

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

DISSERTAÇÃO

**VERIFICAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE EXTRATOS
VEGETAIS SOBRE ESPÉCIES DE FUNGOS DO GÊNERO *Aspergillus*.**

ANA CLÁUDIA DA SILVA VILA NOVA

2008



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

**VERIFICAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE EXTRATOS
VEGETAIS SOBRE ESPÉCIES DE FUNGOS DO GÊNERO *Aspergillus*.**

ANA CLÁUDIA DA SILVA VILA NOVA

Sob a orientação do professor

Dr. Hélcio Resende Borba

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

Seropédica, RJ
Abril de 2008

579.5657

V695v

T

Vila Nova, Ana Cláudia da silva,
1970-

Verificação da atividade
antifúngica de extratos vegetais
sobre espécies de fungos do gênero
Aspergillus / Ana Cláudia da Silva
Vila Nova - 2008.

37f. : il.

Orientador: Hércio Resende Borba.

Dissertação (mestrado) -

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

Bibliografia: f. 26-33.

1. Aspergillus - Teses. 2. Fungos
fitopatogênicos - Teses. 3. Fungos -
Microbiologia - 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

ANA CLÁUDIA DA SILVA VILA NOVA

Dissertação submetida ao Curso de Pós-Graduação em Microbiologia Veterinária, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Microbiologia Veterinária.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 16 / 04 / 2008.



Hélcio Resende Borba, *Ph.D.* – UFRRJ
(Orientador)



Glória Maria Direito, *Dr.^a* – UFRRJ



Manuela da Silva, *Dr.^a* INCQS - FIOCRUZ



Walter Flausino, *Ph.D.* - UFRRJ

Dedico este trabalho a minha avó (*in memoriam*), meu pai e minha mãe por terem me ensinado a acreditar nos meus sonhos e ao meu marido, Marcio, por me ajudar a nunca desistir.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Hécio Resende Borba pela oportunidade de realizar este trabalho, pela confiança depositada, por estar sempre presente e ser amigo em todas as horas.

À professora Glória Maria Direito pelos ensinamentos, estímulo e afeto.

Ao professor Marcelo Elias Fraga pelos ensinamentos e auxílio nos momentos de dúvidas.

Ao professor Francisco de Assis Baroni pela colaboração para a concretização deste trabalho.

Ao funcionário Luís Jorge Soares pelo suporte técnico e amizade.

A Marcio, meu marido, por ter trabalhado dobrado nas horas em que não pude estar presente, por não ter me deixado desistir e pelo seu companheirismo.

Aos meus filhos Márcio e Guilherme por fazerem com que tudo isso valesse a pena.

A minha mãe Ana Maria, meu pai Luiz Carlos, minhas irmãs Ana Lúcia e Aline, Marcinho, Guilherme, Maria Eduarda e Isabella pela companhia nos dias das leituras dos resultados.

Aos meus sogros Noelha e Leonil, sempre na torcida por novas conquistas.

Aos meus familiares e amigos por terem ouvido com atenção todas as vitórias e fracassos desta jornada e por perdoarem minhas ausências.

A amiga Ana Lúcia Medeiros por me mostrar o caminho e pelo apoio.

Aos amigos Alexander Santos, Rita de Cássia de O. Santos e Yara Maria Santos pelo carinho e por dividir todas as ansiedades.

Aos novos amigos Cléa, Telma, Amanda, Monike, Verônica, Marcelo, Pablo, Gerson, Ronaldo, Bruno, Landriane, Rafael, Felipe e Gisele pelo companheirismo e amizade.

Aos funcionários e amigos do Projeto de Sanidade Animal pela alegria da convivência.

BIOGRAFIA

Ana Cláudia da Silva Vila Nova, filha de Luiz Carlos Barbosa da Silva e Ana Maria da Silva, nascida em 21 de julho de 1970 em Campo Grande, estado do Rio de Janeiro.

Concluiu o segundo grau em 1987, formando-se em Professora do Ensino Fundamental, em 1988 formou-se em Professora de Educação Infantil, e no segundo semestre de 2001 ingressou no Curso de Farmácia da Universidade Estácio de Sá, obtendo o título de Bacharel em Farmácia em agosto de 2005, com formação para atuar como Responsável Técnica, também, em Homeopatia. No período de setembro de 2004 a abril de 2005, realizou o projeto de pesquisa “Extração de Polissacarídeos e Identificação dos Monossacarídeos Oriundos da Alga Marinha *Laminaria* sp”, sob orientação do Professor Doutor Robson Roney Bernardo, que foi apresentado como trabalho de conclusão do curso. É Empresária do ramo Farmacêutico desde 1999 e Responsável Técnica de Farmácia Alopática a partir do ano de 2006. Em dezembro de 2006 foi selecionada para o ingresso no Curso de Pós-Graduação – *Stricto-Sensu* – Mestrado em Microbiologia Veterinária, na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRRJ, sob a orientação do Professor Doutor Hélcio Resende Borba. Em fevereiro de 2008 ingressou no Curso de Graduação de Cirurgião Dentista, na Universidade Estácio de Sá.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO DE LITERATURA	3
	2.1 Fungos	3
	2.2 Gênero <i>Aspergillus</i> Fr:Fr	4
	2.3 Micotoxinas	6
	2.4 Plantas medicinais	7
	2.4.1 <i>Cinnamomum</i> spp. Shaeff	8
	2.4.2 <i>Mentha piperita</i> L.	10
	2.4.3 <i>Passiflora foetida</i>	12
	2.5 Fármaco antifúngico: cetoconazol	14
3	MATERIAL E MÉTODOS	15
	3.1 Local	15
	3.2 Espécies fúngicas	15
	3.3 Materiais utilizados	15
	3.4 Manutenção da coleção fúngica	16
	3.5 Contagem de conídios	16
	3.6 Material botânico	17
	3.7 Obtenção dos extratos	17
	3.8 Verificação do pH dos extratos	18
	3.9 Testes de atividade antifúngica	18
	3.10 Obtenção do antifúngico cetoconazol	18
	3.11 Preparo do cetoconazol	18
	3.12 Teste de controle com o cetoconazol	19
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
5	CONCLUSÕES	25
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26
	ANEXOS	34
	I – Certificado de análise da <i>Mentha piperita</i>	35
	II – Certificado de análise da <i>Cinnamomum</i> spp.	36
	III – Certificado de análise do cetoconazol	37

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Espécies fúngicas utilizadas e seus respectivos registros originais	15
Tabela 2 - Espécies fúngicas de referência utilizadas e seus respectivos registros no Laboratório de Atividades Antifúngicas – LAAF	16
Tabela 3 – Número médio de conídios/mL das espécies de <i>Aspergillus</i> nos diferentes testes	17
Tabela 4 – Valores de pH em diferentes concentrações de extratos vegetais	20
Tabela 5 - Avaliação das leituras após incubação de 24, 48 e 168 horas, à 36° C, dos testes antifúngicos com extratos vegetais e com cetoconazol sobre <i>A. flavus</i>	22
Tabela 6 - Avaliação das leituras após incubação de 24, 48 e 168 horas, à 36° C, dos testes antifúngicos com extratos vegetais e com cetoconazol sobre <i>A. carbonarius</i>	22
Tabela 7 - Avaliação das leituras após incubação de 24, 48 e 168 horas, à 36° C, dos testes antifúngicos com extratos vegetais e com cetoconazol sobre <i>A. ochraceus</i>	23
Tabela 8 - Avaliação das leituras após incubação de 24, 48 e 168 horas, à 36° C, dos testes antifúngicos com extratos vegetais e com cetoconazol sobre <i>A. niger</i>	23
Tabela 9 - Avaliação das leituras após incubação de 24, 48 e 168 horas, à 36° C, dos testes antifúngicos com extratos vegetais e com cetoconazol sobre <i>A. parasiticus</i> ..	24

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Fotografia <i>Cinnamomum</i> spp.....	9
Figura 2 - Fotografia da casca de <i>Cinnamomum</i> spp.....	9
Figura 3 - Fotografia <i>Mentha piperita</i> L.....	11
Figura 4 - Fotografia <i>Mentha piperita</i> L.....	11
Figura 5 - Fotografia <i>Passiflora foetida</i>.....	13

RESUMO

VILA NOVA, Ana Cláudia da Silva. **Verificação da atividade antifúngica dos extratos vegetais sobre espécies de fungos do gênero *Aspergillus***. Serpédica: UFRRJ, 2008, 48 pp. (Dissertação, mestrado em Microbiologia Veterinária).

Muitas áreas estão envolvidas na pesquisa de novas substâncias oriundas de plantas. As novas tendências globais de uma preocupação com a biodiversidade e as idéias de desenvolvimento sustentável trouxeram novos ares aos estudos das plantas medicinais brasileiras. Novas linhas de pesquisa foram estabelecidas em universidades brasileiras, algumas delas buscando bases sólidas para a validação do uso de plantas medicinais, justificando, assim, a realização deste trabalho, utilizando extratos aquosos de plantas de ocorrência local, como a *Cinnamomum* spp., *Mentha piperita* e *Passiflora foetida*, na inibição do crescimento de algumas espécies toxígenas do gênero *Aspergillus*, previamente pesquisadas na literatura e apontadas como antifúngicas e favorecendo a utilização de plantas em substituição de produtos químicos. Utilizando o método da concentração mínima inibitória em agar, com a técnica de diluição em placa (Pour-Plate), sendo realizadas diluições dos diferentes extratos, partindo de uma solução de 5% e obtendo-se as diluições de 2,5% e 1,25%. As baterias testes foram incubadas a 36° C. Foi realizado, também, teste de sensibilidade ao antifúngico comercial – Cetoconazol. Observou-se que o extrato aquoso de *Cinnamomum* spp. mostrou-se capaz de inibir o crescimento micelial de *A. flavus* e *A. carbonarius* nas concentrações de 2,5% e 5%, nas leituras de 48 horas. Os demais extratos aquosos, utilizados neste trabalho, não apresentaram efeito inibitório do crescimento micelial dos fungos testados.

Palavras-chave: fungos, atividade antifúngica, extrato.

ABSTRACT

VILA NOVA, Ana Cláudia da Silva. **Verification of the antifungal activity of the vegetable extracts species of the gender *Aspergillus*.**
Seropédica: UFRRJ, 2008, 48 pp. (Dissertation, master's degree in Veterinary Microbiology).

