produtor de aflatoxinas e no emprego da técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) em amostras de grãos de milho inoculados artificialmente. Orientador: Anna Lúcia C. H. Villavicencio. 2003. Dissertação (Mestrado Ciências na Área de Tecnologia Nuclear–Aplicações)–Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo. Disponível em: <http://pelicano.ipen.br/PosG30/TextoCompleto/Simone%20Aquino_M.pdf>. Acesso em: 09 de julho de 2010.

AQUINO, Simone. Avaliação da microbiota fúngica e da presença de micotoxinas em amostras de plantas medicinais irradiadas adquiridas no comércio varejista e atacadista. Orientador: Anna Lúcia C. H. Villavicencio. 2007. 115f. Tese (Doutorado em Tecnologia Nuclear)–Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Autarquia associada à Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007. Disponível em: <http://pelicano.ipen.br/PosG30/TextoCompleto/Simone%20Aquino_D.pdf>. Acesso em: 10 de junho de 2010.

BERNARDI, E.; CALDEIRA, M. F.; NASCIMENTO, J. S. Identificação de fungos filamentosos em erva mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill). *Arquivos do Instituto de Biológico*, São Paulo, v. 72, n. 4, p. 4896493, out./dez., 2005. Disponível em: <http://www.biologico.sp.gov.br/docs/arq/v72_4/bernardi.PDF>. Acesso em: 30 out. 2010.

BORGES, Larissa R. et al. Contagem de Fungos no controle de qualidade da erva mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill) e isolamento de gêneros potencialmente micotoxigênicos. *Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos*, Curitiba, v. 20, n. 1, p. 1036110, jan./jun. 2002.

BRAGA, Sayonara M. L. F. M.; CARDOSO, Maria A. A.; MACÊDO, Cardoso R. O. Micotoxinas em produtos naturais: Alguns aspectos e perspectivas. *Revista Brasileira de Toxicologia*, Paraíba, v. 15, n. 1, p. 53668, 2002.

BRANDÃO, Maria G. L. et al. Qualidade de amostras comerciais de chás de plantas medicinais. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, Botucatu, v. 5, n. 1, 2002. Disponível em: <http://www.ibb.unesp.br/servicos/publicacoes/rbpm/pdf_v5_n1_2002/artigo9_v5_n1.pdf>. Acesso em: 01 jul. de 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria da SVS/MS nº 451 de 19 set. de 1997. Regulamento técnico sobre os princípios gerais para o estabelecimento de critério e padrões microbiológicos para alimentos. *Diário Oficial da União*, Brasília, 2 jul. 1998.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 12 de 2 jan. 2001. Estabelece padrões microbiológicos sanitários para alimentos. Diário Oficial da União, Brasília, 10 jan., p. 4564. 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 48 de 16 de set. 2004. Visa atualizar a normatização do registro de medicamentos fitoterápicos. Diário Oficial da União, Brasília.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 277 de 22 de set. 2005. "Regulamento Técnico para café, cevada, chá, erva mate e produtos solúveis". Diário Oficial da União, Brasília, 29 ago. 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Consulta Pública nº 100, de 21 dez. 2009. Regulamento Técnico sobre Limites Máximos Tolerados (LMT) de Micotoxinas em Alimentos. Diário Oficial da União, Brasília, 22 de dez. 2009.

BUGNO, Adriana. Drogas vegetais: Avaliação da contaminação microbiana e pesquisa de aflatoxinas, ocratoxina A e citrina. Orientador: Terezinha de Jesus Andreoli Pinto. 2006. 174f. Tese (Doutorado em Produção e Controle Farmacêutico) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9139/tde6250820086101633/>>. Acesso em: 01 de jul de 2010.

BUGNO, Adriana et al. Avaliação da contaminação microbiana em drogas vegetais. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, São Paulo, v. 41, n. 4, p. Out./Dez. 2005.

BUGNO, Adriana et al. Occurrence of toxigenic fungi in herbal drugs. Brazilian Journal of Microbiology, São Paulo, n. 1, v. 37, p. 47651, 2006.

CALDAS, Eloisa D.; SILVA, Saulo C.; OLIVEIRA, João N. Aflatoxina e ocratoxina A em alimentos e riscos para a saúde humana. Revista de Saúde Pública, Distrito Federal, v. 36, n. 3, p. 3196323, mar. 2002.

CARVALHO, Suzana et al. Contaminação fúngica em chás de camomila, erva doce e erva mate. Revista Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, v. 68n, 1, p. 91695, 2009.

CARVALHO, C. A.; FERNANDES, B. C. T. M.; FREIRE, R. B. Supressão da resposta imunitária humoral causada pela citrinina. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, Rio de Janeiro, v. 57, n. 2, p. 1716176, 2005.

CELLI, Marcos G. et al. Patulina: incidência e controle em derivados de maçã. Semina: Ciências Agrárias, Londrina, v. 30, n. 1, p. 1356168, jan./mar. 2009.

