UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

BÁRBARA PONZILACQUA SILVA

**Avaliação de extratos de plantas quanto à atividade antimicrobiana e à
detoxificação de micotoxinas**

Pirassununga

2018

BÁRBARA PONZILACQUA SILVA

**Avaliação de extratos de plantas quanto à atividade antimicrobiana e à
detoxificação de micotoxinas**

“Versão corrigida”

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia
e Engenharia de Alimentos da Universidade de
São Paulo, como parte dos requisitos para
obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Qualidade e Produtividade
Animal

Orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Fernandes
de Oliveira

Pirassununga

2018

Ficha catalográfica elaborada pelo
Serviço de Biblioteca e Informação, FZEA/USP,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

PP819a Ponzilacqua Silva, Bárbara
Avaliação de extratos de plantas quanto à
atividade antimicrobiana e à detoxificação de
micotoxinas / Bárbara Ponzilacqua Silva ;
orientador Carlos Augusto Fernandes de Oliveira. --
Pirassununga, 2018.
80 f.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação
em Zootecnia) -- Faculdade de Zootecnia e
Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo.

1. Extratos de plantas. 2. Bactérias
patogênicas. 3. Fungos toxigênicos. 4.
Detoxificação. 5. Micotoxinas. I. Fernandes de
Oliveira, Carlos Augusto, orient. II. Título.

BÁRBARA PONZILACQUA SILVA

**Avaliação de extratos de plantas quanto à atividade antimicrobiana e à
detoxificação de micotoxinas**

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Qualidade e Produtividade Animal

Data de aprovação: 12/12/2018

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Carlos Augusto Fernandes de Oliveira (Presidente)

Instituição: Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos-FZEA/USP

Prof.(a) Dr.(a) Eliana Setsuko Kamimura

Instituição: Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos-FZEA/USP

Prof. Dr. Benedito Corrêa

Instituição: Instituto de Ciências Biomédicas / Dep. de Microbiologia–ICB/USP

Prof. Dr. Adriano Gomes da Cruz

Instituição: Instituto Fed de Educação, Ciência e Tecnol do Rio de Janeiro-IFRJ

DEDICATÓRIA

À Deus, pelo dom da vida e discernimento para entender seus caminhos, e aos meus pais Rosângela Maria e Djalma Junior, por todo apoio, carinho, orações e incentivo durante esses anos de intenso trabalho e dedicação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida e por me dar sabedoria e discernimento, afim de entender seus caminhos e desígnios. Além de colocar as pessoas nos momentos certos em meu caminho.

Aos meus pais, Rosângela e Djalma, minhas pedras preciosas que sempre me educaram no amor e no diálogo, estando ao meu lado nas tempestades e abonaças. Essa conquista é de vocês por não me deixarem desistir e no final colherem os lindos frutos comigo.

Ao meu “pequeno grande” irmão, Felipe Augusto, por todo o incentivo e amor. Sem nossos momentos de descontração e risadas eu não teria passado pelos problemas.

A “Nala”, por atender ao pedido divino e chegar no momento certo para alegrar, dar sentido a minha luta e me fazer sorrir.

A todos meus queridos amigos que fizeram parte dessa caminhada nas orações e no início da conquista de uma trajetória acadêmica.

Em especial ao meu mentor acadêmico de graduação, Dr. Prof. João Luíz Zani pelas dicas e auxílios na escolha do tema e produtos utilizados na pesquisa do mestrado. Também em especial ao Dr. Prof. Ricardo Luiz Moro de Souza, supervisor do PAE, meu mentor espiritual e grande incentivador durante esses anos.

Ao Prof. Dr. Carlos Augusto Fernandes de Oliveira pela orientação, ensinamentos e oportunidades de crescimento pessoal e profissional durante esses anos.

A todo pessoal do Laboratório de Microbiologia e Micotoxycologia de Alimentos (LMMA/FZEA-USP), pelos momentos de superação, ensinamentos e desafios.

Ao querido Dr. George E. Rottinghaus, por me oferecer a oportunidade de realizar parte do meu mestrado nos EUA, por todo suporte, confiança e amizade. Obrigada por abrir mais uma porta em meu caminho.

À Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, pela disponibilidade de espaço na realização do projeto e por todo suporte necessário.

À CAPES, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pelo suporte financeiro providenciado durante todo o período do mestrado.

EPÍGRAFE

“Quem poderá descrever as infinitas belezas e descobertas, os horizontes sem limites que contempla uma alma abandonada à aventura da vontade divina? ”

Chiara Lubich

RESUMO

PONZILACQUA SILVA, B. **Avaliação de extratos de plantas quanto à atividade antimicrobiana e à detoxificação de micotoxinas.** 2018. 80f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga.

A exposição humana a microrganismos patogênicos e suas toxinas em alimentos constitui um grave problema de saúde pública. O uso indiscriminado de antimicrobianos convencionais promove o aumento da resistência dos microrganismos às principais moléculas existentes no mercado. Além disso, as limitações do uso de substâncias químicas em matérias primas alimentares têm estimulado pesquisas para o desenvolvimento de metodologias eco-amigáveis para evitar a multiplicação de fungos e/ou eliminar suas toxinas. O *Staphylococcus aureus* é uma das principais bactérias patogênicas que apresenta taxas elevadas de resistência aos antimicrobianos, e por este motivo tem sido objeto de estudo de pesquisas que tentam identificar novos compostos bioativos para o combate de infecções. O *Aspergillus parasiticus* é um dos principais fungos produtores de aflatoxinas, substâncias carcinogênicas que contaminam diversos tipos de cereais antes e após o processamento. Estudos recentes demonstraram que extratos de plantas possuem atividade antimicrobiana e antifúngica, além de potencial para degradação de micotoxinas. Neste contexto, o presente estudo teve por objetivos avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* de extratos brutos e liofilizados de folhas de maracujá, araquá, alecrim e orégano sobre células planctônicas de *S. aureus* e *A. parasiticus*, bem como verificar a capacidade dos referidos extratos em degradar *in vitro* a aflatoxina B₁ (AFB₁), ocratoxina A (OTA) e zearalenona (ZEA). Os efeitos antibacterianos e antifúngicos dos extratos foram avaliados através da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida / fungicida mínima (CBM/CFM). Os ensaios de degradação da micotoxinas foram realizados em diferentes tempos de incubação (12-48 h) a 37° C, utilizando-se cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) para determinação das concentrações das micotoxinas. O maracujá não demonstrou atividade antimicrobiana tanto para *S. aureus* quanto para *A. parasiticus*. Dos quatro extratos estudados, o araquá demonstrou o maior efeito antibacteriano, cujos valores de CIM para extratos bruto e liofilizado foram 0.39 mg/mL e 0.45 mg/mL, respectivamente. Os menores valores de CIM para *A. parasiticus* foram obtidos com o orégano liofilizado (8.33 mg/mL) e o araquá bruto (3.215 mg/mL). Contudo, não foi possível identificar valores de CFM para o fungo analisado. Não houve efeito de degradação de OTA e ZEA por nenhum dos extratos avaliados. Todos os extratos reduziram a concentração de AFB₁ após 48 h de incubação. A maior porcentagem (60.3%) de redução de AFB₁ foi obtida com o extrato de alecrim após 48 h de incubação. A atividade antimicrobiana demonstrada pelos extratos das plantas avaliadas indica um potencial para sua aplicação no combate a bactérias patogênicas e fungos toxigênicos. Este é o primeiro estudo realizado com extratos dessas quatro espécies de plantas que evidenciou a capacidade de redução *in vitro* de AFB₁.

Palavras-chave: Extratos de plantas. Bactérias patogênicas. Fungos toxigênicos. Detoxificação. AFB₁. OTA. ZEA.

ABSTRACT

PONZILACQUA SILVA, B. **Evaluation of plant extracts on antimicrobial activity and detoxification of mycotoxins.** 2018. 80f. Dissertation (M. Sc.) - School of Animal Science and Food Engineering, University of São Paulo, Pirassununga.

Human exposure to pathogenic microorganisms and their toxins in food is a serious public health problem. The indiscriminate use of conventional antimicrobials increases the resistance of microorganisms to the main molecules available in the market. In addition, limitations on the use of chemical substances in food raw materials have stimulated researches for the development of eco-friendly methodologies to avoid the multiplication of fungi and/or eliminate their toxins. *Staphylococcus aureus* is one of the major pathogenic bacteria with high rates of antimicrobial resistance, and for this reason it has been the subject of research studies aiming to identify new bioactive compounds to combat infections. *Aspergillus parasiticus* is one of the main aflatoxin-producing fungi, which are carcinogenic substances that contaminate many types of cereals before and after processing. Recent studies have demonstrated that plant extracts have antimicrobial and antifungal activity, as well as potential for degradation of mycotoxins. In this context, the objective of the present study was to evaluate the *in vitro* antimicrobial effects of crude and lyophilized extracts of leaves from sweet passion fruit, araçá, rosemary and oregano on planktonic cells of *S. aureus* and *A. parasiticus*. The *in vitro* degradation of aflatoxin B₁ (AFB₁), ochratoxin A (OTA) and zearalenone (ZEN) by the crude extracts was also investigated. The antimicrobial and antifungal effects were evaluated by determining the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal / fungicidal concentration (MBC / MFC). Mycotoxin detoxification assays were conducted at different incubation times (12-48h) at 37 °C. The concentrations of mycotoxins were determined by high performance liquid chromatography (HPLC). Sweet passion fruit had no antimicrobial activity on *S. aureus* or *A. parasiticus*. Out of the four extracts evaluated, araçá showed the highest antimicrobial effect with MIC of 0.39 mg/mL and 0.45 mg/mL for crude and lyophilized extracts, respectively. The lowest MIC values for *A. parasiticus* were obtained with lyophilized oregano (8.33 mg/mL) and crude araçá (3.215 mg/mL). However, no MFC values were obtained for the analyzed fungi. Although OTA e ZEN were not degraded by any extract evaluated, all extracts reduced the concentration of AFB₁ after 48 h of incubation. The highest percentage of AFB₁ reduction (60.3%) was obtained with rosemary extract after 48h of incubation. The antimicrobial activity demonstrated by extracts of the evaluated plants indicates a potential for application against pathogenic bacteria and toxigenic fungi. This is the first study carried out with extracts of these four plants species that demonstrated the *in vitro* ability for AFB₁ reduction.

Keywords: Plant extracts. Pathogenic bacteria. Toxigenic fungi. Detoxification. AFB₁. OTA. ZEN.

LISTA DE FIGURAS

Revisão de Literatura

Figura 1- Estruturas moleculares das aflatoxinas B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂	19
Figura 2- Estrutura molecular da aflatoxina M ₁	21
Figura 3- Estrutura molecular da ocratoxina A.....	21
Figura 4- Estrutura molecular da zearalenona.....	22

Capítulo I

Figura 1- Cromatograma obtido na análise de maracujá doce (<i>Passiflora alata</i>) por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas	46
Figura 2- Cromatograma obtido na análise de araçá (<i>Psidium cattleianum</i>) por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas	46
Figura 3– Cromatograma obtido na análise de alecrim (<i>Rosmarinus officinalis</i>) por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas	47
Figura 4– Cromatograma obtido na análise de orégano (<i>Origanum vulgare</i>) por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas	47

LISTA DE TABELAS

Revisão de Literatura

Tabela 1 - Extratos aquosos de plantas medicinais com ação de degradação em aflatoxinas..29

Capítulo I

Tabela 1 - Valores médios de concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) de extratos de plantas contra *Staphylococcus aureus*.....48

Tabela 2 - Valores médios de concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos de plantas contra *Aspergillus parasiticus*.49

Capítulo II

Tabela 1 - Especificações para cada uma das micotoxinas estudadas.....64

Tabela 2 - Compostos químicos encontrados nos extratos de folhas das plantas após a análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas.66

Tabela 3 - Concentrações de aflatoxina B₁ (ng/mL) em extratos aquosos de plantas no ensaio de descontaminação de acordo com o período de incubação67

Tabela 4 - Porcentagem de redução de aflatoxina B₁ (AFB₁) em extratos aquosos das plantas provenientes de folhas no ensaio de descontaminação em diferentes tempos de incubação ...68

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
2	OBJETIVOS	15
2.1	OBJETIVO GERAL	15
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
3	REVISÃO DE LITERATURA	16
3.1	ASPECTOS DA RESISTÊNCIA BACTERIANA E A RELAÇÃO COM A PRODUÇÃO DE ALIMENTOS	16
3.2	CARACTERÍSTICAS GERAIS DAS MICOTOXINAS	18
3.3	AFLATOXINAS E FUNGOS PRODUTORES	19
3.4	OCRATOXINA E ZEARALENONA	21
3.5	MÉTODOS DE ANÁLISE DE AFLATOXINAS	22
3.6	EFEITO ANTIBACTERIANO DE EXTRATOS DE PLANTAS.....	23
3.7	EFEITO ANTI-FÚNGICO DE EXTRATOS DE PLANTAS E AÇÃO DETOXIFICANTE SOBRE A AFB ₁	26
	REFERÊNCIAS	31
4	CAPÍTULO I.....	40
4.1.	INTRODUÇÃO	41
4.2.	MATERIAL E MÉTODOS	42
4.3.	RESULTADOS	45
4.4.	DISCUSSÃO	49
4.5.	CONCLUSÃO	54
4.6.	REFERÊNCIAS.....	55
5	CAPÍTULO II	60
5.1.	INTRODUÇÃO	61
5.2.	MATERIAL E MÉTODOS	62
5.3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
5.4.	CONCLUSÃO	71
5.5.	REFERÊNCIAS.....	71
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	75
	ANEXOS	76

1 INTRODUÇÃO

A exposição a patógenos infecciosos é uma grande ameaça à saúde humana e animal, sendo responsável por altas taxas de morbidade e mortalidade. Bactérias, fungos e vírus são os principais agentes causadores de toxi-infecções, além de serem frequentemente veiculados por alimentos contaminados. Os problemas decorrentes da contaminação de alimentos podem estar ligados à própria proliferação do microrganismo, ou através de toxinas produzidas pelos mesmos. Com o passar dos anos, os mecanismos de sobrevivência desses microrganismos se desenvolveram tornando seu combate uma tarefa complicada para a indústria alimentícia (GUARDABASSI; KRUSE, 2010; MARINS; TANCREDI; GEMAL, 2014). Não são poucos os problemas causados pelas falhas no combate aos microrganismos patogênicos: resistência às principais moléculas antimicrobianas, seleção de cepas multirresistentes, resíduos de agentes químicos em alimentos, contaminação de alimentos, surtos de infecções e intoxicações alimentares, entre outros. Estas questões podem envolver a produção animal e de alimentos em toda sua cadeia. Diante deste cenário, a Organização Mundial da Saúde Animal tem estabelecido diretrizes para a análise dos riscos à saúde humana e animal devido a microrganismos resistentes de origem animal que podem contaminar consumidores (OIE, 2018). A falta de qualidade e sanidade de alimentos que chegam à mesa do consumidor como potenciais causadores de perigos, é um ponto chave para pesquisas que visam contribuir na tentativa de encontrar soluções para esses problemas.

A introdução de agentes antimicrobianos se iniciou em meados dos anos 1930, e logo após esse período foi observado que a excessiva utilização desses compostos ocasionava rapidamente a seleção de bactérias resistentes (GUARDABASSI; JENSEN; KRUSE, 2010). Os fungos também podem passar por esse processo de seleção, mas o problema principal são as moléculas sintéticas que são tóxicas para células eucarióticas devido à similaridade estrutural, além das toxinas que os mesmos podem pré-formar em substratos que depois serão utilizados para alimentação humana e animal. Alguns microrganismos se destacam quando se trata do excesso de utilização de agentes antimicrobianos. O *Staphylococcus aureus* é uma das causas mais comuns de bacteremia e de outras infecções graves que levam ao risco de vida seres humanos (COSGROVE et al., 2003). Segundo os mesmos autores, as maiores taxas de mortalidade atribuídas a essa espécie bacteriana estão relacionadas às cepas resistentes à meticilina (MRSA). No passado, infecções causadas por essas bactérias estavam limitadas a hospitais e ambientes de assistência à saúde. No entanto, durante os últimos vinte anos, cepas MRSA têm sido relatadas como causadoras de infecções na comunidade como um todo em

diversas partes do mundo, inclusive com transmissão entre pessoas e animais (DAVID; DAUM, 2010). Um exemplo disso foi o primeiro relato de um clone de MRSA relacionado à contaminação de uma família de criadores de suínos na Holanda (VOSS et al., 2005). O recente surgimento em animais, incluindo os destinados à alimentação, enfatiza a importância de se limitar o uso de certos medicamentos e a tentativa de encontrar novas alternativas.

Os problemas associados aos fungos referem-se às cepas toxigênicas capazes de produzir metabólitos secundários e estáveis, denominados micotoxinas, que contaminam matérias primas alimentares e rações (BOK; KELLER, 2004; DINIZ, 2002). Espécies de fungos filamentosos dos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Claviceps* e *Alternaria* estão entre as mais conhecidas como produtores de micotoxinas importantes em saúde pública (MARIN et al., 2013). A proliferação fúngica e a produção de micotoxinas estão relacionadas principalmente a fatores de temperatura e umidade do ar, além da capacidade da cepa de produzir tais toxinas. Por isso, torna-se muito difícil o controle e combate nas primeiras etapas de produção, nas quais muitas vezes a matéria prima precisa permanecer armazenada. Produtos que permanecem armazenados por grande período de tempo são mais susceptíveis a contaminações por micotoxinas. Dessa maneira, uma das possibilidades de controle do problema é o desenvolvimento de tecnologias para a remoção ou destruição dessas toxinas nos produtos. Ressalte-se que a ausência de fungos nos alimentos não implica, necessariamente, na ausência de micotoxinas (PEREIRA; CARVALHO; PRADO, 2002), já que muitas vezes o processamento e a higienização podem eliminar o fungo, mas a toxina permanece por ser estável. No entanto, de acordo com a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura - FAO (2004) elevadas contagens fúngicas podem ser indicativos de presença de micotoxinas.