Many areas are involved in the search for new substances from plants. The new global trends of a concern for biodiversity and the ideas of sustainable development have brought new air to studies of Brazilian medicinal plants. New lines of research were established in Brazilian universities, some of them seeking solid basis for the validation of the use of medicinal plants, thus justifying this work, using aqueous extracts of plants place of occurrence, such as *Cinnamomum spp.*, *Mentha piperita* and *Passiflora foetida*, inhibition of growth of some species of the genus *Aspergillus* toxígenas, previously studied in the literature and identified as antifungal and encouraging the use of plants to replace chemicals. Using the method of minimum inhibitory concentration in agar, with the technique of dilution plate (Pour-Plate), being held dilutions of different extracts, from a solution of 5% and resulting in the dilution of 2.5% and 1.25%. Batteries tests were incubated at the 36°C. It was held also test for sensitivity to antifungal commercial - Ketoconazole. It was observed that the aqueous extract of *Cinnamomum spp.* was able to inhibit the mycelial growth of *A. flavus* and *A. carbonarius* at concentrations of 2.5% and 5% in readings of 48 hours. The other aqueous extracts, used in this work, showed no inhibitory effect of mycelial growth of fungi tested.

Key words: *Cinnamomum spp.*, *Mentha piperita*, *Passiflora foetida*, *Aspergillus*

1 INTRODUÇÃO

A contaminação e a deterioração dos alimentos causadas por fungos são mais comuns que as originadas por qualquer outro grupo de microrganismos. A contaminação por fungos é importante não apenas sob o ponto de vista sensorial, mas também pelo perigo que a produção de micotoxinas representa para o consumidor (MUNINBAZI; BULLERMAN, 1996).

Os fungos estão diariamente influenciando ou participando da vida do homem, ainda que não sejam notados, encontrando-se em vegetais, em animais, no homem, em detritos e em abundância no solo. Isso se deve às suas características peculiares, morfológicas e fisiológicas, que irão facilitar sua disseminação e desenvolvimento nas situações mais diversas.

Os esporos dos fungos são abundantes e amplamente encontrados na natureza, germinam rapidamente no solo, em plantas, em alimentos, em papel e até em vidros. Os alimentos armazenados representam excelente campo para a proliferação dos fungos, principalmente quando os princípios básicos de secagem adequada e armazenamento correto são desconhecidos ou desprezados (PEREIRA et al, 2002).

Sementes de diversas plantas de interesse econômico são atacadas por muitos fungos, mais de 100 espécies já foram registradas como produtores de toxinas a partir de fontes naturais, em diferentes estágios de desenvolvimento. O fungo pode até já ter desaparecido, ou não ser aparente sobre um determinado grão, mas a toxina ainda estará presente.

Enormes prejuízos econômicos são decorrentes da utilização de alimentos contaminados por substâncias tóxicas produzidas pelos fungos, denominadas micotoxinas. Diversos gêneros de fungos, contaminantes comuns dos produtos agrícolas, são produtores de micotoxinas importantes em patologia animal. Dentre eles destaca-se o gênero *Aspergillus*, com várias espécies capazes de crescerem em diversos substratos e sob condições as mais variadas (CRUZ, 1996). A aflatoxina tem recebido grande atenção em comparação com as demais micotoxinas, devido aos efeitos carcinogênicos que podem provocar em animais e o efeito agudo tóxico em seres humanos. As aflatoxinas representam o grupo de micotoxinas com mais resultados positivos em alimentos já relatados (SCUSSEL, 1998; WOOD, 1992). A pesquisa de aflatoxina teve início em 1960, na Inglaterra, quando ocorreu intoxicação de aves tratadas com rações à base de amendoim provenientes do Brasil e da África. Tal fato ficou conhecido como “Doença X” e, na época causou a morte de milhares de animais (LANDERS, 1967). Hoje, é muito difícil encontrar-se um alimento sem aflatoxina. O que se procura é tentar manter os níveis desta toxina dentro dos padrões aceitáveis, tanto nos alimentos dos animais como dos humanos. Entretanto, o ideal é que não se permita o crescimento fúngico e a conseqüente produção de micotoxinas.

Nos últimos anos, no Brasil, várias pesquisas foram realizadas com contribuições relevantes quanto à atividade biológica de plantas que ocorrem nos diferentes ecossistemas brasileiros (DESMARCHELIER et al, 1999; JORGE et al, 2004; DUARTE et al, 2004; LIMA et al, 2006; HIRUMA-LIMA et al, 2006). Muitas áreas estão envolvidas na pesquisa de novas substâncias oriundas de plantas, como a fitoquímica, que trabalha no isolamento, purificação e caracterização de princípios ativos; a etnobotânica e a etnofarmacologia, que buscam informações a partir do conhecimento de diferentes povos e etnias; e a farmacologia, que estuda os efeitos farmacológicos de extratos e dos constituintes químicos isolados (MACIEL et al, 2002; MENDONÇA-FILHO; MENEZES, 2003; VENDRUSCOLO et al, 2005). Reforçando a tese de que o Reino Vegetal é base para a obtenção de substâncias, ou ponto de partida para síntese de moléculas responsáveis pela produção de medicamentos utilizados na cura de várias doenças, (RAMESH, 1998).

Momentos de grandes transformações e mudanças de paradigmas vêm ocorrendo. As novas tendências globais de uma preocupação com a biodiversidade e as idéias de desenvolvimento sustentável trouxeram novos ares aos estudos das plantas medicinais brasileiras. Novas linhas de pesquisa foram estabelecidas em universidades brasileiras, algumas delas buscando bases sólidas para a validação do uso de plantas medicinais (LORENZI; MATOS, 2002); justificando, assim, a realização deste trabalho, utilizando extrato de plantas de ocorrência local, previamente pesquisadas na literatura e apontadas como antifúngicas e favorecendo a utilização de plantas em substituição de produtos químicos. Favorecendo, com isso, a população menos beneficiada pelos avanços tecnológicos em qualquer parte do país.

O objetivo do presente trabalho é verificar a atividade dos extratos aquosos de *Cinnamomum* spp, *Mentha piperita* e *Passiflora foetida* na inibição do crescimento de cinco espécies toxígenas do gênero *Aspergillus*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Fungos

Centenas de espécies diferentes de fungos habitam o solo, sendo mais abundantes nas proximidades da superfície, onde prevalecem as condições de aerobiose. Os fungos existem tanto sob a forma de micélios como sob a forma de esporos. Já que o crescimento fúngico pode iniciar-se a partir de um esporo ou de um fragmento de micélio, é difícil calcular o número desses organismos, relatando-se, contudo, cifras iguais a milhares ou dezenas de milhares por grama de solo (PELCZAR et al, 1981).

Os fungos apresentam uma série de características econômicas e ecológicas que os transformam em organismos indispensáveis para todo e qualquer ecossistema. O impacto do trabalho dos fungos é grande sobre a sociedade atual onde são essenciais na degradação e reciclagem da matéria orgânica, fornecem metabólitos bioativos úteis à medicina, contribuem na produção de alimentos e bebidas alcoólicas. Entretanto, eles exercem maior impacto econômico como fitopatogênicos, contaminando os alimentos, causando alterações nas suas características organolépticas, promovendo prejuízos significativos aos alimentos. Quando presentes em sementes ocasionam perda do poder germinativo. No arroz e no cacau afetam a qualidade, promovendo descoloração, e no café produzem aromas desagradáveis. Podem, ainda, alterar as condições físicas dos produtos, reduzir o valor nutritivo, alterar o aspecto externo, produzir aflatoxinas e favorecer a ação de outros agentes de deterioração, como leveduras, bactérias e insetos (BROOKS, 2000; PEREIRA et al, 2002).

De acordo com VIEGAS (2004), os fungos podem contaminar os alimentos em qualquer momento da produção, transporte, estocagem ou industrialização, dependendo da interação entre o fungo, o substrato e as condições ambientais; podendo causar morte e outros sintomas de toxicidade quando rações ou alimentos contaminados são ingeridos por animais ou humanos (DIENER et al, 1987).

Em termos de maior e menor susceptibilidade, a contaminação dos alimentos por fungos, tendo em vista sua natureza, composição e uso, ocorre na seguinte ordem: cereais, subprodutos de cereais (essencialmente o trigo), subprodutos de matadouros de aves, farinhas de alfafa, mandioca, soja integral, girassol integral, algodão, farinha de soja e de girassol, glúten de arroz e outros, além de produtos submetidos à peletização (PEREIRA et al, 2002).

2.2 Gênero *Aspergillus* Fr.: Fr.

É grande a importância deste gênero, levando-se em conta o fato dele conter muitas espécies capazes de crescer em condições de baixa atividade de água, sendo os mesmos associados a deterioração de alimentos que são muito secos para serem atacados por outros microrganismos (SMITH; MOSS, 1985). Segundo PEREIRA (2002), o gênero *Aspergillus* pertence ao grupo dos hifomicetos que se caracteriza pela formação de conidióforos, ou seja, hifas especializadas com formas e arquitetura variáveis. As espécies de *Aspergillus* crescem rapidamente, produzindo hifas aéreas que exibem estruturas características de conídios: longos conidióforos com vesículas terminais sobre os quais as fiáides produzem cadeias basipetais de conídios. E são identificadas de acordo com as diferenças morfológicas observadas nestas estruturas, incluindo tamanho, forma, textura e cor dos conídios. A produção de pequenos conídios é abundante e estes são facilmente aerossolizados. Após a sua inalação, os indivíduos atópicos quase sempre desenvolvem reações alérgicas graves aos antígenos dos conídios. A este espectro de doenças, que podem ser causadas pelo *Aspergillus*, dá-se o nome de aspergilose, que é uma forma de micose, raramente primária em indivíduos normais, sendo considerada doença oportunista por excelência. A infecção pode se localizar nos pulmões, ouvido, sistema nervoso central, olhos e em outros órgãos. Sendo este fungo ubíquo na natureza, casos de aspergilose, nas mais variadas formas clínicas, têm sido descritos em todo o mundo. As micoses atingem o homem e os animais, ocasionando prejuízos incalculáveis, tanto na economia dos países, como na estabilidade orgânica dos seres vivos, (BROOKS, 2000).

De acordo com SAMSON (2000), dentre os principais gêneros toxígenos, o *Aspergillus* possui espécies de ocorrência mais freqüente e comum nos trópicos.

A espécie *Aspergillus flavus* Link é capaz de colonizar vegetais em decomposição, grãos, sementes e muitos substratos incluindo alimentos e rações animais (PITT; HOCKING, 1997; ROSA, 2002). A atividade de água requerida para o crescimento é de 0,80 a > 0,99 (ótimo 0,98). Para a produção da aflatoxina os valores são de 0,82 a > 0,99 e a atividade de água considerada mais favorável é de 0,95 a 0,99. De acordo com a temperatura, os limites de crescimento variam de 10 a 43° C e a temperatura considerada ótima é de 33° C. Já a temperatura para a produção de aflatoxina é de 13 a 37° C, tendo como ótimo temperaturas entre 16 a 31° C. O pH ótimo para o seu desenvolvimento situa-se entre 5 e 8, mas os mesmos podem crescer em ampla faixa de pH (2 a > 11), (DOMSCH et al, 1980; ICMSF, 1996). Tendo de 4 a 4,5 cm de diâmetro de colônia, com anverso verde-amarelado e reverso creme-amarelado, possui vesícula em forma de abóbada, fértil na superfície inteira e conídios globosos e subglobosos, usualmente rugoso, verde-amarelado, capaz de produzir aflatoxina B₁ e B₂ (VIEGAS, 2004).