CHIMIN, Ariane et al. Avaliação da qualidade de amostras comerciais de *Maytenus ilicifolia* (espinaheira santa) comercializadas no Estado do Paraná. Latin American Journal of Pharmacy, Maringá, v. 27, n. 4, p. 5916597, 2008.

De IONGH, H. et al. Investigation of the factor in groundnut meals responsible for "turkeyX disease". *Biochimica Biophysica Acta*, v.65, p.5486551, dez.1962.

DOCTORFUNGOS. Desenvolvido por Doctorfungos e Webillustrated, 2007.

Apresenta banco de imagens de estruturas fúngicas. Disponível em: <

<http://www.doctorfungus.org/>>. Acesso em: 01 dez. de 2010.

EHRENBERG, C. G. *Nova Acta Academiae Caesareae Leopoldino6 Carolinae Germanicae Naturae Curiosorum* 10: 198. 1820. Disponível em:

<<http://www.mycobank.com/MycoTaxo.aspx?Link=T&Rec=20487>>. Acesso em 05

dez. de 2010.

FARMACOPÉIA Brasileira. 4.ed. São Paulo: Atheneu, 1988, Parte 1. p.V.5.1.6.61–

V.5.1.7.66.

FERREIRA, Helder et al. Aflatoxinas: um risco à saúde humana e animal. *Revista do Centro de Ciência Agrárias e Ambientais, Paraná*, v.2, n.1, jan./jun.2006.

FREIRE, Francisco C.O. et al. Micotoxinas: Importância na alimentação e saúde

humana e animal. Embrapa Agroindústria Tropic, Fortaleza, documentos 110,

2007. ISSN 167761915. Disponível em: <http://www.cnpat.embrapa.br/cnpat/cd/jss/acervo/Dc_110.pdf>. Acesso em: 15 de jul de 2010.

FUJII, Simone; ONO, Elisabete, Y. S.; HIROOKA, Elisa Y. Ocratoxina A em café: controle e metodologia analítica com ênfase a inovação no contexto de segurança alimentar. *Ciências Agrárias, Londrina*, v.23, n.2, p.2736292, jul./dez.2002.

FUJII, Simone; GARCIA, Lourdes B.; HIROOKA, Elisa Y. Metodologia analítica imunoquímica com ênfase na detecção de micotoxinas – Ficotoxinas no sistema agroalimentar. *Alim. Nutr. Araraquara*, v.15, n.3, p.2736284.2004.

FUNGARO, Maria H. P. PCR na micologia: diagnóstico e análise de variabilidade.

Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento, Londrina, ano III, n.14, 2000. Disponível

em: <<http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio14/pcrnamicologia.pdf>>. Acesso em: 18 out. 2010.

FURLANETO, Luciana; MARINS, Vanessa D.; ENDO, Rosane. Qualidade

microbiológica de drogas vegetais comercializadas nas ruas da cidade de Londrina/PR e de seus infusos. *Saúde em Revista, Piracicaba*, v. 5, n. 10, p.49652, 2003.

Disponível em: <<http://www.unimep.br/phpg/editora/revistaspdf/saude10art07.pdf>>.

Acesso em: 01 de ago. de 2010.

GEISEN, R. (1998). PCR Methods for the detection of mycotoxin producing fungi.

In: Bridge P.D., Arora, D.K., Reddy, C.A., Elander, R.P. ed. *Applications of PCR in Mycology*, CAB International, New York, p.2436266.

GOMES, Eliane G.; NEGRELLE, Raquel R.B.; ELPO, Eliane R.S. Determinação da qualidade microbiológica e físico-química de chás de *Cymbopogon citratus* (D.C)

Stapf (capim-limão). *Acta Scientiarum. Health Science, Maringá*, v.30, n.1, p.47654, 2008.

Disponível

em:

<<http://periodicos.uem.br/ojs/index.php/ActaSciHealthSci/article/viewFile/4396/3096>>
.Acessoem:14deset.de2010.

JARDIM, Andréia N. O.; CALDAS, Eloisa D. Exposição humana a substâncias químicas potencialmentetóxicas na dieta eos riscospara a saúde.Química Nova, SãoPaulo,v.32,n.7,p.189861909,2009.

JUNIOR, Valdir F.; PINTO, Angelo C. Plantas medicinais: cura segura? Química Nova, SãoPaulo,v.28,n.3,p.5196528,Mai./Jun.2005.

LIMA, Juliana D. et al. Chá: aspectos relacionados à qualidade e perspectivas. Ciência Rural,SantaMaria,v.39,n.4,p.127061278,Jul.2009.

LINK,H.F.MagazinderGesellschaftNaturforschendenFreundeBerlin3:16.1809.
Disponível em: <<http://www.mycobank.com/MycoTaxo.aspx?Link=T&Rec=9257>>.
Acessoem:11out.de2010.