As aflatoxinas (AF) e a ocratoxina A (OTA) são micotoxinas de grande importância porque são encontradas frequentemente em alimentos, além de causar sérios problemas de saúde quando ingeridas por animais e humanos através da dieta. A zearalenona (ZEA) é outra micotoxina de relevância para a produção de animais e também para seres humanos, tendo em vista que esta toxina mimetiza o estrógeno no organismo dos animais causando danos reprodutivos (Council for Agricultural Science and Technology - CAST, 2003). A micotoxina com maior toxicidade dentre elas é a AFB₁, produzida por algumas espécies de fungos conhecidas como *Aspergillus*. A Agência Internacional de Pesquisa em Câncer concluiu que existem evidências de carcinogenicidade da AFB₁ em humanos, e por isso, tal molécula foi classificada no Grupo 1, ou seja, de substâncias carcinogênicas para humanos (IARC, 2002). Deste modo, observa-se que o combate aos fungos presentes na matéria prima para produção

de alimentos e rações é uma das atividades mais importantes para evitar a presença de micotoxinas, na qual estratégias de prevenção e tratamento se fazem necessárias. Muitas vezes o fungo pode ter sido eliminado do material, mas a toxina já foi pré-formada, por isso métodos que sejam capazes de retirar as micotoxinas do substrato também são interessantes.

Com base nesses aspectos, faz-se necessário o desenvolvimento de novas tecnologias visando à descontaminação de micotoxinas e controle de microrganismos, tanto para substituição dos novos compostos terapêuticos quanto para o controle da contaminação de alimentos. Compostos que sejam biodegradáveis, biologicamente seguros, renováveis e de baixo custo, constituem o alvo dessas tecnologias, e já se sabe que óleos essenciais e extratos de plantas possuem tais características, podendo ser uma alternativa (VARMA; DUBEY, 1999). Existem diversos tipos de compostos secundários produzidos por plantas com possível ação antimicrobiana, concentrados em três grandes grupos: terpenos, fenóis e compostos de nitrogênio (AGOSTINI-COSTA et al., 2012). O sinergismo entre essas moléculas potencializa o efeito das plantas no combate a determinadas infecções (ARAUJO; LONGO, 2016). As principais plantas estudadas são aquelas relacionadas à culinária, tais como os condimentos, porque já se sabe tanto empiricamente quanto cientificamente que são eficientes no combate a microrganismos (KHORSHIDIAN et al., 2018; VILELA et al., 2016). Diante desse potencial antimicrobiano, estudos também apontam que determinadas plantas medicinais podem demonstrar efeito de detoxificação com relação às micotoxinas (BRINDA et al., 2013; IRAM et al., 2016; SANDOSSKUMAR et al., 2007; VELAZHAHAN et al., 2010; WU et al., 2009).

Com o intuito de contribuir para tais pesquisas visando à prospecção de plantas com potencial ação antimicrobiana e também detoxificante de micotoxinas, este trabalho teve por objetivo investigar inicialmente quatro tipos de plantas popularmente conhecidas no Brasil. O estudo analisou os compostos bioativos presentes em maior quantidade nos extratos estudados e a atividade *in vitro* que esses extratos têm no combate ao *S. aureus* e ao *A. parasiticus*, além de avaliar a ação dos mesmos para detoxificação de AFB₁, OTA e ZEA. Trata-se, portanto, de um estudo de triagem inicial *in vitro* para futuras investigações acerca do efeito potencial dessas plantas em produtos alimentícios e estudos *in vivo*.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos antibacterianos e antifúngicos de extratos de plantas sobre células planctônicas de *S. aureus* e *A. parasiticus*, respectivamente, e verificar a capacidade de detoxificação dos referidos extratos sobre a AFB₁, OTA e ZEA.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Produzir extratos aquosos das folhas de maracujá doce (*Passiflora alata*, Curtis), araçá (*Psidium cattleianum*, Sabine), alecrim (*Rosmarinus officinalis*, L.) e orégano (*Origanum vulgare*, L.), e determinar os componentes majoritários desses extratos.
- b) Avaliar o efeito antibacteriano *in vitro* dos extratos contra uma das principais bactérias causadoras de infecções em humanos e animais (*S. aureus*);
- c) Avaliar o efeito antifúngico *in vitro* dos extratos contra um dos principais fungos produtores de aflatoxinas em alimentos (*A. parasiticus*);
- d) Avaliar o efeito *in vitro* dos extratos para detoxificação de AFB₁, OTA e ZEA.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 ASPECTOS DA RESISTÊNCIA BACTERIANA E SUA RELAÇÃO COM A PRODUÇÃO DE ALIMENTOS

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), a resistência a antimicrobianos é uma das maiores ameaças à saúde humana global (WHO, 2016). O uso indiscriminado de antibióticos é uma realidade e um grande problema para a saúde pública, uma vez que essa prática acaba por selecionar diversas bactérias resistentes aos princípios ativos mais comuns dos medicamentos, dificultando o seu combate. Em se tratando de produção animal, o problema é ainda mais sério porque os antibióticos, além de serem utilizados para tratamento de enfermidades, também são usados como promotores de crescimento em muitas vertentes de produção (GONZALES; MELLO; CAFÉ, 2012). A utilização de antibióticos deve ser contrabalanceada com o fato de que bactérias podem se replicar rapidamente, sofrer mutações e serem capazes de trocar material genético entre indivíduos e espécies. A pressão seletiva para genes que sejam resistentes aos princípios ativos empregados nos tratamentos é a principal razão para a resistência se espalhar na comunidade bacteriana (FERNANDES, 2006). Acredita-se que antimicrobianos usados em animais de companhia e na produção de alimentos possam levar à resistência antimicrobiana em humanos e outros animais (DAVIS et al., 2018).

Essas moléculas selecionam bactérias resistentes independentemente de seus reservatórios. Muitas bactérias que causam infecções em humanos tem como seu reservatório animais, podendo ser transmitidas através de alimentos contaminados (transmissão de origem alimentar), exposição a animais (transmissão direta) ou ambientes contaminados (transmissão ambiental) (JENSEN et al., 2010). É fato que o uso de antimicrobianos não é o responsável pela origem da resistência antimicrobiana, uma vez que a variabilidade genética das populações possibilita isso. No entanto, ele tem contribuído para esse efeito. A utilização de antimicrobianos em Medicina Veterinária contribui para a propagação de bactérias resistentes. Um típico exemplo foi a introdução de fluoroquinolonas em animais de produção. Em seguida foram isoladas bactérias resistentes a esse princípio ativo de alimentos de origem animal, e posteriormente, em infecções humanas (GUARDABASSI; JENSEN; KRUSE, 2010).

O primeiro relato de caso em que bactérias multirresistentes mutantes foram capazes de colonizar suínos e humanos ocorreu na Holanda. O clone do clássico

Staphylococcus aureus meticilina resistente (MRSA), ST398, surgido em suínos foi isolado de pacientes que pertenciam a uma família de criadores de suínos (VOSS et al., 2005). O MRSA pode ser hoje considerado como uma zoonose pela capacidade de ser transmitido entre espécies e por ser um agente infeccioso difícil de ser tratado. A transmissão de MRSA entre pessoas e suínos está sendo reportada em vários países como Dinamarca (GUARDABASSI; STEGGER; SKOV, 2007), França (ARMAND-LEFEVRE; RUIMY; ANDREMONT, 2005), Alemanha (WITTE et al., 2007). Isso enfatiza a importância de se limitar o uso de medicamentos. Diante desses achados e outras problemáticas com outros tipos de bactérias as organizações internacionais como a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO), Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) e Organização Mundial da Saúde (OMS) recomendam que os países desenvolvam sistemas de monitoramento para controlar o uso e consumo de antimicrobianos (FAO, 2016; OIE, 2016; WHO, 2015).

O *S. aureus* é uma das espécies bacterianas mais comuns e virulentas que pode infectar tanto pessoas quanto animais, a resistência bacteriana encontrada nessa espécie é um problema de saúde pública mundial. Há pouco tempo atrás infecções causadas por MRSA eram tratáveis facilmente com glicopeptídeos, sobretudo à vancomicina com administração venosa. No entanto vários relatos apontam a ocorrência de isolados dessa espécie bacteriana resistentes à vancomicina (TENOVER; MCDONALD, 2005). Esses casos eram geralmente restritos a hospitais e ambientes associados à assistência em saúde, mas este cenário vem mudando. Acerca de vinte anos atrás cepas atualmente conhecidas como CA-MRSA (associadas a comunidade) veem sendo relatadas em infecções relacionadas a comunidades e não restritas apenas a hospitais e ambientes hospitalares (DAVID; DAUM, 2010). Essas cepas são mais fortes e capazes de acometer indivíduos saudáveis.

Além disso, algumas cepas de *S. aureus* podem produzir toxinas extracelulares e fatores de virulência (MATSUNAGA et al., 1993), cuja presença em alimentos pré-formados representa perigo para a sanidade do mesmo. A presença de termonuclease (TNase) no leite revela o desenvolvimento abundante de *S. aureus*, suficiente para produzir enterotoxinas em quantidade significativa e promover intoxicação alimentar. Sá et al (2004) encontraram 98,86% de cepas da espécie capazes de produzir TNase. Essas toxinas geralmente são termoestáveis, dessa forma podem ser encontradas em leite e derivados após o processo de pasteurização e chegar até o consumidor podendo causar DTA's (Doenças Transmissíveis por Alimentos). Além disso, a resistência antimicrobiana conhecida já há algum tempo pela espécie também tem caráter importante quando se fala de enfermidade que acometem animais, sendo um reservatório para a infecção e transmissão de doenças para humanos.

3.2 CARACTERÍSTICAS GERAIS DAS MICOTOXINAS

A proliferação fúngica e a produção de micotoxinas estão relacionadas a uma série de fatores referentes ao ambiente, como a temperatura e a umidade relativa do ar, e ao substrato incluindo danos mecânicos, umidade, tempo de armazenamento e suscetibilidade à colonização do fungo (FINK-GREMMELS, 2008). As micotoxinas podem prejudicar a saúde animal, humana e causar perdas econômicas na agropecuária. Uma única espécie de fungo pode produzir diversos tipos de micotoxinas, assim como diversos fungos podem produzir dois ou mais tipos de micotoxinas (MAZIERO; BERSOT, 2010). Algumas características atribuídas as micotoxinas são essenciais para entender a dificuldade no combate a essas moléculas, elas são: de baixo peso molecular, não-imunogênicas, termoestáveis, atuam em baixas concentrações e tem amplo espectro de toxicidade (BOK; KELLER, 2004; DINIZ, 2002).

A presença de fungos em rações e alimentos não implica necessariamente na presença de micotoxinas (PEREIRA; CARVALHO; PRADO, 2002), essas moléculas necessitam de condições específicas para sua produção. É importante ressaltar que, após a eliminação do fungo, a micotoxina pode permanecer no alimento sem levantar nenhuma suspeita de contaminação. No entanto elevadas contagens fúngicas podem ser consideradas forte indicativas de presença de micotoxinas nos alimentos. Desde sua descoberta na década de 60, as micotoxinas são constantemente reportadas em diferentes partes do mundo (ISMAIL et al., 2018). Essa ampla distribuição consiste em um sério problema de saúde pública devido a exposição crônica da população a essas moléculas. Mais de 400 micotoxinas são conhecidas mundialmente, no entanto as mais importantes quando se trata de saúde pública são as aflatoxinas, ocratoxinas, tricotecenos, zearalenona e fumonisinas, devido à ocorrência em alimentos e o potencial toxigênico demonstrado em estudos (CHAYTOR et al., 2011). Os principais gêneros de fungos produtores dessas micotoxinas são os *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* e *Claviceps* and *Alternaria*. (MARIN et al., 2013).

De acordo com dados da Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO) aproximadamente 25% de todos os cereais produzidos no mundo estão contaminados com micotoxinas (RICE; ROSS, 1994). O risco de produção de micotoxinas é aumentado através de práticas agrícolas e de colheita inadequadas, condições inadequadas de secagem, manuseio, embalagem, armazenamento e transporte promovem o crescimento de fungos (MARIN et al., 2013). De acordo com Viegas, Viegas e Oppliger (2018), com exceção

das aflatoxinas, as outras micotoxinas não possuem regulamentação por isso deve-se dar uma atenção especial a lacuna de conhecimento ainda existente nesse campo. Além disso, tais toxinas têm se mostrado frequentes em produtos agrícolas exigindo assim uma avaliação de risco toxicológico das mesmas sobre a saúde humana e animal.

3.3 AFLATOXINAS E FUNGOS PRODUTORES

Aflatoxinas são produzidas por fungos do gênero *Aspergillus*, os quais se desenvolvem em diversos produtos como nozes, arroz, frutas desidratadas, cacau, café, uvas, milho e pequenos grãos (TANIWAKI; PITT; MAGAN, 2018); ingredientes utilizados na alimentação humana além de fazerem da produção de rações animais. As principais espécies produtoras de aflatoxinas são o *A. flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius* (SET; ERKMEN, 2010). A ocorrência desse gênero de fungos tem uma distribuição mundial com predomínio em climas tropicais e subtropicais, devido às temperaturas e umidade para o seu desenvolvimento. Os principais tipos de aflatoxinas de interesse médico-sanitário são a B₁, B₂, G₁ e G₂ mostrados na Figura 1. O *A. parasiticus* produz as aflatoxinas B e G e está mais adaptado a ambientes com solos pobres em nutrientes (European Food Safety Authority - EFSA, 2007). A AFB₁ é conhecida pelo alto grau de toxicidade, quando comparada às outras.

Figura 1- Estruturas moleculares das aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂

Paulo (OLIVEIRA et al., 2008; SABINO et al., 1988). As principais fontes de contaminação para os seres humanos são produtos vegetais e de origem animal, tais como leite, queijo, carnes e outros (SMITH et al., 1995). A suscetibilidade específica do homem às diferentes micotoxinas ainda não é amplamente conhecida e vem sendo estudada de forma analítica e epidemiológica. O efeito de toxicidade crônica mais importante das aflatoxinas é a carcinogênese hepática. Esse efeito tem sido demonstrado sobretudo em relação a AFB₁ (IARC, 2002).

A AFB₁ tem sido identificada na etiologia de câncer hepático em humanos em consequência da ingestão de alimentos contaminados (BOSCH; PEERS, 1991). Após a ingestão e absorção das aflatoxinas no trato gastrointestinal, o fígado na tentativa de reduzir a toxicidade do composto acaba metabolizando a molécula em diversas substâncias. O principal metabólito formado é o AFB₁-8,9-epóxido que resulta de uma reação de oxidação na molécula inicial. Esse metabólito possui afinidade por proteínas e pela molécula de DNA, possibilitando a ocorrência de toxicidade aguda ou mutagenicidade / carcinogenicidade (CHAYTOR et al., 2011; CORCUERA et al., 2012).

A biotransformação hepática da AFB₁ também pode levar a formação do composto denominado AFM₁, através de uma reação de hidroxilação (Figura 2). Esse metabólito é excretado no leite, tecidos e fluídos biológicos. Vacas lactantes que tenham sido contaminadas através da ração com AFB₁, biotransformam a molécula em AFM₁ e passam a serem fontes de contaminação do leite e seus derivados. Segundo a Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC, 2002) essa toxina excretada no leite tem carcinogenicidade quase tão elevada quanto a AFB₁. A AFM₁ é resistente a tratamentos térmicos como a pasteurização e a esterilização, portanto uma vez presente no leite ela não pode ser eliminada sem prejuízo a matéria prima. Dessa forma é um problema de saúde pública a ser considerado já que o leite e seus derivados são essenciais na nutrição humana, especialmente para crianças. Além de serem mais sensíveis a essa substância, as crianças possuem uma dieta menos diversificada e mais focada no consumo do leite, tornando o potencial de intoxicação ainda maior.

Figura 2- Estrutura molecular da aflatoxina M1

Fonte: Autoria Própria.

3.4 OCRATOXINA E ZEARALENONA

As ocratoxinas são produzidas por cepas de *Aspergillus* e *Penicillium* presentes em substratos relacionadas a alimentação humana. A OTA é a mais frequente e mais tóxica molécula dentro este grupo (Figura 3). Pode ser encontrada em diversas “commodities” dentre elas café, soja, uva e leite (RICHARD, 2007). Estruturalmente a molécula é semelhante ao aminoácido fenilalanina (Phe), por isso possui efeito inibitório sobre algumas enzimas, em particular Phe-tRNA sintetase, resultando na inibição da síntese de proteínas (MARIN et al., 2013). Além disso, ela é descrita como nefrotóxica e em elevadas quantidade também pode afetar o fígado (CAST, 2003). Essa toxina vem sendo relacionada com nefropatias espontâneas em aves e suínos (CORCUERA et al., 2012). Por isso, a Agência Internacional de Pesquisa em Câncer classificou a OTA como composto possivelmente carcinogênico (IARC, 1993).

Figure 3- Estrutura molecular da ocratoxina A

Fonte: Autoria Própria.