Também, segundo o ICMSF (1996) a temperatura mais favorável para o crescimento do *Aspergillus parasiticus* Speare é 32° C, e seu limite de crescimento varia de 12 a 42° C. A produção de aflatoxina ocorre entre 12 a 42° C e a temperatura considerada ótima é de 25° C. Sua colônia apresenta um diâmetro em torno de 3,2 a 3,5 cm, com anverso verde-amarelado tornando-se verde escuro com o tempo e reverso creme-amarelado. Vesícula globosa e fértil em toda superfície, possui pouca ou nenhuma métula; conídios globosos, muito rugosos, mostrando frequentemente tecido conectivo esverdeado; é produtor de aflatoxina B₁, B₂, G₁ e G₂ (VIEGAS, 2004).

Aspergillus niger Tieghem é considerado um fungo xerofílico, tendo descrita a germinação em atividade de água de 0,77 a 35° C e limite de crescimento, temperatura variando entre 6 a 47° C (AYERST, 1969; PITT; HOCKING, 1997). ABARCA et al (2001),

relatam a ocorrência de cepas ocratoxígenas numa incidência que varia de 1,7 a 18,5% dos isolados de *A. niger*.

Aspergillus ochraceus Wilhelm é frequentemente isolado de solos cultivados, de vegetais, grãos armazenados e de uma ampla variedade de alimentos e rações animais (DOMSCH et al, 1980; PITT; HOCKING, 1985; ROSA, 2002).

Aspergillus carbonarius (Bain.) Thom, inicialmente era reportado como isolado a partir do solo e águas poluídas, porém atualmente, tem sido encontrado em alimentos de origem vegetal, com importância para a produção de ocratoxina A (ABARCA et al, 2003). Possui crescimento ótimo que varia entre 30 a 35° C e não cresce a temperaturas inferiores a 25° C. Tendo ótimo de atividade de água para o crescimento variando de 0,93 a 0,98, dependendo da cepa, com uma maior tolerância a 25 – 30° C (MITCHELL et al, 2004).

2.3 Micotoxinas

São metabólitos secundários de alguns fungos, especialmente fungos saprófitas, que se desenvolvem em matéria alimentar ou rações animais, liberados ou não nos substratos nos quais eles crescem e que causam doenças (micotoxicoses) quando ingeridos em alimentos contaminados (SHANK, 1978; DHINGRA, 1998). Quando não provocam a morte dos animais em processos de intoxicação aguda, determinam redução de peso, diminuição da postura, diminuição da conversão alimentar, aumento da suscetibilidade a doenças infecciosas e parasitárias e problemas reprodutivos, entre outros. Há várias categorias de micotoxinas produzidas por fungos, fixadas diretamente no alimento ou presentes nos esporos produzidos em grande quantidade sobre eles, entre elas encontram-se as aflatoxinas, produzidas essencialmente por *Aspergillus parasiticus* e *A. flavus*, sendo um dos mais tóxicos compostos naturais, de ocorrência comum, aos quais o homem e seus animais estão expostos, podendo ser encontradas em cereais, grãos, amendoim, soja e outros alimentos; sendo classificada como hepatotóxica e carcinogênica para os animais, podendo causar, também, taxa de crescimento reduzido, enterite hemorrágica, supressão da imunidade, decréscimo na produção de carne, leite e ovos. A produção de aflatoxina resulta da tripla combinação da espécie fúngica, do substrato e do meio ambiente; e como fatores que afetam a sua produção estão os físicos, nutricionais e biológicos (CRUZ, 1996; DHINGRA, 1998).

A ocratoxina, micotoxina produzida por espécies de *Aspergillus ochraceus*, *A. niger* e *A. carbonarius* é encontrada em cereais e grãos e classificada como nefrotóxica, podendo causar aborto, reduzida taxa de crescimento, imunidade reduzida, redução na conversão alimentar e diminuição na produção de ovos. As micotoxinas podem ser encontradas no produto armazenado já 24 horas depois da infestação com fungos e entram na dieta dos animais através da utilização de rações elaboradas com grãos já contaminados por toxinas ou de rações estocadas sob condições inadequadas. De maneira geral, todos os grãos possuem elementos fúngicos (conídios) em sua superfície, os quais permanecerão em estado de latência se as condições ambientais permanecerem impróprias ao seu desenvolvimento (PITT; HOCKING, 1997).

Devido às características ambientais, as áreas dos trópicos, que apresentam em sua maioria de 70 a 100% de umidade e mais de 25° C, especialmente o Brasil, dispõe de condições atmosféricas muito favoráveis à rápida proliferação dos fungos, sendo fácil prever a ocorrência de altos níveis de contaminação de alimentos por micotoxinas. O freqüente envolvimento destas substâncias com patologias em animais de produção constitui-se em um dos mais graves problemas para a criação e, em especial, para a avicultura e a suinocultura (CRUZ, 1996; FONSECA, 2007).

2.4 Plantas medicinais

O homem após deixar a vida nômade percebeu a necessidade de produzir alimentos para sua subsistência, porém não deixou de procurar na natureza novas espécies de vegetais que propiciassem o seu bem estar (IORIS, 1999; SIMÕES, 1999). As plantas têm desempenhado um papel fundamental na história evolutiva do homem, o qual, desde os primórdios teve que começar a distinguir as diferenças básicas entre aquelas plantas que eram úteis para ele daquelas que não eram e passar esse conhecimento de geração a geração até os dias atuais. O tratamento das doenças através de plantas medicinais tem atravessado séculos e a partir de meados do século XIX, os extratos de plantas usados na medicina popular foram cedendo lugar para as moléculas puras de elementos ativos de plantas medicinais de ação farmacológica mais específica (ATTISSO, 1979). No entanto, voltando os olhos para as últimas décadas do século XX, verifica-se uma volta das pessoas em busca de um tratamento mais natural, tanto com o uso de plantas da medicina popular, como com a homeopatia, fitoterapia, etc (IORIS, 1999).

As portas que hoje se abrem aos que buscam conhecer, em profundidade, o potencial de cura das plantas, quase totalmente ocultos ao homem, permitem que esse Reino preste, ainda mais amplamente, seu serviço ao homem (CARIBÉ; CAMPOS, 1997). O emprego das plantas medicinais na recuperação da saúde tem evoluído ao longo do tempo, desde as formas mais simples de tratamento local até as formas de fabricação industrial de medicamentos. Apesar das enormes diferenças entre as duas maneiras do uso das plantas, percebeu-se algo que administrado sob a forma de mistura complexa (extrato) ou como substância isolada, por qualquer via, tem a propriedade de provocar reações benéficas capazes de levar à recuperação da saúde (LORENZI; MATOS, 2002).

Extratos de plantas medicinais têm sido utilizados intensamente em estudos farmacológicos com resultados favoráveis no controle e na cura de enfermidades, nas áreas humana e animal (APPLETON, TANSEY, 1975; LOURIA et al, 1989; URBINA et al, 1993; ZOHRI et al, 1995; LEDEZMA et al, 1996; SAN-BLAS et al, 1997). Da mesma forma, alguns trabalhos também têm sido realizados quanto a sua utilização no controle de patógenos associados às sementes (VIEGAS, 2004). A planta medicinal, quando escolhida corretamente, é um medicamento, embora apresente diferenças quando comparada com o produto industrial, principalmente pela presença de substâncias adicionadas como conservantes, corantes, adoçantes e aromatizantes, entre outros (MATOS, 1997).

As plantas produzem vários metabólitos secundários, com atividades farmacológicas das mais variadas, dentre eles, encontram-se os que apresentam atividade antifúngica.

O ressurgimento do interesse nas terapias naturais e o conhecimento da demanda de consumo por produtos naturais efetivos e seguros requerem mais dados sobre os óleos e extratos de plantas (NASCIMENTO et al, 2007).

2.4.1 *Cinnamomum* spp Shaeff

a) Família: Lauraceae.

b) Nomes populares: canela, canela-verdadeira, canela-de-cheiro, canela-da-índia, canela-de tubo, canela-do-ceilão e canela-rainha (LORENZI; MATOS, 2002).

c) Características gerais: originária do Sri Lanka e do sudoeste da Índia e cultivada em vários países do mundo, inclusive no Brasil (PIO CORRÊA, 1984; GRUENWALD, 2000). A canela é mencionada por antigos historiadores gregos e latinos como também por chinês de 2700 a.C. Essa planta figura como especiaria nos livros de Moisés e seu cultivo na Ceilão dataria do ano de 1200 a.C. (CLAUS; YLER, 1968).

É uma árvore pequena, de até 9 metros de altura e 40 centímetros de diâmetro, casca espessa, pálida e glabra, ramos cilíndricos, folhas simples, opostas ou sub-opostas, raramente alternadas, pecioladas, ovadas ou ovado-lanceoladas, flores numerosas, axilares, esverdeado-amareladas, pequenas, aromáticas, bracteadas, reunidas em racimos ramificados. Fruto ovóide, apiculado, 2 centímetros, roxo-escuro, contendo uma semente cujo embrião está cheio de depósitos de óleo essencial (PIO CORRÊA, 1984), de acordo com a Figura 1. Ao atingir, aproximadamente, 2 anos a casca é extraída e comercializada em forma de tubos duplos e desprovidos da epiderme e da camada suberosa usada desde a mais remota antiguidade na culinária, em perfumaria e em farmácia (SOUSA et al, 1991; SIMÕES, 1999; GRUENWALD, 2000), conforme a Figura 2.

A literatura etnofarmacológica cita o uso popular desta planta no tratamento caseiro da diarreia infantil, gripes, verminoses, dor de dente, mau-hálito e vômito (BOORHEM, 1999).

Ensaios farmacológicos mostraram que o óleo essencial e seu principal componente, o cinamaldeído, têm atividade antibacteriana e antifúngica; tendo sua efetividade comprovada contra algumas espécies de fungos toxígenos, como também contra patógenos do trato respiratório, inclusive espécies pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Cândida* e *Histoplasma*; e cepas produtoras de aflatoxina carcinogênica (MONTES-BELMONT; CARVAJAL, 1998; JUGLAL et al, 2002; SOLIMAN; BADEAA, 2002; MCCANN, 2003; ALONSO, 2004; GRUENWALD, 2004). A casca, também, apresenta propriedades antifúngica e antibacteriana, além de mostrar uma ação anestésica local e carminativa (UPHOF, 1968; VALNET, 1972; MOREIRA FILHO, 1972; CAMARGO, 1998).

Devido aos princípios do seu óleo essencial, a canela pode ser usada para prevenir a deterioração de comida devido a contaminação fúngica e bacteriana (MAU et al, 2001; YUSTE; FUNG, 2002; SMITH-PALMER et al, 2002; RANASINGHE et al, 2002; MEJLHOLM; DALRGAARD, 2002; FRIEDMAN et al, 2002; VALERO; SALMERON, 2003; SUHR; NIELSEN, 2003; KALEMBA; KUNICKA, 2003; GUYNOT et al, 2003; FABIO et al, 2003).



