

**UFRRJ  
INSTITUTO DE VETERINÁRIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA  
VETERINÁRIA**

**DISSERTAÇÃO**

**VERIFICAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE EXTRATOS  
AQUOSOS DE *Cymbopogon citratus*, *Peumus boldus* e *Shinus  
terebinthifolia* SOBRE CINCO ESPÉCIES DE FUNGOS DO GÊNERO  
*Aspergillus***

**Alexander Santos**

**2008**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE VETERINÁRIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA  
VETERINÁRIA**

**ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE EXTRATOS AQUOSOS DE  
*Cymbopogon citratus*, *Peumus boldus* e *Shinus terebinthifolia* SOBRE  
CINCO ESPÉCIES DE FUNGOS DO GÊNERO *Aspergillus***

**ALEXANDER SANTOS**

Sob a orientação do Professor  
**Dr. Hélcio Resende Borba**

Dissertação submetida como requisito  
parcial para obtenção do grau de  
**Mestre em Microbiologia Veterinária**,  
no Curso de Pós-Graduação em  
Microbiologia Veterinária

Seropédica, RJ  
Março de 2008

579.5657

S237v

T

Santos, Alexander, 1972-

Verificação da atividade antifúngica de extratos aquosos de *Cymbopogon citratus*, *Peumus boldus* e *Shinus terebinthifolia* sobre cinco espécies de fungos do gênero *Aspergillus* / Alexander Santos - 2008.

55f. : il.

Orientador: Hércio Resende Borba.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Microbiologia Veterinária.

Bibliografia: f. 40-46.

1. *Aspergillus* - Teses. 2. Microbiologia veterinária - Teses. 3. Plantas - Efeito dos fungicidas - Teses. I. Borba, Hércio Resende, 1954-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Microbiologia veterinária. III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE VETERINÁRIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA VETERINÁRIA

ALEXANDER SANTOS

Dissertação submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Microbiologia Veterinária** no Curso de Pós-Graduação em Microbiologia Veterinária

DISSERTAÇÃO APROVADA EM \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_

---

Hélcio Resende Borba, Ph. D. – UFRRJ  
Orientador

---

Cíntia de Moraes Borba, Ph. D. – IOC/FIOCRUZ

---

Walter Teixeira Leira Filho, Ph. D. - UFRRJ

---

Marcelo Elias Fraga, Dr. UFRRJ

*Dedico este trabalho aos que dele  
participaram, desde quando era um sonho:  
Deus por permiti-lo;  
Minha mãe, Yara Maria Santos, pelo apoio e  
exemplo de vida;  
A amiga, cúmplice e esposa, Rita de Cássia,  
pela compreensão por tanta ausência;  
A minha filha Flávia Alessandra pela alegria;  
Ao irmão José Cláudio e cunhada Maria Paz,  
por estarem sempre presentes.*

## AGRADECIMENTOS

Ao professor Hécio Resende Borba pela orientação baseada sempre na amizade que foi essencial para a concretização deste trabalho.

À professora Glória Maria Direito por seu comprometimento com a pesquisa, auxiliando novos pesquisadores.

Ao professor Marcelo Elias Fraga pelo auxílio nos momentos de dúvida.

A todos os colegas do curso de mestrado, pela amizade e discussões interessantes que contribuíram para o crescimento profissional.

À amiga Ana Cláudia, por dividirmos e somarmos esforços na conquista desta etapa de vida.

Aos funcionários do Projeto Sanidade Animal: Luís Jorge Soares, Joselita Teodora de Jesus e Joel Teodósio de Oliveira.

Ao laboratório Parasitologia animal por ter cedido gentilmente o espaço para etapas do trabalho.

À amiga Verônica Junqueira, por tornar meu sonho realidade

## **BIOGRAFIA**

Alexander Santos, filho de Yara Maria Santos, nasceu em 26 de setembro de 1972, Rio de Janeiro, capital.

Concluiu o ensino médio em 1990, em 1991 ingressou no curso de Ciências Biológicas da Faculdade de Humanidades Pedro II (FAHUPE), formando-se em bacharelado e Licenciatura Plena em Ciências Biológicas em Janeiro de 1995. É profissional da educação desde fevereiro de 1995, Funcionário Público Municipal, onde ocupa o cargo de Professor Docente I, Funcionário Público Estadual ocupando o cargo de Professor Docente I desde 1998. Em 1999, ingressou para o Curso de Pós-Graduação-Latu-Sensu-Especialização em Gestão Ambiental, pela Universidade Estadual do Rio de Janeiro (UERJ), formando-se em abril de 2000.

Em dezembro de 2006 foi selecionado para o ingresso no Curso de Pós-Graduação em Microbiologia Veterinária, na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, sob a orientação do Professor Doutor Hércio Resende Borba.

## RESUMO

SANTOS, Alexander. **Verificação da atividade antifúngica de extratos aquosos de *Cymbopogon citratus*, *Peumus boldus* e *Shinus terebinthifolia* sobre cinco espécies de fungos do gênero *Aspergillus*.**

Seropédica: UFRRJ, 2008. 55 p (Dissertação, Mestrado em Microbiologia Veterinária).

Este trabalho foi desenvolvido no Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, em Seropédica-RJ. Foram avaliadas a atividade antifúngica das plantas *Cymbopogon citratus* (capim-limão), *Peumus boldus* (boldo) e *Shinus terebinthifolia* (aroeira), na inibição do crescimento de espécies do gênero *Aspergillus* (*A. flavus*, *A. niger*, *A. ochraceus*, *A. parasiticus* e *A. carbonarius*). Utilizando o método da concentração inibitória mínima em ágar, com a técnica de diluição em placa (Pour-Plate), foram realizadas diluições dos diferentes extratos, obtendo-se as concentrações finais de 5%, 2,5% e 1,25%. Testes de sensibilidade ao antifúngico comercial - cetoconazol foram realizados numa concentração final de 1933,18 µg/mL, conforme recomendada pelo National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Os resultados obtidos nos experimentos demonstraram que os extratos aquosos de *C. citratus* e *S. terebinthifolia*, após 24 horas de incubação, foram capazes de inibir o crescimento de *A. flavus* e *A. carbonarius*, respectivamente. Os demais extratos em estudo e nas concentrações testadas, não foram capazes de inibir o crescimento micelial das espécies do gênero *Aspergillus*.

Palavras-chave: *Aspergillus*, atividade antifúngica, extrato aquoso.

## ABSTRACT

SANTOS, Alexander. **Verification of antifungal activity of aqueous extracts of *Cymbopogon citratus*, *Peumus boldus* and *Shinus terebinthifolia* on five species of fungi of the genus *Aspergillus***

Seropédica: UFRRJ, 2008. 55 p (Dissertation, Magister Scientiae in Veterinary Microbiology).

This work was developed in the Department of Microbiology and Immunology of the Institute of Veterinary Rural Federal University of Rio de Janeiro in Seropédica-RJ.

We evaluated the antifungal activity plant *Cymbopogon citratus* (lemon-grass), *Peumus boldus* (boldo) and *Shinus terebinthifolia* (aroeira), inhibition of growth of species of the genus *Aspergillus* (*A. flavus*, *A. niger*, *A. ochraceus*, *A. Parasiticus* and *A. carbonarius*). Using the method of minimum inhibitory concentration in agar, with the technique of dilution plate (Pour-Plate), were held dilutions of different extracts, resulting in the final concentrations of 5%, 2.5% and 1.25%. Testing of commercial sensitivity to antifungal - ketoconazole were made in a final concentration of 1933.18  $\mu$ g /mL, as recommended by the National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). The results obtained in the experiments have shown that aqueous extracts of *C. citratus* and *S. terebinthifolia*, after 24 hours of incubation, were able to inhibit the growth of *A. flavus* and *A. carbonarius*, respectively. The other extracts being studied and tested in the concentrations were not able to inhibit the growth of mycelial species of the genus *Aspergillus*.

Keywords: *Aspergillus*, antifungal activity, aqueous extract.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE VETERINÁRIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA VETERINÁRIA

ALEXANDER SANTOS

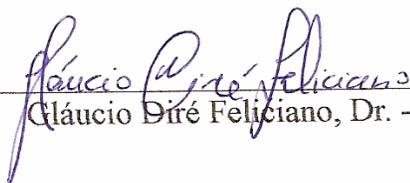
Dissertação submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Microbiologia Veterinária** no Curso de Pós-Graduação em Microbiologia Veterinária

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 15/04/2008



---

Hélcio Resende Borba, Ph. D. - UFRRJ  
Orientador



---

Cláudio Diré Feliciano, Dr. - UERJ



---

Walter Teixeira Leira Filho, Ph. D. - UFRRJ

---

Marcelo Elias Fraga, Dr. UFRRJ

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>4</b>
2.1 O Gênero <i>Aspergillus</i> .....	4
2.2 Micotoxinas.....	6
2.3 Plantas antifúngicas.....	7
2.3.1 <i>Cymbopogon citratus</i> .....	8
2.3.2 <i>Peumus boldus</i> .....	10
2.3.3 <i>Schinus terebinthifolia</i> .....	10
2.4 Antifúngicos.....	12
<b>3.MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>14</b>
3.1 Local.....	14
3.2 Espécies Fúngicas de Referência.....	14
3.3 Manutenção da Coleção Fungica.....	15
3.4 Contagem de conídios.....	15
3.5 Material Botânico.....	16
3.6 Obtenção dos extratos.....	16
3.6.1 Verificação do pH dos extratos .....	17
3.7 Testes de Atividade Antifúngica.....	18
3.8 Obtenção dos Antifúngicos .....	18
3.9 Preparo dos Antifúngicos.....	18
3.10 Testes de Controle com Antifúngicos.....	19
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>20</b>
4.1 Contagem de conídios.....	20
4.2 Valores de pH Obtidos nos Extratos .....	20
4.3 Avaliação do Teste de Atividade Antifúngica para o Extrato de <i>Cymbopogon citratus</i> .....	21
4.4 Avaliação do Teste de Atividade Antifúngica para o Extrato de <i>Peumus boldus</i> .....	21
4.5 Avaliação do Teste de Atividade Antifúngica para o Extrato de <i>Schinus terebinthifolia</i> .....	21
4.6 Avaliação do Teste de Sensibilidade Antifúngica para o Cetoconazol.....	27
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>28</b>
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>39</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS.....</b>	<b>40</b>

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1. Espécies fúngicas de referência utilizadas e seus respectivos registros originais.....</b>	<b>14</b>
<b>Tabela 2. Espécies fungicas de referência utilizadas e seus respectivos registros no Laboratório de Atividade Antifúngicas – LAAF.....</b>	<b>15</b>
<b>Tabela 3. Número médio de conídios/mL das espécies de <i>Aspergillus</i> nos diferentes testes.....</b>	<b>20</b>
<b>Tabela 4. Valores de pH dos extratos <i>Cymbopogon citratus</i>, <i>Peumus boldus</i> e <i>Schinus terebinthifolia</i> nas concentrações de 5%, 2,5% e 1,25%.....</b>	<b>20</b>
<b>Tabela 5. Leitura dos testes de atividade antifúngica para os extratos de <i>Cymbopogon citratus</i>, <i>Peumus boldus</i> e <i>Schinus terebinthifolia</i> com <i>Aspergillus flavus</i>.....</b>	<b>22</b>
<b>Tabela 6. Leitura dos testes de atividade antifungica para extratos de <i>Cymbopogon citratus</i>, <i>Peumus boldus</i>, <i>Schinus terebinthifolia</i> com <i>Aspergillus ochraceus</i>.....</b>	<b>23</b>
<b>Tabela 7. Leitura dos testes de atividade antifúngica para extratos de <i>Cymbopogon citratus</i>, <i>Peumus boldus</i> e <i>Schinus terebinthifolius</i> com <i>Aspergillus carbonarius</i>.....</b>	<b>24</b>
<b>Tabela 8. Leitura dos testes de atividade antifúngica para os extratos de <i>Cymbopogon citratus</i>, <i>Peumus boldus</i> e <i>Schinus terebinthifolia</i> com <i>Aspergillus niger</i>.....</b>	<b>25</b>
<b>Tabela 9. Leitura dos testes de atividade antifúngica para os extratos de <i>Cymbopogon citratus</i>, <i>Peumus boldus</i> e <i>Schinus terebinthifolia</i> com <i>Aspergillus parasiticus</i>.....</b>	<b>26</b>
<b>Tabela 10. Avaliação do teste de sensibilidade antifúngica para Cetoconazol e controles.....</b>	<b>27</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1. <i>Cymbopogon citratus</i>.....</b>	<b>16</b>
<b>Figura 2. <i>Peumus boldus</i>.....</b>	<b>17</b>
<b>Figura 3. <i>Schinus terebinthifolia</i>.....</b>	<b>17</b>
<b>Figura 4. Bateria do teste de atividade antifúngica – leituras de 24, 48 e 168 h – de <i>Cymbopogon citratus</i>.....</b>	<b>29</b>
<b>Figura 5. Bateria do teste de atividade antifúngica – leituras de 24, 48 e 168 h de <i>Peumus boldus</i>.....</b>	<b>32</b>
<b>Figura 6. Bateria do teste e atividade antifúngica – leituras de 24, 48 e 168 h de <i>Schinus terebinthifolia</i>.....</b>	<b>35</b>
<b>Figura 7. Bateria do teste de sensibilidade antifúngica de Cetoconazol.....</b>	<b>38</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Os fungos sempre tiveram relacionado intimamente com a vida do homem em diversos aspectos tanto no que concerne à alimentação, na qualidade de vida e na saúde.

A utilização de alimentos contaminados por substâncias tóxicas produzidas por fungos, denominadas micotoxinas tem levado a enormes prejuízos econômicos ao país. Estando a presença de micotoxinas correlacionada a várias patologias humanas e animais. Estes problemas são mais acentuados nos países de clima tropical úmido, como o Brasil, os quais reúnem condições ambientais adequadas ao desenvolvimento dos fungos, como por exemplo, temperatura e umidade.

A contaminação dos alimentos por micotoxinas pode ocorrer no campo, antes e após a colheita, e durante o transporte e armazenamento do produto.

Ao considerarmos a origem das micotoxinas, teremos que nos ater ao estudo e conhecimento das numerosas espécies fúngicas produtoras de uma ou mais toxinas. Um grande número destes metabólitos tóxicos já foi identificado e caracterizado como substâncias produzidas em contaminações naturais de grãos e outros alimentos. Entre as espécies toxígenas isoladas a partir de cereais no Brasil destacam-se as pertencentes ao gênero *Aspergillus* (CRUZ, 1996). Este gênero compreende espécies produtoras de aflatoxinas, tais como *A. flavus* e o *A. parasiticus* e de Ocratoxina A (OTA), tendo como principal produtor o *A. ochraceus*. Recentemente o *A. niger* e o *A. carbonarius* ganharam importância por serem considerados, também, ocratoxígenos, em regiões tropicais e subtropicais (ABARCA *et al.*, 2001; DALCERO *et al.*, 2002; ROSA *et al.*, 2002).

Os efeitos destas micotoxinas sobre a saúde de animais e do homem variam de acordo com a concentração em que estão presentes nos alimentos e, conseqüentemente, com a quantidade ingerida. Assim podem ocorrer casos agudos decorrentes da ingestão de altas concentrações ou, o que é mais comum, quadros crônicos em virtude do consumo de baixos níveis por períodos prolongados. Estes aspectos determinam a aspergilose que foi uma das principais doenças descritas ligadas aos fungos. A aspergilose é uma doença aguda, subaguda ou crônica, localizada ou generalizada, superficial ou profunda, causada por diferentes espécies de fungos do gênero *Aspergillus*.

Considerando que a presença de fungos do gênero *Aspergillus* é comum e conseqüentemente há contaminação dos grãos desde a lavoura até o consumo final, a decisão

mais sensata parece ser o máximo de controle sobre os fatores que favorecem o desenvolvimento desses fungos, como temperatura, umidade, pH e presença de oxigênio. Entretanto, as condições climáticas nem sempre permitem um controle eficiente. Uma das ferramentas de controle seria o uso de antifúngico. Apesar de diversas drogas antifúngicas estarem disponíveis atualmente no mercado, o seu uso é limitado por diversos fatores como baixa potência, pequena solubilidade, surgimento de espécies resistentes às drogas e toxicidade.(FROMTLING, 1987).

Nos últimos anos tem-se verificado um aumento progressivo da demanda de plantas e preparações de origem vegetal como recursos terapêuticos. Porém esse consumo torna-se preocupante considerando que a fiscalização do comércio de tais produtos é precária; representando, assim vários riscos ao consumidor, podendo-se enumerar como principais a identificação errada da espécie vegetal, indicações errôneas de utilização, posologia inadequada, uso de plantas de má qualidade e tóxicas (ESPÍNOLA, 1997; BRANDÃO *et al.*, 1998; MATOS, 2000).

Um dos interesses da comunidade científica é pela investigação da ativação de extratos vegetais com baixo custo e baixa toxidez que tenham propriedades capazes de substituir produtos químicos. Em muitos casos esses produtos poderão ser utilizados na agricultura, como meio de combate as fitopatologias e na medicina humana e veterinária, para o combate de infecções e micotoxidades. Há necessidade, portanto, da avaliação do efeito de diferentes extratos aquosos de plantas, sobre o crescimento micelial *in vitro* de fungos do gênero *Aspergillus* produtores de micotoxinas, tendo em vista que dados sobre este aspecto são escassos na literatura.

Atentos a todos estes fatores e voltados para a busca crescente de produtos de origem vegetal com baixo custo e baixa toxidez, capazes de substituir com êxito os produtos antifúngicos de uso corrente e considerando, ainda a importância de várias descobertas dos efeitos dos componentes ativos de plantas, a facilidade de obtenção de material de estudo e a importância de pesquisas que venham inibir o crescimento dos fungos do gênero *Aspergillus* e a conseqüente produção das micotoxinas por eles produzidas, é que surgiu a presente investigação.

