

IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS TOXICOGÊNICOS PRODUTORES DE AFLATOXINAS E OCRATOXINA EM PLANTAS MEDICINAIS COMERCIALIZADAS NA FEIRA VER-O-PESO NA CIDADE DE BELÉM DO PARÁ

Margareth Tavares SILVA

SILVA, Margareth Tavares. **Identificação de fungos toxicogênicos produtores de aflatoxinas e ocratoxina em plantas medicinais comercializadas na feira Ver-o-Peso na cidade de Belém do Pará.** Projeto de investigação científica do Curso de Farmácia – Centro Universitário Fibra, Belém, 2017.

As doenças veiculadas por alimentos continuam sendo uma das principais causas de mortalidade nos países da América Latina e Caribe. No Brasil, as doenças infecciosas, parasitárias e do aparelho digestivo corresponderam a 9,2% do total de casos de mortalidade, sendo as regiões Norte e Nordeste as mais afetadas. Diante da preocupação com a qualidade das plantas medicinais utilizadas para a produção de chás, o objetivo desta pesquisa foi verificar a presença de fungos toxicogênicos e não toxicogênicos produtores de aflatoxinas e ocratoxinas, em plantas medicinais comercializadas na feira Ver-o-Peso, na cidade de Belém do Pará. Apesar do grande desenvolvimento da síntese

orgânica e dos processos biotecnológicos, cerca de 25 % dos medicamentos prescritos nos países industrializados são originários de plantas, oriundos de nada mais do que 90 espécies, na utilização na terapia moderna. A utilização das plantas medicinais para o preparo dos chás merece atenção, devido ao seu uso frequente e disseminado pela população em geral (CRUZ *et al.*, 2015). Durante os últimos 20 anos, os fármacos de origem natural que apareceram no mercado são quase que, na totalidade, oriundos das pesquisas científicas de países como China, Coréia e Japão (FOGLIO *et al.*, 2006; MONTAGNER *et al.*, 2010). Em função da origem da planta, diversos tipos de microrganismos podem estar presentes, desde bactérias até fungos, tendo como possíveis fontes de contaminação a poluição na água de irrigação, na atmosfera, no solo, nas condições da coleta, na manipulação, na secagem e na estocagem. No Brasil, segundo a RDC nº 48, os limites para contaminação fúngica de drogas vegetais não foram mantidos e o controle da qualidade de drogas vegetais deve estar de acordo com a referência bibliográfica da Farmacopeia consultada e reconhecida pela ANVISA (AQUINO *et al.*, 2007). O interesse com a segurança dos produtos

naturais é devido, em parte, à possível presença de bactérias patogênicas e fungos toxigênicos produtores de micotoxinas (ROCHA *et al.*, 2004). As micotoxinas mais importantes são as aflatoxinas (*Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*), fusariotoxinas (*Fusarium* spp) e ocratoxinas (*Aspergillus alutaceus*, e algumas espécies de *Penicillium*). Para micotoxicoses humanas, as aflatoxinas e ocratoxinas são consideradas potencialmente carcinogênicas e as fusariotoxinas são de considerável importância, podendo causar riscos à saúde humana e animal (BRASIL, 2002). Investigações da qualidade microbiológica de drogas vegetais e produtos delas obtidos, realizadas em outros países, mostraram índices de contaminação microbiana em desacordo com normas internacionais. No Brasil, avaliações de fitoterápicos comercializados em farmácias apresentaram resultados semelhantes. Os fungos produzem uma grande variedade de produtos naturais, muitas vezes chamados de metabólitos secundários. Alguns desses metabólitos são tóxicos, por exemplo, micotoxinas, enquanto outros são benéficos como os antibióticos (CALVO *et al.*, 2002). Essas toxinas, dependendo do substrato, podem crescer na presença de organismos

competitivos e do teor de umidade. Há evidências de plantas medicinais contaminadas com fungos toxigênicos, pois certos componentes são suscetíveis à transformação química quando contaminados por micro-organismos, levando a uma maior atividade enzimática, transformando alguns dos componentes em outros metabólitos não inicialmente presentes na planta medicinal (FREIRE *et al.*, 2008). Segundo a *International Agency for Research on Cancer*, as aflatoxinas pertencem ao Grupo 1 – carcinogênica; enquanto a ocratoxina A é classificada no Grupo 2b – possivelmente carcinogênica. As aflatoxinas são termorresistentes (>250°C); porém radiação com UV transforma aflatoxina B1 em aflatoxina B2, que é menos tóxica (AQUINO *et al.*, 2007). O efeito agudo dessas toxinas é resultante das ingestões de doses geralmente muito elevadas, e de manifestação e percepção rápidas, podendo levar o animal à morte. O subagudo é o resultado da ingestão de doses não elevadas, que provoca distúrbios e alterações nos órgãos do homem e dos animais (uns mais susceptíveis que outros), dependendo da idade (os mais jovens são mais afetados), do estado nutricional e, também, do sexo (AQUINO *et al.*, 2007; FREIRE *et al.*, 2008). Além disso,