Figura 1 – Fotografia de *Cinnamomum* spp.
www.giardinaggio.it/.../cannella/cannella.asp



Figura 2 – Fotografia da casca de *Cinnamomum* spp.
www.realnaturals.net/real/index.phd?page=shop.bro...

2.4.2 *Mentha piperita* L.

a) Família: Lamiacea.

b) Nomes populares: hortelã, hortelã-pimenta, menta-inglesa, hortelã-apimentada, hortelã-das-cozinhas, menta-inglesa ou sândalo.

c) Características gerais: segundo PIO CORRÊA (1984) a *Mentha piperita* é uma erva aromática, anual ou perene de aproximadamente 30 cm de altura, ligeiramente aveludada, raiz fibrosa, rampante, caule ereto, quadrangular, avermelhado, ramoso, de ramos eretos e opostos, folhas opostas, flores violáceas, numerosas, curtamente pedunculadas, reunidas em verticilos separados uns dos outros e formando, na extremidade dos caules, espigas muito densas, ovóides, munidas de brácteas lineares, ciliadas nas margens, cálice tubuloso, com 5 dentes quase iguais. Originária da Inglaterra, é uma forma híbrida, provavelmente oriunda do cruzamento de *Mentha viridis* L. com *Mentha aquática* L., e largamente cultivada. Toda planta exala em cheiro suave, característico, e possui sabor picante. As sumidades florais, usadas na medicina, têm cheiro particular, fresco, penetrante, sabor apimentado, ligeiramente canforado, a princípio quente, deixando depois na boca uma sensação de frio. A análise química demonstrou conter um princípio amargo, matéria resinosa, tanino e óleo essencial que resfriado a 0° deixa cristalizar uma cânfora particular – o mentol, monoterpene utilizado em produtos de higiene bucal, fármacos, cosméticos e alimentos. O mentol também apresenta grande potencial antifúngico e antibacteriano, tornando seu cultivo de grande importância econômica (SOUSA et al, 1991; SCAVRONI et al, 2006), como mostram a Figuras 3 e 4.

A literatura etnobotânica registra suas propriedades espasmolíticas, antivomitivas, carminativas, estomáquicas e anti-helmínticas, por via oral, antibacterianas, antifúngicas e antiprurido em uso tópico (GOUTAM et al, 1980).



Figura 3 – Foto de *Mentha piperita*
www.cas.vanderbilt.edu/bioimages/species/mepi.htm



Figura 4 – Foto de *Mentha piperita*
www.plant-identification.co.uk/images/labiatea...

2.4.3 *Passiflora foetida* L.

a) Família: Passifloráceas.

b) Nomes populares: maracujá-de-cheiro, maracujá-fedorento, micatinga, maracujá-de-estalo e maracujá-de-estrada.

c) Características gerais: Maracujá – este nome, sinônimo de “flor da Paixão”, compreende numerosas espécies da família das Passifloráceas e do gênero *Passiflora* (PIO CORRÊA, 1984). A família *Passifloracea* está compreendida por doze gêneros com umas 600 espécies originárias das regiões tropicais e subtropicais da América e África. Ao gênero *Passiflora* pertencem mais ou menos 400 espécies, a grande maioria americana (ALONSO, 2004).

As folhas e raízes de algumas Passifloráceas, se não de todas, contém uma substância idêntica à morfina e denominada “passiflorina” muito empregada e indicada como calmante. As folhas são usadas, também, para combater as febres intermitentes, as inflamações cutâneas, erisipela, sendo consideradas diaforéticas e anti-histéricas. Parecem ser ainda consideradas antihelmínticas. A polpa do fruto, com as sementes, são doces e acídulas, muito apreciadas para fabricação de refrigerantes. Planta cuja flor, em concurso popular promovido por uma conhecida revista agrícola brasileira, foi eleita “a mais bela flor” da flora brasileira. É uma planta viscosa, caule com pêlos amarelos ou castanhos amarelados, folhas hastadas ou lanuginosas, glanduloso-ciliadas, brácteas de 2-3 centímetros de comprimento, fruto com 2 - 2,5 centímetros de diâmetro e amarelado. Tem muitas variedades e é cultivada em Porto Rico, Jamaica, Antilhas e largamente difundida na América do Sul (PIO CORRÊA, 1984), de acordo com a Figura 5.



Figura 5 – Foto de *Passiflora foetida*
www.florabase.calm.wa.gov.au/browse/profile/5226

2.5 Fármaco antifúngico: Cetoconazol

A introdução do cetoconazol na prática clínica no início da década de 1970 iniciou uma nova era na terapia antifúngica. É um derivado azólico muito eficiente contra os dermatófitos (ROCHA; SIDRIM, 1999), sendo indicado para uso por via oral ou tópica, apresentando amplo potencial terapêutico para o tratamento de diversas infecções fúngicas superficiais ou sistêmicas. Sua distribuição é limitada e a penetração no líquido cefalorraquidiano é mínima. A resposta ao tratamento oral é relativamente lenta, sendo menos indicado em casos de infecções graves e agudas. A atividade antimicótica do cetoconazol frente aos fungos *Coccidioides immitis*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum* e *Blastomyces dermatitidis* é atingida em concentrações de 0,125 µg/mL até 0,5 µg/mL. Os valores correspondentes para *Sporothrix schenckii*, *Cândida* spp. e *Aspergillus* spp. variam entre 6 µg/mL até concentrações iguais ou maiores que 100 µg/mL (SANDE; MANDELL, 1987; LACAZ; NEGRO, 1991; RICHARDSON; WARNOCK, 1993).

Tem sua atuação no sistema enzimático P – 450 das células fúngicas, resultando na interrupção da síntese de ergosterol pela membrana celular e nos conseqüentes acúmulos de precursores do ergosterol (C – 14 metil-esteróis) junto à parede celular, acarretando, com isso, alteração da permeabilidade da membrana, com interrupção do crescimento e subsequente morte fúngica (EICHENBERG, 2000). A ação fungistática ou fungicida é dependente da concentração da droga. Pela sua freqüente utilização, tem-se observado resistência entre os fungos, principalmente por espécies de *Cândida* (LACAZ; NEGRO, 1991; ARENAS, 1993; ALVES et al, 1999).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Atividade Antifúngica (LAAF), que faz parte do Núcleo de Pesquisas Micológicas e Micotoxicológicas Luiz Celso Hygino da Cruz (LCHC), do Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária do Instituto de Veterinária da Universidade Federal do Rio de Janeiro, localizado no prédio do Projeto de Sanidade Animal.

3.2 Espécies Fúngicas

O Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRRJ forneceu as espécies fúngicas para a realização deste trabalho. As espécies foram originalmente obtidas da American Type Culture Collection (ATCC), Maryland - USA, Agricultural Utilization Research - USA (NCAUR) e da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) – Brasil. As cepas foram *Aspergillus carbonarius* (UFPE nº 1546 Catálogo URM 3ª ed., 1996), *Aspergillus niger* (ATCC 1004), *Aspergillus ochraceus* (NRRL 3174), *Aspergillus flavus* (NRRL 5520) e *Aspergillus parasiticus* (NRRL 2999), como mostra a Tabela 1.

Tabela 1 – Espécies fúngicas utilizadas e seus respectivos registros originais

Espécies	Cepas
<i>Aspergillus carbonarius</i>	UFPE 1546
<i>Aspergillus flavus</i>	NRRL 5520
<i>Aspergillus niger</i>	ATCC 1004
<i>Aspergillus ochraceus</i>	NRRL 3174
<i>Aspergillus parasiticus</i>	NRRL 2999

3.3 Materiais utilizados

- Câmara de Neubauer (hemocitômetro) – 0,100mm/0,0025mm² – Hirschmann Techcolor
- Microscópio Binocular – Wild – (Heerbrugg)
- Balança de Precisão Digital – Sartorius ®
- Papel de filtro Whatman nº 1
- Membrana filtrante Millipore® de porosidade 0,22mm
- Suporte de membrana de aço inox
- Papel de Tornasol (indicador de pH da marca Merck®).
- Estufa BOD Luferto ®

- Câmara de Segurança Biológica - PA – 115 – (Pachane)
- Balança de Precisão Digital Mettler PE360 ®
- Agar Sabouraud Glicosado a 2% (ASG 2%) Vetec
- Placas de Petri estéreis
- Alça de platina
- Tubos de ensaio

3.4 Manutenção da Coleção Fúngica

As cepas chegaram ao LAAF com identificação própria adotada pelo Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária da Universidade Federal do Rio de Janeiro-UFRJ, conforme a Tabela 2 e, foram mantidas em meio Agar Sabouraud glicosado a 2% (ASG2%) à temperatura de 36° C e repicadas trimestralmente – até começarem os testes de atividade antifúngica e sensibilidade ao antifúngico comercial Cetoconazol®– segundo as técnicas e formulações descritas por PITT & HOCKING (1997). Ao início dos testes, as cepas passaram a ser repicadas a cada 7 (sete) dias. As baterias-teste de atividade antifúngica e sensibilidade ao antifúngico comercial Cetoconazol® foram realizadas com cultivos de 7 (sete) dias

Tabela 2 – Espécies fúngicas de referência utilizadas e seus respectivos registros no Laboratório de Atividades 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

3.5 Contagem de conídios

Utilizando uma alça de platina, retirou-se uma pequena fração da porção central da colônia de cada cepa – cultivo de 7 (sete) dias – adicionando a tubos de ensaio contendo 15 mL de água destilada estéril. Os tubos eram homogeneizados por agitação manual, com o objetivo de desprender os propágulos fúngicos, posteriormente retirou-se uma gota do inóculo e levada para Câmara de Neubauer (hemocitômetro), para contagem de UFC/mL (Unidade Formadora de Colônias), com auxílio de microscópio binocular (ALVES et al, 1998; TAMAI et al, 2002; NOGUEIRA et al, 2002; LOUREIRO, MONTEIRO, 2004; BITTENCOURT et al, 2003).

Os números médios de conídios/mL para cada espécie de *Aspergillus* nos diferentes testes de atividade antifúngica dos extratos e no teste de sensibilidade ao cetoconazol estão apresentados na Tabela 3.

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

Espécie	Conídios/mL
<i>A. flavus</i>	152
<i>A. ochraceus</i>	147
<i>A. niger</i>	161
<i>A. parasiticus</i>	152
<i>A. carbonarius</i>	136

3.6 Material Botânico

O material botânico utilizado nos testes antifúngicos foi obtido de duas formas: amostras de *Passiflora foetida* (folhas e sumidades aéreas em floração e frutificação) foram gentilmente cedidas pelo professor Nilton Junqueira, da EMBRAPA Cerrados (CPAC), registrada sob o número de acesso CPAC – MJ – 28 – 01; *Mentha piperita* e *Cinnamomum* foram adquiridas junto a IOD – Comércio de Produtos Naturais Ltda - fornecedora de produtos para manipulação farmacêutica, na forma pulverizada, cujas informações estão discriminadas nos respectivos certificados de análises, constando dos Anexos I e II.