O constante emprego das plantas selecionadas, nas práticas caseiras da medicina popular e estudos científicos comprovados, são motivos suficientes para as suas escolhas como tema do presente estudo, associados ao fato de existirem poucas citações sobre elas com relação a sua possível atividade antifúngica para os fungos de interesse nesta investigação visamos, num futuro próximo, suas validações como medicamentos eficazes e seguros.

Desta forma o presente trabalho teve por objetivo avaliar a atividade antifúngica de extratos aquosos de *C. citratus*, *P. boldus* e *S. terenbinthifolia* sobre o crescimento de *A. niger*, *A. flavus*, *A. ochraceus*, *A. carbonarius* e *A. parasiticus*.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 O Gênero *Aspergillus*

O gênero *Aspergillus* pertence ao grupo dos Hyphomycetos que se caracteriza pela formação de conidióforos, ou seja, hifas especializadas e produtoras de conídios com formas e arquitetura variáveis (LILLARD, *et al.*, 1970; SABINO, *et al.*, 1998). Este gênero é de particular importância por conter muitas espécies capazes de crescer em condições de baixa atividade de água (Aa), sendo então associados com a deterioração de alimentos que são muito secos para serem atacados por outros microrganismos (MOSS; SMITH, 1985). Os alimentos armazenados representam excelente campo para a proliferação dos fungos, principalmente quando os princípios básicos de secagem adequada e armazenamento correto são desconhecidos e desprezados (KOEHLER *et al.*, 1975).

Algumas espécies do gênero *Aspergillus* são patogênicas como o *A. fumigatus* que é o agente da aspergilose pulmonar em humanos e aves (PITT, 1994). Segundo Wadd *et al.* (1997) os fungos do gênero *Aspergillus* são a segunda causa mais comum de micoses oportunistas seguida de *Cândida* sp. Outras são responsáveis pela produção de metabólitos secundários tóxicos (PITT, 1994). Dentre os principais gêneros toxígenos, o *Aspergillus* é o que possui espécies de maior ocorrência sendo comumente encontrado nos trópicos (SAMSON, 2000).

*Aspergillus carbonarius* (BRAIN) Thom, pertence ao subgênero *Circundatti*, seção Nigri, sendo reportado inicialmente como isolado a partir de solo e águas poluídas (KLICH; PITT, 1988), atualmente tem sido encontrado em alimentos de origem vegetal, com importância para a produção de OTA A (ABARCA *et al.*, 2003).

Geralmente, *A. carbonarius* tem um crescimento ótimo a 30-35°C e não cresce a temperaturas inferiores a 25°C. O ótimo de atividade de água (Aa) para o crescimento varia de 0,93 a 0,98 dependendo da cepa, com uma maior tolerância a 25 – 30°C (MITCHEL *et al.*, 2004)

O *Aspergillus flavus* Link de acordo com Klich; Pitt (1988), pertence ao subgênero *Circundatti*, seção Flavi. É de distribuição mundial, predominando em áreas tropicais e subtropicais, sendo aparentemente mais comum em solos cultivados do que em não cultivados. Esta espécie é capaz de colonizar vegetais em decomposição, grãos, sementes e muitos outros substratos incluindo alimentos e rações animais (PITT; HOCKING, 1997; ROSA, 2002). Tem sido descrito ainda como patógeno para insetos e animais e, cerca de

50% dos isolados mostram-se aflatoxígenos (DOMSCH *et al.*, 1980; CHRISTENSEN, 1981; PITT; HOCKING, 1997).

*Aspergillus flavus* apresentou variações no crescimento quando houve alteração nas temperaturas de incubação, isto é, crescimento mínimo ao redor de 10-12°C, máximo entre 43 – 48°C e com um crescimento ótimo perto de 33°C (DOMSCH *et al.*, 1980). As variações de (Aa) que permitem o crescimento de *A.flavus* tem sido avaliadas desde baixas como 0,78 a 33°C (AYERST, 1969) e elevadas como 0,84 a 25°C (PITT; HOCKING, 1997). PITT e MICAMBLE (1995) estabeleceram Aa mínimas em função da temperatura para o crescimento de *A.flavus* da ordem de 0,82 a 25°C, 0,81 a 30°C e de 0,80 a 37°C.

O pH ótimo para o desenvolvimento de *A.flavus* esta entre cinco e oito, mas o mesmo pode crescer em ampla faixa de pH (EPPLEY, 1968; KOEHLER *et al.*, 1975).

*Aspergillus niger* Tieghem var. *niger*, pertence ao subgênero *Circundatti* seção *Nigri* e é considerada uma espécie ubíqua, comumente isolada do solo, plantas, sementes, frutas secas e nozes (DOMSCH *et al.*, 1980; PITT; HOCKING, 1985) é um dos fungos mais freqüentemente isolados a partir de alimentos e rações animais (ROSA, 2002).

A temperatura mínima de crescimento varia de 6-9°C, a máxima de 45-47°C com um ótimo a 35-37°C. É considerado um fungo xerofílico (AYERST, 1969), sendo descrita a germinação em Aa de 0,77 a 35°C (PITT; HOCKING, 1997). ABARCA *et al.*, (2001) relataram a ocorrência de cepas ocratoxígenas numa incidência que variou de 1,7 a 18,5% dos isolados de *A.niger*.

*Aspergillus ochraceus* Wilhelm, pertence ao subgênero *Circundatti* é freqüentemente isolado de solo cultivado, de vegetais e de sua rizosfera, de grãos armazenados, e de uma ampla variedade de alimentos e rações animais (DOMSCH *et al.*, 1980; PITT; HOCKING, 1985; ROSA, 2002).

Seu crescimento ocorre entre 8 e 37° C, com um ótimo a 24 – 31°C . A (Aa) água mínima para crescimento é de 0,77 a 25 °C, com um ótimo a 0,95 – 0,99 (PITT; HOCKING, 1997).

*Aspergillus parasiticus* Speare, de acordo com KLICH e PITT (1988), pertence ao subgênero *Circundatti*, seção *Flavi*. É uma espécie subtropical e tropical, considerada endêmica no amendoim, alimento a partir do qual é mais freqüentemente isolado (PITT; HOCKING, 1997).

O crescimento de *A. parasiticus* tem sido reportado numa faixa de 12 – 42°C, com um ótimo a 32 °C. A (Aa) mínima para o crescimento é 0,82 a 25°C, 0,81 a 30°C e 0,80 a 37°C,

similar ao *A. flavus* cresce em pH de 2,4 A 10,5 a 25°C, 30 °C e 37°C, mas não cresce a 25°C em pH de 2,2. O crescimento ótimo ocorre entre pH 3, 5-8 (PITT; HOCKING,1997).

## 2.2 Micotoxinas

As micotoxinas constituem-se em um grupo de metabólitos secundários sintetizados na fase exponencial por espécies de fungos filamentosos que contaminam frequentemente produtos agrícolas (SANTURIO *et al.*, 1988). Estes metabólitos são tóxicos para humanos e animais, podendo desenvolver atividade mutagênica, carcinogênica e teratogênica.

Estas substâncias com frequência afetam cereais e sementes oleaginosas durante a colheita, armazenamento e industrialização (EPPLEY, 1968) causando reduções significativas no rendimento da colheita e conseqüentemente perdas econômicas. Sua presença em produtos alimentícios depende do crescimento de espécies fúngicas específicas e de fatores como umidade e temperatura.

As micotoxinas mais estudadas dentre as sintetizadas por espécies pertencentes ao gênero *Aspergillus*, são as aflatoxinas (AFL) e a ocratoxina A (OTA). Na produção desta última, tem destaque o *A. ochraceus*, que é o principal produtor em climas tropicais úmidos (PITT; HOCKING, 1997; MANTLE; CHOW, 2000). Entretanto, tem sido estabelecida a produção de OTA por diferentes espécies de seção Nigri, tais como o *A.niger* e o *A.carbonarius* (ABARCA *et al.*, 2001; DALCERO *et al.*, 2002; ROSA *et al.*, 2002).

Quanto aflatoxinas a literatura cita o *A. flavus* e o *A.parasiticus* como principais produtores desse metabólitos. São relatados 4 tipos de aflatoxinas: B1, B2, G1 e G2, sendo o *A. flavus* geralmente produtor de aflatoxinas B1 e B2 e o *A. parasiticus* com frequência produzindo B1, B2, G1 e G2 (DAVIS ; DIENER, 1983).

A (AFL)B1 é a mais encontrada e também a mais tóxica. Provoca profundas alterações orgânicas traduzidas por hemorragias através da inibição dos fatores II e VII da coagulação sanguínea e lesões no hepatócito; a ingestão de baixas quantidades por longo período determina baixa conversão alimentar nos animais, imunodepressão e câncer hepático. Os rebanhos que consomem grãos contaminados são os mais afetados, principalmente aves e suínos.(SABINO *et al*, 1988; OMS, 1983).

As principais linhagens fúngicas que produzem AFL, necessitam de determinadas condições para o seu desenvolvimento, como umidade relativa do ar entre 80 e 90% e temperatura ambiental superior a 20°C (PREGNOLATTO; SABINO, 1969; RIBEIRO NETO, 1980). Sendo o Brasil um país de clima tropical, apresenta condições favoráveis para o desenvolvimento destas micotoxinas.

Durante o seu crescimento, estocagem e processamento, os cereais podem ser invadidos pelos fungos aflatoxigenos. Dessa forma, milho, amendoim canteio, sorgo, cevada, feijão, arroz e rações tornam-se excelentes substratos para o seu desenvolvimento.(HERRY; LEMETAYER, 1992; WOOD, 1992; WOOD ; POHLAND, 1992)

A Ocratoxina A provoca lesões extensas nos túbulos renais, especialmente em suínos impedindo a reabsorção de água pelo organismo (WHO, 1979; MERWE *et al.*, 1965).O risco para humanos é difícil de assegurar e determinar, mas como a carne de porco é uma parte importante da dieta da população rural – usualmente comem a carne de porco não inspecionado -, o risco certamente existe, tanto que a porcentagem de morte por falência renal é alta em algumas áreas rurais e se questiona a possibilidade da suposta causa ser a OTA A (PITT, 1987).

A OTA já foi detectada em soro sangüíneo humano (ZIMMERLI; DICK, 1995; UENO *et al.* , 1998) e em leite de mulheres (MIRAGLIA *et al.*, 1998). Sua ingestão ocorre principalmente por alimentos vegetais como milho, café, cevada e seus derivados (micotoxicose primária) e através de resíduos e metabólitos presentes em alimentos de origem animal, como carne e patês (micotoxicose secundária).

BACON *et al.* (1973) analisando a produção de OTA por *A. ochraceus* em rações para aves, encontraram como melhor neste substrato o uso de Aa 0.95 com temperatura de incubação de 30 °C. RAMOS *et al.* (1998) obtiveram maior produção de OTA utilizando temperatura de 30°C em grãos de cevada com Aa 0,98.

### **2.3 Plantas antifúngicas**

Recorrer às virtudes curativas de alguns vegetais é uma das primeiras manifestações do homem, marcando um antigo desejo de compreender e utilizar a natureza como recurso terapêutico, nas doenças que afligem o corpo e a alma (ALZUGARY; ALZUGARY, 1983).

O conhecimento histórico do uso de plantas medicinais nos mostra ao longo da história da humanidade que pela própria necessidade humana, as plantas foram os primeiros recursos terapêuticos utilizados (ALMEIDA, 1993). Há registros médicos que comprovam que os chineses já utilizavam as plantas medicinais desde 3700 a.C e acreditavam que havia uma planta apropriada para o tratamento de cada doença (COWAN, 1999; DE SOUZA *et al.*, 2003; NIERO *et al.*, 2003).Entretanto, a pesquisa sistemática, tendo em vista o isolamento dos princípios ativos vegetais, iniciou-se no século XIX, quando o farmacêutico alemão Friediech Wilhelm Setürner procurava no ópio, a substância responsável por sua ação hipnótica (SIANI, 2003).

As plantas produzem dois tipos distintos de metabólitos. Os metabólitos primários, são encontrados em todos os sistemas vivos e são essenciais ao crescimento e a vida da própria planta, como por exemplo os aminoácidos, monossacarídeos, ácidos carboxílicos, etc. Os metabólitos secundários são produtos de metabolismo específico, e são resultantes de processos adaptativos. A produção de determinados metabólitos secundários pode ser característica restrita de certas plantas e são caracterizados por uma enorme diversidade química. Hoje, sabe-se que as referidas substâncias, são de importância relevante nos mecanismos de defesa das plantas contra seus predadores (BRUNETON, 1995; BASILE *et al.*, 2000; DUFFY; POWER, 2001; LIMA, 2001; NIERO *et al.*, 2003).

Os metabólitos secundários são constituídos por uma variedade de substâncias bioativas, e nos dias atuais o interesse científico por essas substâncias tem aumentado devido a busca por novos medicamentos oriundos de plantas (BASILE *et al.*, 1999; SATO *et al.*, 2002; PAIVA *et al.*, 2003).

Dentre os metabólitos secundários estão os compostos fenólicos que desempenham importante papel na resistência das plantas ao ataque de fungos (AGRIOS, 1988). Entre os compostos fenólicos destacam-se os flavonóides e os taninos (ZUANAZZI, 2002).

Segundo Carvalho *et al.*, (2000) a utilização de extratos de plantas com propriedades antifúngicas se constitui numa alternativa ecológica promissora para substituir a proteção tradicional promovida pela aplicação de fungicidas, podendo, ainda, ser associada às demais práticas de manejo integrado de doenças, contribuindo para atender á crescente demanda nacional e internacional por produtos orgânicos.

### **2.3.1 Nome científico: *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf.**

a) Família: GRAMINEAE (POACEAE)

b) Nomes populares: capim-cheiroso, erva-cidreira, capim-cidreira, capim-limão, capim-santo, capim-de-cheiro, capim-marinho, capim-cidrô, chá-de-estrada, cidrô, citronela-de-java, capim-cidrilho, patchuli, capim-catinga, capim-ciri, grama-cidreira, capim-cidrilho, capim-citronela.

c) Sinonímia : *Andropogon schonanthus* L., *Andropogon citratus* DC. ex Nees, *Andropogon citratus* DC., *Andropogon ceriferus* Hack ., *Andropogon citriodorum* hort. ex Desf ., *Andropogon nardus* subsp. *ceriferus* (Hack.) Hack., *Andropogon roxburghii* Ness ex Steud., *Andropogon densiflorus* Steud., *Cymbopogon nardus* subvar. *citratus*(DC.) Roberty, *Cymbopogon densiflorus*( Steud.)Stapf.

d) Características gerais: erva cespitosa quase acaule, com folhas longas, estreitas e aromáticas e, quando recentemente amassadas têm forte cheiro de limão. Flores raras e estéreis em nossas condições. Muito cultivada em quase todos os países tropicais inclusive no Brasil, tanto para fins industriais como em hortas caseiras para uso em medicina tradicional. Para novo plantio os perfilhos devem ser retirados em grupos de 3, uma vez por ano, e replantados com espaçamento de 50 x 80 cm. Permite até 4 cortes por ano (MATOS,2000)

O *Cymbopogon citratus* tem sido largamente difundido de norte a sul do país na forma de um chá de aroma e sabor agradáveis e de ação calmante e espasmolítica suaves; contendo um pouco menos que 0,5% de óleo essencial (CRAVEIRO *et al.*, 1981), com atividade antimicrobiana (GRUENWALD, 2000).

O óleo essencial do *C.citratus* é formado principalmente por citral, ao qual se atribui a atividade calmante e espasmolítica (MATOS,2000). Um outro componente presente no óleo essencial de *C.citratus* porém em menor quantidade e o mirceno. A este ultimo atribui-se ação analgésica (SOUSA *et al.*, 1991; ROBINEAU, 1995; MATOS, 2000).

O seu chá deve ser do tipo abafado e preparado de preferência com folhas frescas, que têm um sabor mais agradável; é empregado para alívio de pequenas crises de cólicas uterinas e intestinais, bem como no tratamento do nervosismo e estados de intranqüilidade, farmacologicamente comprovados. Ambas as preparações, chá e refresco, podem ser bebidos a vontade, pois são completamente desprovidos de qualquer ação tóxica, mesmo quando tomado muitas vezes no mesmo dia (MATOS, 2000). Recomenda-se, porém cuidado para evitar a presença de microfragmentos da folha no chá, os quais poderiam causar pequenas lesões nas mucosas que revestem o aparelho digestivo, da boca aos intestinos (ROBINEAU, 1995).

A atividade antimicrobiana do *C. citratus* é citada na literatura (ONAWUNMI *et al.*,1984; SIMÕES *et al.*, 1986; MENENDÉ, 1993; MAHMOUD, 1994) sugerindo que o citral é o principal responsável por esta atividade (ONAWUNMI *et al.*, 1984). O citral é um óleo volátil basicamente constituído de aldeídos monoterpênóides acíclicos o alfa-citral e o beta-citral (70 a 85%v/v) que em conjunto é unicamente denominado de citral.(CARLINI *et al.*, 1985; FERREIRA,1989) Estudos realizados por Kishore *et al.*, 1993; Lima *et al.*, 1993 demonstraram atividade antifúngica do óleo em sua condição de volátil frente a diferentes espécies de dermatófitos, dos gêneros *Trichophyton* e *Microsporum*.