A ZEA (Figura 4) é outra toxina de relevância para a produção animal. Essa toxina é produzida por diversas espécies do gênero *Fusarium*. Estruturas presentes nesta molécula

conferem a ela uma sinalização estrogênica para o organismo (CAST, 2003). Dessa maneira, a ZEN pode induzir alterações hormonais provocando infertilidade, edema vulvar, prolapso vaginal, hipertrofia mamária em fêmeas, feminização em machos, atrofia testicular (PERAICA, M., RADÍĆ, B., PAVLOVIC, 2000). Além do efeito estrogênico conhecido, outros efeitos hematotóxicos, genotóxicos e a modulação da resposta imune também são relatados (HUEZA et al., 2014; ZINEDINE et al., 2007).

Figure 4- Estrutura molecular da zearalenona

Fonte: Autoria própria.

3.5 MÉTODOS DE ANÁLISE DE AFLATOXINAS

A evolução da química analítica tem proporcionado a popularização de novas técnicas e a adequação de outras já existentes para a análise de micotoxinas e principalmente aflatoxinas. As técnicas cromatográficas são amplamente utilizadas para a análise de micotoxinas em alimentos em laboratórios, devido à elevada precisão, exatidão e reprodutibilidade. Entretanto, considerando o alto custo das técnicas cromatográficas, métodos imunoenzimáticos, os quais se baseiam na interação antígeno (micotoxina de interesse) e anticorpo, têm sido amplamente utilizados para análise de micotoxinas, principalmente em condições de campo ou para triagens (PEREIRA; TOLEDO, 1995). Essas interações são altamente específicas, no entanto quando existem micotoxinas análogas há a possibilidade de reações cruzadas (SOUZA; VARGAS; JUNQUEIRA, 1999).

A técnica mais comum de imunoensaio é o ELISA (“enzyme-linked immunosorbent assay”), que pode ser qualitativa (através da simples comparação visual de cores) ou quantitativa (mediante a leitura em espectrofotômetro). A cromatografia de camada delgada (CCD) foi a primeira técnica empregada para análise de aflatoxinas, mas atualmente ainda é muito utilizada para análises micotoxicológicas, sobretudo pelo seu baixo custo. Essa técnica

possibilita a separação e análises qualitativas e semi-quantitativas por comparação visual ou densitometria. Os maiores problemas da CCD incluem a possibilidade de obtenção de falsos positivos e superestimação da concentração, por isso atualmente esta técnica é mais utilizada em análises de triagem (“screening”), para posterior confirmação com utilização principalmente de cromatografia líquida-espectrometria de massas (LC-MS) (SULYOK et al., 2006).

A técnica mais empregada em análises de micotoxinas é a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). A sua adaptabilidade para determinações quantitativas com boa sensibilidade é um fator importante, além da possibilidade de separar espécies não voláteis e termicamente instáveis (TONHI et al., 2002). Com relação aos detectores, não existe um ideal para o HPLC, pois não são versáteis e nem universais, no entanto apresentam ampla faixa de aplicações. A sensibilidade de um detector é determinada a partir da relação entre o sinal produzido e a quantidade de amostra que esse sinal irá gerar (PERES, 2002). Para micotoxinas, considerando suas propriedades fluorescentes sob luz ultra-violeta, utilizam-se detectores de fluorescência.

Métodos envolvendo o uso de LC-MS, que dispensem o uso de derivatização, são os mais utilizados desde a década de 90 por serem mais rápidos e práticos (CAPPIELLO; FAMIGLINI; TIRILLINI, 1995). Quando acoplados com a espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS) tem o potencial ainda maior para isolar e identificar fragmentos formados a partir da quebra de íons de forma inequívoca, além de baixos limites de detecção (AL-TAHER et al., 2017; DE GIROLAMO et al., 2017).

3.6 EFEITO ANTIBACTERIANO DE EXTRATOS DE PLANTAS

Antes dos anos de 1960 quase que 80% de todos os antibióticos, drogas e pesticidas tiveram origem através de estudos de produtos naturais como raízes, cascas e folhas, sendo a maioria eficaz principalmente para o tratamento de bactérias Gram-positivas (GUIMARÃES; DA SILVA MOMESSO; PUPO, 2010; NEWMAN; CRAGG, 2016). Durante essa época, apenas três derivados sintéticos produzidos totalmente em laboratório foram introduzidos no mercado, o trimetropim, o metronidazol e a isoniazida (FERNANDES, 2006). A utilização empírica de plantas no combate a doenças é uma prática comum e conhecida há séculos. No entanto, com o crescimento acelerado da população, a quantidade de produtos necessários para o controle de infecções passou a ser muito grande. Dessa forma a exigência da síntese em

larga escala de produtos poderia ser suprida apenas por laboratórios de produção de moléculas sintéticas (LELARIO et al., 2018). Os produtos naturais perderam importância na pesquisa dando lugar a produção de compostos sintéticos. Com o passar do tempo, alguns problemas surgiram em um período muito curto, tais como alterações do balanço orgânico, poluição de vários ecossistemas, indução de resistência microbiana e mudanças genéticas em seres vivos.

Os compostos ativos presentes em plantas são metabólitos orgânicos sintetizados com grande variabilidade de moléculas (LEÃO, 2007). Os metabólitos primários são aquelas moléculas produzidas pela planta para seu crescimento e desenvolvimento. Os metabólitos secundários são compostos produzidos que desempenham importante papel na sobrevivência da planta no meio ambiente em que se encontra (AGOSTINI-COSTA et al., 2012). Alguns exemplos dessas substâncias são os alcaloides, flavonoides e saponinas geralmente associados a propriedades antimicrobianas, anti-inflamatórias e calmantes (MACHADO, 2009). Com o avanço de novas técnicas, um grande número de ingredientes ativos de plantas medicinais foram isolados e introduzidos em valiosas drogas medicinais (KUMARI et al., 2011).

Os estudos com óleos essenciais e extratos de plantas veem sendo desenvolvidos contra várias espécies microbianas distintas, devido à conscientização científica acerca do uso de substâncias naturais ao invés das sintéticas (LELARIO et al., 2018). Segundo alguns autores, as plantas produzem diversas pequenas moléculas com ação antibiótica fraca quando comparadas isoladamente aos antibióticos comuns produzidos por bactérias e fungos (ARAÚJO; LONGO, 2016). No entanto, os mesmos autores afirmam que as plantas são eficientes no combate a infecções por adotarem o sinergismo entre essas moléculas. Magalhães (2010) afirma que o efeito sinérgico dos compostos bioativos dos extratos são mais eficientes quando comparados aos efeitos de seus constituintes separadamente. Muitas das plantas pesquisadas, e que vem demonstrando efeitos contra microrganismos, são conhecidas como especiarias, frutas ou ervas popularmente utilizadas para diversos fins terapêuticos.

O orégano é uma planta perene pertencente à família das Lamiaceae. Essa planta é conhecida pelo seu potencial medicinal, suas folhas e flores são muito utilizadas pela homeopatia (OYARZABAL, 2011). Akrayi, Salih e Hamad (2015) demonstraram elevada ação antimicrobiana de extratos aquosos de *Origanum vulgare* (orégano) contra bactérias patogênicas, dentre elas a *Escherichia coli*. A literatura indica que o óleo essencial do orégano possui em torno de 34 compostos ativos com composição variável, os principais são o carvacrol e o timol que podem fazer parte de 80,2% e 98% da composição total, respectivamente (SOKOVIĆ et al., 2010). Estudos *in vivo* foram realizados por Oyarzabal

(2011) com o intuito de testar a utilização do óleo essencial dessa planta na aplicação intramamária para o tratamento de mastite bovina. A formulação fitoterápica com 3% de óleo testado não foi eficiente no tratamento da mastite subclínica. No entanto a autora salienta que como os efeitos *in vitro* dessa planta já foram comprovados é necessário a realização de outros trabalhos com diferentes amostras de orégãos e diferentes formulações realmente garantir se há eficiência ou não no tratamento com a planta.

Outra planta pertencente à família das Lamiaceae e utilizada popularmente como especiaria é o alecrim que possui o nome científico de *Rosmarinus officinalis*. Trata-se de um arbusto perene de cheiro agradável e que cresce em quase todo o mundo (LIU et al., 2017). O alecrim é utilizado em produtos farmacêuticos e na medicina tradicional, pois possui atividade antioxidante e antimicrobiana (AZIZKHANI; TOORYAN, 2015). Santoyo et al. (2005) identificaram 33 compostos diferentes presentes no óleo essencial do alecrim, os principais que constituem cerca de 80% do total do óleo são: α -pineno, 1,8-cineol, cânfora, verbenona e borneol. Segundo os mesmos autores a atividade antimicrobiana do alecrim foi eficiente contra uma série de bactérias patogênicas comumente encontradas em alimentos contaminados, dentre elas o *S. aureus*. Muhaisen et al. (2016) estudaram diversos extratos aquosos e metanólicos de plantas encontrando uma ótima atividade de *R. officinalis* contra *S. aureus*. É importante ressaltar que os estudos demonstram atividade antimicrobiana de óleos essenciais e também de extratos, tornando o uso desse condimento de fácil acesso e com um grande potencial para alimentos.

A *Passiflora alata*, também conhecida como maracujá doce, é uma planta nativa brasileira usada para uma série de preparações farmacológicas registradas pela agência regulatória ANVISA “Agência Nacional de Vigilância Sanitária” (NORIEGA et al., 2011). A ação da planta era empiricamente vinculada a efeitos calmantes e anti-inflamatórios pela medicina tradicional, no entanto já foram comprovados tais efeitos através de algumas pesquisas (VARGAS et al., 2007). Outras espécies do mesmo gênero já foram mais estudadas em relação ao efeito antimicrobiano como, por exemplo, a *Passiflora edulis* (maracujá azedo). Singh e Das (2013) testaram extrato de *P. edulis* (polpa) contra a principal bactéria causadora de cáries dentária, pertencente ao gênero *Streptococcus*, e obtiveram resultados significantes de inibição. Segundo Pereira e Vilegas (2000) dentre as três espécies de passiflora (*P. edulis*, *P. alata* e *P. incarnata*) encontradas na literatura, a espécie oficial brasileira *P. alata* é a menos estudada. No entanto poucos estudos realizados com tal espécie demonstraram certa ação antimicrobiana frente à *S. aureus* e outras cepas bacterianas, indicando assim um potencial para a utilização da mesma e a necessidade de novos estudos (VASIĆ et al., 2012).

O Brasil possui um dos biomas vegetais mais ricos do planeta devido ao clima do país que vai do tropical ao subtropical. A *Psidium cattleianum* (araçá) também conhecida como a goiaba selvagem ou goiaba brasileira é uma planta nativa brasileira popularmente utilizada para o tratamento de diarreias, hemorragias e câimbras (DENARDIN et al., 2015). Essa espécie vem sendo estudada atualmente devido a evidências de ação antimicrobiana e também antioxidante (DENARDIN et al., 2015; MEDINA et al., 2011; SCUR et al., 2016). Exemplares de frutos coletados em Pelotas no Rio Grande do sul evidenciaram atividade antioxidante e antimicrobiana frente à cepa de *Staphylococcus enteritidis*, revelando um alto potencial de aplicação em alimentos e na indústria farmacêutica (MEDINA et al., 2011). Outro trabalho também realizado no sul do país também demonstrou ação antimicrobiana da planta. Scur e colaboradores (2016) estudaram o óleo essencial, extrato etanólico e aquoso das folhas do araçá e evidenciaram atividade antimicrobiana contra diversas cepas de ATCC, dentre elas a *S. aureus*.

Todos esses trabalhos juntamente com outros utilizando diversos tipos de plantas medicinais popularmente conhecidas (ANANTAWORASAKUL et al., 2017; BRAQUEHAIS et al., 2016; FRATINI et al., 2014; MUHAISEN et al., 2016; ROZATTO, 2012; SOKOVIĆ et al., 2009; ZEEDAN et al., 2014) evidenciam a importância do estudo de tais compostos como alternativas. Como relatado anteriormente o problema da resistência antimicrobiana é grave e requer uma atenção especial por se tratar de um assunto de saúde pública. Dessa forma a substituição das moléculas comuns de antibióticos se faz necessária e uma alternativa para sanar o problema. Como demonstrado, a ação antimicrobiana de diversas plantas que veem sendo estudadas pode ser uma saída de baixo custo e ecologicamente correta. No entanto ainda faltam pesquisas sobre a efetiva ação *in vitro* de algumas plantas, a real ação *in vivo* e os possíveis efeitos de toxicidade celular que podem ser encontrados.

3.7 EFEITO ANTI-FÚNGICO DE EXTRATOS DE PLANTAS E AÇÃO DETOXIFICANTE SOBRE A AFB₁

A presença de fungos toxigênicos e aflatoxinas em matéria prima para a fabricação de alimentos e rações após os processos de industrialização é um grande problema para a indústria e requer muita atenção. As técnicas de combate podem ocorrer antes da contaminação da matéria-prima ou após a sua contaminação, processo também chamado de descontaminação. Considerando os problemas econômicos e de saúde causados pelas aflatoxinas, há um crescente interesse em pesquisas para o desenvolvimento de estratégias a

fim de prevenir tanto a formação das aflatoxinas em alimentos e rações, quanto a sua remoção em produtos já contaminados. A contaminação dos cereais pode ocorrer no campo, no armazenamento e durante o transporte, ou seja, em boa parcela de todo o processo produtivo. Com o intuito de resolver esse problema algumas medidas já foram tomadas através da utilização de produtos durante o processo de produção para eliminar ou reduzir os fungos toxigênicos e as aflatoxinas. Com relação aos processos de detoxificação, utilizados com o objetivo de remover a aflatoxina pré-formada nos produtos, existem três métodos que podem ser aplicados: os químicos, os físicos e os biológicos (BOVO et al., 2013; ISMAIL et al., 2018).

Os métodos químicos consistem na degradação estrutural das moléculas de aflatoxinas através de ácidos, bases, aldeídos, agentes oxidantes e alguns gases. Os métodos físicos envolvem inativação pelo calor, extração com solventes, radiação (gama ou ultravioleta) (DI GREGORIO et al., 2014). Os métodos biológicos consistem em utilizar bactérias ou leveduras com a função de degradar ou adsorver as aflatoxinas. A utilização de microrganismos, como leveduras e bactérias, vêm sendo demonstradas na detoxificação de aflatoxinas por muitos pesquisadores (CORASSIN et al., 2013; OATLEY et al., 2000; PELTONEN et al., 2001; SHANTHA, 1999). A biodegradação utilizando microrganismos ou enzimas é uma das melhores estratégias para a gestão de aflatoxinas em alimentos e rações (WU et al., 2009). A forma mais conhecida e utilizada na produção animal para sanar os problemas das micotoxinas são os adsorventes, como por exemplo, o aluminossilicato. O objetivo dessa prática é a ligação entre as duas substâncias impedindo a absorção gastrointestinal das aflatoxinas pelo organismo (RAMOS; HERNÁNDEZ, 1997). Os adsorventes podem ser classificados em minerais (argilas, carvão ativado) ou orgânicos (fibra vegetal, extrato de parede celular de leveduras e bactérias) (ISMAIL et al., 2016). No entanto cada tratamento tem suas limitações, e por isso estudos capazes de encontrar novos compostos que desempenhem esse papel sendo seguros biologicamente e de baixo custo são essenciais.

Estudos que confirmam o potencial antifúngico de determinadas plantas medicinais, também relatam o efeito na detoxificação (BRINDA et al., 2013; IRAM et al., 2016; SANDOSSKUMAR et al., 2007; VELAZHAHAN et al., 2010; WU et al., 2009). Técnicas como o uso de óleos essenciais e extratos de plantas para ação antifúngica e detoxificante estão se tornando populares no meio acadêmico, por se mostrarem boas alternativas na prevenção da contaminação em alimentos (PONZILACQUA; CORASSIN; OLIVEIRA, 2018). Substâncias ativas de plantas podem ser uma ótima alternativa aos químicos sintéticos para ação adsorvente e também através da degradação por enzimas. Com o processo de

evolução natural, as plantas desenvolvem mecanismos de sobrevivência e adaptação diferentes, tanto para superfícies bióticas quanto para abióticas em resposta ao estresse e ao ataque de patógenos (CABRAL; FERNÁNDEZ PINTO; PATRIARCA, 2013). Estudos que pretendam entender os mecanismos de ação e a segurança toxicológica da utilização de plantas ainda são escassos, o que prejudica a utilização mais efetiva desses compostos na agropecuária e na indústria.

Dados da literatura revelam que óleos essenciais e seus principais componentes como os monoterpenos são ótimos como fumigantes botânicos contra a presença de fungos e a contaminação de micotoxinas (KITIC; PAVLOVIC; BRANKOVIC, 2013). Existem dois modos diferentes de ação, um contra o crescimento fúngico e outro contra a secreção da aflatoxina. A ação antifúngica das plantas está relacionada a diversos compostos químicos presentes, e não pode ser atribuída apenas a um mecanismo celular e sim ao conjunto deles (KITIC et al., 2002, 2005). Villela (2009) testaram o óleo essencial de *Eucalyptus globulus* (eucalipto comum) e seu principal componente 1,8-cineol, separadamente, contra *A. flavus* e *A. parasiticus* e constatou que a atividade antifúngica da molécula isoladamente foi menor do que o óleo essencial completo. Esses achados podem sugerir que os menores componentes existentes no óleo são críticos para a efetiva ação do mesmo, uma vez que podem ter efeitos sinérgicos ou potencializar a ação (BURT, 2004). Dessa maneira, talvez a utilização do extrato completo da planta seja mais eficiente do que o isolamento de um composto e o uso apenas dele. Isso revela uma característica importante para a aplicação desses compostos, eles possuem relativa facilidade para a obtenção uma vez que podem ser aplicados em sua totalidade facilitando a preparação do extrato.