3.7 Obtenção dos extratos

Para os testes antifúngicos os extratos foram obtidos de duas formas: pesou-se as folhas e sumidades aéreas em floração e frutificação de *P. foetida* secas – 10g – em balança de precisão digital. Reduziu-se a pequenos pedaços, manualmente, e adicionou-se a elas 200 mL de água destilada em início de fervura (95° C), a infusão foi reservada para filtração após atingir a temperatura ambiente. E o material pulverizado, de *Cinnamomum* e de *Mentha piperita* – 10g de cada amostra, foi transferido para um becher contendo 200 mL de água destilada e levado a início de fervura. Em seguida, foram resfriados até temperatura ambiente. As infusões foram filtradas em gaze e papel de filtro, obtendo-se um extrato bruto aquoso de concentração a 5%. 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 acoplada em suporte de membrana de aço inox, em condições assépticas.

3.8 Verificação do pH dos extratos

Sabendo-se da importância de se trabalhar com um extrato com pH próximo a valores da neutralidade, para que a acidez ou alcalinidade do extrato não causem inibição ou retardo do crescimento fúngico, fez-se necessário a verificação do pH de todos os extratos utilizados nesta pesquisa.

Amostras das diferentes concentrações dos extratos foram imediatamente transferidas para um becker e procedeu-se a avaliação do pH utilizando-se o papel de Tornasol.

3.9 Testes de Atividade Antifúngica

Verificou-se a atividade antifúngica utilizando o método da concentração inibitória mínima (MIC) em agar, com a técnica de diluições em placas (Pour-Plate), (THATCHER; CLARK, 1973; ICMSF, 1978; NABET et al., 1997; APHA, 1998; USP-24-NF 19, 2000; HORNER et al, 2004), com modificações e diluições dos diferentes extratos, partindo de uma solução de 5% do extrato, padronizado pela NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). De cada diluição retirou-se 1 mL e foi adicionado em placa de Petri descartável estéril, em seguida adicionado 1 mL de cada suspensão dos inóculos e posteriormente vertido 8 mL de meio Agar Sabouraud Glicosado a 2% (ASG 2%) da marca Vetec ®. As placas passaram por processo de homogeneização em oito e após solidificação, levadas a incubar em estufa BOD, ajustada em temperatura de 36° C. Os testes foram realizados em triplicata e os resultados obtidos após incubação de 24, 48 e 168 horas. Para cada bateria, foi realizado o teste controle contendo meio e extrato, em duplicata e, meio e fungo. Todo procedimento foi realizado sob condições assépticas.

3.10 Obtenção do Antifúngico Cetoconazol®

Cetoconazol® foi adquirido comercialmente sob a forma de pó (NCCLC, 1992) sendo fornecido o laudo de garantia e controle de qualidade, como consta em Anexo III. Todas as recomendações quanto à conservação do produto foram seguidas.

3.11 Preparo do Cetoconazol

O dimetil-sulfóxido (DMSO) foi eleito como solvente para a preparação da solução de Cetoconazol® (WARNOCK, 1989; NCCLS, 1992). Realizou-se a pesagem de 0,029g do princípio ativo, em balança de precisão digital (NCCLS, 1992), e após a sua solubilização, obteve-se a concentração final de 1933,18µg/mL, respeitando a concentração mínima de 1280µg/mL, como valor mínimo, recomendado no NCCLS (1992). O teste de sensibilidade foi realizado imediatamente após a solubilização completa do antifúngico (WARNOCK, 1989). Todo o procedimento foi realizado em Câmara de Segurança Biológica.

3.12 Teste de controle com o Cetoconazol

Da solução do antifúngico retirou-se 1 mL e foi adicionado em placa de Petri descartável estéril, em seguida foi adicionado 1 mL de cada suspensão dos inóculos e posteriormente vertido 8 mL de meio Agar Sabouraud Glicosado a 2% (ASG 2%). As placas passaram por processo de homogeneização em oito e após solidificação, levadas a incubar em estufa, ajustada em temperatura de 36° C. Os testes foram realizados em duplicata e os resultados obtidos após incubação de 24, 48 e 168 horas. Para cada bateria, foi realizado o teste controle contendo 1 mL da suspensão do inóculo e o solvente DMSO – placa A com 1 mL e placa B com 0,1 mL. Em toda abateria foi realizado controle com placas contendo apenas meio de ASG 2% puro.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 4 mostra os valores de pH obtidos no extrato de *Cinnamomum*, *Mentha piperita* e *Passiflora foetida*. Independentemente da concentração, o pH manteve-se entre 5 e 6.

Tabela 4 – Valores de pH em diferentes concentrações de extratos vegetais.

Extrato	Concentração		
	1,25%	2,5%	5%
<i>Mentha piperita</i>	6	6	6
<i>Cinnamomum</i>	5	5	5
<i>Passiflora foetida</i>	5	5	5

De acordo com os resultados apresentados nas Tabelas 5, 6, 7, 8 e 9 observou-se que o extrato aquoso de *Mentha piperita*, para as cinco espécies de *Aspergillus*, foram semelhantes, independente das concentrações utilizadas e do tempo de incubação, onde todas as placas apresentaram desenvolvimento micelial nas leituras de 24, 48 e 168 horas. Estudos anteriores demonstraram que o óleo essencial de menta foi capaz de inibir o desenvolvimento micelial dos fungos *A. niger* e *A. flavus* nas concentrações 1500 e 2000 mg/mL, respectivamente (PEREIRA et al, 2006). Resultados semelhantes foram observados por MONTES-BELMONT & CARVAJAL (1998), que comprovaram a eficácia do óleo essencial de *Mentha piperita* alcançando total inibição do desenvolvimento micelial de *A. flavus*. SINGH et al (1993) demonstraram o efeito fungicida e fungistático do óleo essencial de menta, alcançando inibição de 100% dos micélios, a partir da concentração de 2000 mg/mL, levando-os a afirmar que o óleo de menta pode ser usado como um forte produto no controle de doenças de plantas e animais.

Os resultados referentes à adição do extrato aquoso de *Cinnamomum* spp., conforme apresentado nas Tabelas 5, 6, 7, 8 e 9 demonstraram que em relação aos fungos *A. flavus* e *A. ochraceus* houve inibição do desenvolvimento micelial na maior concentração (5%) e apenas durante período de 24 horas de incubação. Os fungos *A. niger* e *A. parasiticus* não tiveram o seu desenvolvimento micelial afetado nas concentrações testadas. O fungo *A. carbonarius* apresentou o seu desenvolvimento micelial afetado em todas as concentrações durante o período de incubação de 24 horas. Até 48 horas de incubação, com as concentrações de 2,5% e 5% do extrato, constatou-se uma inibição total do desenvolvimento micelial, conforme observado nas Tabelas 5, 6, 7, 8 e 9. CHALFOUN et al (2004) avaliaram o efeito “in vitro” do óleo essencial de canela e constataram inibição total do desenvolvimento micelial de *A. niger*, entre outros microrganismos. Em seu trabalho, VIEGAS (2004), afirma que o óleo essencial da casca da canela obteve maior inibição do desenvolvimento micelial de *A. flavus* entre os óleos por ele testados. Outros estudos (SALMERAN; POZO, 1991; PATKAR, et al, 1993; RYU; HOLT, 1993; SINHA, et al, 1993; MUKHERJEE; NANDI, 1994), apontam o óleo essencial de *Cinnamomum* sendo um agente fungistático contra vários fungos tóxicos.

Com relação ao efeito da adição do extrato aquoso de *Passiflora foetida*, observou-se que não houve inibição do desenvolvimento micelial de nenhum dos fungos testados, em nenhuma das concentrações utilizadas, de acordo com as Tabelas 5, 6, 7, 8 e 9. Há, no

entanto, necessidade de mais estudos para se verificar se há ou não atividade biológica em qualquer dessas frações.

Apesar dos extratos vegetais aquosos avaliados nos testes antifúngicos nunca terem sido investigados com esta finalidade, nenhum se mostrou eficiente na inibição de crescimento das espécies analisadas. Estudos feitos por MEI-CHIN e SHIH MING (1999), demonstraram que extratos vegetais aquosos podem ter a propriedade de inibir o crescimento de *Aspergillus* spp. Extratos brutos aquosos de *Allium sativum* nas concentrações de 5% e 2,5% foram capazes de inibir o crescimento das cinco espécies do gênero *Aspergillus* (MEDICI, 2005).

O resultado negativo do extrato aquoso de *P. foetida*, sobre os fungos testados pode ser atribuído a diferença do material botânico utilizado - *P. foetida* em forma desidratada e *Cinnamomum* spp. e *M. piperita* pulverizados – causando uma possível inadequação do método de extração, sugerindo possivelmente uma extração mais eficaz dos constituintes obtidos a partir do material pulverizado.

Nos experimentos realizados, a diminuição da atividade antifúngica dos extratos, observada a partir de 48 horas de incubação, pode ser atribuída não só as interações químicas, como também a perda ou diminuição dos compostos ativos com o decorrer do tempo.

A temperatura de incubação a 36° C para os testes antifúngicos justifica-se em virtude das cinco espécies investigadas apresentarem na literatura, em relação a climas tropicais e subtropicais um crescimento ótimo na faixa de 30 a 37 °C (PITT; HOCKING, 1977; MITCHELL, et al, 2004). Experimentos realizados por MEDICI, 2005 e SOUZA, 2005 nas temperaturas de incubação 25 e 37° C demonstraram não existir influência da temperatura no crescimento das cepas de *Aspergillus* quando tratados com extratos aquosos vegetais.

Os valores de pH obtidos no extrato de *Cinnamomum* spp, *Mentha piperita* e *Passiflora foetida* não interferiram no crescimento das espécies estudadas e é concordante com o intervalo de pH apresentado para *A. parasiticus* e *A. flavus* (DOMSCH, et al, 1980; ICMSF, 1996 e PITT; HOCKING, 1997).

Diversos solventes são empregados por diferentes autores com a finalidade de solubilizar as drogas como dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilformamida e polietilenoglicol (WARNOCK, 1989; NCCLS, 1992). O solvente de escolha nos testes antifúngicos foi o dimetilsulfóxido, que além de solubilizar bem o antifúngico (cetoconazol), utilizado no controle, não interferiu no crescimento das cepas de *Aspergillus*.

É necessário que se realizem novas pesquisas com concentrações diferentes das testadas e na obtenção dos extratos aquosos de *Cinnamomum* spp, *Mentha piperita* e *Passiflora foetida*, para que se possa afirmar que eles não apresentam atividade antifúngica frente às espécies pesquisadas neste trabalho.

Tabela 5: Avaliação das leituras após incubação de 24, 48 e 168 horas, à 36 °C, dos testes antifúngicos com extratos vegetais e com cetoconazol sobre *A. flavus*.