### 2.3.2 Nome científico: *Peumus boldus* (Molina) Lyons

a) Família: MONIMIÁCEA

b) Nomes populares: Boldo- do Chile, boldo, boldo-verdadeiro

c) Sinonímia: *Peumus boldus* (Molina) Lyons

d) Características gerais: Árvores pequenas, dióicas, de folhagens permanentes, originárias das regiões montanhosas do Chile. No Brasil é encontrado somente no comércio. Suas folhas são opostas, coriáceas, inteiras, ovais ou oval-elíptica, medindo de 3 a 6 cm de comprimento por 2 a 4 cm de largura, margens levemente enroladas para o lado da face dorsal e limbo de cor cinza-esverdeado. A face ventral possui pequenas protuberâncias mais escuras dotadas de pêlos no centro, tornando-as ásperas ao tato (SOUZA *et al.*, 1991; SILVA, 1997).

Suas folhas possuem alcalóides derivados principalmente do núcleo da aporfina. Entre os alcalóides isolados ocorrem boldina, iso-coridina, nor-isocoridina, laurotetanina e outros. Contém, ainda taninóides dentre eles o boldosídio e peumosídio. As folhas fornecem ainda óleo essencial ascaridol, linalol (SOUZA *et al.*, 1991; SILVA, 1997).

As folhas são usadas popularmente no tratamento de problemas hepáticos apresentando também ações estomáticas, sedativas e anti-helmíntica (SOUZA, *et al.*, 1991; SILVA, 1997) .

O boldo é usado como fonte de boldina e matéria-prima de preparações farmacêuticas, tinturas, extrato fluido e vinho. É muito comum seu uso em forma de chás caseiros. Atividade biológica da boldina é descrita como colagogo, que produz um aumento gradual do fluxo da bile em animais de laboratórios. Em dose moderada é excitante das funções digestivas.(SOUZA, *et al.*.,1991 ;SILVA,1997).

O óleo essencial de *P.boldus* apresentou atividade antibacteriana sobre *Escherichia coli*, *Neiseria gonorrhoea*, *Pseudomonas.aeruginosa*, *Staphylococcus.aureus* e antimicótica sobre *Candida.albicans*, *Bacillus.cereus*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizopus nigricans*, *Aspergillus.niger* e *Trichophyton.mentagrophytes* .Estas atividades podem estar relacionadas aos ésteres boldino, ascasridiol presentes na sua composição química(GUERIN; REVEILLERE, 1984)

Quando testado por Lima e Farias (1999), o óleo essencial de *P.boldus* foi ativo sobre espécies de *Candida* sp. SÁ *et al.* (1995,1996) testaram o óleo essencial de *P.boldus* sobre várias espécies de microorganismo e o mesmo só foi ativo sobre *Staphylococcus.aureus* e *N.gonohrea*.

### 2.3.3 *Schinus terebinthifolia*

a) Família: Anacardiaceae

b) Nomes populares: aguaraiá, aroeira, aroeira-branca, aroeira-da-praia, aroeira-do-brejo, aroeira-do-campo, aroeira-do-paraná, aroeira-mansa, aroeira-negra, aroeira-pimenteira, aroeira-precoce, aroeira-vermelha, bálsamo, cabuí, cambuí, coração-de-bugre, corneíba, fruto-de-raposa, fruto-do sabiá

c) Sinonímia: *Sacorthea bahiensis* Turcz., *Schinus mucronulata* Mart., *Schinus antiarthritica* Mart.ex March., *Schinus weimanniifolius* Mart., *Schinus weinmannifolia* Mart. var. *pauciflora* Engl., *Schinus aroeira* Vell., *Schinus rhoifolia* Mart., *Schinus riedeliana* Engl., *Schinus intermedia* Chodat & Hassl., *Schinus angustifolia*( Chodat. & Hassl.) Barkl., *Schinus dubua* Barkl., *Schinus hassleri* Barkl., *Schinus chichita* Speg., *Schinus terebinthifolia* Raddi var. *aroeira* ( Vell. ) March., *Schinus acutifolia* Engl., *Schinus raddiana* Engl., *Schinus lentiscifolia* March. var. *crenulata* March., *Schinus mellisii* Engl ., *Schinus molle* var. *hassleri* Back.

d) Características gerais: árvore mediana com 5-10m de altura, perenifólia, dióica, de copa larga e tronca com 30-60 cm de diâmetro, revestido de casca grossa. Folhas compostas imparipinadas, com 3 a 10 pares de folíolos aromáticos, medindo de 3 a 5 cm de comprimento por 2 a 3 cm de largura. Flores masculinas e femininas muito pequenas, dispostas em panículas piramidais. Fruto do tipo drupa, globóide, com cerca de 5 cm de diâmetro, aromático e adocicado, brilhante e de cor vermelha, conferindo as plantas, na época da frutificação, um aspecto festivo. Ocorre ao longo da Mata Atlântica desde o Rio Grande do Norte até o Rio Grande do Sul. Pode ser cultivada a partir de sementes ou por estaquia (LORENZI,1992; BRAGA,1960)

Fornecem madeira para moirões, lenha e carvão. É amplamente cultivada na arborização de ruas e praças. A literatura etnobotânica cita o uso das cascas, com base na tradição popular, na forma de cozimento (decocto), especialmente pelas mulheres, durante vários dias, em banhos de assento após o parto como antiinflamatório e cicatrizante, ou como medicação caseira para o tratamento de doenças do sistema respiratório, bem como nos casos de hemoptise e hemorragia uterina. As folhas e frutos são adicionados a água de lavagem de feridas e úlceras, embora a eficácia destas preparações não tenham sido, ainda, comprovadas cientificamente (BRAGA,1960 ;LORENZI,1992; GRUENWALD,2000).

Os resultados de sua análise fitoquímica registram a presença de alto teor de tanino, biflavonóides e ácidos triterpênicos nas cascas de até 5% de óleo essencial formado por mono

e sequeiterpenos nos frutos e nas folhas. Em todas as partes da planta foi identificada a presença de pequena quantidade de alquil-fenois, substâncias causadoras de dermatite alérgica em pessoas sensíveis (GRUENWALD,2000)

Os resultados dos ensaios farmacológicos registraram a existência nesta planta de propriedades antiinflamatória , cicatrizantes e antimicrobiana para fungos e bactérias incluindo nesta ação *Monilia*, *Staphylococcus* e *Pseudomonas*. Um ensaio clínico feito com extrato aquoso das cascas na concentração de 10% aplicado na forma de compressas intravaginais em 100 mulheres portadoras de cervicite e cervicovaginites promoveu 100% de cura num período de uma a três semanas de tratamento (BANDEIRA,1974).

Com base no uso tradicional desta planta e nos resultados de estudos químicos farmacológicos e clínico, as preparações feitas com suas cascas podem ser usadas no tratamento tópico de ferimentos na pele ou, especialmente, nas mucosas em geral, infectados ou não, nos casos de cervicite (ferida no colo do útero) e de hemorróidas inflamadas, bem como nas inflamações das gengivas e da garganta na forma de gargarejos, bochechos e compressas.(MATOS, 2002).

Carlson *et al* (1998) estudaram a possível sensibilidade de *S.aureus*, *E. coli*, *Sarcina lutea* e *Mycobacterium phlei* frente a diversos tipos de extratos de espécies a família Anacardiaceae .

O extrato aquoso de *S.terebinthifolius* mostrou atividade inibitória do crescimento de *Trichophyton rubrum*, *Microsporium canis*, *Epidermophyton flocosum* e *C.albicans*, resultados estes respaldados pela literatura que evindencia o poder antimicrobiano de espécies pertencentes á família Anacardiaceae, como mostra pesquisa realizada por IEVERN *et al.*,(1979).

## **2.4 Antifúngico**

Com o aumento das infecções fúngicas, aumenta também a necessidade de novos agentes antifúngicos. Os antifúngicos existentes no mercado possuem limitações terapêuticas, principalmente quando se levam em consideração os efeitos colaterais como o nefropatotoxicidade e a hepatotoxicidade. Como exemplo de antifúngicos que apresentam esses efeitos tóxicos temos a anfotericina B, e o cetoconazol, entre outros. Além disso, podem ser fungistáticos e não fungicidas (azóis) ou podem desenvolver resistências (TAVARES, 1999; ZACCHINO *et al.*, 2003).

De acordo com Polak (1999), o fármaco ideal para cura de infecções antifúngicas ainda não foi descoberto. Os fármacos utilizados nas infecções fúngicas podem ser tóxicos

não apenas para as células fúngicas, mas também para as células do hospedeiro. Essa ação tóxica é devida a semelhança entre a célula fúngica e a célula humana. Numerosos agentes que inibem processos vitais da célula fúngica são conhecidos, mas devido a sua toxicidade para o homem não podem ser empregados como medicamento.

Segundo Selitrennikoff (1992), os novos agentes antifúngicos devem inibir processos moleculares que estão ausentes, ou que sejam suficientemente diferentes no hospedeiro. Fungos e humanos são ambos eucarióticos e as extensivas diferenças entre suas células ainda estão sendo exploradas para o desenvolvimento de novos agentes antifúngicos (ZACCHINO, *et al.*, 2003).

A lista de substâncias químicas com ação antifúngica é bastante extensa, mas ainda muito restrita ao ser comparada com o número de drogas bacterianas disponíveis. (LACAZ; NEGRO, 1991; ALVES *et al.* 1999).

As drogas antifúngicas exercem ações fungistáticas ou fungicidas, direta ou indiretamente. Os antifúngicos têm características especiais quanto ao mecanismo de ação, via de administração, ação em micoses superficiais e, ou sistêmicas, podendo ser classificados com base no sítio-alvo e estrutura química, sendo que estes atuam em sua maioria na membrana celular (azóis, anfotericina e nistatina), excetuando-se a fluocitosina e a griseofulvina, que atuam na síntese do ácido nucléico (LACAZ; NEGRO, 1991).

O cetoconazol é indicado em uso tópico ou por via oral, tendo amplo potencial terapêutico para o tratamento de infecções micóticas superficiais e sistêmicas. A distribuição do cetoconazol é limitada e sua penetração no líquido cefalorraquidiano é mínima. A resposta ao tratamento oral é relativamente lenta, sendo menos útil em infecções graves e agudas. (SANDE;MANDELL,1987;LACAZ; NEGRO, 1991; RICHARDSON ; WARNOCK,1993).

### 3.MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Local

As avaliações das atividades antifúngicas dos extratos aquosos das plantas selecionadas foram realizadas no Laboratório de Atividade Antifúngicas (LAAF), pertencente ao Núcleo de Pesquisas Micológicas e Micotoxológicas Luiz Celso Hygino da Cruz (LCHC), do Departamento de Microbiologia e Imunológica Veterinária do Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Localizado no prédio do Projeto de Sanidade Animal.

#### 3.2 Espécies Fúngicas de Referência

As espécies fúngicas de referência foram cedidas pelo Departamento de Biologia CCDB FIOCRUZ originalmente obtidas da American Type Culture Collection (ATCC), Maryland – USA, Agricultural Utilization Research – USA (NCAUR) e da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) – Brasil. (Tabela 1).

**Tabela 1 . Espécies fúngicas de referência utilizadas e seus respectivos registros originais**

<b>Espécies</b>	<b>Ref.CCDB</b>
<i>Aspergillus. carbonarius</i>	UFPE nº 1546. Catálogo URM 3ªed ., 1996
<i>Aspergillus. flavus</i>	NRRL 5520
<i>Aspergillus.niger</i>	ATCC 1004
<i>Aspergillus.parasiticus</i>	NRRL 2999
<i>Aspergillus.ochraceus</i>	NRRL 3174

### 3.3 Manutenção da Coleção Fúngica

As cepas chegaram ao LAAF com identificação própria adotada pelo Departamento de Microbiologia e Imunológica Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRRJ (tabela 2) e, foram mantidas em meio Agar Sabouraud glicosado a 2% (ASG 2%) (Anexo A), a temperatura de 25°C e repicadas trimestralmente, até que fossem iniciados os testes de atividade antifúngica e sensibilidade ao antifúngico comercial Cetoconazol - segundo as técnicas e formulações descritas por Pitt;Hocking (1997). Quando os testes se iniciaram, as cepas passaram a ser repicadas de sete em sete dias. Todos os testes foram realizados com cultivos de sete dias

**Tabela 2 . Espécies fúngicas de referência utilizadas e seus respectivos registros no Laboratório de Atividade Antifúngicas – LAAF**

Espécies	Cepas
<i>Aspergillus carbonarius</i>	437
<i>Aspergillus flavus</i>	335
<i>Aspergillus niger</i>	434
<i>Aspergillus ochraceus</i>	435
<i>Aspergillus parasiticus</i>	336

### 3.4 Contagem de conídios

Uma fração de cada cepa com o cultivo de sete dias era retirada com o auxílio de alça de platina e adicionada a tubos de ensaio contendo 15 mL de água destilada estéril. Cada tubo passava por um processo de homogeneização manual por agitação, a fim de desprender os propágulos, e deste era retirada uma gota do inóculo e levada para Câmara de Neubauer (hemocitômetro) – 0,100mm/0,0025mm<sup>2</sup>- Hirschmann Techcolor, procedendo-se a contagem de células (Anexo B) , com auxílio de Microscópio Binocular – Wild – (Heerbrugg),(Loureiro e Monteiro,2004)

### 3.5 Material Botânico

O material botânico utilizado nos testes antifúngicos foi obtido de duas formas: folhas de *C. citratus* foram coletadas no Município do Rio de Janeiro, Estado do Rio de Janeiro, em propriedade particular, sendo a exsiccata identificada e depositada no Herbário do Departamento de Botânica da com o respectivo registro: RBR30123; *P. boldus* e *S. terebinhtifolia* foram adquiridas junto a YOD, fornecedora dos produtos para manipulação farmacêutica, na forma pulverizada cujas informações estão discriminadas nos respectivos certificados de análises (Anexo D).

### 3.6 Obtenção dos extratos

Folhas secas de *C. citratus* foram pesadas em Balança de Precisão Digital – Sartorius até atingirem um peso de 10 g. Posteriormente foram reduzidas em pequenos pedaços, e adicionadas em 200 mL de água destilada em início de fervura (95°C). A infusão ao chegar à temperatura ambiente foi filtrada em gaze e papel de filtro (Whatman nº 1), obtendo-se o extrato bruto aquoso a 10% . Os extratos foram submetidos a diluições em água destilada estéril, para obtenção de concentrações de 5, 2,5 e 1,25%, e esterilizados por membrana filtrante Milipore de porosidade 0,22mm, acoplada em suporte de membrana de aço inox, em Ultravioleta – Câmara de Segurança Biológica .

A mesma técnica relatada anteriormente foi utilizada em relação ao material pulverizado correspondente á *P. boldus* e *S. terebinhtifolia*.



**Figura 1.** *Cymbopogon citratus*

Fonte: IAC ([www.iac.sp.gov.br/PAM/Especies/CapimLima.htm](http://www.iac.sp.gov.br/PAM/Especies/CapimLima.htm))



**Figura 2.** *Schinus terebinthifolia*

Fonte: BFNS ([www.bfns.org.au/index.php?c+4&w=34](http://www.bfns.org.au/index.php?c+4&w=34))



**Figura 3.** *Peumus boldus*

Fonte: UNIGRAZ ([www.uni-graz.at/~katzner/pictures/peum\\_03.jpg](http://www.uni-graz.at/~katzner/pictures/peum_03.jpg))

### **3.6.1 Verificação do pH dos extratos**

Uma vez que o pH ácido ou alcalino do extrato poderia causar a inibição ou retardo do crescimento fúngico, foi verificado o pH dos mesmos.

Amostras das diferentes concentrações dos extratos foram imediatamente transferida para um becker e procedeu-se a avaliação do pH utilizando-se o papel Tornasol ( pHgametro da marca Merck®).

### **3.7 Testes de Atividade Antifúngica**

A atividade antifúngica foi verificada utilizando o método da concentração inibitória mínima (MIC) em agar, com a técnica de diluições em placa (Pour – Plate), (HORNER *et al.*, 2004; USP-24-NF 19, 2000; APHA, 1998; NABET *et al.*., 1997; ICMSF, 1978; THATCHER; CLARCK, 1973), com modificações, sendo realizadas diluições dos extratos, partindo de uma solução 5% padronizado pela National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS).. De cada diluição dos extratos retirou-se 1ml que foi colocado em placa de Petri descartável estéril. Em seguida, foi adicionado as placas 1mL de cada suspensão dos inóculos. Por último, tubos contendo 8 mL do meio Agar Sabouraud Glicosado a 2% (ASG2%) da marca Vetec ® - adquiridos comercialmente – (Anexo A), eram vertidos nas placas de Petri; estas passavam por processo de movimentos na forma de oito e após repouso e total solidificação, levadas a incubar em Estufa BOD Luferco, ajustada para temperatura de 36°C. Os testes foram realizados em triplicata e os resultados obtidos após leituras de 24, 48 e 168 horas. Para cada bateria, foi realizados o teste controle contendo meio e extrato, em duplicata e, meio e fungo, conforme protocolo em anexo (Anexo C). Todo o procedimento foi realizado em UV – Câmara de Segurança Biológica – PA – 115 .

### **3.8 Obtenção dos Antifúngicos**

Os princípios ativos do Cetoconazol utilizado, estavam sob a forma de pó (NCCLS,1992). O cetoconazol foi adquirido comercialmente junto a farmacêutica Dra.Alda Maria Magalhães D' Almeida Silva, CRF5563, sendo fornecido o laudo de garantia e controle de qualidade de cada um deles ( Anexos C)

### **3.9 Preparo do Antifúngico**

O solvente eleito para a preparação da solução de Cetoconazol foi o dimetil-sulfóxido (DMSO) (WARNOCK, 1989; NCCLS, 1992).Procedeu-se a pesagem de 0,029g do princípio ativo, em Balança de Precisão Digital Mettler PE 360 (NCCLS,1992)e em seguida à solubilização da droga, obtendo-se a concentração final de 1933,18 µg/mL, respeitando a concentração mínima de 1280 µg/mL como recomendado no NCCLS (1992). O teste de sensibilidade foi iniciado imediatamente após a solubilização completa do antifúngico de acordo com Warnock, (1989). Todo o procedimento foi realizado em Ultravioleta - Câmara de Segurança Biológica - PA-115 .