Os compostos das plantas agem sobre microrganismos danificando o sistema enzimático da célula através da redução da síntese de proteínas e de compostos estruturais; desnaturando enzimas responsáveis pela germinação de esporos e interferindo nos aminoácidos envolvidos com a germinação (CONNER; BEUCHAT, 1984; NYCHAS, 1995; PONZILACQUA; CORASSIN; OLIVEIRA, 2018). Alguns componentes presentes nos óleos essenciais como os monoterpenos, timol e limoneno foram identificados como potentes inibidores da enzima pectina metilesterase, responsável pela formação dos principais componentes da parede celular de fungos (MAREI; ABDEL RASOUL; ABDELGALEIL, 2012). Portanto essas substâncias podem causar sérios danos à célula fúngica levando a sua morte. Reddy, Reddy e Muralidharan (2009) estudaram potencial para redução da AFB₁ de alguns extratos de plantas *in vitro*. Dentre eles os que tiveram maior eficácia foram: *Allium sativum* (alho), *Ocimum sanctum* (majerição), *Curcuma longa* (cúrcuma) e *Syzygium*

aromaticum (cravo-da-índia). Todas essas plantas fazem parte de grupos de condimentos comumente utilizados em culinária por grande parte das culturas mundiais. Essa característica é interessante uma vez que o processo de descontaminação pode ser feito diretamente no produto final ou na matéria-prima já beneficiada, podendo ser utilizada nos alimentos ou rações (PONZILACQUA; CORASSIN; OLIVEIRA, 2018).

Iram e colaboradores (2015) realizaram testes *in vitro* e *in vivo* com o extrato aquoso de *Corymbia citriodora* (eucalipto) para redução de AFB₁ e AFB₂ e obtiveram o primeiro relato científico do fato. Recentemente, alguns estudos *in vitro* tem revelado o potencial de detoxificação que extratos aquosos de plantas podem demonstrar (ISMAIL et al., 2018). A Tabela 1 apresenta resultados de estudos que utilizaram extratos aquosos de plantas para analisar a atividade de descontaminação de aflatoxinas. O modo de ação dessas plantas ainda não é completamente compreendido. Alguns autores sugerem que a redução na toxicidade, com a utilização de determinadas plantas, se dá pelas modificações no anel de lactona presente na estrutura natural de aflatoxina (VELAZHAHAN et al., 2010). Outros autores atribuem a ação devido à remoção da dupla ligação do anel furano na maioria dos produtos formados após a exposição da micotoxina ao extrato de planta (IRAM et al., 2016).

Tabela 1 - Extratos aquosos de plantas medicinais com ação de degradação em aflatoxinas.

Espécies de plantas	Parte planta	Volume de extrato (µL)	Aflatoxina (concentração)	Degradação (%)	Referência
<i>Trachyspermum ammi</i>	Semestres	500	AFG ₁ (50 ng)	64,5	Velazhahan et al. (2010)
<i>Adhatoda vasica</i> Nees	Folha	500	AFB ₁ (100 ng)	98,3	Vijayanandraj et al. (2014)
<i>Corymbia citriodora</i>	Folha	250	AFB ₁ (100 µg/L)	95,2	Iram et al. (2015)
			AFB ₂ (50 µg/L)	92,9	
<i>Cassia fistula</i>	Folha	250	AFB ₁ (100 µg/L)	54,4	Iram et al. (2016)
			AFB ₂ (50 µg/L)	59,7	
<i>Ocimum basilicum</i>	Folha	250	AFB ₁ (100 µg/L)	92,8	Iram et al. (2016)
			AFB ₂ (50 µg/L)	88,7	

Fonte: Autoria própria

A utilização de óleos essenciais é mais comum do que outros tipos de extratos, pois é uma forma mais eficaz de se retirar e predizer os componentes atuantes existentes em cada espécie de planta. Os óleos essenciais possuem maior quantidade de compostos ativos, em termos de porcentagem, em comparação com extratos aquosos e etanólicos. No entanto, é de se considerar que a extração de óleos essenciais é mais complicada e necessita de equipamentos específicos para ser realizada (SANTOS et al., 2004). A aplicação em larga escala de plantas tem atraído grande atenção de microbiologistas, pois são biodegradáveis, biologicamente seguros, renováveis e de baixo custo (VARMA; DUBEY, 1999). Portanto pode-se dizer que a utilização de plantas na detoxificação de micotoxinas é uma técnica “eco amigável”.

REFERÊNCIAS

- AGÊNCIA INTERNACIONAL DE PESQUISA EM CâNCER - IARC. **Some naturally occurring substances:** food and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. Lyon: IARC, 1993. (Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans, 56).
- AGÊNCIA INTERNACIONAL DE PESQUISA EM CâNCER - IARC. **Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene.** Lyon: IARC, 2002. (Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans, 82).
- AGOSTINI-COSTA, T. S. et al. Secondary metabolites. In: DHANARASU, S. (Ed.) **Chromatography and its applications.** Rijeka, Croatia: InTech, 2012. cap. 8, p. 131-164.
- AKRAYI, H.; SALIH, R.; HAMAD, P. In vitro screening of antibacterial properties of *Rhus coriaria* and *Origanum vulgare* against some pathogenic bacteria. **Aro, The Scientific Journal of Koya University**, Koya, v. 3, n. 2, p. 35–41, 2015.
- AL-TAHER, F. et al. Detection and quantitation of mycotoxins in infant cereals in the U.S. market by LC-MS/MS using a stable isotope dilution assay. **Food Control**, London, v. 72, p. 27–35, 2017.
- ANANTAWORASAKUL, P. et al. *In vitro* antibacterial activity and *in vivo* therapeutic effect of *Sesbania grandiflora* in bacterial infected silkworms. **Pharmaceutical Biology**, Lisse, v. 55, n. 1, p. 1256–1262, 2017.
- ARAÚJO, M. M. ; LONGO, P. L. Teste da ação antibacteriana in vitro de óleo essencial comercial de *Origanum vulgare* (orégano) diante das cepas de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 83, article e0702014, p. 1–7, 2016.
- ARMAND-LEFEVRE, L.; RUIMY, R.; ANDREMONT, A. Clonal comparison of *Staphylococcus aureus* isolates from healthy pig farmers, human controls, and pigs. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 11, n. 5, p. 711–714, 2005.
- AZIZKHANI, M.; TOORYAN, F. Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary extract, mint extract and a mixture of tocopherols in beef sausage during storage at 4°C. **Journal of Food Safety**, Malden, v. 35, n. 1, p. 128–136, 2015.
- BOK, J. W.; KELLER, N. P. LaeA, a regulator of secondary metabolism in *Aspergillus* spp. **Eukaryotic Cell**, Washington, DC, v. 3, n. 2, p. 527–35, 2004.
- BOSCH, F. X.; PEERS, F. Aflatoxins: data on human carcinogenic risk. In: O'NEILL, I. K.; CHEN, J.; BARTSCH, H. (Ed.) **Relevance to human cancer of N-nitroso compounds tobacco smoke and mycotoxins.** Lyon: IARC Scientific Publications, 1991. p. 48–53.
- BOVO, F. et al. Efficiency of lactic acid bacteria strains for decontamination of aflatoxin M1 in phosphate buffer saline solution and in skimmed milk. **Food and Bioprocess Technology**, New York, v. 6, n. 8, p. 2230–2234, 2013.

BRAQUEHAIS, I. D. et al. Estudo preliminar toxicológico, antibacteriano e fitoquímico do extrato etanólico das folhas de *Jatropha mollissima* (Pohl) Baill. (pinhão-bravo, Euphorbiaceae), coletada no Município de Tauá, Ceará, Nordeste Brasileiro. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 18, n. 2, supl. 1, p. 582–587, 2016.

BRINDA, R. et al. Role of *Adhatoda vasica* (L.) nees leaf extract in the prevention of aflatoxin-induced toxicity in Wistar rats. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Oxford, v. 93, n. 11, p. 2743–2748, 2013.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 94, n. 3, p. 223–253, 2004.

CABRAL, L. C.; FERNÁNDEZ PINTO, V.; PATRIARCA, A. Application of plant derived compounds to control fungal spoilage and mycotoxin production in foods. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 166, n. 1, p. 1–14, 2013.

CAPPIELLO, A.; FAMIGLINI, G.; TIRILLINI, B. Determination of aflatoxins in peanut meal by LC/MS with a particle beam interface. **Chromatographia**, Wiesbaden, v. 40, n. 7–8, p. 411–416, 1995.

CHAYTOR, A. C. et al. Occurrence and decontamination of mycotoxins in swine feed. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, Suwon, v. 24, n. 5, p. 723–738, 2011.

CONNER, D. E.; BEUCHAT, L. R. Effects of essential oils from plants on growth of food spoilage yeasts. **Journal of Food Science**, Malden, v. 49, n. 2, p. 429–434, 1984.

CORASSIN, C. H. et al. Efficiency of *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria strains to bind aflatoxin M1 in UHT skim milk. **Food Control**, London, v. 31, n. 1, p. 80–83, 2013.

CORCUERA, L. A. et al. An approach to the toxicity and toxicokinetics of aflatoxin B1 and ochratoxin A after simultaneous oral administration to fasted F344 rats. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 50, n. 10, p. 3440–3446, 2012.

COSGROVE, S. E. et al. Comparison of mortality associated with methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia: a meta-analysis. **Clinical Infectious Diseases**, Oxford, v. 36, n. 1, p. 53–59, 2003.

COUNCIL FOR AGRICULTURAL SCIENCE AND TECHNOLOG - CAST. **Mycotoxins: risk in plant, animal and human systems**. Ames: CAST, 2003.

DAVID, M. Z.; DAUM, R. S. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: epidemiology and clinical consequences of an emerging epidemic. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, DC, v. 23, n. 3, p. 616–87, 2010.

DAVIS, M. et al. Understanding media publics and the antimicrobial resistance crisis. **Global Public Health**, Abingdon, v. 13, n. 9, p. 1158–1168, 2018.

DE GIROLAMO, A. et al. Performance evaluation of LC–MS/MS methods for multi-

mycotoxin determination in maize and wheat by means of international proficiency testing. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 86, p. 222–234, 2017.

DENARDIN, C. C. et al. Antioxidant capacity and bioactive compounds of four Brazilian native fruits. **Journal of Food and Drug Analysis**, Taipei, v. 23, p. 387–398, 2015.

DI GREGORIO, M. C. et al. Mineral adsorbents for prevention of mycotoxins in animal feeds. **Toxin Reviews**, London, v. 33, n. 3, p. 125–135, 2014.

DINIZ, S. P. S. S. **Micotoxinas**. Campinas: Rural, 2002.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY - EFSA. Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the commission related to the potential increase of consumer health risk by a possible increase of the existing maximum levels for aflatoxins in almonds, hazelnuts and pis. **The EFSA Journal**, Parma, v. 446, p. 1–127, 2007.

FERNANDES, P. Antibacterial discovery and development—the failure of success? **Nature Biotechnology**, New York, v. 24, n. 12, p. 1497–1503, 2006.

FINK-GREMMELS, J. Mycotoxins in cattle feeds and carry-over to dairy milk: a review. **Food Additives & Contaminants: Part A**, Abingdon, v. 25, n. 2, p. 172–180, 2008.

FRATINI, F. et al. Antibacterial activity of essential oils, their blends and mixtures of their main constituents against some strains supporting livestock mastitis. **Fitoterapia**, Milan, v. 96, p. 1–7, 2014.

GONZALES, E.; MELLO, H. H. C.; CAFÉ, M. B. Uso de antibióticos promotores de crescimento na alimentação e produção animal. **Revista UFG**, Goiania, v. 13, n. 13, p. 48–53, 2012.

GUARDABASSI, L.; KRUSE, H. Princípios da utilização prudente e racional de antimicrobianos em animais. In: GUARDABASSI, L.; JENSEN, L. B.; KRUSE, H. **Guia de antimicrobianos em veterinária**. Porto Alegre, Artmed, 2010. p. 17–30.

GUARDABASSI, L.; STEGGER, M.; SKOV, R. Retrospective detection of methicillin resistant and susceptible *Staphylococcus aureus* ST398 in danish slaughter pigs. **Veterinary Microbiology**, Tokyo, v. 122, n. 3–4, p. 384–386, 2007.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 3, p. 667–679, 2010.

HUEZA, I. M. et al. Zearalenone, an estrogenic mycotoxin, is an immunotoxic compound. **Toxins**, Basel, v. 6, n. 3, p. 1080–95, 2014.

IRAM, W. et al. Mass spectrometric identification and toxicity assessment of degraded products of aflatoxin B1 and B2 by *Corymbia citriodora* aqueous extracts. **Scientific Reports**, London, v. 5, article e14672, p. 14672, 2015.

IRAM, W. et al. Structural analysis and biological toxicity of aflatoxins B1 and B2

degradation products following detoxification by *Ocimum basilicum* and *Cassia fistula* aqueous extracts. **Frontiers in Microbiology**, Boca Raton, v. 7, article 1105, p. 1-18, 2016.

ISMAIL, A. et al. **Aflatoxin M1**: prevalence and decontamination strategies in milk and milk products critical reviews in microbiology. **Critical Reviews in Microbiology**, Boca Raton, v. 42, n. 3, p. 418-427, 2016. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/1040841X.2014.958051>>. Acesso em: 23 out. 2018.

ISMAIL, A. et al. Aflatoxin in foodstuffs: occurrence and recent advances in decontamination. **Food Research International**, Barking, v. 113, p. 74–85, 2018.

JENSEN, L. B. et al. Riscos à saúde humana associados à utilização de antimicrobianos em animais. In: GUARDABASSI, L.; JENSEN, L. B.; KRUSE, H. (Ed.) **Guia de antimicrobianos em veterinária**. Porto Alegre: Artmed, 2010. p. 31–46.

KHORSHIDIAN, N. et al. Potential application of essential oils as antimicrobial preservatives in cheese. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, Amsterdam, v. 45, p. 62–72, 2018.

KITIC, D.; PAVLOVIC, D.; BRANKOVIC, S. The role of essential oils and the biological detoxification in the prevention of aflatoxin borne diseases. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, Hilversum, v. 13, n. 21, p. 2767–2790, 2013.

KITIC, D. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Calamintha nepeta* (L.) Savi ssp. *glandulosa* (Req.) P.W. Ball from Montenegro. **Journal of Essential Oil Research**, Wheaton, v. 14, n. 2, p. 150–152, 2002.

KITIC, D. et al. Chemical composition and microbial activity of the essential oil of *Calamintha nepeta* (L.) Savi ssp. *Nepeta* var. *subisodonda* (Borb.) Hayek from Serbia. **Journal of Essential Oil Research**, Wheaton, v. 17, n. 6, p. 701–703, 2005.

KUMARI, P. et al. Quantitative assessment and antibacterial activity of *Origanum vulgare* L. **Journal of Phytology**, Abu Dhabi, v. 3, n. 12, p. 15–21, 2011.

LEÃO, J. D. J. **Bioatividade de extratos vegetais no controle de *Sitophilus oryzae* (LINNÉ, 1763) em arroz**. 2007.91p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2007.

LELARIO, F. et al. Identification and antimicrobial activity of most representative secondary metabolites from different plant species. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, Heidelberg, v. 5, n. 1, p. 13, 2018.

LIU, Q. et al. Antibacterial and antifungal activities of spices. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 18, n. 6, p. 1283, 2017.

MACHADO, R. C. M. **Interação inseto-planta e suas implicações no manejo integrado de pragas**. 2009. 53p. Monografia (Especialização) – Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

MAGALHÃES, C. F. **Efeito de extratos e frações de *Piper aduncum* sobre o crescimento e metabolismo dos *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sanguis***. 2010. 53p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Vale do Rio Doce, Governador Valadares, 2010.

MAREI, G. I. K.; ABDEL RASOUL, M. A.; ABDELGALEIL, S. A. M. Comparative antifungal activities and biochemical effects of monoterpenes on plant pathogenic fungi. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, Amsterdam, v. 103, n. 1, p. 56–61, 2012.

MARIN, S. et al. Mycotoxins: occurrence, toxicology, and exposure assessment. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 60, p. 218–237, 2013.

MARINS, B. R.; TANCREDI, R. C. P.; GEMAL, A. L. **Segurança alimentar no contexto da vigilância sanitária: reflexões e práticas**. Rio de Janeiro: Nova Aliança, 2014.

MATSUNAGA, T. et al. Characteristics of *Staphylococcus aureus* isolated from peracute, acute and chronic bovine mastitis. **The Journal of Veterinary Medical Science**, Tokyo, v. 55, n. 2, p. 297–300, abr. 1993.

MAZIERO, M. T.; BERSOT, L. D. S. Micotoxinas em alimentos produzidos no Brasil. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v. 12, n. 1, p. 89–99, 2010.

MEDINA, A. L. et al. Araçá (*Psidium cattleianum* Sabine) fruit extracts with antioxidant and antimicrobial activities and antiproliferative effect on human cancer cells. **Food Chemistry**, Oxford, v. 128, n. 4, p. 916–922, 2011.