Extratos	24 h.			48 h			168 h						
	Concentrações			Concentrações			Concentrações			Controles			Antifúngico
	1,25%	2,5%	5,0%	1,25%	2,5%	5,0%	1,25%	2,5%	5,0%	Meio	Meio e fungo	Meio e extrato	Cetoconazol
<i>Cinnamomum spp.</i>	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-
<i>M. piperita</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-
<i>P. foetida</i>	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-

(+) houve crescimento; (-) não houve crescimento.

Tabela 6: Avaliação das leituras após incubação de 24, 48 e 168 horas, à 36 °C, dos testes antifúngicos com extratos vegetais e com cetoconazol sobre *A. carbonarius*.

Extratos	24 h.			48 h			168 h						
	Concentrações			Concentrações			Concentrações			Controles			Antifúngico
	1,25%	2,5%	5,0%	1,25%	2,5%	5,0%	1,25%	2,5%	5,0%	Meio	Meio e fungo	Meio e extrato	Cetoconazol
<i>Cinnamomum spp.</i>	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-
<i>M. piperita</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-
<i>P. foetida</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-

(+) houve crescimento; (-) não houve crescimento.

Tabela 7: Avaliação das leituras após incubação de 24, 48 e 168 horas, à 36 °C, dos testes antifúngicos com extratos vegetais e com cetoconazol sobre *A. ochraceus*.

Extratos	24 h.			48 h			168 h						
	Concentrações			Concentrações			Concentrações			Controles			Antifúngico
	1,25%	2,5%	5,0%	1,25%	2,5%	5,0%	1,25%	2,5%	5,0%	Meio	Meio e fungo	Meio e extrato	Cetoconazol
<i>Cinnamomum spp.</i>	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-
<i>M. piperita</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-
<i>P. foetida</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-

(+) houve crescimento; (-) não houve crescimento.

Tabela 8: Avaliação das leituras após incubação de 24, 48 e 168 horas, à 36 °C, dos testes antifúngicos com extratos vegetais e com cetoconazol sobre *A. niger*.

Extratos	24 h.			48 h			168 h						
	Concentrações			Concentrações			Concentrações			Controles			Antifúngico
	1,25%	2,5%	5,0%	1,25%	2,5%	5,0%	1,25%	2,5%	5,0%	Meio	Meio e fungo	Meio e extrato	Cetoconazol
<i>Cinnamomum spp.</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-
<i>M. piperita</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-
<i>P. foetida</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-

(+) houve crescimento; (-) não houve crescimento.

Tabela 9: Avaliação das leituras após incubação de 24, 48 e 168 horas, à 36 °C, dos testes antifúngicos com extratos vegetais e com cetoconazol sobre *A. parasiticus*

Extratos	24 h.			48 h			168 h						
	Concentrações			Concentrações			Concentrações			Controles			Antifúngico
	1,25%	2,5%	5,0%	1,25%	2,5%	5,0%	1,25%	2,5%	5,0%	Meio	Meio e fungo	Meio e extrato	Cetoconazol
<i>Cinnamomum spp.</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-
<i>M. piperita</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-
<i>P. foetida</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-

(+) houve crescimento; (-) não houve crescimento.

5 CONCLUSÕES

O método de diluições em placa para testes de atividade antifúngica dos extratos de plantas e o teste de sensibilidade ao antifúngico comercial testado neste experimento, mostrou-se eficaz devido à sua praticidade, rapidez, sensibilidade e reprodutibilidade.

O meio Agar Sabouraud Glicosado a 2% mostrou-se uma boa opção para a realização dos testes, propiciando o crescimento das espécies pesquisadas, adequada leitura dos resultados e economicamente acessível.

O dimetilsulfóxido (DMSO) foi capaz de solubilizar o antifúngico Cetoconazol, não interferindo no crescimento das espécies pesquisadas, podendo ser utilizado na avaliação da sensibilidade dos referidos fungos toxígenos frente à droga testada.

Os extratos brutos aquosos de *M. piperita* e *P. foetida* não foram capazes de inibir o crescimento de nenhuma das cinco espécies do gênero *Aspergillus* investigadas, em nenhuma das concentrações testadas.

O extrato bruto aquoso de *Cinnamomum* spp inibiu o crescimento de *A. carbonarius* até 48 horas de incubação nas concentrações de 2,5% e 5%.

Há necessidade de uma padronização dos métodos propostos para que se possa mensurar a atividade antifúngica das plantas, e assim elucidar a verdadeira bioatividade, potencial terapêutico e utilização dos extratos aquosos.

Novas pesquisas sobre a avaliação do efeito de diferentes extratos aquosos vegetais sobre o crescimento micelial de fungos toxígenos devem ser intensificadas, tendo em vista que dados sobre este aspecto são escassos na literatura.

Embora os resultados obtidos com os extratos aquosos de *Cinnamomum* spp., *Mentha piperita* e *P. foetida* não tenham apresentado uma inibição totalmente eficaz sobre o crescimento dos fungos testados, a procura, através da pesquisa, de um produto natural de baixo custo e de menor agressividade ao meio ambiente deve ser incentivada.

REFERÊNCIAS

- 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 ochratoxin A contamination in dried vine fruits from the Spanish market. *Journal of Food Protection*, 66(3): 504 – 506, 2003.
- ALONSO, J. Tratado de Fitofármacos y Nutracêuticos. Editora corpus. Rosário, Argentina, p. 1039, 2004.
- ALVES, S.B.; MOINO JÚNIOR, A.; ALMEIDA, J.E.M. Técnicas de laboratório. In: ALVES, S.B. (ed). Controle microbiano de insetos. Piracicaba: Fealq., p. 637 – 711, 1998.
- ALVES, S. H.; LOPES, J. O.; CURY, A. E. Teste de susceptibilidade aos antifúngicos: por que, quando e como realizar. Disponível em: <http://www.newslab.com.br/antifung.htm>. Acesso em: setembro de 2007. 1999.
- APHA – AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. Standard methods for the examination of water and wastewater. 20th, Washington, D.C., 1998.
- APPLETON, J.A.; TANSEY, M.R. Inhibition of growth of zoopathogenic fungi by garlic extract. *Mycologia*, Lawrence, 67: 882-885, 1975.
- ARENAS, R. Micologia médica ilustrada. México: Nueva editorial interamericana. Cap. 34: Antimicóticos, p. 359 – 376, 1993.
- ATTISSO, M. L. As plantas medicinais voltam a florescer. O correio da UNESCO – As plantas medicinais florescem. Editora Fundação Getúlio Vargas. p. 6-8. Rio de Janeiro, 1979.
- AYERST, G. The effects of moisture and temperature on growth and spore germination in some fungi. *Jour. Store Prod. Res.* 5: 669 – 687, 1969.
- BITTENCOURT, V.R.E.P.; BAHIENSE, T.C.; FERNANDES, E.K.K.; SOUZA, E.J. Avaliação da ação *in vivo* de *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883 aplicado sobre *Bachiaria decumbens* infestada com larvas de *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari:Ixodidae). *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, (Brazil J. Vet. Parasitol.)*, 12(1): 38- 42, 2003.
- BOORHEM, R.L. Reader's digest – Segredos e virtudes das plantas medicinais. Reader's Digest Brasil Ltda, Rio de Janeiro, 1999.
- BROOKS, G. F; BUTEL, J. S.; MORSE, S. A. Microbiologia Médica. 21ª edição. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2000.
- CAMARGO, M. T. L. A. Plantas medicinais e de rituais afro-brasileiros II: Estudo Etnofarmacobotânico. Ícone editora. São Paulo, 1998.

CARIBÉ, J.; CAMPOS, J. M.. Plantas que ajudam o homem. Guia prático para a época atual. 5ª edição. São Paulo, 1997.

CHALFOUN, S. M.; PEREIRA, M. C.; RESENDE, M. L. V.; ANGÉLICO, C. L.; SILVA, R. A. Effect of powdered spice treatments growth, sporulation and production of aflatoxin by toxigenic fungi. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, 28 (4): 856 - 862, jul./ago. 2004.

CLAUS, E. P.; TYLER, V. E. *Farmacognosia*. Editora Ateneo. Buenos Aires, 1968.

CRUZ, L. C. H. *Micotoxinas: Perspectivas Latinoamericana*. Seropédica. Editora da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1996.

DESMARCHELIER, C.; LISBOA ROMÃO, R.; COUSSIO, J.; CICCIA, G. Antioxidant and free radical scavenging activities in extracts from medicinal trees used in the “Caatinga” region in northeastern Brazil. *J. Ethnopharmacol.*, 67: 69 – 77, 1999.

DHINGRA, O. D.; COELHO NETTO, R. A. *Micotoxinas em grãos*. Revisão anual de *Patologia de Plantas*. Passo Fundo, 6: 49 – 101, 1998.

DIENER, U.L.; COLE, R.J.; SANDERS, T.H.; PAYNE, G.A.; LEE, L.S.; KLICH, M. A.. Epidemiology of aflatoxin formation by *A. flavus*. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto, 25: 249 – 270, 1987.

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

DUARTE, M. C. T.; FIGUEIRA, G. M.; PEREIRA, B.; MAGALHÃES, P. M.; DELARMELENA, C. Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoólicos de espécies da coleção de plantas medicinais CPQBA/UNICAMP. *Rev. Brasileira de Farmacognosia*, 14 (Supl. 1): 6 – 8, 2004.

EICHEMBERG, M. L. Susceptibilidade antifúngica da *Malassesia pachidermatis* isolada de cães com otite externa através do método de microdiluição em caldo. Rio Grande do Sul, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 86 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Faculdade de Veterinária. 2000.

FABIO, A.; CORONA, A.; FORTE, E.; QUAGLIO, P. Inhibitory activity of spices and essential oils on psychrotrophic bacteria. *New Microbiol.* 26(1): 115 – 120, 2003.

FONSECA, H. Os fungos e a deterioração de alimentos. Disponível: <<http://www.micotoxinas.com.br/boletim4.htm>>. Acesso em 20 de dezembro de 2007.

FRIEDMAN, M.; HENIKA, P. R.; MANDRELL, R. E. Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica*. *J. food prot.* 65(10): 1545 – 1560, 2002.

GOUTAM, M.P.; JAIN, P.C.; SINGH, K.V. Activity of some essential oils against dermatophytes. *Indian Drugs*, 17 (09): 269-70, 1980.

GRUENWALD, J. PDR for herbal medicines. 3^a edição. Montvale, NJ: Thompson PDR; pp. 199 – 200, 2004.

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

GUYNOT, M. E.; RAMOS, A. J.; SETO, L. Antifungal activity of volatile compounds generated by essential oils against fungi commonly causing deterioration of bakery products. *J. Appl microbial.* 94(5): 893 – 899, 2003.