### **3.10 Testes de Controle com Antifúngico**

Foi adicionada em placa de Petri descartável estéril 1mL da solução do antifúngico. Em seguida foi adicionado 1mL da suspensão dos inóculos. Por ultimo, foi vertido 8 mL do meio Agar Sabouraud Glicosado a 2% (ASG2%) . As placas passaram por um processo de homogeneização com movimentos em forma de oito e após repouso e total solidificação, foram levadas a incubar em Estufa BOD , ajustada para temperatura de 36°C. Os testes foram realizados em duplicata e os resultados obtidos após leituras de 24, 48 e 168 horas. Para cada bateria, foi realizado um controle com duas placas contendo cada uma , 1mL da suspensão do inóculo e o solvente DMSO. Em toda a bateria foi realizado controle com placas contendo apenas meio de ASG 2% puro. Todo o procedimento foi realizado em ultravioleta – Câmara de Segurança.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Contagem de conídios

**Tabela 3. Número médio de conídios/mL das espécies de *Aspergillus* nos diferentes testes**

Espécie	conídios/mL
<i>Aspergillus flavus</i>	152
<i>Aspergillu. Ohraceus</i>	147
<i>Aspergillu. Niger</i>	161
<i>Aspergillus parasiticus</i>	152
<i>Aspergillus. Carbonarius</i>	136

### 4.2 Valores de pH Obtidos nos Extratos

A tabela 3 mostra os valores de pH obtidos para os extratos nas diversas concentrações utilizadas nos experimentos. Observa-se, que independentemente da concentração, e comum de se esperar o pH entre 5,5 e 6.

**Tabela 4. Valores de pH dos extratos *Cymbopogon citratus*, *Peumus boldus* e *Schinus terebinthifolia* nas concentrações de 5, 2,5 e 1,25%**

Extratos	pH nas diferentes concentrações		
	5%	2,5%	1,25%
<i>Cymbopogon citratus</i>	5,5	5,5	5,5
<i>Peumus boldus</i>	6	6	6
<i>Schinus terebinthifolia</i>	6	6	6

#### **4.3 Avaliação do Teste de Atividade Antifúngica para o Extrato de *Cymbopogon citratus***

Ao final da leitura (168h), todas as placas se mostraram positivas em todas as concentrações. As placas contendo *A.flavus* e extrato mostraram-se negativas em 24 h para todas as concentrações (Tabela 4). Na leitura de 48h apresentou-se negativo somente na concentração de 5% (Tabela 5).

Não houve inibição do crescimento em nenhuma das placas contendo *A.niger*, *A.ochraceus*, *A.carbonarius*, *A.parasiticus* e o extrato de *C.citratus* nas concentrações de 5%, 2,5%, 1,25%, nas leituras de 24, 48 (Tabelas 5 a 8). Ao final da leitura (168h), todas as placas se mostraram positivas (Tabelas 4 a 8).

#### **4.4 Avaliação do Teste de Atividade Antifúngica para o Extrato de *Peumus boldus***

As placas contendo *A.parasiticus* e extrato a uma concentração de 1,25% foram às únicas que não apresentaram crescimento em 24 horas, leitura negativa (Tabela 8). *A. flavus*, *A.carbonarius*, *A.niger* e *A.ochraceus* mostraram leitura positiva nas duas primeiras leituras (24 e 48 h) independente das concentrações (Tabelas 4,5,6 e 7). Ao final da leitura (168h), todas as placas apresentaram crescimento, leitura positiva (Tabelas 4 a 8)

#### **4.5 Avaliação do Teste de Atividade Antifúngica para o Extrato de *Schinus terebinthifolia***

*A.flavus* e *A.niger*, apresentaram-se positivos em todas as concentrações e em todas as horas (24,48,168h) em que as leituras foram realizadas, com crescimento total nas placas. *Aspergillus parasiticus*, apresentou negatividade para as duas primeiras leituras (24 e 48 h). As placas contendo *A.carbonarius* e extrato com as concentrações de 2,5 e 5% apresentaram-se negativas na leitura de 24 h. Ao final da leitura (168h) todas as placas se mostraram positivas.

Tabela 5. Leitura dos testes de atividade antifúngica após incubação de 24, 48, 168h a 36°C dos para os extratos de *C. citratus*, *P. boldus* e *S. terebinthifolia* com *A. flavus*

*Aspergillus flavus*

Extratos	24 h					
	Concentrações					
	1,25%	2,5%	5%	Meio	Meio e fungo	Meio e extrato
<i>C. citratus</i>	-	-	-	-	+	-
<i>P. boldus</i>	+	+	+	-	+	-
<i>S. terebinthifolia</i>	+	+	+	-	+	-

Extratos	48 h					
	Concentrações					
	1,25%	2,5%	5%	Meio	Meio e fungo	Meio e extrato
<i>C. citratus</i>	+	+	-	-	+	-
<i>P. boldus</i>	+	+	+	-	+	-
<i>S. terebinthifolia</i>	+	+	+	-	+	-

Extratos	168 h					
	Concentrações					
	1,25%	2,5%	5%	Meio	Meio e fungo	Meio e extrato
<i>C. citratus</i>	+	+	+	-	+	-
<i>P. boldus</i>	+	+	+	-	+	-
<i>S. terebinthifolia</i>	+	+	+	-	+	-

(+) houve crescimento

(-) não houve crescimento

**Tabela 6. Leitura dos testes de atividade antifúngica após incubação de 24, 48, 168 h a 36 °C dos extratos de *C. citratus*, *P. boldus*, *S. terebinthifolia* com *A. ochraceus***

*Aspergillus ochraceus*

Extratos	24 h					
	Concentrações					
	1,25%	2,5%	5%	Meio	Meio e fungo	Meio e extrato
<i>C. citratus</i>	+	+	+	-	+	-
<i>P. boldus</i>	+	+	+	-	+	-
<i>S. terebinthifolia</i>	+	+	+	-	+	-

Extratos	48 h					
	Concentrações					
	1,25%	2,5%	5%	Meio	Meio e fungo	Meio e extrato
<i>C. citratus</i>	+	+	+	-	+	-
<i>P. boldus</i>	+	+	+	-	+	-
<i>S. terebinthifolia</i>	+	+	+	-	+	-

Extratos	168 h					
	Concentrações					
	1,25%	2,5%	5%	Meio	Meio e fungo	Meio e extrato
<i>C. citratus</i>	+	+	+	-	+	-
<i>P. boldus</i>	+	+	+	-	+	-
<i>S. terebinthifolia</i>	+	+	+	-	+	-

(+) houve crescimento  
 (-) não houve crescimento

**Tabela 7. Leitura dos testes de atividade antifúngica após incubação 24, 48, 168h, a 36°C dos extratos de *C.citratus*, *P.boldus* e *S.terebinthifolius* com *A.carbonarius***

*Aspergillus carbonarius*

Extratos	24 h					
	Concentrações					
	1,25%	2,5%	5%	Meio	Meio e fungo	Meio e extrato
<i>C. citratus</i>	+	+	+	-	+	-
<i>P. boldus</i>	+	+	+	-	+	-
<i>S. terebinthifolia</i>	+	-	-	-	+	-

Extratos	48 h					
	Concentrações					
	1,25%	2,5%	5%	Meio	Meio e fungo	Meio e extrato
<i>C. citratus</i>	+	+	+	-	+	-
<i>P. boldus</i>	+	+	+	-	+	-
<i>S. terebinthifolia</i>	+	+	+	-	+	-

Extratos	168 h					
	Concentrações					
	1,25%	2,5%	5%	Meio	Meio e fungo	Meio e extrato
<i>C. citratus</i>	+	+	+	-	+	-
<i>P. boldus</i>	+	+	+	-	+	-
<i>S. terebinthifolia</i>	+	+	+	-	+	-

(+) houve crescimento  
 (-) não houve crescimento

**Tabela 8. Leitura dos testes de atividade antifúngica após incubação 24, 48, 168h, a 36°C dos extratos de *C. citratus*, *P. boldus* e *S. terebinthifolia* com *A. niger***

*Aspergillus niger*

Extratos	24 h					
	Concentrações					
	1,25%	2,5%	5%	Meio	Meio e fungo	Meio e extrato
<i>C. citratus</i>	+	+	+	-	+	-
<i>P. boldus</i>	+	+	+	-	+	-
<i>S. terebinthifolia</i>	+	+	+	-	+	-

Extratos	48 h					
	Concentrações					
	1,25%	2,5%	5%	Meio	Meio e fungo	Meio e extrato
<i>C. citratus</i>	+	+	+	-	+	-
<i>P. boldus</i>	+	+	+	-	+	-
<i>S. terebinthifolia</i>	+	+	+	-	+	-

Extratos	168 h					
	Concentrações					
	1,25%	2,5%	5%	Meio	Meio e fungo	Meio e extrato
<i>C. citratus</i>	+	+	+	-	+	-
<i>P. boldus</i>	+	+	+	-	+	-
<i>S. terebinthifolia</i>	+	+	+	-	+	-

(+) houve crescimento  
 (-) não houve crescimento

Tabela 9. Leitura dos testes de atividade antifúngica após incubação 24, 48, 168h, a 36°C dos extratos de *C. citratus*, *P. boldus* e *S. terebinthifolia* com *A. parasiticus*

*Aspergillus parasiticus*

Extratos	24 h					
	Concentrações					
	1,25%	2,5%	5%	Meio	Meio e fungo	Meio e extrato
<i>C. citratus</i>	+	+	+	-	+	-
<i>P. boldus</i>	-	+	+	-	-	-
<i>S. terebinthifolia</i>	-	-	-	-	-	-

Extratos	48 h					
	Concentrações					
	1,25%	2,5%	5%	Meio	Meio e fungo	Meio e extrato
<i>C. citratus</i>	+	+	+	-	+	-
<i>P. boldus</i>	+	+	+	-	+	-
<i>S. terebinthifolia</i>	+	+	+	-	+	-

Extratos	168 h					
	Concentrações					
	1,25%	2,5%	5%	Meio	Meio e fungo	Meio e extrato
<i>C. citratus</i>	+	+	+	-	+	-
<i>P. boldus</i>	+	+	+	-	+	-
<i>S. terebinthifolia</i>	+	+	+	-	+	-

(+) houve crescimento  
 (-) não houve crescimento

#### 4.6 Avaliação do Teste de Sensibilidade Antifúngica para o Cetoconazol

Ao final da leitura (168 horas), todas as placas se mostraram negativas frente ao Cetoconazol, não havendo crescimento fúngico de nenhuma das cepas testadas. Os controles meio, fungo e DMSO mostraram-se positivos em todas as leituras (24,48 e 168 horas). O controle do meio foi negativo, não apresentando contaminação (Tabela 10)

**Tabela 10. Avaliação do teste de sensibilidade antifúngica para Cetoconazol e controles**

<b>Leitura</b>	<b>Cetoconazol</b>	<b>Meio+fungo+DMSO</b>	<b>Meio</b>
<b>24 h</b>	-	+	-
<b>48 h</b>	-	+	-
<b>168 h</b>	-	+	-

(+) houve crescimento

(-) não houve crescimento

## 5. DISCUSSÃO

Um número significativo de trabalhos já foram realizados para determinar a atividade antifúngica de *C.citratus* contra fungos do gênero *Aspergillus*, porém na sua maioria foi utilizado o seu óleo essencial, o que torna difícil a discussão e comparação com esta pesquisa. De acordo com Helal *et al.* (sem data) o óleo essencial de *C.citratus* revelou-se como sendo um dos mais ativos contra *A.flavus* dentre os oito óleos essenciais testados. Outros estudos realizados por Stangarlin; Pascholati (1997) demonstraram que extratos de *C.citratus* testados “*in vitro*” no desenvolvimento de fungos fitopatogênicos afetaram a germinação de esporos e o crescimento miceliano.

De acordo com Billerbeck *et al.*(2001) o *A niger* em contato com óleo essencial de *C.citratus* passa a apresentar alterações na hifa. Segundo Sikkena *et al.*(1994) alterações na membrana plasmática de *A.niger* ocorre em presença de óleo essencial de *C.citratus*.

*Cymbopogon citratus* quando testados por Belém (1997), sobre fungos de armazenamento: *A. flavus*, *A. niger* e *Penicillium spp* apresentou atividade antifúngica satisfatória.

Em relação a atividade antimicrobiana de *Schinus terebinthifolia* vários trabalhos foram publicados grande parte desses trabalhos foram feitos com bactérias e leveduras. Malcolm *et al.*(1969) relataram atividade antifúngica contra espécies de *Candida* e *Aspergillus*. Apesar da determinação da atividade antifúngica contra espécies de *Aspergillus* estes trabalhos foram realizados com óleo essencial,dificultando a discussão e comparação com o presente trabalho.

Guerin; Reveil-Lere em 1984 avaliando o óleo essencial de *P. boldus* o mesmo mostrou-se ativo sobre *A. niger*. Estas atividades podem estar relacionadas aos ésteres boldino e ascaridiol presentes na sua composição química. Grande parte das pesquisas realizadas com *P. boldus* foi feita com uso de seu óleo essencial.

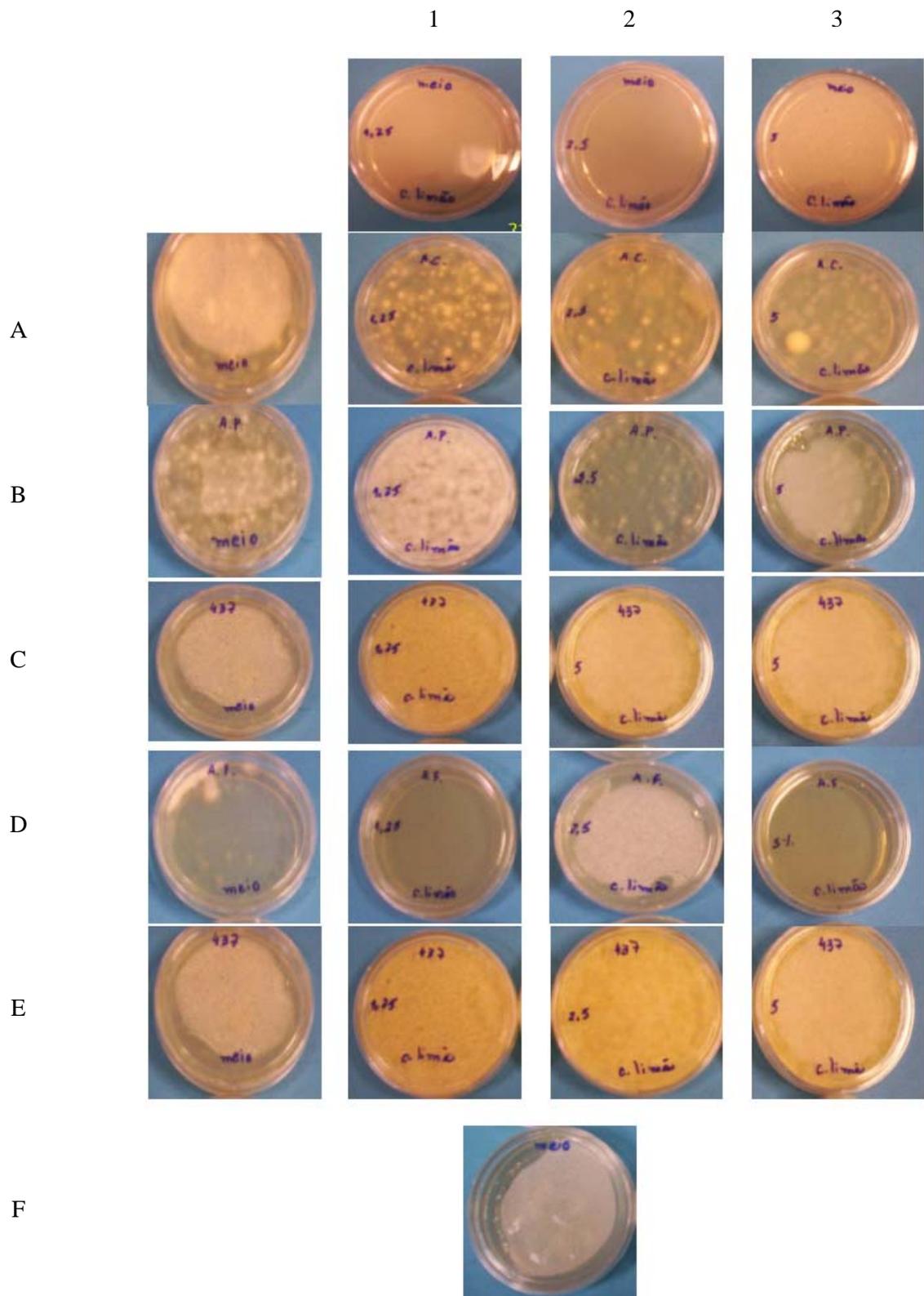


Figura 4. Bateria do teste de atividade antifúngica – leituras de 24, 48 e 168 horas – de *Cymbopogon citratus*