os produtos do seu metabolismo, no organismo, interferem com o sistema imunológico do homem ou animal, diminuindo a resistência imunológica (MELO *et. al.*, 2010). As amostras foram moídas e colocadas em sacos de polietileno envoltos em sacos de papel de 10g para análise da microbiota fúngica e 50g para a determinação de aflatoxinas e ocratoxina (em duplicata). As amostras foram pesadas e alíquotas de 10g e colocadas em frascos de vidro contendo 90mL de água destilada estéril, agitadas por 30 minutos e alíquotas de 1,0mL, repassadas em diluições seriadas de 10^{-1} a 10^{-10} , em tubos de ensaio estéreis. Uma fração de 0,1mL foi semeada superficialmente, em placas de petri (em duplicata) contendo ágar sabourad dextrose e ágar batata, posteriormente, incubadas por 7 dias na temperatura de 25°C em estufa. Por meio do aspecto macromorfológico da colônia, foi possível sugerir o gênero presente na cultura. Os estudos macroscópicos foram baseados nas características: tamanho, bordas, textura, relevo (no verso e reverso da colônia) e pigmentação. Foi colocada sobre uma lâmina uma alíquota retirada da cultura. Posteriormente, esta foi colocada sobre uma gota de lactofenol, e homogeneizada

e coberta por lamínula. Depois foi examinada ao microscópio, nas objetivas de 10 e 40 vezes. Essa técnica teve a finalidade de visualizar micélio vegetativo e reprodutor de fungos filamentosos, como também as características das células vegetativas e reprodutoras por brotamento de leveduras. Em um elermeyer contendo 50 g de amostra, foram adicionados 270 mL de metanol e 30mL de solução de cloreto de potássio (KCl 4%). Após agitação de 30 minutos, o conteúdo do frasco foi filtrado em papel de filtro e uma alíquota de 150mL foi retirada e transferida para um béquer de 600mL. Foi adicionada uma alíquota 150mL de solução de sulfato de cobre a 10% e 5g de celite. A suspensão foi filtrada e, dessa, foram transferidos 150mL para funil de separação e, adicionados 150mL de água e 20mL de clorofórmio. A mistura foi agitada e, após separação da fase, a camada inferior, a clorofórmica, foi extraída. Foram adicionados, novamente, 20mL de clorofórmio. A mistura foi agitada e, após a separação das fases, a camada orgânica foi extraída. O filtrado, então, foi evaporado até atingir a secura em banho-maria a 80°C, em capela de segurança química. No estudo, os preceitos éticos foram respeitados. Os resultados foram expressos usando como

suporte dos programas Microsoft Word e Excel 2016. Identificamos as plantas mais usadas na feira assim como as suas funções. Todas as informações foram passadas pelas erveiras responsáveis pela venda. Após o preparo das amostras, fez-se o macrocultivo usando a técnica spread plate (cultivo de micro-organismo em superfície), assim como o microcultivo, sendo observadas as estruturas no microscópio. As amostras cultivadas no isolamento de micro-organismos para um melhor resultado no método de microcultivo, após o período de incubação, apresentaram resultados positivos e negativos. Quanto ao isolamento e identificação dos fungos toxicogênicos das 21 amostras analisadas, 7 (33%) corresponderam ao gênero *Aspergillus* e 3 (14%) corresponderam ao gênero *Penicillium*, o que não se enquadra nos achados de Aquino (2007), que encontrou que 24,42% para *penicillium* e 18,81% para *penicillium*. Quanto à presença das micotoxinas, 100% foram negativas tanto para Aflatoxinas quanto para Ocratoxinas, o que corrobora com os resultados achados por Aquino (2007). Quanto à validação da CCD, a fase móvel que teve maior afinidade pelas toxinas em estudo foi a que contém metanol devido ao arraste ter ocorrido por uma