MUHAISEN, H. M. et al. Antimicrobial agents from selected medicinal plants in Libya. **Chinese Journal of Integrative Medicine**, Beijing, v. 22, n. 3, p. 177–184, 2016.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, Washington, v. 79, n. 3, p. 629–661, 2016. Disponível em: < <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jnatprod.5b01055> >. Acesso em: 24 out. 2018

NORIEGA, P. et al. *Passiflora alata* curtis: a Brazilian medicinal plant . **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas**, Santiago, v. 10, n. 5, p. 398–413, 2011.

NYCHAS, G. Natural antimicrobials from plants. In: GOULD, G. W. **New methods of food preservation**. Boston, MA: Springer US, 1995. p. 58–89.

OATLEY, J. T. et al. Binding of aflatoxin B1 to bifidobacteria in vitro. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 63, n. 8, p. 1133–6, 2000.

OLIVEIRA, C. A. F. et al. Aflatoxins and cyclopiazonic acid in feed and milk from dairy farms in São Paulo, Brazil. **Food Additives and Contaminants: Part B**, Abingdon, v. 1, n. 2, p. 147–152, 2008.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE - WHO. **Global action plan on antimicrobial resistance**. 2015. Disponível em: <

http://www.wpro.who.int/entity/drug_resistance/resources/global_action_plan_eng.pdf >. Acesso em: 25 out. 2018.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE - WHO. **Fact sheet: antibiotic resistance**. 2016. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/antibiotic-resistance/en/>>. Acesso em: 24 out. 2018.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE ANIMAL - OIE. **Terrestrial animal health code**. 2018. Disponível em: <<http://www.oie.int/standard-setting/terrestrial-code/>>. Acesso em: 26 out. 2018.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE ANIMAL - OIE. **The OIE strategy on antimicrobial resistance and the prudent use of antimicrobials**. 2016. Disponível em: <http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Media_Center/docs/pdf/PortailAMR/EN_OIE-AMRstrategy.pdf>. Acesso em: 25 out.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA ALIMENTAÇÃO E AGRICULTURA - FAO. **Worldwide regulation for mycotoxins in food and feed in 2003**. Rome: FAO, 2004.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA ALIMENTAÇÃO E AGRICULTURA - FAO. **Action plan on antimicrobial resistance 2016-2020**. Rome: FAO, 2016.

OYARZABAL, M. E. B. **Aplicação do óleo essencial do orégano (*Origanum vulgare*) no tratamento da mastite bovina e presença de fungos no leite bovino in natura**. 2011. 74p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

PELTONEN, K. et al. Aflatoxin B1 binding by dairy strains of lactic acid bacteria and bifidobacteria. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 84, n. 10, p. 2152–2156, 2001.

PERAICA, M.; RADÍĆ, B.; PAVLOVIC, M. Efectos tóxicos de las micotoxinas en el ser humano. **Bulletin of World Health Organization**, Geneve, v. 77, n. 9, p. 754–766, 2000.

PEREIRA, C. A. M.; VILEGAS, J. H. Y. Constituintes químicos e farmacologia do gênero *Passiflora* com ênfase a *P. alata* Dryander., *P. edulis* Sims e *P. incarnata* L. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 3, n. 1, p. 1–12, 2000.

PEREIRA, M. M. G.; CARVALHO, E. P.; PRADO, G. Crescimento e produção de aflatoxinas por *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 20, n. 1, p. 141-156, 2002.

PEREIRA, M. L.; TOLEDO, M. C. F. Micotoxinas: impacto na saúde humana e animal e sua detecção pelo método de ELISA. **Cadernos Técnicos da Escola de Veterinária da UFMG**, Belo Horizonte, n. 13, p. 5–27, 1995.

PERES, T. B. Noções básicas de cromatografia. **Biológico**, São Paulo, v. 64, n. 2, p. 227–229, 2002.

PONZILACQUA, B.; CORASSIN, C. H.; OLIVEIRA, C. A. F. Antifungal activity and detoxification of aflatoxins by plant extracts: potential for food applications. **The Open Food Science Journal**, Hilversum, v. 10, n. 1, p.24-32, 30 out. 2018.

RAMOS, A. J.; HERNÁNDEZ, E. Prevention of aflatoxicosis in farm animals by means of hydrated sodium calcium aluminosilicate addition to feedstuffs: a review. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 65, n. 1–4, p. 197–206, 1997.

REDDY, K. R. N.; REDDY, C. S.; MURALIDHARAN, K. Potential of botanicals and biocontrol agents on growth and aflatoxin production by *Aspergillus flavus* infecting rice grains. **Food Control**, London, v. 20, n. 2, p. 173–178, 2009.

RICE, L. G.; ROSS, P. F. Methods for detection and quantitation of fumonisins in corn, cereal products and animal excreta. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 57, n. 6, p. 536–540, 1994.

RICHARD, J. L. Some major mycotoxins and their mycotoxicoses - an overview. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 119, n. 1–2, p. 3–10, 2007.

ROZATTO, M. R. **Determinação da atividade antimicrobiana *in vitro* de extratos, frações e compostos isolados de *Arrabidaea brachypoda***. 2012. 100f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2012.

SÁ, M. E. P. et al. Importância do *Staphylococcus aureus* nas mastites subclínicas: pesquisa de enterotoxinas e toxina do choque tóxico, e a relação com a contagem de células somáticas. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 41, n. 5, p. 321–326, 2004.

SABINO, M. et al. Ocorrência de aflatoxina B1 em produtos alimentícios e rações animais, consumidos no Estado de São Paulo e em várias outras regiões do Brasil no período de 1980 a 1987. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 48, n. 1/2, p. 81–5, 1988.

SANDOSSKUMAR, R. et al. Inhibition of *Aspergillus flavus* growth and detoxification of aflatoxin B1 by the medicinal plant zimmu (*Allium sativum* L. x *Allium cepa* L.). **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Seoul, v. 23, n. 7, p. 1007–1014, 29 maio 2007.

SANTOS, A. S. et al. Descrição de sistema e de métodos de extração de óleos essenciais e determinação de umidade de biomassa em laboratório. Embrapa Amazônia Oriental. **Comunicado Técnico 99**, p. 1-6, 2004.

SANTOYO, S. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil obtained via supercritical fluid extraction. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 68, n. 4, p. 790–795, 2005.

SCUR, M. et al. Antimicrobial and antioxidant activity of essential oil and different plant extracts of *Psidium cattleianum* Sabine. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 76, n. 1, p. 101–108, 2016.

SET, E.; ERKMEN, O. The aflatoxin contamination of ground red pepper and pistachio nuts sold in Turkey. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 48, n. 8–9, p. 2532–2537, 2010.

SHANTHA, T. Fungal degradation of aflatoxin B1. **Natural toxins**, New York, v. 7, n. 5, p. 175–8, 1999.

SINGH, S.; DAS, D. Passion fruit: a fetched passion for dentists. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, Jhansi, v. 4, n. 2, p. 754–757, 2013.

SMITH, J. E. et al. Role of mycotoxins in human and animal nutrition and health. **Natural toxins**, New York, v. 3, n. 4, p. 187–92, discussion 221, 1995.

SOKOVIĆ, M. et al. Antibacterial effects of the essential oils of commonly consumed medicinal herbs using an in vitro model. **Molecules**, Basel, v. 15, n. 11, p. 7532–7546, 2010.

SOKOVIĆ, M. et al. Susceptibility of pathogenic bacteria and fungi to essential oils of wild *Daucus carota*. **Pharmaceutical Biology**, Lisse, v. 47, n. 1, p. 38–43, 2009.

SOUZA, S. V. C.; VARGAS, E. A.; JUNQUEIRA, R. G. Eficiência de um kit de ELISA na detecção e quantificação de aflatoxina M1 em leite e investigação da ocorrência no estado de Minas Gerais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 19, n. 3, p. 401–405, dez. 1999.

SULYOK, M. et al. Development and validation of a liquid chromatography/tandem mass spectrometric method for the determination of 39 mycotoxins in wheat and maize. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, London, v. 20, n. 18, p. 2649–2659, 2006.

TANIWAKI, M. H.; PITT, J. I.; MAGAN, N. Aspergillus species and mycotoxins: occurrence and importance in major food commodities. **Current Opinion in Food Science**, Amsterdam, v. 23, p. 38–43, 2018.

TENOVER, F. C.; MCDONALD, L. C. Vancomycin-resistant staphylococci and enterococci: epidemiology and control. **Current Opinion in Infectious Diseases**, Hagerstown, v. 18, n. 4, p. 300–305, 2005.

TONHI, E. et al. Fases estacionárias para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR) baseadas em superfícies de óxidos inorgânicos funcionalizados. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 4, p. 616–623, 2002. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422002000400017&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>. Acesso em: 18 jul. 2017.

VARGAS, A. J. et al. *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* spray-dried aqueous extracts inhibit inflammation in mouse model of pleurisy. **Fitoterapia**, Milano, v. 78, n. 2, p. 112–119, 2007.

VARMA, J.; DUBEY, N. K. Prospectives of botanical and microbial products as pesticides of tomorrow. **Current Science**, Bangalore, v. 76, n. 2, p. 172–179, 1999.

VASIĆ, S. M. et al. Biological activities of extracts from cultivated granadilla *Passiflora alata*. **EXCLI Journal**, Mainz, v. 11, p. 208–218, 2012.

VELAZHAHAN, R. et al. Detoxification of aflatoxins by seed extracts of the medicinal plant, *Trachyspermum ammi* (L.) Sprague ex Turrill - Structural analysis and biological toxicity of

degradation product of aflatoxin G1. **Food Control**, London, v. 21, n. 5, p. 719–725, 2010.

VIEGAS, S.; VIEGAS, C.; OPPLIGER, A. Occupational exposure to mycotoxins: current knowledge and prospects. **Annals of Work Exposures and Health**, Oxford, v. 62, n. 8, p. 923–941, 2018.

VIJAYANANDRAJ, S. et al. Detoxification of aflatoxin B1 by an aqueous extract from leaves of *Adhatoda vasica* Nees. **Microbiological Research**, v.169, n.4, p.294-300, 2014.

VILELA, G. R. et al. Activity of essential oil and its major compound, 1,8-cineole, from *Eucalyptus globulus* Labill., against the storage fungi *Aspergillus flavus* Link and *Aspergillus parasiticus* Speare. **Journal of Stored Products Research**, Oxford, v. 45, n. 2, p. 108–111, 2009.

VILELA, J. et al. Antimicrobial effect of essential oils of *Laurus nobilis* L. and *Rosmarinus officinallis* L. on shelf-life of minced “Maronesa” beef stored under different packaging conditions. **Food Packaging and Shelf Life**, Amsterdam, v. 8, p. 71–80, 2016.

VOSS, A. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pig farming. **Emerging infectious diseases**, Atlanta, v. 11, n. 12, p. 1965–1966, 2005.

WITTE, W. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in humans and animals, Central Europe. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 13, n. 2, p. 255–258, 2007.

WU, Q. et al. Biological degradation of aflatoxins. **Drug Metabolism Reviews**, New York, v. 41, n. 1, p. 1–7, 2009.

ZEEDAN, G. S. G. et al. Evaluation of antibacterial effect of some Sinai medicinal plant extracts on bacteria isolated from bovine mastitis. **Veterinary World**, Rajkot, v. 7, n. 11, p. 991–998, 2014.

ZINEDINE, A. et al. Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: An oestrogenic mycotoxin. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 45, n. 1, p. 1–18, 2007.

4 CAPÍTULO I

Efeito antimicrobiano de extratos de ervas medicinais e plantas tradicionais brasileiras contra *Staphylococcus aureus* e *Aspergillus parasiticus* usando modelo *in vitro* *

Bárbara Ponzilacqua¹, Sarah Lee¹, João Luíz Zani², Roice Eliana Rosim¹, Carlos Humberto Corasin¹, Carlos Augusto Fernandes Oliveira¹

¹ Departamento de Engenharia de Alimentos, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Av. Duque de Caxias Norte, 225, CEP 13635-900, Pirassununga, SP, Brasil

² Departamento de Doenças Infecciosas, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, CEP 96010-900, Pelotas, RS, Brasil

RESUMO

Bactérias e fungos são importantes agentes causadores de toxi-infecções alimentares. Novas tecnologias visando o controle desses microrganismos, tanto na substituição de novos compostos farmacêuticos quanto na prevenção da contaminação de alimentos, devem ser estudadas. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos antimicrobianos dos extratos brutos e liofilizados de maracujá doce (*Passiflora alata*, Curtis), araçá (*Psidium cattleianum*, Sabine), alecrim (*Rosmarinus officinalis*, L.) e orégano (*Origanum vulgare*, L.) sobre as células planctônicas de *Staphylococcus aureus* e *Aspergillus parasiticus*. As concentrações inibitórias mínimas (CIM), bactericida mínima (CBM) e fungicida mínima (CFM) do extrato de *P. alata* não puderam ser detectados porque a concentração máxima do extrato vegetal utilizado foi incapaz de inibir o crescimento bacteriano e fúngico. O extrato de *P. cattleianum* demonstrou CIM com 0,39 mg/mL e 0,35 mg/mL para o extrato bruto e liofilizado, respectivamente, e foi considerada a menor concentração de inibição em comparação com outras. O *R. officinalis* apresentou melhor resultado com extrato liofilizado (CIM: 0,57 mg/mL), enquanto que *O. vulgare* apresentou melhor resultado com extrato bruto (CIM: 0,65 mg/mL), ambos contra *S. aureus*. No presente estudo, os condimentos estudados mostraram alguma ação antimicrobiana como esperado. O maracujá-doce não apresentou ação contra nenhum dos microrganismos e o araçá demonstrou ser o melhor extrato avaliado contra os dois microrganismos.

Palavras-chave: Extratos de plantas; Atividade antimicrobiana; *S. aureus*; *A. parasiticus*.

* Artigo a ser submetido no periódico Current Agriculture Research Journal.

4.1 Introdução

A exposição a patógenos infecciosos tem sido uma grande ameaça para a saúde humana e animal. Bactérias e fungos são os principais agentes causadores de infecções, além de serem responsáveis por contaminarem muitos alimentos envolvidos em infecções alimentares. Com o passar dos anos, esses microrganismos desenvolveram mecanismos para sobrevivência, tornando seu combate uma tarefa complicada para a indústria médica e alimentícia. A introdução de agentes antimicrobianos se iniciou em meados dos anos 1930, e logo após esse período foi observado que a excessiva utilização desses compostos acabava por selecionar bactérias resistentes rapidamente (GUARDABASSI; KRUSE, 2010). Os fungos também podem passar por esse processo de seleção, mas o principal problema são as moléculas sintéticas que são tóxicas para células eucarióticas devido à similaridade estrutural. Novas tecnologias visando o controle de microrganismos, tanto na substituição para novos compostos farmacêuticos quanto na prevenção de contaminação de alimentos, devem ser estudadas.

Óleos essenciais e extratos de plantas possuem metabólitos secundários com ação antimicrobiana, que parecem ser uma alternativa aos antimicrobianos comuns por causarem impacto ambiental mínimo (VARMA; DUBEY, 1999) e não são tóxicos em comparação aos agentes sintéticos (DABUR et al., 2007). No entanto, os estudos ainda são poucos em relação a efetividade na ação desses compostos (ANDREU et al., 2018; PONZILACQUA; CORASSIN; OLIVEIRA, 2018). Existem diversas categorias de compostos secundários com possível ação antimicrobiana, dentre eles estão os terpenos, fenóis e compostos de nitrogênio (AGOSTINI-COSTA et al., 2012). Já se sabe que o sinergismo entre essas moléculas torna as plantas eficientes no combate a infecções (ARAUJO; LONGO, 2016).

As principais plantas estudadas são aquelas relacionadas a culinária, como os condimentos, por já possuírem evidências de controle e prevenção de microrganismos (KHORSHIDIAN et al., 2018; VILELA et al., 2016). Dentre elas, destacam-se o alecrim e o orégano, especiarias usadas em praticamente todas as culturas milenares. No entanto, é importante salientar que os compostos produzidos pelas plantas também dependem de condições ambientais.

A flora nativa brasileira é muito rica em diversidade de espécies devido a distintas regiões presentes no país. Algumas plantas já são popularmente utilizadas, mas precisam ser melhor analisadas quanto ao seu potencial medicamentoso e efeitos tóxicos. Um exemplo é o maracujá doce (*Passiflora alata*) presente em preparações farmacológicas (NORIEGA et al.,

2011), mais ainda pouco explorado (PEREIRA; VILEGAS, 2000). Outro exemplo de utilização empírica para tratamentos de diarreias, hemorragias e câimbras é o araçá (*Psidium cattleianum*) (DENARDIN et al., 2015).

Nesse estudo foram utilizadas duas plantas nativas brasileiras com pouco informação referente a sua ação antimicrobiana, e dois condimentos já conhecidos na literatura (GONELIMALI et al., 2018; SOKOVIĆ et al., 2010). O objetivo foi avaliar os efeitos antimicrobianos de extratos brutos e liofilizados das plantas orégano, alecrim, maracujá e araçá sobre células planctônicas de *S. aureus* e *A. parasiticus*.