HIRUMA-LIMA, C. A.; SANTOS, L. C.; KUSHIMA, H.; PELLIZZON, C. H.; SILVEIRA, G. G.; VASCONCELOS, P. C. P.; VILEGAS, W.; SOUZA BRITO, A. R. M. *Qualea grandiflora*, a Brazilian “Cerrado” medicinal plant presents an important antiulcer activity. *J. Ethnopharmacol.*, 104: 207 – 214, 2006.

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

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

ICMSF – INTERNATIONAL COMMISSION OF MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS. Microorganismos de los alimentos: características de los patógenos microbianos. Zaragoza: Acribia, p. 403 – 428, 1996.

IORIS, E. Plantas medicinais do Cerrado. Perspectivas comunitárias para a saúde. FIMES (Fundação Integrada Municipal de Ensino Superior). Goiás, 1999.

JORGE, R. M.; LEITE, J. P. V.; OLIVEIRA, A. B.; TAGLIATI, C, A. Evaluation of antinociceptive, anti-inflammatory and antiulcerogenic activities of *Maytenus ilicifolia*. *J. Ethnopharmacol.*, 94: 93 – 100, 2004.

JUGLAL, S.; GOVINDEN, R.; ODHAV, B. Spice oils for the control of co-occurring mycotoxinproducing fungi. *Food Prot.* 65(4): 683 – 687, 2002.

KALEMBA, D.; KUNICKA, A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Curr. Med. Chem.* 10(10): 813 – 829, 2003.

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.

LANDERS, K. E.; DAVIS, N. D.; DIENER, U. L. Influence of atmospheric gases on aflatoxin production by *Aspergillus flavus* in peanuts. *Phytopathology*, 57: 1086 – 1090, 1967.

- LEDZMA, E.; SOUZA, L.; JORQUERA, A.; SANCHEZ, J.; LANDER, A.; RODRIGUEZ, E.; JAIN, M.K.; APITZ-CASTRO, R. Efficacy of ajoene, an organosulfur derived from garlic, in the short-term therapy of tinea pedis. *Mycoses*, Berlin, 39: 393-395, 1996.
- LIMA, M. R. F.; XIMENES, C. P. A.; LUNA, J. S.; SANT'ANA, A. E. G. The antibiotic activity of some Brazilian medicinal plants. *Rev. Brasileira de Farmacognosia*, 16: 300 – 306, 2006.
- LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. *Plantas Mediciniais no Brasil - nativas e exóticas*. São Paulo: Instituto Plantarum, Nova Odessa, 512 pp, 2002.
- LOUREIRO, E.S. & MONTEIRO, A.C. Seleção de isolados de *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* e *Paecilomyces farinosus*, patogênicos para operárias de *Atta sexdens* (Linnaeus, 1758) (Hymenoptera: Formicidae). *Arq. Inst. Biol.*, 71(1): 35 – 40, 2004.
- LOURIA, D.B.; LAVENHAR, M.; KAMINSKI, T.; ENG. H.K. Garlic (*Allium sativum*) in the treatment of experimental cryptococcosis. *Journal of Medical and Veterinary Mycology, Oxfordshire*, 27: 253-256, 1989.
- MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA Jr, V. F.; GRYNBERG, N. F. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Química Nova*, 25: 429 – 438, 2002.
- MATOS, F. J. A. *As plantas das farmácias vivas. Álbum de gravuras para identificação das principais plantas medicinais do projeto farmácias vivas*. BNB. Fortaleza, 1997.
- MAU, J.; CHEN, C.; HSIEH, P. Antimicrobial effect of extracts from Chinese chive, cinnamon and corni fructus. *J. Agric. Food. Chem.* 49(1): 183 – 188, 2001.
- MCCANN, J. *Herbal medicine handbook*, 2ª edição. Philadelphia: Lippincott. 2003.
- MEDICI, R. L. D. Avaliação da atividade antifúngica de extratos aquosos de plantas sobre espécies toxígenas de *Aspergillus*. TESE (Mestrado em Microbiologia Veterinária)- UFRRJ, Seropédica. 120 pp, 2005.
- MEI-CHIN Y.; SHIH-MING, T. Inhibitory effect of seven *Allium* plants upon three *Aspergillus* species. *International Journal of Food Microbiology*, 49(1 – 2): 49 – 56, 1999.
- MEJHOLM, O.; DALGAARD, P. Antimicrobial effect of essential oils on the seafood spoilage micro-organism *Photobacterium phosphoreum* in liquid media and fish products. *Lett appl. Microbiol.* 34(1): 27 – 31, 2002.
- MENDONÇA-FILHO, R. F. W.; MENEZES, F. S. Estudo da utilização de plantas medicinais pela população da Ilha Grande-RJ. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 13 (supl): 55 – 58, 2003.
- 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*, 97(2): 439 – 445, 2004.

MONTES-BELMONT, R.; CARVAJAL, M. Controlo of *Aspergillus flavus* in maize with plant essential oils and their components. J. food prot. 61(5): 616 – 619, 1998.

MOREIRA FILHO, H. Plantas medicinais. Imprensa Universitária Federal do Paraná, Curitiba, 1972.

MUKHERJEE, P. S.; NANDI, B. Poultry feed preservation from fungal infection by cinnamom oil. Journal of mycopathological research. 32(1): 1 – 5, 1994.

MUNINBAZI, C.; BULLERMAN, L. Molds and mycotoxins in foods from Burundi. J. Food Protect., 59 (8): 869 – 875, 1996.

NABET, P.; AUMAITRE, E.; BESSET, J. Microbiological analysis of water for pharmaceutical use report of an SFSTP Commission STP Pharma Pratiques. 7: 35-39. 1997.

NASCIMENTO, P. F. C.; NASCIMENTO, A. C.; RODRIGUES, C. S. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. Revista Brasileira de Farmacognosia, 17(1): 108-113, Jan./Mar, 2007.

NCCLS – NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: proposed standard. M27 – P, 12 (25), 1992.

NOGUEIRA, S.R.; CASTRO, H.A.; ANDRÉ, C.M.G. Notas científicas: Efeito de fungicidas na germinação *in vitro* de conídios de *Claviceps africana*. *Pesq. Agropec. Bras.*, 37 (10): 1511 – 1515, 2002.

PATKAR, K.; USHA, C.; SHETTY, h.; PASTER, N.; LACEY, J. Effect of spice essential oils on growth and aflatoxin B₁ production by *A. flavus*. Letters in applied microbiology, 17(2): 49 – 51, 1993.

PELCZAR, M.; REID, R.; CHAN, E. C. S. Microbiologia. Vol. II. Editora McGraw-Hill do Brasil. São Paulo, Brasil. 1981.

PEREIRA, M. C.; VILELA, G. R.; COSTA, L. M. A. S.; SILVA, R. F.; FERNADES, A. F.; FONSECA, E. W. N.; PICCOLI, R. H. Inibição do desenvolvimento fúngico através da utilização de óleos essenciais de condimentos. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, 30 (4): 731 – 738, jul./ago. 2006.

PEREIRA, M. M. G.; CARVALHO, E. P.; PRADO, G. Crescimento e produção de aflatoxinas por *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. B. CEPPA. Curitiba, 20 (1): 141 – 156, jan./jun. 2002.

PIO CORRÊA, M. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Ministério da Agricultura. IBDF. I, IV, V, 1984.

PITT, J. I.; 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.

RAMESH, P. Pharmaceutical aspects of paclitaxel. *International Journal of Pharmaceutics*. 172: 1 – 2, 1998.

RANASINGHE, L.; JAYAWARDENA, B.; ABEYWICKRAMA, K. Fungicidal activity of essential oils of *Cinnamomum zeylanicum* (L.) and *Syzygium aromaticum* (L.) merr et Perry against crown rot and anthracnose pathogens isolated from banana. *Lett appl. Microbial*. 35(3): 208 – 211, 2002.

RICHARDSON, M. D.; WARNOCK, D. W. Fungal infection – Diagnosis and management. London: Blackwell. Cap. 3: Antifungal drugs, p. 17 – 43, 1993.

ROCHA, M. F. G.; SIDRIM, J. J. C. Drogas antifúngicas. In: Sidrim, J. J. C.; MOREIRA, J. L. B. Fundamentos clínicos e laboratoriais da micologia médica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap. 5, p. 36 – 44, 1999.

ROSA, C. A. R. Microbiota toxígena e ocratoxinas em rações destinadas à alimentação de aves, bovinos, suínos de importância em saúde animal. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – UFRRJ, Seropédica, 147 pp, 2002.

RYU, D.; HOLT, D. L. Growth inhibition of *Penicillium expansum* by several commonly used food ingredients. *Journal of food protection*. 56(10): 862 – 867, 1993.

SALMERAN, J.; POZO, R. Effect of *Cinnamom* (*Cinnamomum zeylanicum*) and clove (*Eugenia caryophyllus*) on growth and toxigenesis of *A. flavus*. *Microbiologie aliments et nutrition*. 9(1): 83 – 87, 1991.

SAMSON, R. A. List of names of *Trichomaceae* published between 192 and 1999. In: Integration of modern taxonomic methods for *Penicillium* and *Aspergillus* classification. R. A. SAMSON & J. I. PITT (eds). Amsterdam: Harwood Academic Publishers, pp. 73 – 81, 2000.

SAN-BLAS, G.; URBINA, J.A.; MARCHAN, E.; CONTRERAS, L.M.; SORAIS, F.; SAN-BLAS, F. Inhibition of *Paracoccidioides brasiliensis* by ajoene is associated with blockate of phosphatidylcholine biosynthesis. *Microbiology*, New York, 143: 1583 – 1586, 1997.

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. 799 – 807, 1987.

SCAVRONI, J.; VASCONCELLOS, M. C.; VALMORBIDA, J.; FERRI, A. F.; MARQUES, M. O. M.; ONO, E. O.; RODRIGUES, J. D. Rendimento e composição química do óleo essencial de *Mentha piperita* L. submetida a aplicações de giberelina e citocinina. *Revista brasileira de plantas medicinais*. 8 (4): 40 - 43, Botucatu, 2006.

SCUSSEL, M. V. Micotoxinas em alimentos. Florianópolis: Insular, 1998, 144p.

SHANK, R. C. Mycotoxicoses of man: dietary and epidemiological considerations. In: Mycotoxic fungi, micotoxins, micotoxicoses, and encyclopedic handbook. T. D. Wiley & L. G. Morehouse (Eds.) New York: Marcel Dekker, pp. 1 – 12, 1978.

SIMÕES, C.M.O.; Schenkel, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. Farmacognosia – da planta ao medicamento. Editora Universitária, UFRGS/UFSC, Porto Alegre/Florianópolis, 1999.

SINHA, K. K.; SINHA, A. K.; GGAJENDRA, P.; PRASAD, G. The effect of clove and cinnamom oils on growth of and aflatoxin production by *A. flavus*. Letters in applied microbiology. 16(3): 114 – 117, 1993.

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

SMITH-PALMER, A.; STEWARTT, J.; FYFE, L. Inhibition of listeriolysin O and phosphatidylcholinespecific production in *Listeria monocytogenes* by subinhibitory concentrations of plant essential oils. J. med. Microbial. 51(7): 567 – 574, 2002.