LINK,H.F.MagazinderGesellschaftNaturforschendenFreundeBerlin8:37.1816.
Disponível em: <<http://www.mycobank.com/MycoTaxo.aspx?Link=T&Rec=7681>>.
Acessoem:11out.de2010.

MANDIGAN, Michael T. et al. Microbiologia de Brock. 12. ed. São Paulo: Artmed, 2010.46p.

MEIRELLES, Paula G. et al. Imunoensaios: uma alternativa para a detecção de fungostoxigênicosemalimentos.Semina: Ciências Agrárias,Londrina,v.27,n.4,p. 6176628,out./dez.2006.

MYCOBANK. Desenvolvido por Mycobank,2004.Apresenta pesquisas científicase bancodeimagensdefungos.Disponívelem:<<http://www.mycobank.com/>>.Acesso em:10dez.2010.

MICHELI, P.; HALLER, A. Historia stirpium indigenarum Helvetiae inchoata: 113. 1768. Disponível em:<<http://www.mycobank.com/MycoTaxo.aspx?Link=T&Rec=7248>>.Acessoem:11out. de2010.

MINAMI, Luciana et al. Fumonisinás: efeitos toxicológicos, mecanismo de ação e biomarcadoresparaavaliaçãodaexposição.Semina: Ciências Agrárias,Londrina,v. 35,n.3,p.2076224.Jul./Set.2004.

MULLIS, Kary B.; FALOONA, Fred A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase6catalysed chain reaction. Methods in Enzymology. v. 155, p. 3356350. 1987.

OLIVEIRA,MarizeS.et al.IncidênciadeAflatoxinas,DesoxinivalenoleZearalenona emprodutoscomercializadosemidadesdoestadodeMinasGeraisnoperíodode 1998–2000.Revista do Instituto Adolfo Lutz, v.60,n.2,p.1296134,2002.

OLIVEIRA, Renata C.; BANDO, Érika; JUNIOR, Miguel M. Intralaboratory optimization and validation of a method for patulin determination in grapes by thin layer chromatography. *Brazilian Journal of Microbiology*, Paraná, v. 38, p. 3046308, 2007.

OLIVEIRA, Tatiana R. et al. Maize (*Zea Mays* L.) landraces from the southern region of Brazil: Contamination by *Fusarium* sp, zearalenone, physical and mechanical characteristics of the kernels. *Brazilian Archive of Biology And Technology*, Curitiba, v. 52, n. special, p. 165, nov. 2009.

ONO, Elisabete Y. S. O. et al. Micotoxinas em alimentos: Progressos na imunodeteção. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, Brasília, n. 32, 2004. Disponível em: <http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio32/micotoxinas_32.pdf>. Acesso em: 20 de jul de 2010.

POZZI, Claudia, R. et al. Aspectos relacionados à ocorrência e mecanismo de ação de fumonisinas. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 32, n. 5, p. 9016907, 2002.

PRADO, Guilherme et al. Efeito da irradiação na microbiota fúngica de plantas medicinais. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v. 33, n. 5, p. 137261378, set./out. 2009.

PubMed—U.A—National Library of Medicine. Desenvolvido pelo National Center for Biotechnology Information, 1996. Permite acesso online a base de dados das pesquisas bibliográficas de referências de artigos médicos. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>>. Acesso em: 29 set. 2010.

RINDDELL, Roland W. Permanent stained mycological preparations obtained by slide culture. *Mycologia*, v. 42, p. 2656270. 1950.

ROCHA, Lílíana O.; SOARES, Maria M. S. R.; CORRÊA, Cristiana L. Análise da contaminação fúngica em amostras de *Cassia acutifolia* Delile (sene) e *Peumus boldus* (Molina) Lyons (boldo do Chile) comercializadas na cidade de Campinas, Brasil. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, Campinas, v. 40, n. 4, p. 5216 527, out./dez. 2004.

RUSSOMANNO, O. M. R. et al. Ocorrência de fungos em chás comercializados (Resumo). *Summa Phytopathologica*, v. 30, n. 1, 2004.

SASSAHARA, Marcia; YANAKA, Erika K.; NETTO, Daisy P. Ocorrência de aflatoxina e zearalenona em alimentos destinados a o gado leiteiro na Região Norte do Estado do Paraná. *Ciências Agrárias*, Londrina, v. 24, n. 1, p. 63672, jan./jun. 2003.

SEKIYAMA, Beatriz L. et al. Aflatoxins, ochratoxin, and zearalenone in maize based food products. *Brazilian Journal Microbiology*, São Paulo, v. 36, n. 3, p. 2896 294, jul./set. 2005. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/bjm/v36n3/arq16.pdf>>. Acesso em: 10 ago. 2010.

SIDRIM, José J. C.; ROCHA, Marcos F. G. *Micologia médica à luz de autores contemporâneos*. 1. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., p. 83686. 2004.