4.2 Material e métodos

a) Plantas

As folhas foram coletadas de três diferentes tipos de famílias de plantas (Passifloraceae, Myrtaceae and Lamiaceae) durante o verão e o outono no Sul do Brasil no ano de 2017. As espécies estudadas foram *Passiflora alata*, *Psidium cattleianum*, *Rosmarinus officinalis* e *Origanum vulgare*. Exsicatas de cada uma das plantas foram encaminhadas para o Instituto de Botânica de São Paulo para identificação e, duas delas (maracujá doce e araçá), foram adicionadas ao Herbário da Instituição (*Passiflora alata* SP499802 e *Psidium cattleianum* SP499801).

b) Preparação dos extratos

Os extratos foram preparados seguindo as recomendações da Farmacopéia Brasileira (Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA, 2010), com algumas modificações. Todas as folhas foram secas, trituradas e depois adicionou-se álcool etílico (96 °GL), numa proporção de 4 g de planta em 100 mL de solução. O material foi deixado em incubação por 15 dias em 37 °C e agitado três vezes ao dia. O solvente orgânico foi eliminado através de destilação fracionada sobre pressão reduzida (Heidolph®). Após a evaporação, cada extrato foi subdividido em 2 alíquotas, uma chamada de extrato bruto e outra que passou pelo processo de liofilização. Para os experimentos, o extrato liofilizado foi diluído com água destilada.

Os dois tipos de extratos para as quatro espécies de plantas foram testados, totalizando oito ensaios. Os extratos liofilizados foram preparados com o “pó” da planta e água destilada, na concentração de 40 mg/mL. Os extratos brutos foram usados nas concentrações obtidas de

acordo com o cálculo de matéria seca: 28,31 mg/mL *Passiflora alata*, 60 mg/mL *Psidium cattleianum*, 32,24 mg/mL *Rosmarinus officinalis*, 6,45 mg/mL *Origanum vulgare*.

c) Análise dos compostos das plantas por GC-MS

As amostras foram analisadas pelo Sistema SHIMADZU CG-MS QP2020 (SHIMADZU CO., LTDA., Japão). A separação dos componentes foi realizada em uma coluna ZB-5HT (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm). Para a detecção de GC-MS, foi utilizado um sistema de impacto de elétrons com energia de ionização 70 eV. Como gás de arraste foi utilizado gás hélio a uma vazão constante de 1,8 mL/min na coluna. As temperaturas da linha de transferência, do injetor e da fonte de ionização foram ajustadas para 280 °C. A temperatura da fonte de íons foi de 280 °C. A temperatura inicial da coluna foi mantida a 60 °C durante 1 min, e depois gradualmente aumentada para 280 °C a uma taxa de 10 °C/min e mantida a 280 °C por 35 min. As amostras foram injetadas manualmente no sistema CG-MS no modo Split 2:1. Os componentes foram identificados comparando seus espectros de massa com os padrões da biblioteca digital do National Institute of Standards and Technology (NIST 14). O conteúdo relativo de cada componente encontrado foi calculado pelas áreas dos picos como porcentagens do total de compostos presentes no extrato.

d) Cepa bacteriana e fúngica

Dois tipos de microrganismos foram usados: uma bactéria Gram-positiva - *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), e um fungo filamentoso - *Aspergillus parasiticus* (NRRL 2999).

e) Concentração inibitória mínima bacteriana e concentração bactericida mínima

Concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos de plantas foram testadas pela técnica de microdiluição em caldo (NCCLS, 2015). A bactéria foi incubada em caldo cérebro coração (OXOID®, Inglaterra) e ajustada a turbidez de 0,5 McFarland, através da análise em densitômetro DEN-1 (Biosan Ltd). Os extratos de plantas foram sucessivamente diluídos em triplicata na proporção de 1:2 nas microplacas de 96 cavidades, adicionando-se 50 µL de cada extrato e 50 µL de solução salina 0,85%. Deste modo, os extratos liofilizados, previamente dissolvidos em solução salina 0,85% a 40 mg/mL, foram testados em concentrações decrescentes de 20 até 0,16 mg/mL para as quatro plantas. Com relação aos extratos brutos, e considerando as concentrações iniciais conforme descrito no item 4.2.b, as concentrações

decrecentes foram as seguintes: 14,16 até 0,11 mg/mL (*P. alata*), 30 até 0,23 mg/mL (*P. cattleianum*), 16,12 até 0,13 mg/mL (*R. officinalis*) e 3,23 até 0,025 mg/mL (*O. vulgare*).

Após as diluições, 50 µL de caldo Mueller-Hinton (KASVI®, Itália) e 5 µL de suspensão bacteriana foram adicionados em cada poço. Foram preparados controles positivos (somente bactéria), controles negativos (somente extratos) e dois antimicrobianos de referência (Cefalexina e Ciprofloxacina) e incluídos em cada microplaca testada. As microplacas foram incubadas a 35 °C por 24 h, depois deste período a turbidez foi analisada visualmente (NCCLS, 2005). Dez µL de resazurina a 0.01 % foi adicionada em cada poço e incubada, novamente, a 37 °C por 2h (LAVINIKI, 2013) devido à sua propriedade de viabilidade celular e também como complemento da análise visual. Os poços que permaneceram azuis foram considerados sem crescimento bacteriano e os poços que mudaram para roxo ou rosa foram considerados com crescimento celular (MOREIRA, 2011; PALOMINO et al., 2002). Para determinar a concentração bactericida mínima (CBM), uma alíquota de 5 µL de cada poço foi semeada em ágar Triptona de Soja (OXOID®, Inglaterra). A menor concentração que não teve crescimento no ágar foi considerada como concentração bactericida mínima (CBM). Todo o experimento foi repetido três vezes, ou seja, utilizando-se 3 microplacas preparadas conforme descrito acima.

f) Concentração inibitória mínima fúngica e concentração fungicida mínima

O efeito antifúngico foi analisado de acordo com o teste de referência de microdiluição em caldo (NCCLS, 2002). O inóculo fúngico foi preparado em ágar Batata-dextrose, a 35 °C por 7 dias. Após o período de incubação, foi preparada uma suspensão fúngica acrescentando-se 1 mL de solução salina 0,85% e 0,01mL de Tween 20 (Sigma, USA) na placa de crescimento. A suspensão foi ajustada com espectrofotômetro (Biosan Ltd) a transmitância de 80-82% em comprimento de onda fixo 530 nm. As suspensões serão diluídas a 1:50 no meio padrão, que corresponderão a 2x a densidade necessária de UFC/mL para a realização do teste.

Os extratos de plantas foram sucessivamente diluídos na proporção de 1:2 em triplicata nas microplacas de 96 cavidades, e acrescidos de meio padrão RPMI-1640 (Inlab, Brasil) suplementado com MOPS [ácido 3-(N-morfolino) propanosulfônico] a uma concentração final de 0,165 mol/L (NCCLS, 2002). As concentrações dos extratos brutos e liofilizados foram as mesmas usadas para o teste realizado com a bactéria, conforme descrito no item 4.2.e. Controles positivos e negativos foram preparados, respectivamente, com fungo e extratos, e além disso, um antifúngico de referência também foi utilizado (Fluconazol)

(STOPPA et al., 2009). As microplacas foram incubadas a 35 °C, sem agitação, por 46 a 50 h. Após o período de incubação a resazurina foi utilizada com o mesmo propósito do mencionado anteriormente para bactérias. A concentração fungicida mínima (CFM) foi testada adicionando 10 µL de cada poço sem crescimento fúngico visível em ágar Sabourad-dextrose (KASVI®, Itália) e incubado a 35 °C por 48 h. Todo o experimento foi repetido três vezes, ou seja, utilizando-se 3 microplacas preparadas conforme descrito acima.

g) Análise Estatística

Os dados foram analisados usando MIXED do Statistical Analyzes System (SAS INSTITUTE, 2002). O modelo para análise de CIM e CBM/CFM considerou cada poço das três microplacas como uma unidade experimental, além de efeitos fixos de quatro extratos de plantas, tipo de extrato (bruto e liofilizado) e interação entre tratamento e extratos. O delineamento experimental foi em blocos casualizados, considerando o efeito dos blocos de cada placa de análise, sendo incluído no modelo como efeito aleatório. Os efeitos do tratamento foram analisados pelo teste T student, considerando-se $P < 0,05$.

4.3 Resultados

Os principais compostos de cada extrato foram analisados por cromatografia gasosa com espectrômetro de massa (GC-MS) e comparados com a biblioteca digital NIST 14 para identificação das principais substâncias. As Figuras 1, 2, 3 e 4 mostram os cromatogramas obtidos nos extratos de maracujá, araçã, alecrim e orégano, respectivamente. A grande maioria dos compostos encontrados foi classificada como compostos terpenóides, mas também foram identificados alguns hidrocarbonetos. A substância de maior porcentagem encontrada no maracujá doce foi o hidrocarboneto isononano (31,3%), seguida de 3-etil-2-metilhexano (16,8%); Metil-2-metilundecanoato (12,9%) e heptanonitrilo (11,4%). A análise do araçá-rosa revelou como principais compostos o cariofileno (28,9%); eucaliptol (11,7%); naftaleno (7,6%); gamma muurolene (7,2%); humulina (5,9%); 2,6,10,10-Tetrametilbicyclo[7.2.0]undeca-2,6-dieno (5,8%); allo-aromadendrene (5,4%) e cicloheptano (5,0%). O alecrim demonstrou presença predominante de cânfora (39,7%); verbenona (34,5%) e borneol (6,7%), todos compostos terpenóides. O orégano revelou presença de terpinen-4-ol (25,8%); Ácido oxálico, isohexil neopentil éster (22,9%); 8-Metilundec-1-ene (20,3%) e carvacrol (11,4%).

Figura 1- Cromatograma obtido na análise de maracujá doce (*Passiflora alata*) por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

Fonte: Autoria própria

Figura 2- Cromatograma obtido na análise de araçá (*Psidium cattleianum*) por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

Fonte: Autoria própria

Figura 3— Cromatograma obtido na análise de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

Fonte: Autoria própria

Figura 4— Cromatograma obtido na análise de orégano (*Origanum vulgare*) por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

Fonte: Autoria própria

Os resultados foram analisados de acordo com os efeitos bacteriostáticos / fungistáticos (CIM) e bactericidas / fungicidas (CBM/CFM). É importante enfatizar que essa técnica não representa um valor absoluto, mas um intervalo entre dois valores. O valor real da

CIM é um ponto entre a menor concentração do teste capaz de inibir o crescimento do microrganismo e a próxima menor concentração de teste. No entanto, de acordo com (NCCLS, 2005) e para fins de análise estatística CIM, CBM e CFM foram considerados um número absoluto.

Os resultados do teste *in vitro* para os extratos brutos e liofilizados contra *S. aureus* estão apresentados na Tabela 1. *P. alata* CIM e CBM não puderam ser detectados porque a concentração máxima do extrato vegetal utilizado foi incapaz de inibir o crescimento bacteriano. Dessa forma, só é possível confirmar que existe um número > 14,15 mg/mL e > 20 mg/mL, respectivamente, para extratos brutos e liofilizados. Todos os outros extratos apresentaram inibição de crescimento. Para ambos os tipos de extratos, *P. cattleianum* demonstrou a menor concentração de inibição comparada a outras.

Tabela 1 - Valores médios de concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) de extratos de plantas contra *Staphylococcus aureus*.

Extrato de planta	CIM	CBM
Brutos:		
<i>P. alata</i>	>14,15 ^a	>14,15 ^a
<i>P. cattleianum</i>	0,39 ^c	0,78 ^c
<i>R. officinalis</i>	0,84 ^b	1,68 ^b
<i>O. vulgare</i>	0,65 ^{bc}	1,30 ^{bc}
Erro padrão	0,12	0,24
Liofilizados:		
<i>P. alata</i>	>20 ^a	>20 ^a
<i>P. cattleianum</i>	0,45 ^c	0,90 ^b
<i>R. officinalis</i>	0,57 ^c	1,15 ^b
<i>O. vulgare</i>	1,23 ^b	1,84 ^b
Erro padrão	0,11	0,30

^{a-c} Valores médios dentro de cada coluna sem sobrescrito comum diferem significativamente (P < 0,05).

Fonte: Autoria própria

A Tabela 2 evidencia os resultados dos dois tipos de extratos contra *A. parasiticus*. Alguns valores de MIC foram possíveis de medir, mas os valores de MFC não foram encontrados. O mesmo resultado para a inibição bacteriana utilizando *P. alata* foi observado para o fungo, não sendo possível identificar a CIM. Além disso, a concentração de *R.*

officinalis liofilizada foi maior que 20 mg/mL e também não foi possível de se obter. Os valores de CFM não foram conclusivos porque todos os ensaios apresentaram crescimento na placa.

Tabela 2 - Valores médios de concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos de plantas contra *Aspergillus parasiticus*.

Extratos de plantas	Brutos	Liofilizados
<i>P. alata</i>	>14,15 ^a	>20 ^a
<i>P. cattleianum</i>	3,125 ^b	10 ^b
<i>R. officinalis</i>	16,12 ^c	>20 ^a
<i>O. vulgare</i>	>3,225 ^b	8,33 ^b
Erro padrão	0,44	0,31

^{a-c} Valores médios dentro de cada coluna sem sobrescrito comum diferem significativamente ($P < 0,05$).

Fonte: Autoria própria

4.4 Discussão

Uma série de estudos relacionados a extratos de plantas e óleos essenciais vem demonstrando eficácia de alguns compostos em atividades antibacterianas (DANNENBERG et al., 2019; DE ASSIS et al., 2018; FRATINI et al., 2014; KITIC et al., 2005) e antifúngicas (BAGHLOUL; MANSORI; DJAHOUDI, 2016; BOUKAEW; PRASERTSAN; SATTAYASAMITSATHIT, 2017; CARMO et al., 2008; VASIĆ et al., 2012). Esses compostos são metabólitos secundários com variações em sua estrutura e composição química resultando em efeitos antimicrobianos (SAVOIA, 2012; STOJKOVIĆ et al., 2013). De acordo com Agostini-Costa et al. (2012) existem três principais categorias de metabólitos secundários: terpenos, fenóis e compostos de nitrogênio. Eles são classificados de acordo com sua estrutura e o principal mecanismo de ação. A análise cromatográfica revelou que alguns dos principais compostos identificados nos extratos desse estudo, eucaliptol canfora e carvacrol, possuem ação antimicrobiana e antioxidante já descrita (NOSTRO; PAPALIA, 2012; FERREIRA et al., 2013; KHORSHIDIAN et al., 2018).

As variações nos resultados de CIM podem ser atribuídas a uma série de fatores: espécie da planta utilizada, tipo de obtenção do extrato e espécie de microrganismo alvo. No presente estudo, duas espécies nativas brasileiras (maracujá e araçá) com pouca informação a respeito de sua ação antimicrobiana, e dois condimentos (alecrim e orégano) já conhecidos na

literatura foram avaliados (GONELIMALI et al., 2018; SOKOVIĆ et al., 2010). O extrato etanólico foi utilizado devido à sua eficiência para extração de compostos e fácil manipulação, com o objetivo de aplicação em produtos alimentícios. Se comparado com extrato aquoso, o extrato etanólico demonstra melhores resultados de inibição (OTHMAN et al., 2017; SCUR et al., 2016), uma vez que, solventes semelhantes à água têm a habilidade de extrair os mesmos compostos que a água, mas em maior quantidade. Essa metodologia de extração não requer muitos equipamentos e as técnicas são simples em relação ao tipo de extração, por exemplo, de óleos essenciais.

Os extratos de plantas foram separados em dois tipos, bruto e liofilizado, e suas atividades foram analisadas para todas as espécies de plantas utilizadas neste trabalho. A análise de *P. alata* foi inconclusiva para os dois tratamentos, porque houve crescimento bacteriano e fúngico em todas as concentrações testadas, inclusive na maior concentração analisada (bruto = 14,15 mg/mL e liofilizado = 20 mg/mL). O extrato de *P. cattleianum* demonstrou a melhor eficiência na atividade antibacteriana com as menores concentrações de CIM encontradas em todo o experimento. Apesar dos resultados de CIM serem próximos, *P. cattleianum* bruto demonstrou diferença estatística ($P < 0,05$) entre todos os extratos exceto *Origanum vulgare* (Tabelas 1 e 2). Não houve diferença entre o uso do extrato bruto e o liofilizado em relação ao efeito antibacteriano. Os valores do CBM seguiram as mesmas tendências. No entanto, com o extrato liofilizado não houve diferença estatística entre as tres plantas que demonstraram efeito (Tabela 1).

A atividade antifúngica não foi tão expressiva quanto à antibacteriana. O CIM não foi determinado para os extratos brutos de *P. alata* e *O. vulgare* e para os extratos liofilizados de *P. alata* e *R. officinalis*. Apesar disso, quando os dois tratamentos são observados é possível identificar que o CIM para *R. officinalis* foi 16,12 mg/mL (extrato bruto) e para o *O. vulgare* foi 8,33 mg/mL (liofilizado). Para *P. alata* a concentração inibitória foi inconclusiva para os dois tipos de extratos assim como para o ensaio bacteriano (Tabela 2). Não houve diferença estatística entre os resultados de CIM para *P. cattleianum* e *O. vulgare* nos dois tipos de extratos estudados. Para os extratos brutos encontrou-se diferença entre os extratos de *P. alata* e *R. officinalis*. Para os extratos liofilizados essa diferença não foi observada. No entanto, todos os valores de CIM foram muito altos quando comparados aos resultados antibacterianos. De acordo com Rozatto (2012) não há uma classificação consensual sobre o adequado valor de CIM que represente uma boa ação de extratos de plantas. Entretanto, alguns autores fornecem valores para caracterizar a ação dos compostos.