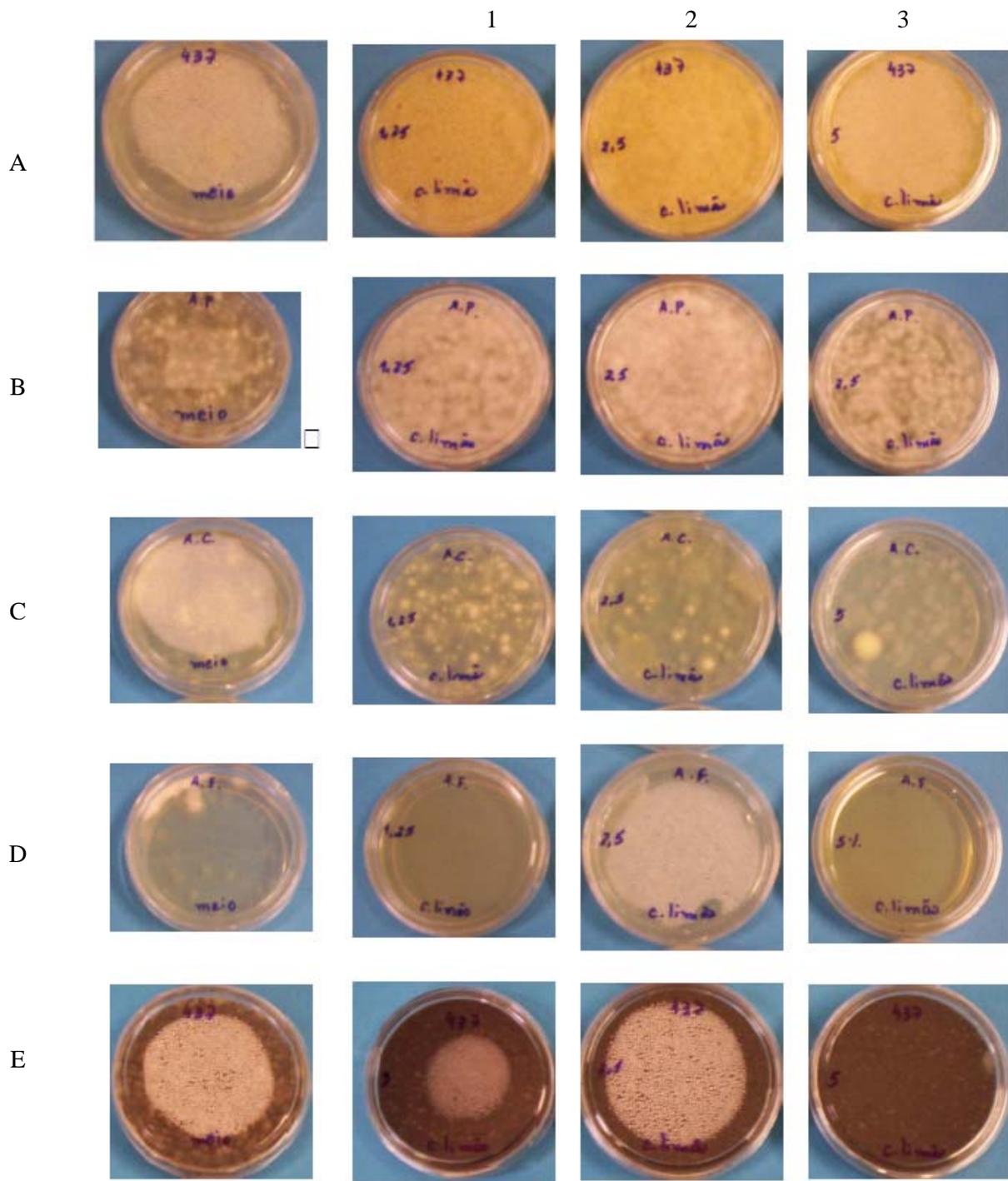


Figura 4. Continuação

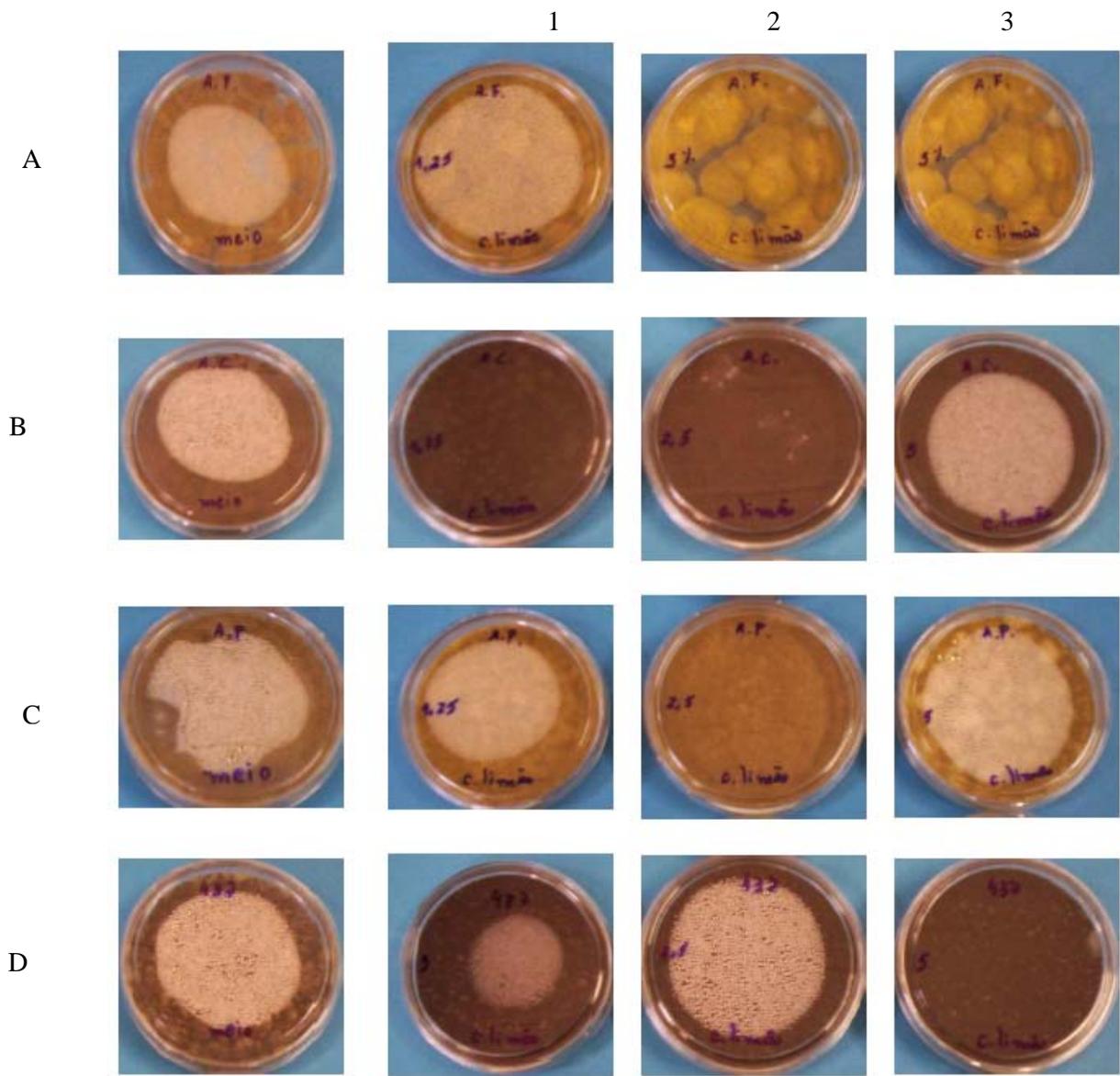


Figura 4. Continuação

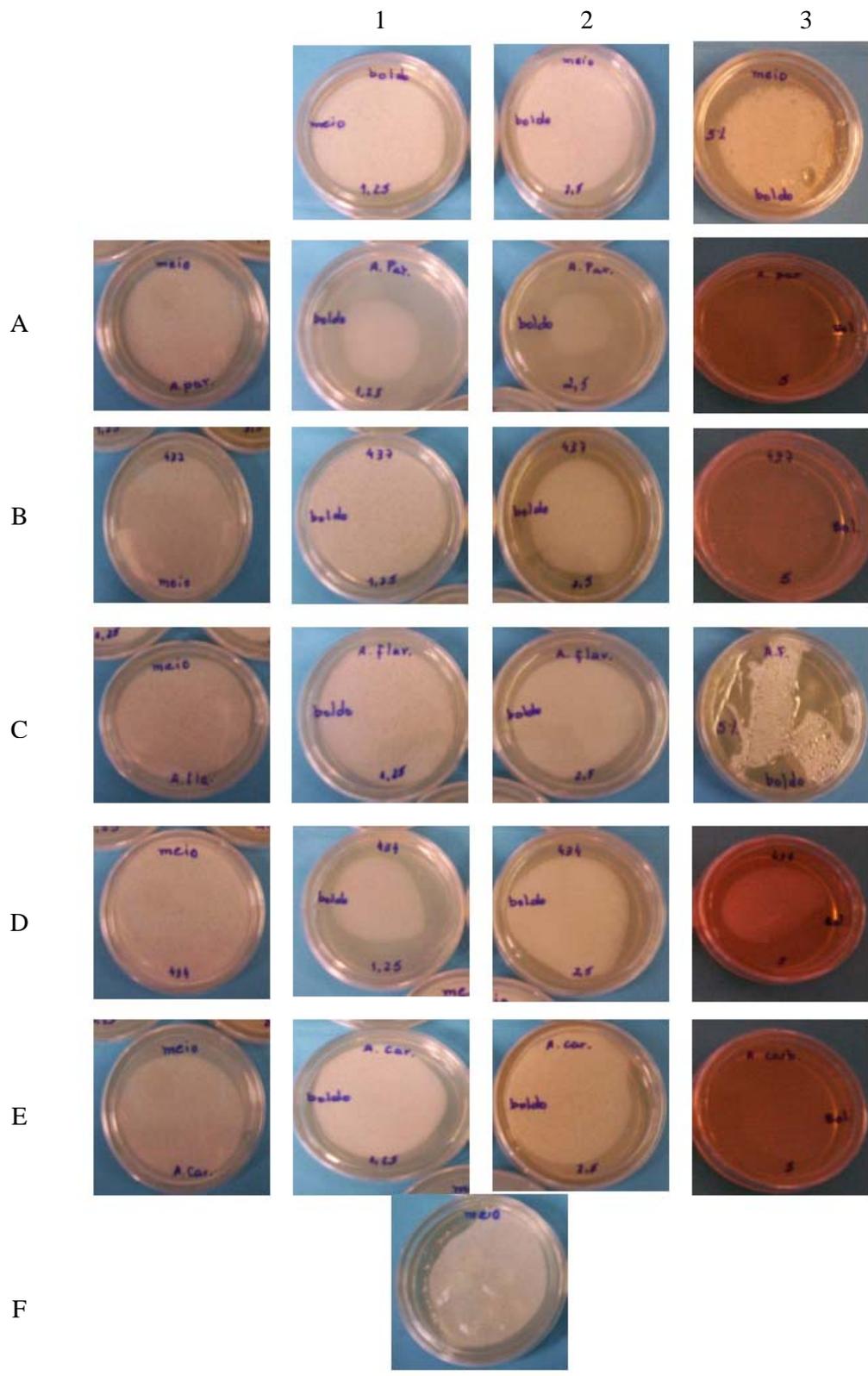


Figura 5. Bateria do teste de atividade antifúngica – leituras de 24, 48 e 168 horas – de *Peumus Boldus*