SILVEIRA, Francisco J. F.; LAMOUNIER, Joel A. Prevalência do aleitamento materno e práticas de alimentação complementar em crianças com até 24 meses de idade na região do Alto Jequitinhonha, Minas Gerais. *Revista de Nutrição*, Campinas, v. 17, n. 4, p. 437-447. Out./dez. 2004.

SOUZA, Rodrigo A. M. Potencial antioxidante e fenólico de infusões de ervas consumidas no Brasil. 2007. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, São Paulo. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11141/tde6080820076165038/publico/RodrigoSouza.pdf>>. Acesso em: 13 set. de 2010.

SEMINÁRIO APLICADOS, 2009, Goiânia, Cromatografia líquida de alta eficiência: Revisão literária. Goiânia: Universidade Federal de Goiânia, 2009. Disponível em: <http://www.ufg.br/this2/uploads/files/66/Andrea_Cintra.pdf>. Acesso em: 13 out. 2010.

THE UNITED STATES Pharmacopeia. 28. ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2005. 3013p.

THORNTON, Christopher R. et al. Production of a monoclonal antibody specific to the genus *Trichoderma* and closely related fungi, and its use to detect *Trichoderma* spp. in naturally infested compost. *Microbiology*, Reading, v. 148, p. 1263-1279, 2002.

TORRES, Andréia C. B. Cromatografia de alta eficiência: Revisão da Literatura. Orientadora: Rosângela de Oliveira Alves. 2009. 36f. Seminário apresentado junto à disciplina Seminário Aplicados do Programa de Pós-Graduação (Doutorado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás, Goiás, 2009. Disponível em: http://www.ufg.br/this2/uploads/files/66/Andrea_Cintra.pdf. Acesso em: 8 de dez. 2010.

VALENTE, A.L.P.; COLLINS, C.H.; MANFREDI, J.E. Conceitos básicos de cromatografia líquida de alta eficiência. *Química Nova*, São Paulo, v. 6, n. 3, p. 1036-1039, jul. 1983.

VECCHIA, Andréia D.; FORTES, Raquel C. Contaminação fúngica em granola comercial. *Ciência e Tecnologia dos Alimentos*, Campinas, v. 27, n. 2, p. 324-327, abr./jun. 2007.

VULCANO, Irma R. C.; SILVEIRA, Josianne N.; LEITE, Edna M. A. Teores de chumbo e cádmio em chás comercializados na região metropolitana de Belo Horizonte. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, São Paulo, v. 44, n. 3, p. 425-431, Jul./Set. 2008.

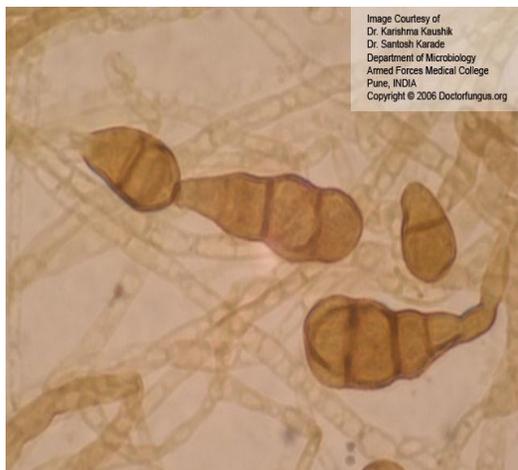
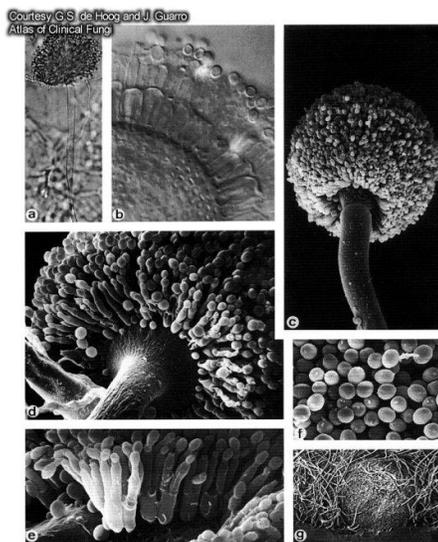
WELKE, Juliana E. et al. Ocorrência, aspectos toxicológicos, métodos analíticos e controle da patulina em alimentos. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 39, n. 1, p. 300-308, jan./fev. 2009a.

WELKE, Juliana E.; HOELTZ, Michele; NOLL, Isa B. Aspectos relacionados à presença de fungos toxigênicos em uvas e ocratoxina A em vinhos. *Ciência Rural*, RioGrandedoSul, v.39, n.8, p.256762575, nov.2009b.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Quality control methods for medicinal plant materials. Geneva, 1998. 115p.