Aligiannis et al. (2001) afirmam que valores considerados como indicativos forte, moderado e fraco de inibição antimicrobiana são $CIM \leq 0,5$ mg/mL; $0,5 > CIM \geq 1,5$ mg/mL e $CIM > 1,5$ mg/mL, respectivamente. Portanto, os dois tipos de extratos de *P. cattleianum* foram considerados forte inibidores contra *S. aureus*. Igualmente, para *R. officinalis* e *O. vulgare* os dois tratamentos foram considerados com inibição moderada. Para a atividade antifúngica, todos os extratos foram avaliados como fracos inibidores. Alternativamente, Webster et al. (2008) e Assis et al. (2018) consideram satisfatórios e promissores valores de CIM menores ou iguais a 1 mg/mL. Nesse caso, *P. cattleianum*, *R. officinalis* e *O. vulgare* foram classificados com ação satisfatória contra *S. aureus* para seus extratos brutos. Para os extratos liofilizados, os valores de *O. vulgare* foram maiores do que 1 mg/mL, portanto considerados não satisfatórios. De acordo com as interpretações de Aligiannis, Webster e Assis, nenhum dos extratos de plantas tiveram ação satisfatória contra *A. parasiticus*.

Em relação a *P. alata* os dois extratos, bruto e liofilizado, não foram eficientes para os dois microrganismos testados. O gênero *Passiflora* é um dos poucos já estudado e explorado para uso humano com vários fitoquímicos, como alcalóides, flavonóides, saponinas, óleos essenciais e carotenóides, além de minerais, fibras e vitaminas (SIMÃO et al., 2018). No entanto, não existe muita literatura sobre a ação antimicrobiana envolvendo *P. alata* (PEREIRA; VILEGAS, 2000). Os compostos predominantes encontrados na análise GC-MS desse extrato não são relacionados à atividade antimicrobiana na literatura. O isononano, substância de maior quantidade, é um hidrocarboneto com ação psicotrófica conhecida. Ele está presente em grande quantidade na Erva-de-São-João (*Hypericum perforatum*) e é usado como fitoterápico para depressão e neutralização de veneno de cobra (SAMY; GOPALAKRISHNAKONE; CHOW, 2012). Neste caso, os resultados da análise de cromatografia são condizentes com os encontrados nos ensaios antimicrobianos, ou seja, o extrato em questão não demonstrou qualquer ação frente às espécies de microrganismos estudadas.

Nossos resultados diferem de Vasić et al. (2012) que encontraram atividade antimicrobiana contra 27 tipos diferentes de microrganismos, dentre os quais, alguns importantes em saúde pública, como o *S. aureus* e *A. flavus*. Eles afirmam que a variação nas condições de crescimento da planta promove diferentes compostos bioativos, por isso seria possível variar a produção de taninos e/ou fenóis para fins específicos. Em uma recente pesquisa, Simão et al. (2018) produziram plantas *in vitro* de quatro espécies de *Passiflora* e elucidaram que a espécie *P. alata* apresentou saponinas como o composto de maior presença em suas folhas, flavonoides também estavam presentes. Mesmo assim, após testar um grande

número de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, os autores encontraram atividade antimicrobiana contra *Bacillus thuringiensis* e *Streptococcus pyogenes*, e nenhuma ação contra *S. aureus*, assim como nossos achados. Esses resultados conflitantes evidenciam a necessidade de mais estudos com extratos de *P. alata* para clarear o mecanismo da ação inibitória das plantas e entender melhor os tipos de microrganismos sensíveis a esses extratos.

P. cattleianum demonstrou o menor resultado de CIM para todos os ensaios realizados com bactérias e para os realizados com extrato bruto contra fungos. De acordo com esses resultados, extrato bruto de araçá foi considerado o mais promissor do estudo. A eficiência foi notada contra *S. aureus* com baixas concentrações: 0,39 mg/mL e 0,45 mg/mL para os extratos bruto e liofilizado, respectivamente. Apesar da ação contra *A. parasiticus* não ter sido considerada satisfatória, comparado com os outros extratos, apresentou a menor concentração com efeito inibitório, indicando assim uma boa atividade. Em estudo semelhante realizado por Scur et al. (2016) usando extrato etanólico de *P. cattleianum* também encontraram bons resultados contra *S. aureus*, CIM = 3,125 mg/mL. Esses autores afirmam que o extrato etanólico pode apresentar como principais compostos bioativos: taninos, flavonoides e terpenos. Portanto, a ação antimicrobiana pode estar atribuída a essas pequenas moléculas bioativas presentes no extrato.

De acordo com a literatura os compostos fenólicos são pequenas moléculas bioativas relacionadas com atividade antimicrobiana de muitas plantas, eles podem inativar enzimas essenciais e/ou formar complexos com íons metálicos. Medina et al. (2011) realizaram a caracterização físico-química do *P. cattleianum* e encontraram altas doses de compostos fenólicos, que foram atribuídos aos efeitos antimicrobianos. Como complemento, esses autores propuseram que os compostos fenólicos podem agir desestabilizando a membrana da célula bacteriana, afetando o mecanismo de respiração do microrganismo. Biegelmeier et al. (2011) também identificaram muitos compostos fenólicos presentes em frutos de araçá, no entanto um dos compostos com maior porcentagem identificados foi o sesquiterpeno cariofileno com 22,5%. O mesmo foi identificado no presente estudo, o composto encontrado em maior quantidade no extrato do araçá com 28,88%. Frente a esses achados podemos afirmar que a ação antimicrobiana presente no extrato de araçá está relacionada a esse composto, cariofileno, e também a ação sinérgica entre todas as substâncias de maior quantidade encontradas, conforme já proposto por Araújo e Longo (2016).

O alecrim (*R. officinalis*) e o orégano (*O. vulgare*) mostraram eficientes resultados contra *S. aureus* para todos os tipos de extratos testados, revelando um bom potencial de aplicação, uma vez que essas ervas já são conhecidas e consagradas na culinária. Estudos

comparando extratos metanólicos e aquosos de alecrim mostraram que uma boa extração de compostos ativos está relacionada ao solvente utilizado no processo (MUHAISEN et al., 2016). Tais autores observaram que o efeito de inibição do extrato metanólico foi maior do que o extrato aquoso para os mesmos tipos de plantas. No entanto, o metanol é um composto tóxico que promove uma série de efeitos colaterais tais como irritação de mucosas e sistema nervoso, lesões nos olhos, náusea, vômito. Nosso estudo demonstra que o etanol é uma boa opção de solvente para extrair os principais compostos ativos, uma vez que é forte, de fácil manipulação e não citotóxico como o metanol. De acordo com Gonelimali et al. (2018), extratos etanólicos apresentaram os menores valores de CIM quando comparados com os respectivos extratos em água. No entanto, ainda se fazem necessários estudos para elucidar qual a real aplicação desses extratos na clínica médica, devido a sua possível toxicidade quando utilizados em altas quantidades.

O alecrim é uma planta da família Lamiaceae que possui cânfora e verbena como principais compostos quando analisado por cromatografia gasosa/espectrometria de massas (GC/MS) (ARAÚJO et al., 2014; MHIRI et al., 2018). Complementarmente, Santoyo et al. (2005) estudou o mesmo extrato e considerou esses dois compostos, cânfora e verbena, como os responsáveis pela ação antibacteriana contra *S. aureus* e *Escherichia coli*. Os resultados revelados neste trabalho confirmam a ação desses dois compostos como os principais responsáveis pela ação antimicrobiana do alecrim. Lakušić et al. (2012) encontraram os mesmos principais compostos que nosso estudo, mas também revelaram as possíveis variações de compostos nessa planta de acordo com o ambiente em que ela se encontra. Um estudo realizado com óleo essencial de alecrim contra *A. parasiticus* (NRRL2999), encontrou como principais compostos ativos piperitona, α -pineno, limoneno e 1,8-cineol (RASOOLI et al., 2008). Essa diferença entre compostos pode explicar a necessidade de 9 vezes mais a concentração do extrato para o efeito fungistático encontrado no presente trabalho em comparação com Rasooli (16,12 mg/mL comparado com 1,75 mg/mL). Apesar do efeito fungistático, os dois estudos não demonstram ação fungicida contra a cepa estudada.

O mecanismo de ação antibacteriana do alecrim está relacionado com a redução do pH citoplasmático pH (pH_{int}) e a desestruturação da célula, isso funciona tanto para cepas Gram-positivas quanto para Gram-negativa (GONELIMALI et al., 2018). Sánchez, García e Heredia et al. (2010) afirmam que as mudanças no pH_{int} causam danos a membrana celular da bactéria. Portanto, a redução do pH interno causada por compostos como timol e carvacrol é um forte indicativo da atividade antimicrobiana (LAMBERT et al., 2001). Carvacrol é um dos compostos encontrados em maior quantidade no óleo essencial de orégano e é classificado

como um composto fenólico (KULISIC et al., 2004; SOKOVIĆ et al., 2010). Como relatado anteriormente, o extrato etanólico possui muitos compostos biologicamente ativos conhecidamente presentes na família Lamiaceae.

O extrato de orégano estudado apresentou grandes concentrações de monoterpenos, mas a quantidade de carvacrol (11,4%) não foi muito alta em comparação com os outros compostos e o extrato como um todo. Essa pode ser uma das explicações para que esse extrato, apesar do que já se conhece em literatura, não ter tido a melhor eficiência encontrada neste trabalho. Apesar disso, o composto de maior quantidade, terpinen-4-ol (25,8%) já foi relatado como responsável pela ação inibitória contra *S. aureus* ATCC 29213, a mesma utilizada para o presente estudo (CHA et al., 2007). Em estudo realizado por Barra et al. (2007) o composto terpinen-4-ol mostrou boa atividade contra *A. flavus* quando testado isoladamente. Esse foi o composto de maior quantidade encontrado no extrato de orégano. Essa pode ser uma evidencia que comprove a ação que este extrato teve sobre o fungo *A. parasiticus*, apesar das concentrações inibitórias não terem sido satisfatórias e nem promissoras. No entanto outros estudos, como Carmo et al. (2008) já revelaram bons resultados de ação fungistática. Isso suporta a ideia de que talvez seja possível a utilização de extratos de orégano em sistemas de preservação de alimentos com o intuito de eliminar ou impedir o crescimento de microrganismos. O orégano é um condimento muito utilizado na culinária brasileira e de outros países, o que auxilia na sua aceitação com esse objetivo.

4.5 Conclusão

No presente estudo, extratos etanólicos obtidos das folhas de araquá demonstraram maior efeito antibacteriano sobre *S. aureus*, quando comparado ao alecrim e orégano. No entanto, nenhum dos extratos de plantas apresentou efeito antifúngico relevante sobre *A. parasiticus*. O maracujá doce também não apresentou ação antibacteriana e antifúngica, embora existam relatos evidenciando presença de moléculas envolvidas em ações antimicrobianas nesse extrato. Os resultados obtidos indicam que extratos de plantas se apresentam como alternativas interessantes para reduzir a carga bacteriana de alimentos. Este foi um estudo de triagem para avaliação da atividade antimicrobiana dos quatro tipos de extratos, a fim de selecionar a melhor ação em suas concentrações mínimas. A partir dos resultados obtidos, futuras pesquisas devem ser realizadas para desenvolver formulações comerciais baseadas em experimentos de triagem a campo e ensaios toxicológicos.

Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

Agradecimentos

Este estudo foi financiado em parte pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001

4.6 Referências

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. **Farmacopéia brasileira**, v. 1. 5. ed. Brasília: ANVISA/FGV, 2010.

AGOSTINI-COSTA, T. S. et al. Secondary metabolites. In: DHANARASU, S. (Ed.) **Chromatography and its applications**. Rijeka, Croatia: InTech, 2012. cap. 8, p. 131-164.

ALIGIANNIS, N. et al. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 49, n. 9, p. 4168–4170, 2001.

ANDREU, V. et al. Chemical composition and antifungal activity of plant extracts traditionally used in organic and biodynamic farming. **Environmental Science and Pollution Research International**, Landsberg, v. 25, n. 30, p. 29971-29982, 2018.

ARAUJO, M. M. ; LONGO, P. L. Teste da ação antibacteriana in vitro de óleo essencial comercial de *Origanum vulgare* (orégano) diante das cepas de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 83, article e0702014, p. 1–7, 2016.

ARAÚJO, S. G. et al. Volatile compounds of Lamiaceae exhibit a synergistic antibacterial activity with streptomycin. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 45, n. 4, p. 1341–1347, 2014.

ASSIS, F. V. et al. Antibacterial activity of Lamiaceae plant extracts in clinical isolates of multidrug-resistant bacteria. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 90, n. 2, p. 1665–1670, 2018.

BAGHLOUL, F.; MANSORI, R.; DJAHOUDI, A. In vitro antifungal effect of *Rosmarinus officinalis* essential oil on *Aspergillus niger*. **National Journal of Physiology, Pharmacy and Pharmacology**, Johdpur, v. 7, n. 3, p. 1, 2016.

BARRA, A. et al. Characterization of the volatile constituents in the essential oil of *Pistacia lentiscus* L. from different origins and its antifungal and antioxidant activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 55, n. 17, p. 7093–7098, 2007.

BIEGELMEYER, R. et al. Comparative analysis of the chemical composition and antioxidant activity of red (*Psidium cattleianum*) and yellow (*Psidium cattleianum* var. *lucidum*) strawberry guava fruit. **Journal of Food Science**, Malden, v. 76, n. 7, p. C991–C996, 2011.

BOUKAEW, S.; PRASERTSAN, P.; SATTAYASAMITSATHIT, S. Evaluation of antifungal activity of essential oils against aflatoxigenic *Aspergillus flavus* and their allelopathic activity from fumigation to protect maize seeds during storage. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 97, p. 558–566, 2017.

CARMO, E. S. et al. The potential of *origanum vulgare* L. (Lamiaceae) essential oil in inhibiting the growth of some food-related *aspergillus* species. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 39, n. 2, p. 362–367, 2008.

CHA, J.-D. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Cryptomeria japonica*. **Phytotherapy Research**, New York, v. 21, n. 3, p. 295–299, 2007.

DABUR, R. et al. Antimicrobial activity of some indian medicinal plants. **African Journal of Traditional, Complementary, and Alternative Medicines**, Nigeria, v. 4, n. 3, p. 313, 2007.

DANNENBERG, G. S. et al. Essential oil from pink pepper (*Schinus terebinthifolius* Raddi): chemical composition, antibacterial activity and mechanism of action. **Food Control**, London, v. 95, p. 115–120, 2019.

DENARDIN, C. C. et al. Antioxidant capacity and bioactive compounds of four Brazilian native fruits. **Journal of Food and Drug Analysis**, Taipei, v. 23, p. 387–398, 2015.

FERREIRA, F. D. et al. Inhibitory effect of the essential oil of *Curcuma longa* L. and curcumin on aflatoxin production by *Aspergillus flavus* link. **Food Chemistry**, Oxford, v. 136, n. 2, p. 789–793, 2013.

FRATINI, F. et al. Antibacterial activity of essential oils, their blends and mixtures of their main constituents against some strains supporting livestock mastitis. **Fitoterapia**, Milan, v. 96, p. 1–7, 2014.

GONELIMALI, F. D. et al. Antimicrobial properties and mechanism of action of some plant extracts against food pathogens and spoilage microorganisms. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 1–9, 2018.

GUARDABASSI, L.; KRUSE, H. Princípios da utilização prudente e racional de antimicrobianos em animais. In: GUARDABASSI, L.; JENSEN, L. B.; KRUSE, H. **Guia de antimicrobianos em veterinária**. Porto Alegre, Artmed, 2010. p. 17–30.

KHORSHIDIAN, N. et al. Potential application of essential oils as antimicrobial preservatives in cheese. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, Amsterdam, v. 45, p. 62–72, 2018.

KITIC, D. et al. Chemical composition and microbial activity of the essential oil of *Calamintha nepeta* (L.) Savi ssp. *nepeta* var. *subisodonda* (Borb.) Hayek from Serbia. **Journal of Essential Oil Research**, Wheaton, v. 17, n. 6, p. 701–703, 2005.

KULISIC, T. et al. Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. **Food Chemistry**, v. 85, n. 4, p. 633–640, 2004.

LAKUŠIĆ, D. V. et al. Environment-related variations of the composition of the essential oils of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) in the Balkan peninsula. **Chemistry and Biodiversity**, v. 9, n. 7, p. 1286–1302, 2012.

LAMBERT, R. J. et al. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, n. 3, p. 453–62, set. 2001.

LAVINIKI, V. **Atividade antimicrobiana in vitro dos óleos essenciais de canela da china (*Cinnamomum cassia*), orégano (*Origanum vulgare*), pimenta negra (*Piper nigrum*) e tomilho branco (*Thymus vulgaris*) frente a amostras de salmonella enterica isoladas de aves**. 2013. 51 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

MEDINA, A. L. et al. Araçá (*Psidium cattleianum* Sabine) fruit extracts with antioxidant and antimicrobial activities and antiproliferative effect on human cancer cells. **Food Chemistry**, Oxford, v. 128, n. 4, p. 916–922, 2011.

MHIRI, R. et al. Characterization of aromatic compounds and biological activities of essential oils from Tunisian aromatic plants. **Journal of Food Measurement and Characterization**, United States, v. 12, n. 2, p. 839–847, 2018.

MOREIRA, C. A. **Atividade in vitro de agentes antimicrobianos contra biofilmes de Staphylococcus spp. de otite canina**. 2011. 101p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2011.

MUHAISEN, H. M. et al. Antimicrobial agents from selected medicinal plants in Libya. **Chinese Journal of Integrative Medicine**, Beijing, v. 22, n. 3, p. 177–184, 2016.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS - NCCLS. **Método de referência para testes de diluição em caldo para a determinação da sensibilidade a terapia antifúngica dos fungos filamentosos**: norma aprovada. S.l.: NCCLS/OPAS/ANVISA, 2002. (NCCLS documents, v. 22, n. 15).