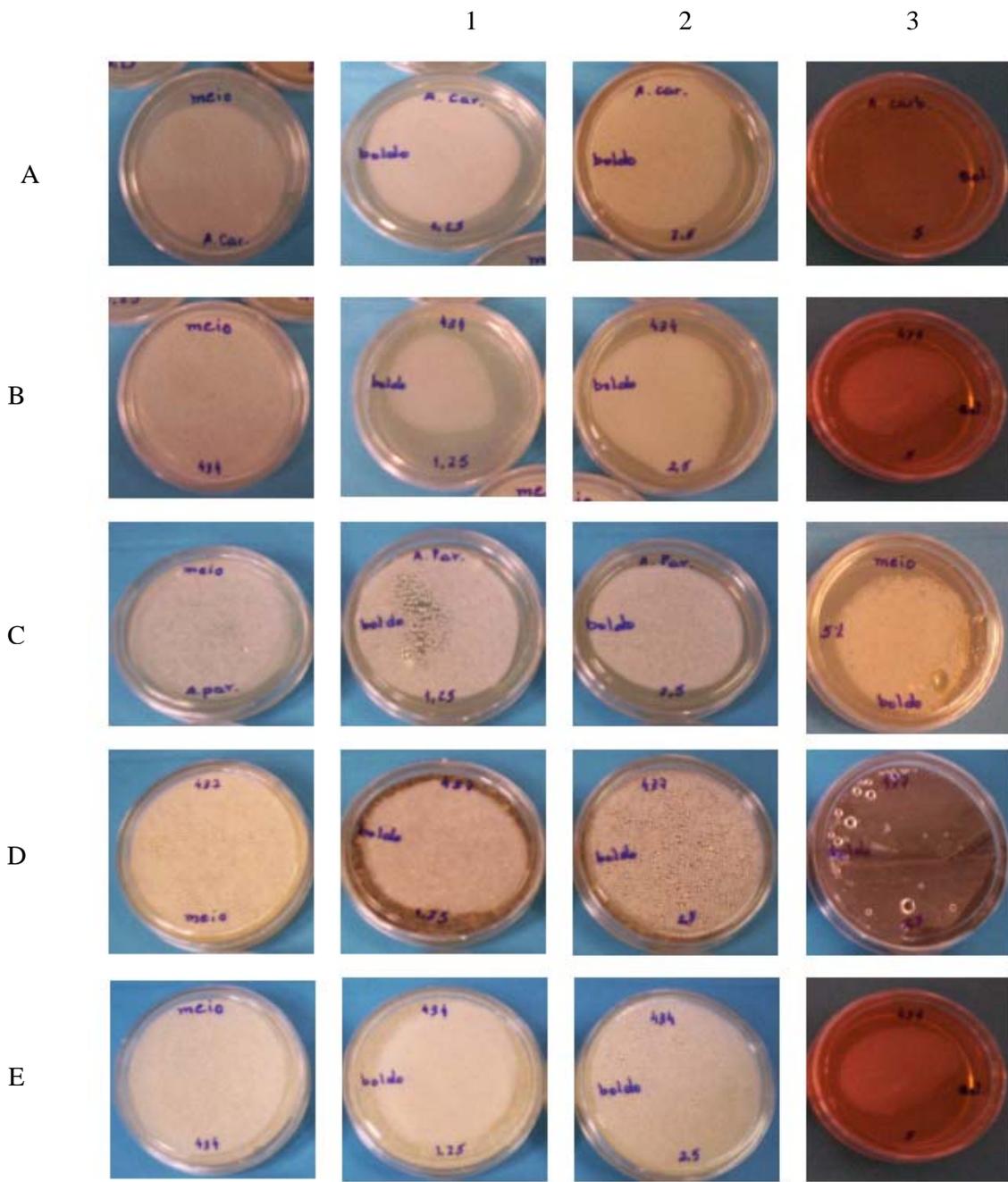


Figura 5. Continuação

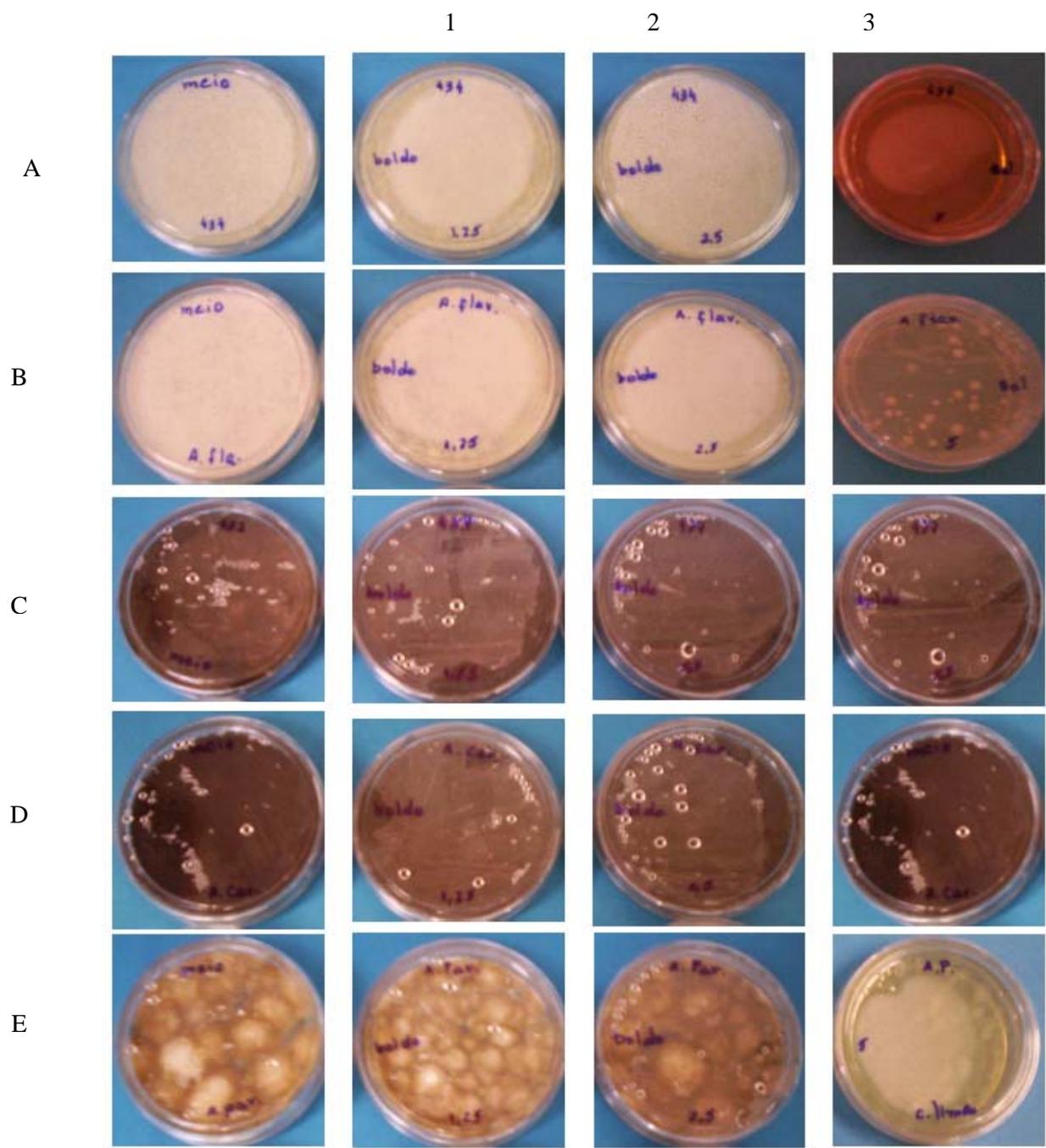


Figura 5. Continuação

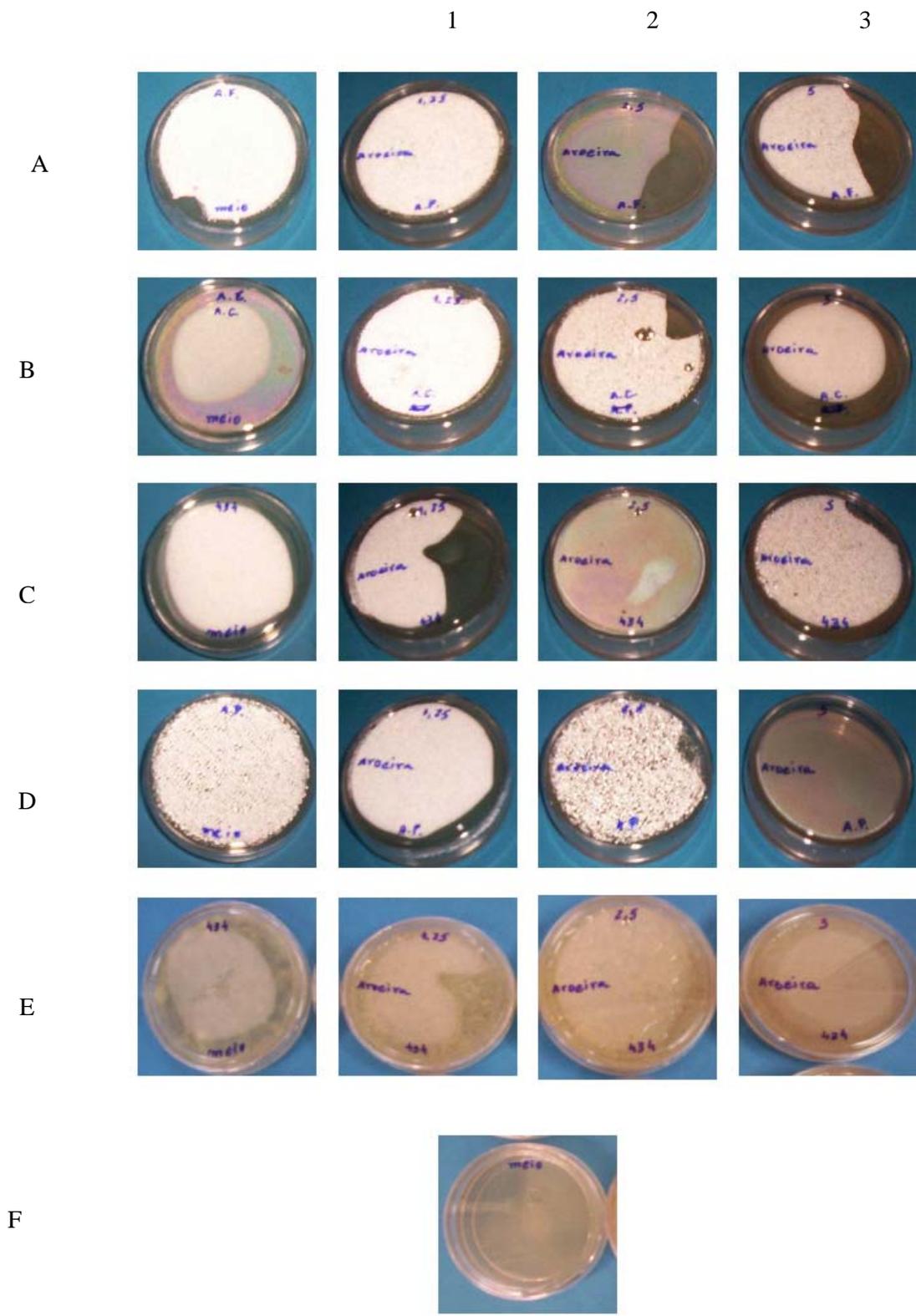


Figura 6. Bateria do teste de atividade antifúngica – leituras de 24, 48 e 168 horas – de *Schinus terebinthifolia*

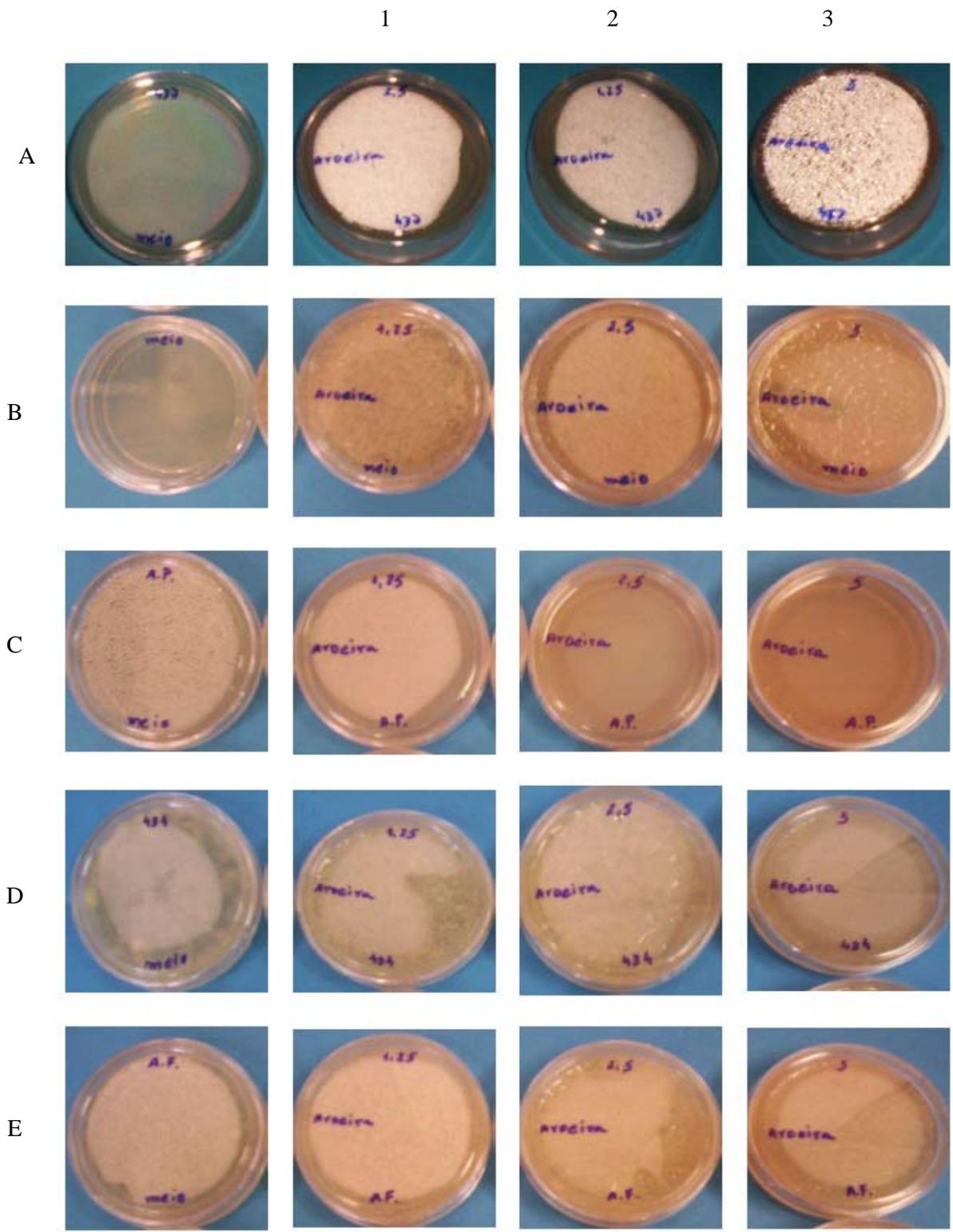


Figura 6. Continuação

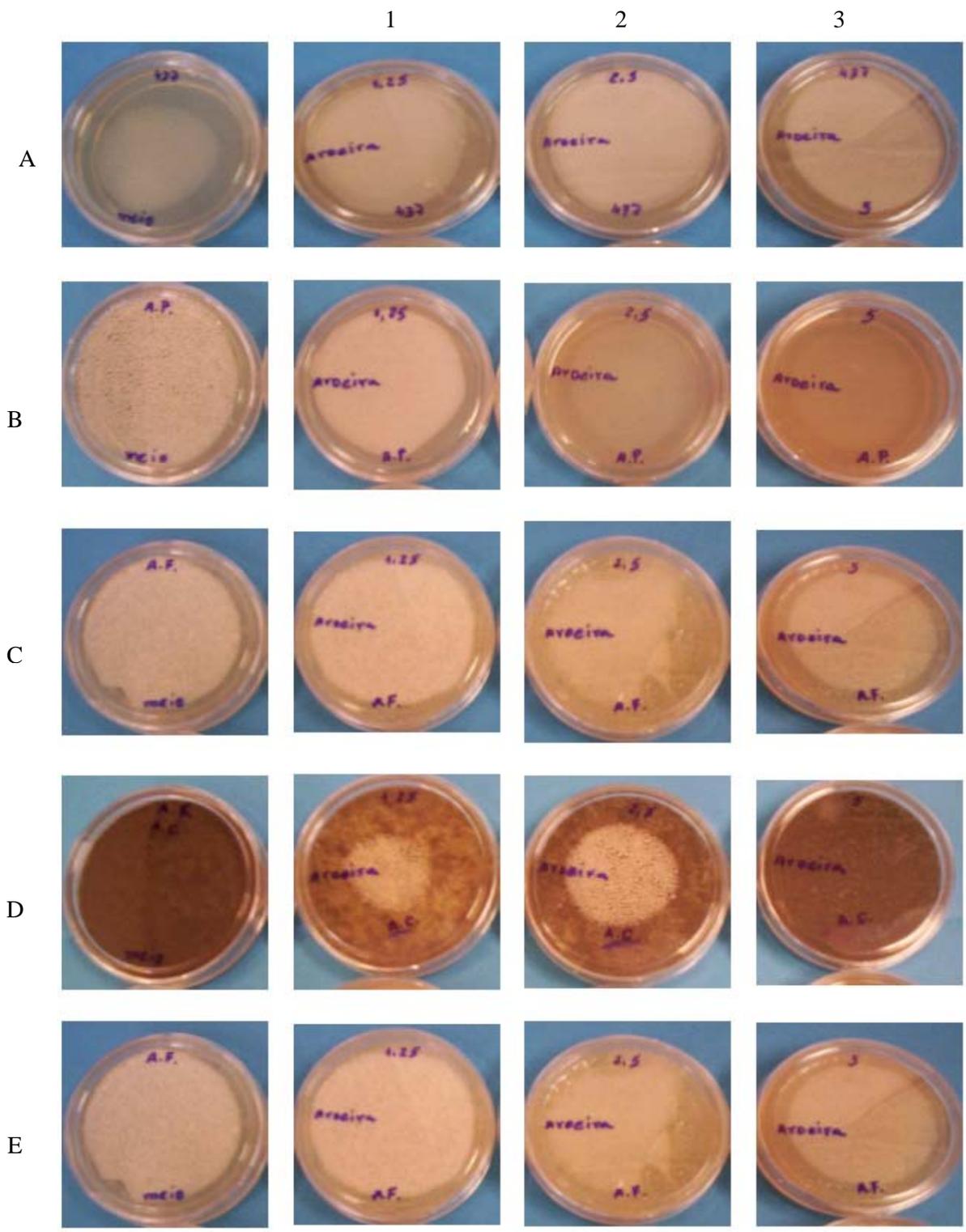


Figura 6. Continuação

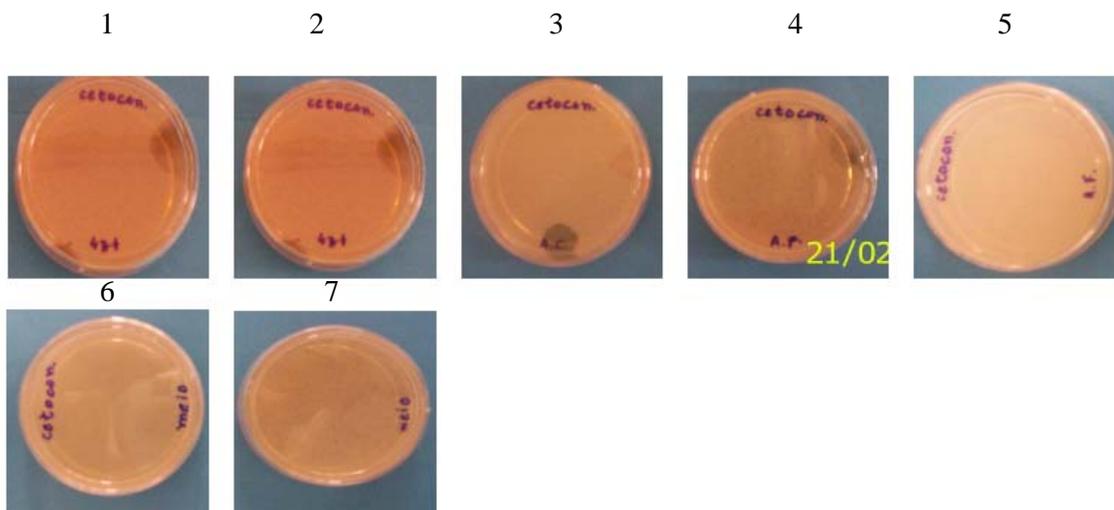


Figura7. Bateria do teste de sensibilidade ao antifúngico Cetocanazol

## 6. CONCLUSÕES

O método de diluições em placa para testes e atividade antifúngica dos extratos de plantas e os testes de sensibilidade ao antifúngico utilizado neste trabalho, mostrou-se eficaz devido a sua praticidade, rapidez, sensibilidade e baixo custo.

O meio Agar Sabouraud Glicosado a 2% propiciou crescimento das cinco espécies do gênero *Aspergillus* e também a leitura adequada dos resultados dos testes de atividade antifúngica dos extratos de plantas e testes de sensibilidade ao antifúngico, sendo uma boa opção para a realização destes na rotina laboratorial.

O solvente dimetil-sulfóxido (DMSO), foi capaz de solubilizar o antifúngico Cetoconazol; não interferindo no desenvolvimento das cinco espécies do gênero *Aspergillus*.

O extrato aquoso de *Cymbopogon citratus* mostrou -se ativo contra *Aspergillus flavus* na concentração de 5% em 48 horas. No entanto, se faz necessária a realização de estudos em concentrações diferentes das testadas e na forma de obtenção dos extratos de *Peumus boldus* e *Schinus Terebinthifolia*, para que se possa afirmar que eles não apresentam atividade antifúngica frente as cinco espécies do gênero *Aspergillus* aqui investigadas.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABARCA, M. L.; ACCENSI, F.; BRAGULAT, M. R.; CABAÑES, F.J. Current importance of Ochratoxin A – Producing *Aspergillus* spp. *Journal of Food Protection*, 64(6): 903 -906, 2001.
- ABARCA, M.L.; ACCENSI, F.; BRAGULAT, M.R.; CASTELLA, G.; CABAÑES, F.J. *Aspergillus carbonarius* as the main source of ochraoxin A contamination in dried vine fruits from the Spanish market. *Journal of Food Protection*, 66, n.3, p.504-506.
- AGRIOS, G.N. *Plant Pathology*. New York: Academic Press, 1988.
- ALMEIDA, E.R. *As plantas medicinais brasileiras*. São Paulo: Hemus, 1993.
- APHA – AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 20<sup>th</sup>, Washington, DC, 1998.
- ALVES, T.M.A .; SILVA, A.F.; BRNDÃO, M.; GRANDI, T.S.M .; SMÂNIA , E.F.A.; SMÂNIA JUNIOR, A.; ZANI, C.L. Biological screening of Brazilian medicinal plants. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.95, n.3, p.367-373, 1999.
- ALZUGARY,D., ALZUGARY, C. *Plantas que curam*, Rio de Janeiro: s.n.,v.1,1983.
- AYERST, G. The effects of moisture and temperature on growth and spore germination in some fungi. *Jour. Store Prod. Res .:* 669-687, 1969.
- BRAGA, R.A. *Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará*. 2.ed, Fortaleza: Impr.Oficial,1960.
- BANCON,C.W.; SWEENEY, J.G.; ROBBINS, J.D.; BURDICK,D.Production of Penicillic Acid and Ochratoxin A on poultry Feed by *Aspergillus ochraceus*: Temperature and Moisture Requirements. *Applied Microbiology*,V 26(2): P155-160,1973.
- BANDEIRA, J.A. Ação antiinflamatória e cicatrizante de *Schinus aroeira* Vell., em pacientes com cervicite e cervicovaginite, *Ver, Inst, Antibioticos, Recife*, 105-106, 1974.
- BASILE,A.; GIORDANO, S.; LÓPEZ-SAEZ, J.A.; COBIANCHI, C.R. Antibacterial activity of pure flavonoids isolated from mosses. *Phytochemistry*, v.52, 1479-1482, 1999.
- BRANDÃO, M.G.L.; FREIRE, N.; VIANNA-SOARES, C.D. Vigilância de fitoterápicos em Minas Gerais, Verificação da qualidade e diferentes amostras comerciais de camomila. *Cadernos de Saúde Pública*, v.14, n.2, p.693-700, 1998.
- CARLINI, E.L.A; SILVA-FILHO, A.R; SUCHECKI, D; MALUF, E; CALIL, H.M; LODDER, H.M; LEITE, J.R; CONTAR, J.D.P; ASSOLANT, K.R.M; SEABRA, M.L; SOUZA, M.L.O; FROCHTENGARTEN, M.L; SILVEIRA-FILHO, N.G; BUENO, O.F.A; FILHO, O.G; KLEPACZ, S; GIRARDI, S.M.V; TUFUK, S; FERREIRA, T.M.S. Farmacologia pré-clínica, clínica e toxicologia do capim-cidrão, *Cymbopogon citratus*. Brasília: CEME (Programa de Pesquisa em Plantas Medicinais, 1), 15p,1985.