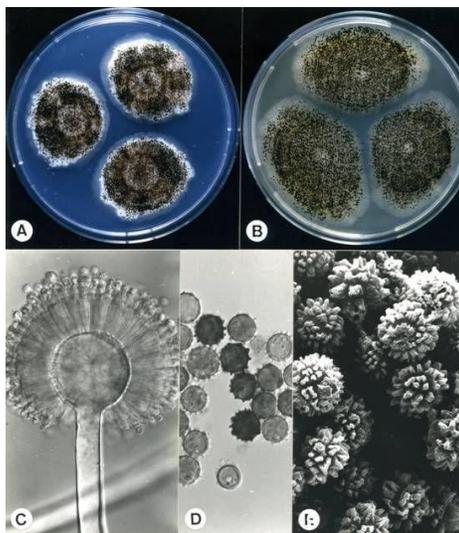
ANEXOS

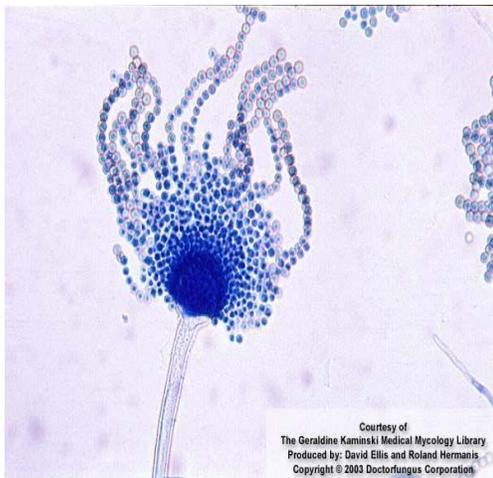
Prancha de Imagens:

*Aspergillus alternata*Fonte: <<http://www.doctorfungus.org>>

Aspergillus alliaceus, IMI 87209. a-c. Conidiophores and conidia. g. sclerotia. a. x512; b. x1600; c. x1030; d. x2050; e. x3100; f. x3300; g. x355.

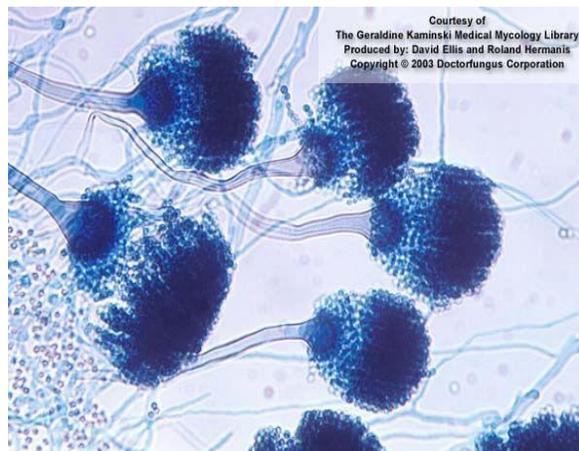
401

*Aspergillus alliaceus*Fonte: <<http://www.doctorfungus.org>>*Aspergillus auricomus*Fonte: <<http://www.hear.org>>*Aspergillus carbonarius*Fonte: <<http://www.doctorfungus.org>>