SOLIMAN, K. M.; BADEAA, R. I. Effect of oil extrated from some medicinal plant on different mycotoxigenic fungi. Food chem. Toxicol. 40(11): 1669 – 1675, 2002.

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

SOUZA, F. M. L. Ensaios in vitro da ação antifúngica de extratos vegetais em cepas de *Aspergillus*. TESE (Mestrado em Microbiologia Veterinária) – UFRRJ, Seropédica. 57 pp, 2005.

SUHR, K. I.; NIELSEN, P. V. Antifungal activity of essential oils evaluated by two different application techniques against rye bread spoilage fungi. J. Appl. Microb. 94(4): 665 – 674, 2003.

TAMAI, M.A.; ALVES,S.B.;LOPES, R.B.; FAION, M.; PADULLA, L.F.L. Toxicidade de produtos fitossanitários para *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. *Arq. Inst. Biol.*, 69 (3): 89 – 96, 2002.

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

TRABULS, L. R.; ALTERTHUM, F.; Microbiologia. Editora Atheneu. São Paulo, 2004.

UPHOP, J.C.T.H. Dictionary of economic plants, 2ª edição, Germany, J. Cramer, 1968.

URBINA, J. A.; MARCHAN, E.; LAZARDI, K.; VISBAL, G.; APITZ – CASTRO, R.; GIL, F.; AGUIRRE, T.; PIRAS, M.M.; PIRAS, R. Inhibition of phosphatidylcholine biosíntesis and cell proliferation in *Trypanosoma cruzi* by ajoene and antiplatelet compound isolated from garlic. Biochemical Pharmacology, Oxford, 45 (12): 2381 – 2387, 1993.

USP – 24 – THE UNITED STATES PHARMACOPEIA – THE NATIONAL FORMULARY – NF 19. Rockville, MD: United States Pharmacopeial Convention: INC, 2569 pp, 2000.

VALERO, M.; SALMERON, M. C. Antibacterial activity of 11 essential oils against *Bacillus cereus* in tyndallized carrot broth. Int. J. food microb. 85(1-2): 73 – 81, 2003.

VALNET, J. Aromatherapie – Traitement dès malades par lês essences de plantes, Paris, Librarie Maloine, 1972.

VENDRUSCOLO, G. S.; RATES, S. M. K.; MENTZ L. A. Dados químicos e farmacológicos sobre as plantas utilizadas como medicinais pela comunidade do bairro Ponta Grossa, Porto Alegre, Rio Grande do Sul. Revista Brasileira de Farmacognosia, 15: 361 – 372, 2005.

VIEGAS, E.C. Emprego de óleos essenciais de plantas medicinais no controle de *Aspergillus* spp. Em sementes de amendoim (*Arachis hypogaea* L.). Dissertação (Doutorado em Fitotecnia). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2004.

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.

WOOD, G. E. Mycotoxins in foods and feeds in the United States. Journal of Animal Science, 70(12): 3941 – 3949, Dez. 1992.

YUSTE, J.; FUNG, D. Y. Inactivation of *Listeria monocytogenes* Scott A 49594 in apple juice supplemented with cinnamon. J. Food prot. 65(10): 1663 – 1666, 2002.

ZOHRI, A-N.; ABDEL-GAWAD, K.; SABER, S. Antibacterial, antidermatophytic and antitoxigenic activities of onion (*Allium cepa* L.) oil. Microbiological Research, Jena, 150 (2): 167 – 172, 1995.

ANEXOS

Anexo I – Certificado de análise da *Mentha piperita*

YOD

Comércio de Produtos Naturais Ltda.

Rua Dr. Elton César, nº 74 - Chácara Campo dos Amarais
Campinas - Estado de São Paulo - Cep 13082-028

Fone /Fax: (0xx19) 3746-3300

CNPJ nº 07.042.876/0001-06 - INSC. EST. 244.574.227.117

DADOS TÉCNICOS E CIENTÍFICOS

PLANTA: HORTELÃ PÓ

-REF.YOD: 490306 E

CÓDIGO DO PRODUTO: 269

LOTE DO FARR: MENI 01/03

MANUFATURA: 10/05

VALIDADE: 10/08

NOME CIENTÍFICO: *Mentha piperita* L.

FAMÍLIA: *Labiatae*

PARTE UTILIZADA: Folha

MÉTODO DE SECAGEM: À sombra

GRANULOMETRIA: 0,30 mm

ORIGEM: Polônia

ASPECTO MACROSCÓPICO / MICROSC. / ORGANOLEPTICAS:

Folhas opostas de coloração verde, oval lanceoladas, agudas no ápice, margem serradas. Microscopia: mesófilo heterogêneo assintético pelos unisseriados com cutícula verrucosa, estômatos paraciticos. Pó fino e higroscópico de coloração pardo esverdeada sabor e odor aromático.

CONSTITUINTES QUÍMICOS E TESTES REALIZADOS:

Umidade: 0% (esp. max. 12%) cinzas totais: 10,96% (esp. max. 11%) cinzas insolúveis: 2,13% (esp. max. 2,5%)

Teor de óleo essencial: 1,33% (esp. max. 0,5%)

Menos de 10 ppm em chumbo.

PESQUISA DE CONTAMINANTES MICROBIOLÓGICOS

ANÁLISE	ESPECIFICAÇÃO	RESULTADOS
Contagem padrão em placas	Max. 1.000 UFC/g	De acordo
Balores 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</i> sp	Ausência	De acordo
<i>Salmonella</i> sp	Ausência	De acordo

ANÁLISE REALIZADA PELA YOD

	PRÉ FRACIONAMENTO	PÓS FRACIONAMENTO
Aspectos	Pó	Pó
Cor	Castanho esverdeado	Castanho esverdeado
Odor	Aromático/Característico	Aromático/característico
Sabor	Característico	Característico
Densidade aparente	0,352g/ml	0,367g/ml
Umidade	9,55%	8,86%
PH(1%)	5,24	5,26

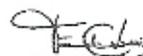
FARMACÉUTICA RESPONSÁVEL: FERNANDA SASSI CRF-SP 12.115

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.


Dr. Fernanda L. Sassi
CRF-SP 12.115

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.

www.yodervas.com.br - 0800 144962

Anexo II – Certificado de análise da *Cinnamomum* spp.

YOD

Comércio de Produtos Naturais Ltda.

Rua Dr. Eilen César, nº 74 - Chácara Campo dos Amarais
Campinas - Estado de São Paulo - Cep 13082-026
Fone /Fax: (0xx19) 3746-3300
C.N.P.J.:01.343.767/0001-85 - INSCR. EST.: 244.574.227.117



DADOS TÉCNICOS E CIENTÍFICOS

PLANTA: CANELA PÓ

-REF.YOD: 602006 E

CÓDIGO DO PRODUTO: 2981

LOTE DO FABR: CANJ 09/02

MANUFATURA : 04/06

VALIDADE: 04/09

NOME CIENTÍFICO: *Cinnamomum* spp

FAMÍLIA: Lauraceae

PARTE UTILIZADA : Casca

MÉTODO DE SECAGEM: Ao sol

ORIGEM : Java

ASPECTO MACROSCÓPICO / MICROSC./ ORGANOLEPTICAS:

Casca enrolada, de superfície pardo avermelhada escura, com algumas regiões acinzentadas. Face interna pardacenta e lisa. Fratura ríflida, fácil e granulosa. Microscopia: em seção transversal observa-se grupo de células pétreas, rafe medular, célula de mucilagem e célula oleífera. Odor e sabor aromático, adocicado. Pó fino e ligrescópico de coloração pardo avermelhada.

CONSTITUINTES QUÍMICOS E TESTES REALIZADOS:

Umidade: 5,7% (esp.máx.9%); cinzas totais: 3,2% (esp.máx. 5%); cinzas insolúveis: 0,73% (esp.máx.3%).
Teor de óleo essencial: 1% (esp.mín.0,5%).

PESQUISA DE CONTAMINANTES MICROBIOLÓGICOS

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

ANÁLISE REALIZADA PELA YOD

	PRÉ FRACIONAMENTO	PÓS FRACIONAMENTO
Aspectos	Pó	Pó
Cor	Pardo avermelhado	Pardo avermelhado
Odor	Característico	Característico
Sabor	Característico	Característico
Densidade aparente	0,536g/ml	0,542g/ml
Umidade	10,80%	10,86%
pH (Sol.1%) +/- 1,00	5,36	5,42

Dra. Fernanda C. Sassi
CRF-SP 12.115

FARMACÉUTICA 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.

www.yodervas.com.br - 0800 144962

Anexo III – Certificado de análise do Cetoconazol



Produto: CETOCONAZOL

Data de Fabricação: 02/07/03

Data de Validade: 02/07/07

Nota Fiscal: 0542730

Volumes: 03

País de Origem: CHINA

Lote de Fabricação: 20030709

CIQ: 7031116615

730

Ser.003.000

CERTIFICADO DE ANÁLISE

FD000095

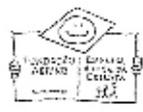
FÓRMULA MOLECULAR: C₂₆ H₂₈ Cl₂ N₄ O₄
 PESO MOLECULAR: 511,4
 CAS: 65777-49-1
 DCB: 5229,81-1

ARMazenamento: À temperatura ambiente, em recipiente perfeitamente fechado e protegido da luz.

Exame/Componente	Especificação	Resultado dos exames
CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS		
- Aparição*	Pó branco ou quase branco.	Pó branco.
SOLUBILIDADE		
- Água*	Praticamente insolúvel.	Praticamente insolúvel
- Álcool*	Ligeiramente solúvel.	Ligeiramente solúvel
- Hexano*	Solúvel.	Solúvel
PIRÓLISE		
- Acido de fusão*	140°C a 150°C	145°C a 140°C
- Grau de perda*		
- 1 g, 105°C, 4 horas*	No máximo 0,5 %	0,0 %
IDENTIFICAÇÃO		
- Infravermelho	Positivo	Positivo
REACÇÃO DE YOUNG		
- Reacção de ignição	No máximo 0,15	0,10
ROTACÃO ESPECÍFICA		
- 40 mg/ml em metanol, 20°C	+14 a +16	0*
IMPUREZAS ORGÂNICAS VOLÁTEIS		
- Impurezas orgânicas voláteis	Confusão	Confusão
IMPUREZAS INORGÂNICAS		
- Metais pesados	No máximo 20 ppm	Menor que 20 ppm
PERDA DE SECAGEM		
- Perda de secagem	Confusão	Confusão
COMBUSTÍVEL		
- Nitrogênio	No máximo 10,0% em matéria seca	
ESTABILIDADE		
- Estabilidade	Confusão	Confusão

Observações: [X] Aprovado Data de Análise: 25/09/2003

Theophilus Mariano Neto
 Farmacêutico Responsável
 CRF-SP: 12.916



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