CARLSON, H.J.; DOUGLAS, H.G.; ROBERTSON, J. Antibacterial substances separated from plants. *Journal Bacteriol*, v55, n3, p.241-248, 1998.

CARVALHO, R.A.; LACERDA, J.T.; OLIVEIRA, E.F.; CHOAIRY,S.A; BARREIRO NETO,M.; SANTOS, E.S. Dos controles de fusariose do abacaxizeiro com plantas antibióticas/ Control of fusarium fruit rot of pineapple with antibiotic plants. João Pessoa; EMEPA-PB, 37p.;il, 2000.

CHRISTENSEN, M. A synoptic Key and evaluation of species in the *Aspergillus flavus* group. *Mycology*, 73p 1056-1984, 1981.

CRAVEIRO , A.A., G.F;FERNANDES, C.H.S ;ANDRADE *et al.* Óleos essenciais de plantas do Nordeste. Ed.UFC, Fortaleza, 209pp, 1981.

CRUZ, L. H. C. Micotoxinas: Perspectiva Latinoamericana. Seropedica. Editora da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1996.

COWAN, M.M Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, v.12, n.4, p. 564-582, 1999.

DALCERO, A. M.; MAGNOLI, C.; HALLACK, C.; CHIACCHIERA, S.M.; PALACIOS, G.; ROSA, C. A. R. Detection of ochratoxin A in animal feeds and capacity to produce this mycotoxin by *Aspergillus section Nigri* in Argentina. *Food Additives and Contaminates*,V.19 N 11 P.1065– 1072, 2002.

DAVIES, N. D. & DIENER, U. L. (1983) Biology of *A.flavus* and *A. parasiticus*: Some characteristics of toxigenic and nontoxigenic isolates of *A.flavus* e *A.parasiticus*. In: Aflatoxin and *A.flavus* in corn. URBAN L. DIENER ( Editor-in-Chief) Southern Cooperative Series Bulletin 279, Department of Research Information, Alabama Agricultural Experiment Station, Auburn University.1983.112p.

DE BILLERBECK, V.G., ROQUES, C.G., BESSIERE, J.M., FANVIEILLE, J.L. and DARGENT, R.Effect of *Cymbopogon nardus* (L.) W.Watson essential oil on the growth and morphogenesis of *Aspergillus niger*.*Canadian Journal of Microbiology*,v.47, p.9-17,2001.

DE SOUZA, MM.; BELLA CRUZ, A.; SCHUMACHER, M.B.; KREUGER, M.R.O.; FREITAS, R.A.; BELLA CRUZ, R.C. Métodos de avaliação de atividade biológica de produtos naturais e sintéticos. In: BRESOLIN, T.M.B.; CECHINEL FILHO,V (Editores) Ciências Farmacêuticas: Contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos Editora UNIVALI, Itajaí, 2003.

DOMSCH, K. H.; GAMS, W.; ANDERSON, T.H. Compendium of soil fungi London: Academic Press, 1980.

EPPLEY, R.M. Screening Method for Zearalenone, Aflatoxin and Ochratoxin: *J.Assoc.Off.Anal.Chem*,V. 51 N.11P.74-8,1968.

ESPÍNOLA, E. B. Uso seguro e racional de produtos fitoterápicos. *Revista Racine*, p.52-53, maio/jun., 1997.

GUERIN,J; REVEIL-LERE,H. Antifungal activity of plants extracts used in therapy. I . Study of 41 plants extracts against 9 fungus species. *The Annals of Pharmacotherapy Française*, v.42, n.6,p. 553-9, 1984.

GRUENWALD, J., Physicians Desk References (PDR) for herbal medicines, Med. Econ. Co, New Jersey, 858p, 2000.

HELAL GA,SARHAN MM, ABU SHAHLA AN.Effect of *Cymbopogon citratus* L.essential oil on the growth, morphogenesis and aflatoxin production of *Aspergillus flavus* ML2-strain.*Journal of Basic Microbiol*, Fev, v.47, n.1., 5-15, 2007.

HERRY, M.P.; LEMETAYER,L. Aflatoxin B<sub>1</sub> contamination in oilseeds, dried fruits and spices. *Microbiol. Alim&Nutrition* .v. 10, p.261-266,1992.

HORNER, R;NOAL , A.L.; SCHIMITZ, M.; KRAUSPENHAR, L. C.; ALIEVI, M.M.Atividade antibacteriana de mel frente ás bactérias hospitalares e ATCC. Sociedade Brasileira de Patologia Clínica . Disponível em : <http://w.w.w.sbpc.org.br/T8.jsp?pageid=590&siteid=1>. Acesso em: julho 2006.

KISHORE, N; MISHARA, A.K.; CHANSOURIA, J.P.N. Fungitoxicity of essential oils against dermatophytes. *Mycoses*. Belfast, v.36, p.211-215, 1993.

KLICH, M. & PITT, J. I. A laboratory guide to common *Aspergillus* species and their Teleomorphs. North Ryde: Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, 116pp, 1988.

KOEHLER, P. E.; HANLIN, R.T.; BERAHA, L. Production of aflatoxins B<sup>1</sup> e G<sup>1</sup> by *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* isolated from market pecans . *Appl. Microbiology*, 30: 581-583, 1975.

ICMSF-INTERNATIONAL COMISSION OF MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS. Their significance and methods of enumeration. Toronto – Canadá: University of Toronto Press, 434 pp, 1978.

IEVEN, M.; BERGHE, D.A.V.; MERTENS,F.; VLIETINCK, A.; LAMMENS, E. Screening of higher plants for biological activities I. Antimicrobial activity. *Planta medica*, v.36, n3, p.311-32, 1979.

LACAZ, C.S.; NEGRO, G. Drogas antifúngicas Terapêutica das micoses. In: LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E.C. Micologia médica fungos, actinomicetos e algas de interesse médico. São Paulo: Savier. Cap.38, p . 616-651,1991

LILLARD, H. S.; HANLIN, R. T.; LILLARD, D. A. Aflatoxigenic isolates of *Aspergillus flavus* from pecans. *Appied Microbiology*, 19: 128-130,1970.

LIMA, E.O; FARIAS, N.M.P. Atividade Antifúngica de óleos Essenciais, obtidos de Plantas Medicinais, contra leveduras do gênero candida. *Revista Brasileira de Ciências da Saúde* , v.3,n.1/3, p.51-64, 1999.

LIMA, E.O; GOMPERTZ, O.F; GIESBRECHT, A.M.; PAULO, M.; PAULO, M.Q.; In vivo antifungal activity of essential oils obtained from officinal plants against dermatophytes. *Mycoses*, Belfast, v.36, p.333-336, 1998.

LORENZI, H., Árvores brasileiras - manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Ed. Plantarum, Nova Odessa, 1992.

MAHMOUD, A.L.E. Antifungal action and antiaflatoxic properties of some essential oil constituents *Letters Applied Microbiology*., Oxford, v.19.110-113, 1994.

MALCOM, S.A.; SOFOWORA, E. A. Antimicrobial activity of selected Nigerian folk remedies and their constituent plants. *Lloydia*, v.32, n.6, p.512-517, 1969.

MATOS, F.J. de A. Plantas medicinais: guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no nordeste do Brasil .2ª ed. Fortaleza: Imprensa Universitária-UFC, .344p, 2000.

MATOS, F.J.A. Farmácias Vivas – sistema de utilização de plantas medicinais projetado para pequenas comunidades. 4. ed. Edições UFC. Fortaleza, 267pp, 2002.

MENENDÉ, P; ONELL, S.; MULLER, S.; DELLACASSA, B. Estudio de la actividad antimicrobiana de distintos aceites esenciales Nota I. In: Jornada de Pesquisa da Universidade Federal de Santa Maria<sup>3</sup>, 1993. Anais . Santa Maria: AUG, P.124, 1993.

MERWE, K.J. VAN DER; STEYN, P.S.; FOURIEL, L. Micotoxins. Part II. The constitution of Ochratoxin A, B e C, metabolites of *Aspergillus ochraceus* with. *Journal of the Chemical Society*., London, p . 7030-88, 1965.

MIRAGLIA, M.; BTRERA, C.; CORNELI, S.; CAVA, E.; MONTAMINO, G.; MIRAGLIA, E. Ocurrence of ochratoxin A (AO) in maternal Serum, Placenta and foliculum. In: Mycotoxins and Phycotoxins - Development in chemistry, Toxicology and food safety. Proceedings of International IUPAC symposium on Mycotoxins and Phycotoxins, 9 – Miraglia, M.; van Egmond, h.p.; Brera, C. & Gilbert, J. ( Eds) Pages 165-172 – Alaken, Inc. FortCollins, Colorado, 1998.

MITCHELL, D.; PARRA, R.; ALDRED, D.; MAGAN, N. Water and temperature relations of growth and ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* strains from grapes in Europe and Israel . *Journal of Applied Microbiology*, v.97, n°2., p.439-445, 2004.

NABET, P.; AUMAITRE, P.; KENDALL, K. *et al* .Invasive hyphomycotic rhinitis in a cat due *Metarhizium anisopliae*. *Med. Mycol.*, v.36, n.1., p.51-54, 1997.

NCCLS – NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; proposed standard. M27-P, v.12, n.25, 1992.

NIERO, R.; MALHAEIROS, A.; BITTENCOURT, C.M.S .; BIAVATTI, M.W.; LEITE, S.N.; CECHINEL FILHO, V. Aspectos químicos e biológicos de plantas medicinais e considerações sobre fitoterápicos. In BRESOLIN, T.M.B.; CECHINEL FILHO, V. Ciências Farmacêuticas Contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos . Editora UNIVALI, 2003.

OMS- Organización Mundial De La Salud . Criterios de salud ambiental 11: Micotoxinas. 131p, 1983.

ONAWUNMI, G.O.; YISAK, W-AB OGUNLANA, E.O. Antibacterial constituents in the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. *J. Ethnopharmacol.*, Lausanne, v.12, n.3, p.279-286, 1984.

PAIVA, S.R.; FIGUEIREDO, M.R.; ARAGÃO, T.V.; KAPLAN, M.A.C. Antimicrobial activity in vitro of plumbagin isolated from *Plumbago* species. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* v. 98, p.959-961, 2003.

PITT, J.L. *Penicillium viridicatum*, *Penicillium verrucosum*, and production of ochratoxin A. *Applied and Environmental Microbiology*, v.53, p.266-269, 1987.

PITT, J.L. & HOCKING, A.D. Fungi and food spoilage, first edition. Sidney: Academic Press, 1985.

PITT, J. I. & HOCKING, A. D. Fungi and food spoilage, second edition. Black Academic & Professional – Chapman & Hall: London, 593 pp, 1997.

PITT, J.I.; MICAMBLE, B.F. Water relations of *Aspergillus flavus* and closely related species. *Journal Food Protection*, v.58 p.86-90, 1995.

PITT, J.I. The current role of *Aspergillus* and *Penicillium* in human and animal health. *Journal Medical and Veterinary Mycology*, v.32, Supl. n.1 p. 17-32, 1994.

POLAK, A. Past, present and future of antimycotic combination therapy. *Mycoses*, v.42, p.335-370, 1999.

PREGNOLATTO, W. & SABINO, M. Pesquisa e dosagem de Aflatoxinas em amendoim e derivados e em outros cereais. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 20, n.30., p.65-71, 1969.

RIBEIRO NETO, L.V. Aflatoxinas e Câncer Hepático, *Ciência e Cultura*, 33(8): 1051-3, 1980.

RICHARDSON, M.D. & WARNOCK, D.W. Fungal infection – Diagnosis and management. London: Blackwell. Cap3: Antifungal drugs, p.17-43, 1993.

ROBINEAU, L.G. Hacia una farmacopea caribeña / TRAMIL 7, enda-caribe UAG & Universidad de Antioquia, Santo Domingo. 697pp, 1995.

ROSA, C. A. R. Micobiota toxígena e ocratoxinas em rações destinadas á alimentação de aves, bovinos, suínos e importância em saúde animal. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias)- UFRRJ, Seropedica, 147 pp, 2002.

RUIZ, A.R.; DE LATORRE, R.A.; ALONSO, N.; VILLAESCUSA, A.; BETANCOURT, J.; VIZOSO, A. Screening of medicinal plants for induction of somatic segregation activity in *Aspergillus nidulans*. *J. ethnopharm.*, v.52, n.4, p.123-127, 1996.

SÁ, L.D; *et al.* Antimicrobial effect of essential oils on bacteria causing conjunctivitis. *Boletim da Sociedade Broteriana*, v.67, p.99-102, 1995-1996.

SABINO, M; LAMARDO,L.C.A.; INOMATA, E.I.; ICHIKAWA, A.H. & GIANNATTASIO, C.M.P.) Ocorrência de aflatoxinas B<sup>1</sup> em produtos alimentícios e rações animais, consumidos no Estado de São Paulo e várias regiões do Brasil, no período de 1980 a 1987. *Rev. Inst. Adolfo Lutz.*, 48 n.1 e 2, p.81-5,1998.

SATO, N.T.; TANAKA, H.; FUJIWARA, S.; HIRATA, M.; YAMAGUCHI, R.; ETOH, H.; TOKUDA, C. Antibacterial property os isoflavonoids isolated from *Erythrina variegata* against cariogenic oral bacterial . *Phytomedicine*, v .9.p. 427-433, 2002.

SAMSON, R. A. List of names of *Trichomaceae* published between 1992 and 1999. In: Integration of modern taxonomic methods for *Penicillium* and *Aspergillus* classification. R. A.SANSOM & J. I. PITT (eds) Amsterdam: Harwood Academic Publishers, pp. 73 -81, 2000.

SANDE, M.A. & MANDELL, G.L. Drogas antimicrobianas –Drogas antimicóticas e antivirais. In: GOODMAN, L.; GILMAN, A.G. As bases farmacológicas da terapêutica. Rio de Janeiro: Guanabara. Cap. 54, p . 779-807, 1987.

SANTURIO,J.M.;BALDISSERA,M.A.;SILVA,J.B.&BRONDANI,E.R.Detecção de aflatoxinas em rações para consumo animal . Resultados de 1987. *Rev. Centro de Ciências Rurais*,v.18,2., p.169-75,1988.

SELITRENNIKOFF, C.P. Screening for antifungal drugs. In: Biotechnology of Filamentosos Fungi – Technology and Products. Boston: Butterum Henemann, p.189-217, 1992

SIANI, CARLOS. Desenvolvimento tecnológico de fitoterápicos:plataforma metodológica. Scriptorio: Rio de Janeiro, 2003.

SIKKEMA, J., de BONT, J.A.M and POOLMAN, B., 1994. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes . *Journal of Biological Chemistry*, n.269, p.8022-8028,1994.

SILVA, E.B. Uso das plantas medicinais pelos moradores do Engenho Uchôa, Recife, 1997.

SIMÕES, C.M.O; MENTZ, L.A;SCHENKEL, E.P; IRGANG, B.E ; STEHMANN, J.R. Plantas da medicina popular do Rio Grande no Sul. Porto Alegre : Editora da Universidade, .171p, 1986

SMITH, J. E. & MOSS, M. O. Mycotoxins – Formation, analysis and significance. Great Britain: John Wiley & Sons, 148pp, 1985.

SOUSA, M.P.; MATOS,M.E.O., MATOS, F.J.A. Constituintes químicos de plantas medicinais brasileiras. Imprensa Universitaria/ UFC, Fortaleza, 416pp, 1991.

TAVARES , W. Manual de Antibióticos e Quimioterápicos Antiinfecciosos, 2 ed. Atheneu: São Paulo, 792,1999.

THATCHER, F.S.; CLARK, D.S. *Analysis microbiológico de los alimentos*. Zaragoza; España: Acribia, 271pp, 1973.

UENO, Y.; MAKI, S.; LIN, J.; FURUYA, M.; SUGIURA, Y.; KAWAMURA, O. A 4-year study of plasma ochratoxin in a selected population in Tokyo by immunoassay and immunoaffinity column-linked HPLC. *Food and Chemical Toxicology*, v.36, n.5 p.455-449, 1998.