Aspergillus flavus

Fonte: <<http://www.doctorfungus.org>>



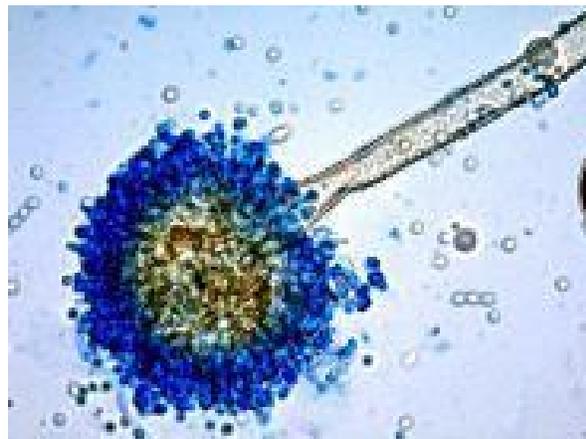
Aspergillus fumigatus

Fonte: <<http://www.doctorfungus.org>>



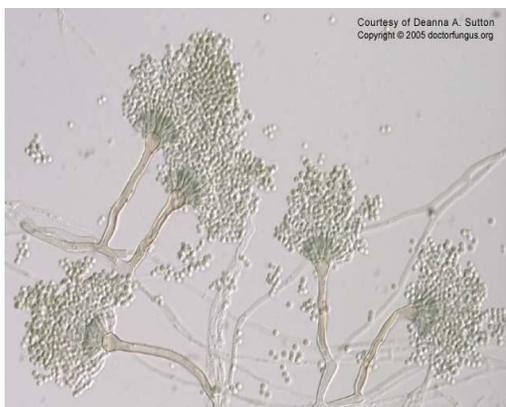
Aspergillus glaucus

Fonte: <<http://www.doctorfungus.org>>



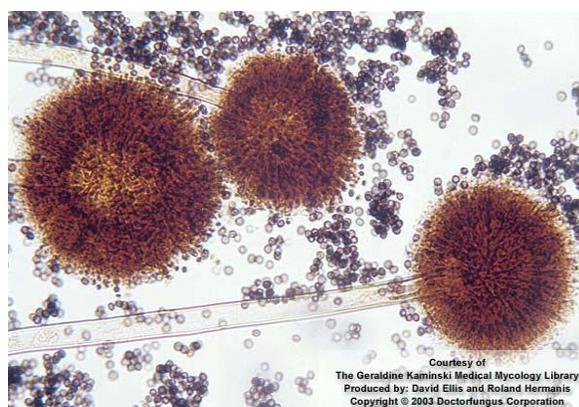
Aspergillus melleus

Fonte: <<http://www.schimmel6schimmelpilze.de>>



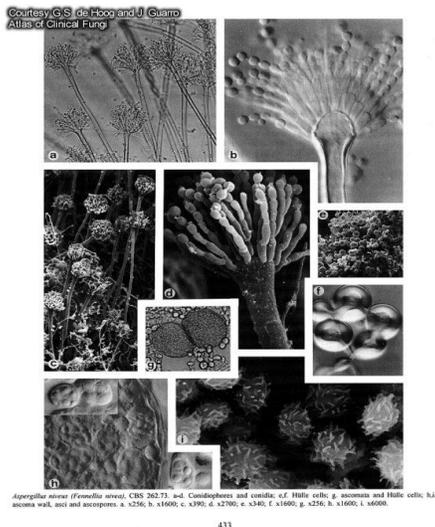
Aspergillus nidulans

Fonte: <<http://www.doctorfungus.org>>

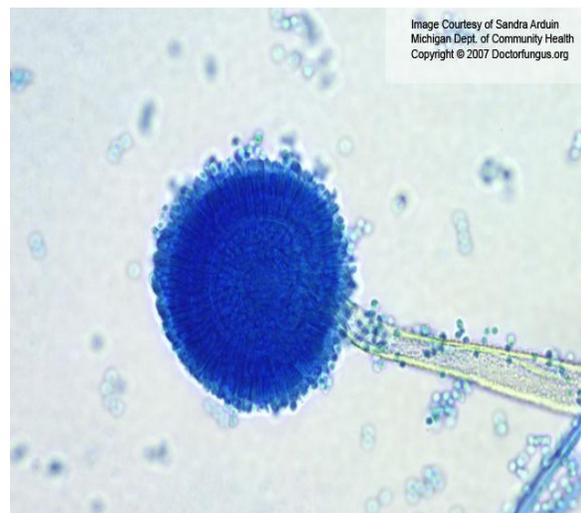


Aspergillus niger

Fonte: <<http://www.doctorfungus.org>>



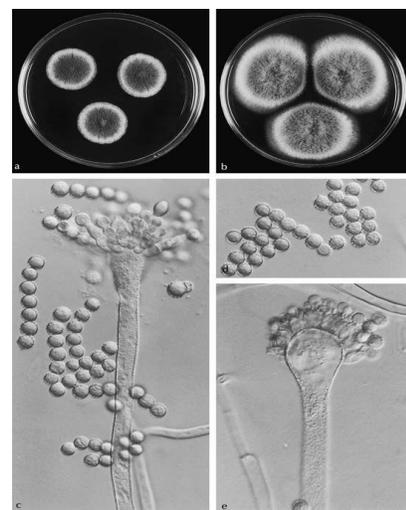
Aspergillus niger
Fonte: <<http://www.doctorfungus.org>>



Aspergillus ochraceus
Fonte: <<http://www.doctorfungus.org>>



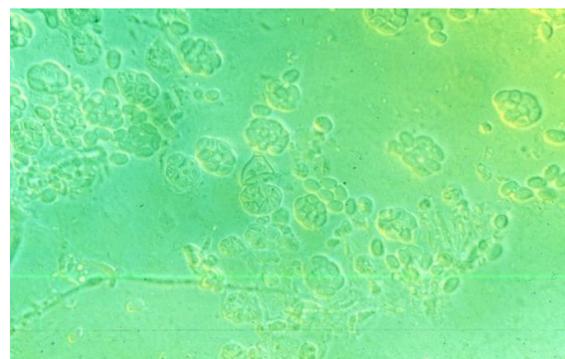
Aspergillus oryzae
Fonte: <<http://www.doctorfungus.org>>