distância maior. Quanto à presença de *Aspergillus* e *Penicillium*, foi detectada a presença desses como contaminantes, servindo de alerta quanto à qualidade microbiológica, entretanto, quando analisamos a presença de toxinas que são produzidas por esses fungos, 100% das amostras foram negativas tanto para aflatoxinas como para ocratoxinas. Quanto à validação da CCD, a fase móvel que apresentou maior afinidade com as toxinas foi a fase que contém o metanol e o método de extração aderido foi o em que o clorofórmio é o líquido extrator. A farmacopeia apresenta especificações (níveis permitidos de microrganismos) adequadas para verificação da qualidade de drogas vegetais e suas preparações derivadas. Em estudos de amostras de plantas nativas e exóticas, obtidas por extrativismo e cultivo, na grande maioria, os resultados indicaram altos níveis de contaminação microbiana (saprofita ou patogênica) e baixos teores de princípios ativos. A qualidade do produto comercializado ainda é baixa. Entre os microrganismos de importância médico-sanitária, potencialmente presentes nas plantas medicinais disponíveis à população, sejam elas industrializadas ou não, estão as bactérias aeróbias mesófilas, a *Escherichia*

coli, *Staphylococcus aureus* e fungos produtores de micotoxinas. A legislação brasileira traz, por meio da RDC nº 7 de 2011, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), os limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos, porém essa legislação não contempla as plantas medicinais tradicionalmente utilizadas no país. Dentre os valores estipulados pela RDC, o maior limite tolerável para micotoxinas que se tem com relação às Aflatoxinas Totais (AT = B1, B2, G1, G2) é de 20µg/kg (PPB). Pôde-se concluir que as amostras apresentaram fungos toxicogênicos e não toxicogênicos, o que representa um risco à saúde dos consumidores; nas plantas, não foi detectada a presença de aflatoxinas pelo método de CCD. Sugere-se, a partir desses resultados, a realização de um estudo quantitativo mais amplo e com métodos mais sensíveis (HPLC), com mais amostras e repetições.

PALAVRAS-CHAVE: Fungos toxicogênicos. Aflatoxinas e Ocratoxina. Ver-o-Peso, Belém do Pará.

REFERÊNCIAS

AQUINO, S.; GONZALEZ, E.; ROSSI, M.H.; DARTORA, M.M.P.A.; SILVA, P.V.; CORRÊA, B.; VILLAVIVÊNCIO, A.L.C.; **Efeitos da radiação gama na contaminação fúngica de espinheira santa (*Maytenus ilicifolia*)**. Reunião Anual do Instituto Biológico 2007; 72(2); 71.

BRASIL. ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução N°274 de 15 de Outubro de 2002. **Regulamento técnico Mercosul sobre limites máximos de aflatoxinas admissíveis no leite, no amendoim e no milho**. Publicada no DOU – Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 16 de Out. de 2002.

BRASIL. ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC N°48, de 16 de Março de 2004. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Publicada no DOU – Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 18 de Março de 2004.

CALVO, A.M., Wilson, R.A., Bok, J.W., Keller, N.P. 2002. Relationship between secondarymetabolismo and fungal development. *Microbiology Molecular Biology Rewiews* 66(3): 447-459.

CRUZ M. T.; ALVIM, M. N. Fitoterápicos: estudos com plantas para fins terapêutico e medicinal, **Statewide Agricultural Land Use Baseline**, v. 1, 2015.

FOGLIO, Mary Ann *et al*, Plantas Medicinais como Fonte de Recursos Terapêuticos: Um Modelo Multidisciplinar, **MultiCiências**, v. 7, n. 1, p. 1–8, 2006.

FREIRE, F.C.O., Vieira, I.G.P., Guedes, M.I.F., Mendes, F.N.P. 2008. Micotoxinas: importância na alimentação e na saúde humana e animal. *Embrapa Agroindústria Tropical*. Disponível em: <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc/427374>> Acesso em: 23 janeiro, 2017.

MELO, J.G., Martins, J.D.G.R., Amorim, E.L.C., Albuquerque, U.P. 2007. Qualidade de produtos a base de plantas medicinais comercializadas no Brasil: castanha-da-índia (*Aesculus hippocastanum* L), capim-limão (*Cymbogon citratus* (DC) Stapf) e centela (*Centella asiatica* (L.) Urban). *Acta Botanica Brasilica*. 21(1): 27-36. Online. Disponível em:<>. Acesso em: 13 de janeiro. 2017.

MONTAGNER, S.; COSTA, A., Diretrizes modernas no tratamento da acne vulgar: Da abordagem inicial à manutenção dos benefícios clínicos, **Surgical and Cosmetic Dermatology**, v. 2, n. 3, p. 205–213, 2010.

ROCHA, L. O.; SOARES, M. M. S. R.; CORRÊA, C. 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.** *Braz. J. Pharm. Sci.* v. 40, n. 4, p. 522-523, 2004.