WADD A, LEISENRING W, Van BURIK JO-ANNE, BOWDEN RALEICH Epidemiology of *Aspergillus* infections in a large cohort of patients undergoing bone marrow transplantation. *Journal Infect Disease* v.7, n.175, p.1459-66, 1997

WARNOCK, D.W. Methods with antifungal drugs. In: EVANS, E. G. V.; RICHARDSON, M.D. *Medical mycology: a practical approach*. Oxford: IRL Press. Cap. 11, p. 235-259, 1989.

WHITAKER, T. B. Standardisation of mycotoxin sampling procedures: an urgent necessity. *Food Control*, 14: 233-237, 2003.

WHO – Environmental Health Criteria 105: Selected Mycotoxins: Ochratoxins, Trichotecenes, Ergot. Geneva, World Health Organization, 263pp, 1979.

WOOD, G.E. Mycotoxins in foods and feeds in the United States. *Journal of Animal Science*, v.70, n. 12, p.3941 – 3949, Dez 1992.

WOOD, G. E & POHLAND, A. E. Mycotoxins in food and their safety ramifications. In: *Food Safety Assessment – American Chemical Society*, Washington, D. C. pp 262-275, 1992.

ZACCHINO, S.A.; YUNES, R.A.; CECHINEL FILHO, V.; ENRIZ, R.D.; KOUZNETSOV, V.; RIBAS, J.C. The need for new antifungal drugs: screening for antifungal compounds with a selective mode of action with emphasis on the inhibitors of the fungal cell wall. In: RAI, M.; MARES, D. (Editors) *Plant-derived antimycotics: current trends and future prospects*. The Haworth Press, p1-41, 2003.

ZIMMERLI, B.; DICK, R. Ochratoxin A in serum of residents north of Alps. *Jour. of Chromatography B*, v.666, p. 85-89, 1995.

ZUANAZZI, J.A.S. Flavonóides. In: *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 4 ed. Porto Alegre / Florianópolis: Editora Universitária/ UFRGS/ Ed da UFSC. 821P, 2002.

## **ANEXOS**

<b>A – Composição do meio de cultivo utilizado na manutenção dos isolados, nos testes de avaliação antifúngica e de sensibilidade ao antifúngico.....</b>	<b>49</b>
<b>B – Protocolo para contagem de conídios dos testes de atividade antifúngica para os extratos vegetais e dos testes de sensibilidade aos antifúngicos.....</b>	<b>50</b>
<b>C – Certificado de análise do antifúngico Cetoconazol fornecido pela farmacêutica responsável.....</b>	<b>53</b>
<b>D – Dados técnicos e científicos das plantas.....</b>	<b>55</b>

## ANEXO A

Agar Sabourand glicosado a 2% (ASG2%)

Peptona de caseína.....	5g
Peptona de carne.....	5g
Glicose.....	20 g
Agar-agar.....	15g
Água destilada.....	1000mL

Obs: Esterelize por autoclavação a 121°C por 15 minutos. Foi utilizado a marca MERCK®.

## ANEXO B

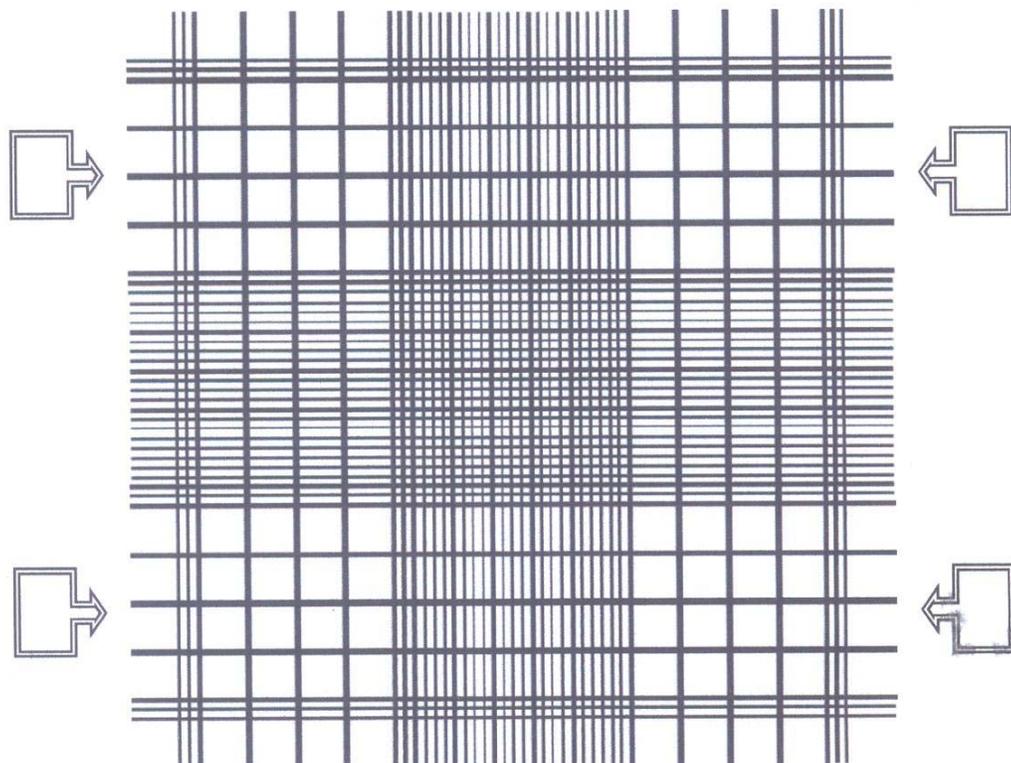
Protocolo para contagem de conídios dos testes de atividade antifúngica para os extratos vegetais e dos testes de sensibilidade aos antifungicos

## PROTOCOLO PARA CONTAGEM DE CONÍDIOS

DATA:

ISOLADO:

PLANTA:



MÉDIA:

N.º MÉDIO DE UFC/ML

Fórmulas para ajuste em  $10^6$  UFC/ML

N.º médio de conídios em  $A \times 1,0 \times 10^4 = \text{UFC/ML}$

$$c' = A/400$$

N.º médio de conídios em  $c' \times 4,0 \times 10^6 = \text{UFC/MI}$

## ANEXO C

Certificado de análise do antifúngico Cetoconazol fornecido pela farmacêutica responsável.

Certificado de análise do Cetoconazol fornecido pelo estabelecimento onde o fármaco foi adquirido.

 <p>Verdadeiramente 900174111 Galena Sistema de Qualidade certificado pelo CCB nº 00011001</p>		<p>730 Seq.003-000</p>	
<p>Produto: CETOCONAZOL</p>		<p>Pais de Origem: CHINA</p>	
<p>Data de Fabricação: 02/07/03</p>		<p>Lote de Fabricação: 20030709</p>	
<p>Data de Validade: 02/07/07</p>		<p>CIQ: 7031116615</p>	
<p>Nota Fiscal: 0542730</p>		<p>Volumes: 03</p>	
<p><b>CERTIFICADO DE ANÁLISE</b></p>			
<p>FÓRMULA MOLECULAR: C<sub>26</sub> H<sub>28</sub> Cl<sub>2</sub> N<sub>4</sub> O<sub>4</sub>          PESO MOLECULAR: 531,4          CAS: 65277-42-1          DCB: 0229.01.6</p>			
<p>ARMAZENAMENTO: À temperatura ambiente, em recipiente perfeitamente fechado e protegido da luz.</p>			
<p>Exame/Componentes</p>		<p>Especificação</p>	
<p>Resultado dos exames</p>			
<p><b>CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS</b></p>			
<p>- Descrição*</p>		<p>Pó branco ou quase branco.</p>	
<p>SOLUBILIDADE</p>		<p>Pó branco.</p>	
<p>- Água*</p>		<p>Praticamente insolúvel.</p>	
<p>- Etanol*</p>		<p>Praticamente insolúvel.</p>	
<p>- Metanol*</p>		<p>Ligeiramente solúvel.</p>	
<p>POINTE DE FUSÃO</p>		<p>Solúvel.</p>	
<p>- Ponto de fusão*</p>		<p>148°C a 152°C</p>	
<p>PERDA POR DESSECAÇÃO</p>		<p>148°C a 149°C</p>	
<p>- 1 g, 105°C, 4 horas*</p>		<p>No máximo 0,5 %</p>	
<p>IDENTIFICAÇÃO</p>		<p>0,0 %</p>	
<p>- Infravermelho*</p>		<p>Positivo</p>	
<p>RESÍDUO DE IGNIÇÃO</p>		<p>Positivo</p>	
<p>- Resíduo de ignição</p>		<p>No máximo 0,1%</p>	
<p>ROTACÃO ESPECÍFICA</p>		<p>0,1%</p>	
<p>- 49 mg/ml, em metanol, 20°C</p>		<p>-1° a +1°</p>	
<p>IMPUREZAS ORGÂNICAS VOLÁTEIS</p>		<p>0°</p>	
<p>- Impurezas orgânicas voláteis</p>		<p>Conforme</p>	
<p>METALIS PESADOS</p>		<p>Conforme</p>	
<p>- Metais pesados</p>		<p>No máximo 20 ppm</p>	
<p>PUREZA CROMATOGRAFICA</p>		<p>Menor que 20 ppm</p>	
<p>- Pureza cromatográfica</p>		<p>Conforme</p>	
<p>LOTEAMENTO</p>			
<p>Estudo de estabilidade</p>		<p>Conforme</p>	
<p>ESTABILIDADE APARENTE</p>			
<p>Resíduo de água</p>		<p>Conforme</p>	
<p>CONCLUSÃO</p>			
<p>Este Certificado é válido em função da análise realizada em conformidade com o padrão estabelecido no Regulamento Técnico de Qualidade para o Controle de Qualidade de Medicamentos, Resolução RDC nº 11/2008, da ANVISA.</p>			
<p>Resultado: <input checked="" type="checkbox"/> Aprovado</p>		<p>Data de Análise: 25/09/2003</p>	
<p></p>			
<p>Theóphilo Marinho Neto Farmacêutico Responsável CRF-SP: 18.016</p>		<p></p>	
<p>Rua Pedro Stancato, 860 - Campos dos Amarais - CEP 13082-560 - Campinas/SP - DDG 0800-7014311 - www.galena.com.br</p>			

G A R A N T I A D A Q U A L I D A D E

## ANEXO D

### Dados Técnicos e Científicos das plantas

**YOD**  
*Comércio de Produtos Naturais Ltda.*

Rua Dr. Elton César, nº 74 - Chácara Campo dos Amarais  
Campinas - Estado de São Paulo - Cep 13082-025  
Fone /Fax: (0xx19) 3746-3300  
C.N.P.J.:01.343.767/0001-86 - INSCR. EST.: 244.574.227.117



**DADOS TÉCNICOS E CIENTÍFICOS**

**PLANTA: AROEIRA CHÁ**

**-REF.YOD: 531006 E**

CÓDIGO DO PRODUTO:2722

LOTE DO FABR: ARO04/02

MANUFATURA : 12/2005

VALIDADE: 12/2008

NOME CIENTÍFICO: Schinus terebinthifolius Rad.

FAMÍLIA: Anacardiaceae

PARTE UTILIZADA : Casca

MÉTODO DE SECAGEM: Ao sol

ORIGEM : Brasil

**ASPECTO MACROSCÓPICO / MICROSC./ ORGANOLEPTICAS:**

Casca apresenta-se enrolada em tubos, rugosa e de coloração pardo acinzentada em sua superfície externa; a face interna é estriada longitudinalmente de coloração bege avermelhada. Microscopia: em secção longitudinal observa-se cristais prismáticos, células pétreas e canal secretor. Em caso de pó: pó fino, cor pardo avermelhado, sabor levemente amargo e odor característico.

**CONSTITUINTES QUÍMICOS E TESTES REALIZADOS:**

Umidade: 10,2% (esp.máx. 11,5%); cinzas totais: 8,2% (esp.máx. 10,5%); cinzas insolúveis: 4,62% (esp.máx. 6%).

Teste para taninos: Positivo

**PESQUISA DE CONTAMINANTES MICROBIOLÓGICOS**

ANÁLISE	ESPECIFICAÇÃO	RESULTADOS
Contagem padrão em placas	Max. 10.000 ufc/g	De acordo
Bolores e leveduras	Max. 100 ufc/g ou ml	De acordo
Contagem de enterobactérias	Max. 100 ufc/g ou ml	De acordo
E. coli	Ausência	De acordo
Staphylococcus aureus	Ausência	De acordo
Pseudomonas sp	Ausência	De acordo
Salmonella sp	Ausência	De acordo

**ANÁLISE REALIZADA PELA YOD**

	PRÉ FRACIONAMENTO	PÓS FRACIONAMENTO
Aspectos	Casca fina em rasuras	De acordo
Cor	Pardo avermelhado	Pardo avermelhado
Odor	Característico	Característico
Sabor	Característico	Característico
Umidade	9,08%	9,15%
PH (1%)	6,15	6,19

FARMACÊUTICA RESPONSÁVEL : FERNANDA SASSI CRF-SP 12.115

PRODUTO IRRADIADO ATRAVES DE RAIOS GAMA.

ESTE PRODUTO CORRESPONDE AO PADRÃO DE QUALIDADE DE IDENTIFICAÇÃO

ESTABELECIDO PELA RESOLUÇÃO RDC 17 DE 24/02/2000.

TESTES REALIZADOS PELO FABRICANTE.

ESTOCAR AO ABRIGO DE LUZ E CALOR EM AMBIENTE LIMPO, SECO E AREJADO. PRODUTO FITOTERÁPICO EM ESTUDO, EMBASADO EM USO TRADICIONAL. OS DADOS ACIMA ESTÃO EM CONFORMIDADE COM OS EMITIDOS PELO FABRICANTE.

Dra. Fernanda C. Sassi  
CRF-SP 12.115

**www.yodervas.com.br - 0800 144962**

**YOD**  
*Comércio de Produtos Naturais Ltda.*

Rua Dr. Elton César, nº 74 - Chácara Campo dos Amarais  
Campinas - Estado de São Paulo - Cep 13082-025  
Fone /Fax: (0xx19) 3746-3300  
C.N.P.J. 01.343.767/0001-86 - INSCR. EST.: 244.574.227.117



**DADOS TÉCNICOS E CIENTÍFICOS**

**PLANTA: BOLDO DO CHILE PÓ**

**-REF.YOD:596706 E**

CÓDIGO DO PRODUTO: 76  
MANUFATURA :04/06  
NOME CIENTÍFICO: *Peumus boldus molina*  
PARTE UTILIZADA : Folha  
GRANULOMETRIA 0.30 mm

LOTE DO FABR: BOL 04/04  
VALIDADE: 04/09  
FAMÍLIA: *Monimiaceae*  
MÉTODO DE SECAGEM: Ao sol  
ORIGEM :Chile

**ASPECTO MACROSCÓPICO / MICROSC./ ORGANOLEPTICAS:**

Folha coriácea, grossa, simples, inteira, plana, quebradiça, oval elípticas, de cor verde acinzentado, cobertas por pêlos verrucosos, que se tornam ásperas e desagradáveis ao tato. Microscopia: apresenta mesófilo assimétrico, presença de hipoderme e pêlos tectores tipo estrelar, presença de glândulas oleíferas. Odor aromático e sabor levemente amargo. Pó fino de coloração esverdeado. Sabor levemente amargo e odor aromático.

**CONSTITUINTES QUÍMICOS E TESTES REALIZADOS:**

Umidade:11,6%(esp. Max.12%) cinzas totais:3,7%(esp. Max12%) cinzas insolúveis:5,1% (esp. Max.8%)  
Teor de óleo essencial:3,0% (esp. Min.1,5%)  
Alcalóides totais:0,25% (esp. Min.0,2%)  
Menos de 10 ppm em chumbo.

**PESQUISA DE CONTAMINANTES MICROBIOLÓGICOS**

ANÁLISE	ESPECIFICAÇÃO	RESULTADOS
Contagem padrão em placas	Max. 10.000 UFC/g	De acordo
Bolores e leveduras	Max. 100 UFC/g ou ml	De acordo
Contagem de enterobactérias	Max. 100 UFC/g ou ml	De acordo
<i>E. coli</i>	Ausência	De acordo
<i>Staphylococcus aureus</i>	Ausência	De acordo
<i>Pseudomonas sp</i>	Ausência	De acordo
<i>Salmonella sp</i>	Ausência	De acordo

**ANÁLISE REALIZADA PELA YOD**

	PRÉ FRACIONAMENTO	PÓS FRACIONAMENTO
Aspectos	Pó	Pó
Cor	Pardo escuro	Pardo escuro
Odor	Característico	Característico
Sabor	Característico	Característico
Densidade aparente	0,361g/ml	0,363g/ml
Umidade	8,82%	8,86%
Alcalóide	Positivo	Positivo
PH (Sol.1%) +/- 1,00	6,17	6,23

FARMACÊUTICA RESPONSÁVEL : FERNANDA SASSI CRF-SP 12.115

PRODUTO IRRADIADO ATRAVÉS DE RAIOS GAMA.

ESTE PRODUTO CORRESPONDE AO PADRÃO DE QUALIDADE DE IDENTIFICAÇÃO

ESTABELECIDO PELA RESOLUÇÃO RDC 17 DE 24/02/2000.

TESTES REALIZADOS PELO FABRICANTE.

ESTOCAR AO ABRIGO DE LUZ E CALOR EM AMBIENTE LIMPO, SECO E AREJADO. PRODUTO FITOTERÁPICO EM ESTUDO, EMBASADO EM USO TRADICIONAL. OS DADOS ACIMA ESTÃO EM CONFORMIDADE COM OS EMITIDOS PELO FABRICANTE.

Dra. Fernanda C. Sassi  
CRF-SP. 12.115

**www.yodervas.com.br - 0800 144962**