Aspergillus parasiticus
Fonte: <<http://www.doctorfungus.org>>



Aspergillus terreus
Fonte: <<http://www.doctorfungus.org>>

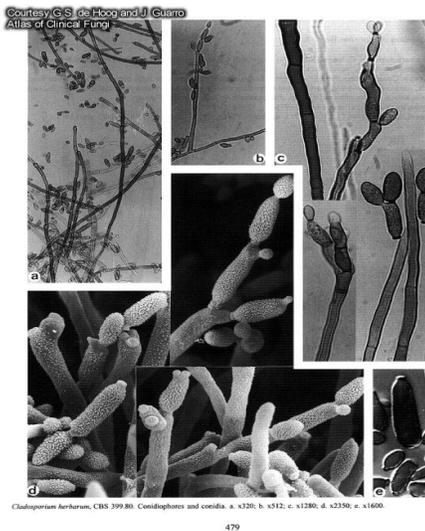


Byssoschlamys sp.
Fonte: <<http://www.flickr.com>>



Cladosporium cladosporioides

Fonte: <<http://www.doctorfungus.org>>



Cladosporium herbarum

Fonte: <<http://www.doctorfungus.org>>



Fusarium culmorum

Fonte: <<http://www.mycobank.org>>



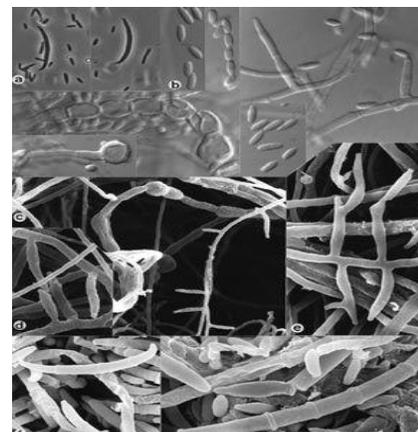
Fusarium equiseti

Fonte: <<http://www.andaluciainvestiga.com>>



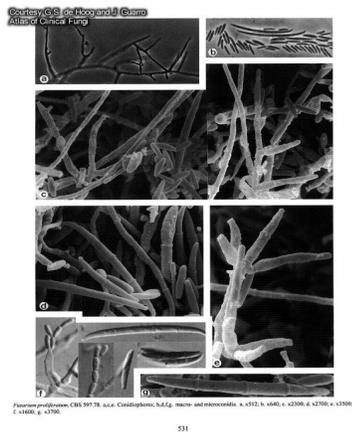
Fusarium graminearum

Fonte: <<http://www.agnet.org/library/bc/54012/>>



Fusarium nygamai

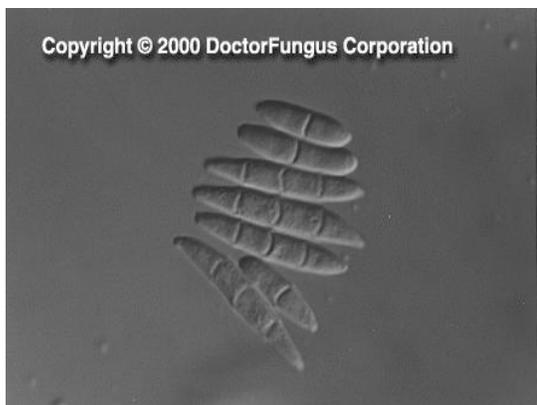
Fonte: <<http://www.mycobank.org>>



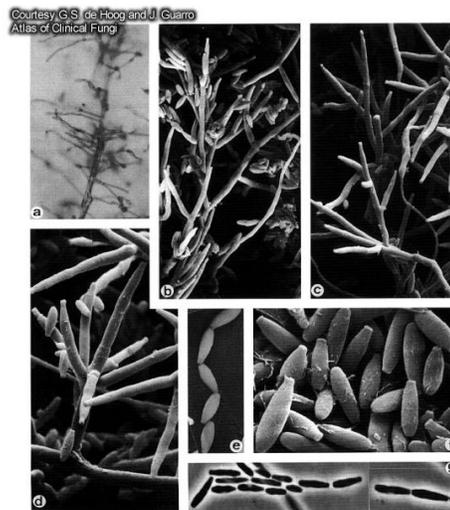
Fusarium proliferatum
 Fonte: <<http://www.doctorfungus.org>>



Fusarium crookwellense
 Fonte: <<http://www.grainscanada.gc>>



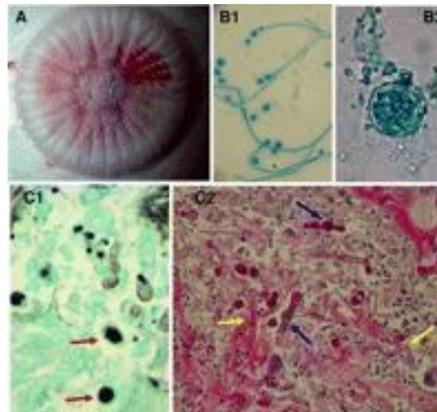
Fusarium spp
 Fonte: <<http://www.doctorfungus.org>>



Fusarium verticillioides
 Fonte: <<http://www.doctorfungus.org>>



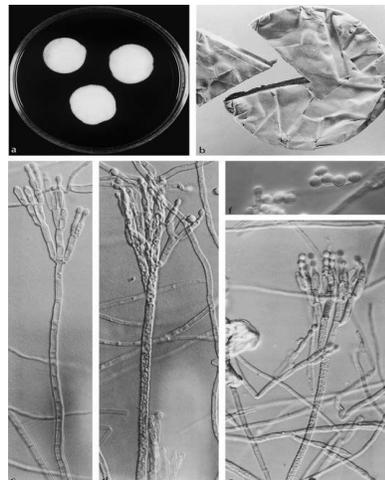
Monascus purpureus
 7 dní kultivace na širobovém agaru
 Fonte: <<http://www.technoinhome.com>>



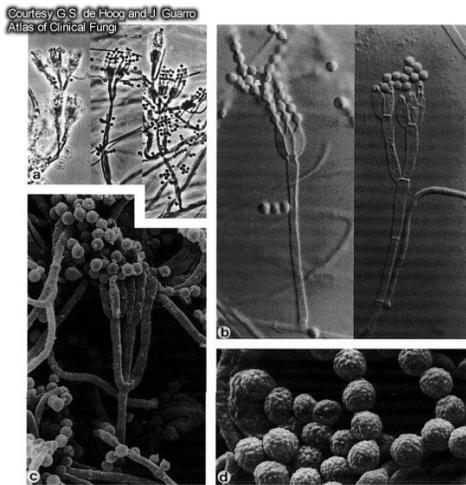
Monascus ruber
 Fonte: <<http://journals.asm.org/cgi/figsearch>>



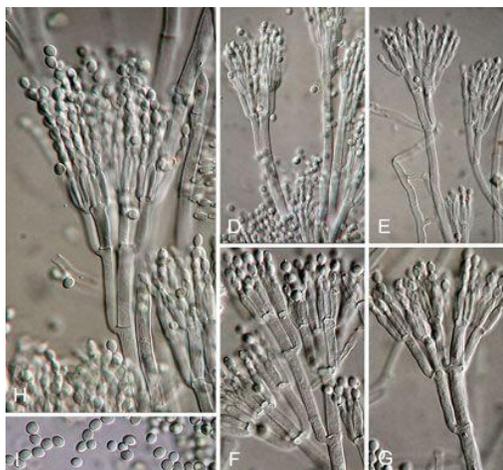
Mucor spp
Fonte: <<http://www.doctorfungus.org>>



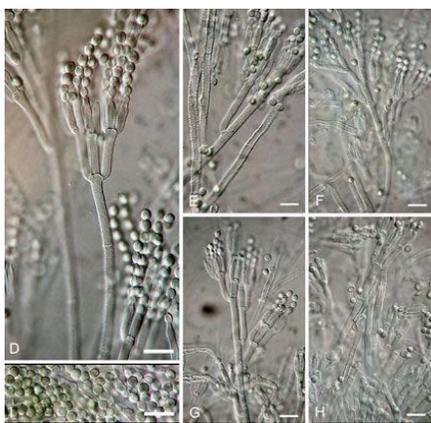
Penicillium camemberti
Fonte: <<http://www.mycobank.org>>



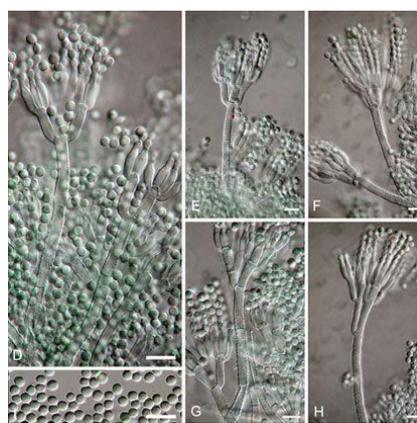
Penicillium citrinum
Fonte: <<http://www.doctorfungus.org>>



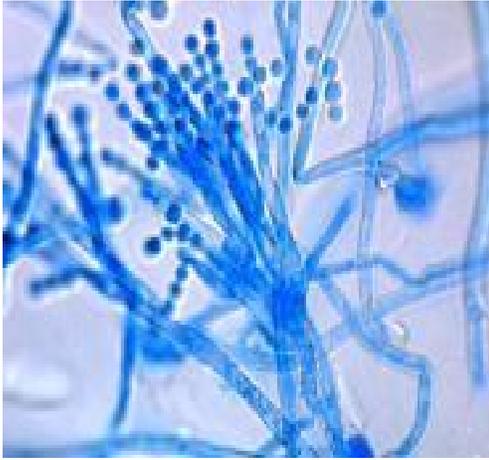
Penicillium expansum
Fonte: <<http://www.mycobank.org>>



Penicillium nordium
Fonte: <<http://www.mycobank.org>>

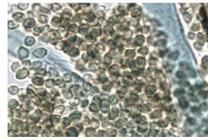


Penicillium verrucosum
Fonte: <<http://www.mycobank.org>>



Penicillium viridicatum

Fonte: <<http://www.schimmel6schimmelpilze.de>>



Rhizopus arrhizus

Rhizopus microsporus

Fonte: <<http://www.doctorfungus.org>>