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS - NCCLS. **Metodologia dos testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos por diluição para bactéria de crescimento aeróbico**: norma aprovada – sixth edition. 6th ed. S.l.: NCCLS/OPAS/ANVISA, 2005. (NCCLS documents, v. 23, n. 2).

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS – NCCLS. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing**. S.l.: NCCLS/OPAS/ANVISA, 2015. (NCCLS documents, v. 25).

NORIEGA, P. et al. *Passiflora alata* curtis: a Brazilian medicinal plant. **Boletim Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas**, Santiago, v. 10, n. 5, p. 398–413, 2011.

NOSTRO, A.; PAPALIA, T. Antimicrobial Activity of Carvacrol: Current Progress and Future Prospectives. **Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery**, Amsterdam, v. 7, n. 1, p. 28–35, 2012.

OTHMAN, M. B. et al. Antimicrobial activity of essential oil and aqueous and ethanol extracts of *Teucrium polium* L. subsp. *gabesianum* (L.H.) from Tunisia. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, Lucknow, v. 23, n. 3, p. 723–729, 2017.

PALOMINO, J.-C. et al. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Bethesda, v. 46, n. 8, p. 2720–2, ago. 2002.

PEREIRA, C. A. M.; VILEGAS, J. H. Y. Constituintes químicos e farmacologia do gênero *Passiflora* com ênfase a *P. alata* Dryander., *P. edulis* Sims e *P. incarnata* L. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 3, n. 1, p. 1–12, 2000.

PERUMAL SAMY, R.; GOPALAKRISHNAKONE, P.; CHOW, V. T. Therapeutic application of natural inhibitors against snake venom phospholipase A(2). **Bioinformation**, Singapore, v. 8, n. 1, p. 48–57, 2012.

PONZILACQUA, B.; CORASSIN, C. H.; OLIVEIRA, C. A. F. Antifungal activity and detoxification of aflatoxins by plant extracts: potential for food applications. **The Open Food Science Journal**, Hilversum, v. 10, n. 1, p. 24–32, 2018.

RASOOLI, I. et al. Antimycotoxigenic characteristics of *Rosmarinus officinalis* and *Trachyspermum copticum* L. essential oils. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 122, n. 1–2, p. 135–139, 2008.

ROZATTO, M. R. **Determinação da atividade antimicrobiana in vitro de extratos , frações e compostos isolados de Arrabidaea brachypoda determinação da atividade antimicrobiana in vitro de extratos , frações e compostos isolados de Arrabidaea brachypoda**. 2012. 100 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2012.

SÁNCHEZ, E.; GARCÍA, S.; HEREDIA, N. Extracts of edible and medicinal plants damage membranes of *Vibrio cholerae*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 76, n. 20, p. 6888–6894, 2010.

SANTOYO, S. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil obtained via supercritical fluid extraction. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 68, n. 4, p. 790–795, 2005.

SAS INSTITUTE. **SAS user's guide**. Cary: SAS Institute, 2002.

SAVOIA, D. Plant-derived antimicrobial compounds: alternatives to antibiotics. **Future Microbiology**, London, v. 7, n. 8, p. 979–990, 2012.

SCUR, M. et al. Antimicrobial and antioxidant activity of essential oil and different plant extracts of *Psidium cattleianum* Sabine. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 76, n.

1, p. 101–108, 2016.

SIMÃO, M. et al. A comparative study of phytoconstituents and antibacterial activity of in vitro derived materials of four *Passiflora* species. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 90, n. 3, p. 2805–2813, 2018.

SOKOVIĆ, M. et al. Antibacterial effects of the essential oils of commonly consumed medicinal herbs using an in vitro model. **Molecules**, Basel, v. 15, n. 11, p. 7532–7546, 2010.

STOJKOVIĆ, D. et al. *In situ* antioxidant and antimicrobial activities of naturally occurring caffeic acid, *p*-coumaric acid and rutin, using food systems. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Oxford, v. 93, n. 13, p. 3205–3208, 2013.

STOPPA, M. A. et al. Estudo comparativo entre as metodologias preconizadas pelo CLSI e pelo Eucast para avaliação da atividade antifúngica. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 2, p. 498–502, 2009.

VARMA, J.; DUBEY, N. K. Prospectives of botanical and microbial products as pesticides of tomorrow. **Current Science**, Bangalore, v. 76, n. 2, p. 172–179, 1999.

VASIĆ, S. M. et al. Biological activities of extracts from cultivated granadilla *Passiflora alata*. **EXCLI Journal**, Mainz, v. 11, p. 208–218, 2012.

VILELA, J. et al. Antimicrobial effect of essential oils of *Laurus nobilis* L. and *Rosmarinus officinalis* L. on shelf-life of minced “Maronesa” beef stored under different packaging conditions. **Food Packaging and Shelf Life**, Amsterdam, v. 8, p. 71–80, 2016.

WEBSTER, D. et al. Antifungal activity of medicinal plant extracts: preliminary screening studies. **Journal of Ethnopharmacology**, Amsterdam, v. 115, n. 1, p. 140–146, 2008.

5 CAPÍTULO II

Efeito de extratos de ervas medicinais e plantas tradicionais brasileiras na detoxificação de micotoxinas *in vitro* *

Bárbara Ponzilacqua^a, G.E. Rottinghaus^b, B. R. Landers^b and Carlos Augusto Fernandes Oliveira^a

^a Departamento de Engenharia de Alimentos, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Av. Duque de Caxias Norte, 225, CEP 13635-900, Pirassununga, SP, Brazil

^b Laboratório de Diagnóstico Médico Veterinário, Faculdade de Medicina Veterinária, University of Missouri, Columbia, MO, EUA

RESUMO

Micotoxinas são moléculas diversas produzidas por fungos filamentosos que ocorrem em uma ampla variedade de substratos causando perdas econômicas e problemas de saúde pública. Elas podem contaminar alimentos e rações e são de difícil controle. Alguns estudos apontam que plantas medicinais que possuem potencial antimicrobiana também podem demonstrar efeito de degradação em micotoxinas. O objetivo deste estudo foi avaliar quatro extratos aquosos de plantas *Passiflora alata* (maracujá doce), *Psidium cattleianum* (araçá), *Rosmarinus officinalis* (alecrim), *Origanum vulgare* (orégano) quanto a sua capacidade de degradação de AFB₁, ocratoxina A e zearalenona. As análises foram realizadas utilizando colunas de imunoafinidade e a identificação e quantificação das micotoxinas foi feita através de cromatografia líquida de alta eficiência. As taxas de degradação foram comparadas ao experimento controle sobre as mesmas condições de incubação. Para as toxinas OTA e ZEA os extratos não demonstraram degradação. O extrato de maracujá não demonstrou degradação de AFB₁ estatisticamente eficiente. Já o extrato mais eficiente na redução de AFB₁ foi o alecrim com uma média de degradação de 60,3±2,9 % no período de 48h, seguido pelo orégano com 38,3±4,6% e pelo araçá com 30±2%. Quanto maior o tempo de incubação maiores foram as porcentagens de redução. Os resultados encontrados revelam uma interessante alternativa ao controle de micotoxinas presentes em substratos alimentícios devido ao uso de plantas que são seguras para humanos e para o meio ambiente.

Palavras-chave: Extratos de plantas, descontaminação, micotoxinas, AFB₁, OTA, ZEA

* Artigo submetido no periódico Food Control.

5.1 Introdução

Micotoxinas são metabólitos secundários quimicamente diversos produzidos por espécies de fungos filamentosos. Elas podem ocorrer em uma ampla variedade de substratos causando perdas econômicas. Podem contaminar alimentos e rações e são de difícil controle devido as seguintes características: baixo peso molecular, não imunogênicas, termoestáveis, agem em baixas concentrações e tem ampla espectro de toxicidade (ABRUNHOSA et al., 2016). Tais características apontam que as micotoxinas são um sério problema para a saúde pública, devido à exposição crônica da população a essas moléculas por meio da alimentação. Embora mais de 400 micotoxinas tenham sido identificadas, as mais importantes incluem as aflatoxinas, ocratoxina A (OTA) e zearalenona (ZEA) (CHAYTOR et al., 2011). Entre as 20 aflatoxinas atualmente conhecidas, a aflatoxina B₁ (AFB₁) é a mais comumente encontrada em alimentos, apresentando também a maior toxicidade no fígado, órgão-alvo (CAMPAGNOLLO et al., 2016). Em 1987, a Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC) concluiu que haviam evidências de carcinogenicidade natural de AFB₁ em humanos, posteriormente, classificando a molécula no Grupo 1 – carcinógenos humanos (IARC, 2002). A OTA é um composto principalmente nefrotóxico, podendo também causar danos ao fígado em altas concentrações (RICHARD, 2007). A OTA é classificada no Grupo 2B de compostos carcinogênicos (IARC, 1993). A ZEN induz alterações hormonais pelo fato de sua estrutura molecular conferir uma sinalização estrogênica no organismo, causando efeitos negativos no sistema reprodutivo e urinário (Conselho de Ciência e Tecnologia Agrícola – CAST, 2003).

Uma vez que essas micotoxinas podem causar efeitos de toxicidade em animais e humanos, as pesquisas têm se concentrado no controle ou eliminação desses metabólitos tóxicos de alimentos e rações animais (ZHOU et al., 2017). A detoxificação parece ser a saída mais atraente e pode ser classificada em três tipos: processos físicos, químicos e microbiológicos (BOVO et al., 2013). No entanto, cada tratamento tem suas próprias limitações, por isso é necessário identificar compostos desintoxicantes biologicamente seguros e de baixo custo. Estudos apontam que plantas medicinais com potencial antimicrobiano também podem demonstrar efeito desintoxicação (BRINDA et al., 2013; IRAM et al., 2016; SANDOSSKUMAR et al., 2007; VELAZHAHAN et al., 2010; WU et al., 2009). Recentemente, o potencial de aplicação de extratos aquosos de plantas tem sido estudado para a descontaminação de alimentos (ISMAIL et al., 2018; PONZILACQUA; CORASSIN; OLIVEIRA, 2018). Vijayannandraj et al. (2014) realizaram estudos com

sementes e folhas de 31 plantas medicinais, e encontraram degradação de AFB₁ pela atividade da *Adhatoda vasica* Nees (noz de malamar), com redução de 98%. O objetivo deste estudo foi avaliar quatro extratos aquosos de folhas de plantas com algum efeito antibacteriano e antifúngico (MEDINA et al., 2011; Vasić et al., 2012), como potenciais agentes de descontaminação de AFB₁. Dois condimentos já conhecidos na literatura, *Rosmarinus officinalis* (alecrim) e *Origanum vulgare* (orégano) (GONELIMALI et al., 2018; SOKOVIĆ et al., 2010) e duas plantas nativas brasileiras com pouca informação sobre sua atividade antimicrobiana, *Passiflora alata* (maracujá doce) e *Psidium cattleianum* (araçá). Assim, essas plantas foram avaliadas segundo seu potencial de detoxificação de aflatoxina B₁, zearalenona and ocratoxina A, podendo ser uma estratégia rentável e ecológica para a desintoxicação.

5.2 Material e métodos

a) Material vegetal

Foram coletados três tipos diferentes de folhas dos gêneros Passifloraceae, Myrtaceae e Lamiaceae, no período de verão e outono no sul do Brasil no ano de 2017. As folhas estudadas foram das seguintes espécies: *Passiflora alata*, *Psidium cattleianum*, *Rosmarinus officinalis* e *Origanum vulgare*. Amostras de exsicatas foram enviadas ao Instituto de Botânica de São Paulo para identificação e, duas delas, adicionadas ao Herbário SP (*Passiflora alata* SP499802 e *Psidium cattleianum* SP499801).

b) Preparação dos extratos

Os extratos foram preparados seguindo as recomendações de Velazhahan et al. (2010) com algumas modificações. Todas as folhas foram secas, trituradas e adicionadas em água destilada estéril, na proporção de 16 g de planta em 80 mL de solução. O material permaneceu em incubação durante a noite sob agitação, em temperatura ambiente. Após a incubação, foi centrifugado por 20 min. O sobrenadante foi separado e centrifugado novamente por mais 5 min. Depois disso, o extrato foi esterilizado através de papel de filtro Whatman (No. 1) por sucção com bomba de vácuo e usado para posterior teste de descontaminação.

c) Análise compostos bioativos dos extratos por CG-MS

As amostras foram analisadas pelo Sistema SHIMADZU CG-MS QP2020 (SHIMADZU CO., LTDA., Japão). A separação dos componentes foi realizada em uma coluna ZB-5HT (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm). Para a detecção de GC-MS, foi utilizado um

sistema de impacto de elétrons com energia de ionização 70 eV. Como gás de arraste foi utilizado gás hélio a uma vazão constante de 1.8 mL/min na coluna. As temperaturas da linha de transferência, do injetor e da fonte de ionização foram ajustadas para 280 °C. A temperatura da fonte de íons foi de 280 °C. A temperatura inicial da coluna foi mantida a 60 °C durante 1 min, e depois gradualmente aumentada para 280 °C a uma taxa de 10 °C/min e mantida a 280 °C por 35 min. As amostras foram injetadas manualmente no sistema CG-MS no modo Split 2:1. Os componentes foram identificados comparando seus espectros de massa com os padrões da biblioteca digital do National Institute of Standards and Technology (NIST 14). O conteúdo relativo de cada componente encontrado foi calculado pelas áreas dos picos como porcentagens do total de compostos presentes no extrato.

d) Ensaios de descontaminação

Os efeitos de descontaminação de AFB₁, OTA e ZEN foram testado misturando 200 µL de de cada pdrão de micotoxina a 100 ng/mL em um teste tubo contendo 1000 µL de extrato vegetal. A concentração de cada micotoxina nos misturas foi de 16,67 ng/mL. As amostras foram incubadas por quatro diferentes tempos (12, 24, 36 e 48h) a 37 °C. Após esse período, a análise das micotixnas foi realizada utilizando colunas de imunoafinidade para AFB₁ (EASI-EXTRACT® AFLATOXIN), OTA (OCHRAPREP®) e ZEN (EASI-EXTRACT® ZEARALENONE) conforme descrito nas instruções do fabricante (R-Biopharm Rhone LTD, St. Louis, MO). O volume total (1200 µL) foi mixturado com 15 mL de solução salina tamponada com fosfato (PBS) e passado através da coluna de imunoafinidade à temperatura ambiente. Após essa etapa a coluna foi levada com 2 mL de água. A recuperação da aflatoxina foi realizada usando 1,5 mL de acetonitrila, aguardando 5 minutos e colocando 1,5 mL de água. Estes materiais foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Para AFB₁, a fluorescência foi melhorada por derivatização pós-coluna realizada em Kobra® Cell (R-Biopharm Rhone LTD).

e) Equipamentos

Todas as analyses cromatográficas foram realizadas com bomba Hitachi Model L-1230, detector fluorescente Hitachi Model L-2485, amostrador automático Hitachi Model L-2000 com software Hitachi D-2000 Elite em um computador. As especificações usadas para cada micotoxina analisada estão na Tabela 1. O limite de determinação do método analítico foi de 1 ng/mL para cada micotoxina, considerada a quantidade mínima que poderia gerar pico cromatográfico três vezes acima do desvio padrão da linha de base.

Tabela 1 - Especificações para cada uma das micotoxinas estudadas

Micotoxinas	AFB ₁	OTA	ZEN
Coluna (tamanho, mm)	HyperClone 3 µm C ₁₈ BDS (10 x 4,6)	Synergi 4 µm C ₁₈ polar-RP (150 x 4,6)	Synergi 4 µm C ₁₈ polar-RP (150 x 4,6)
Fase móvel	Água: acetonitrila: metanol (2300:500:500)	Acetonitrila: água: ácido fosfórico (375:625:1)	Acetonitrila: água: ácido fosfórico (375:625:1)
Tempo de retenção (min)	7,31	10,52	9,04
Excitação/ Emissão (nm)	365 / 440	330/ 460	274 / 465

Fonte: Autoria própria

f) Reagentes e soluções

Os padrões de micotoxinas AFB₁, ZEA e OTA foram adquiridos da Sigma (Sigma, St Louis, MO, USA). As amostras individuais foram preparadas em água/acetonitrila (9:1, v/v), de acordo com Scott (1990) e armazenadas em frascos de vidro âmbar a 5 °C. Todos os reagentes usados tinham grau analítico e a água foi purificada por deionização (Mili-Q system, Millipore, Bedford, MA, USA). A acetonitrila e o metanol com grau HPLC (Fisher Scientific, Hampton, New Hampshire, USA) foram usados para análises cromatográficas.

g) Estatística

A análise estatística dos ensaios de desintoxicação de micotoxinas foi realizada no Modelo Linear Geral do SAS® (SAS, 2004), utilizando-se o Teste de Tukey para diferenças significativas entre os extratos aquosos testados e tempo de incubação, adotando-se $P < 0,05$.

5.3 Resultados e discussão**a) Resultado do GC-MS para principais compostos dos extratos de folhas**

O material foi encaminhado para a análise por cromatografia gasosa com espectrômetro de massas (GC-MS). Os resultados cromatográficos foram comparados a

biblioteca digital NIST 14, onde os principais compostos foram identificados. A Tabela 2 representa os principais compostos presentes em cada extrato estudado com suas respectivas porcentagens em relação a totalidade do extrato.

A análise revelou que alguns dos principais compostos identificados possuem ação antimicrobiana e antioxidante já conhecidas, como por exemplo, o eucaliptol, o camphor, e o carvacrol (NOSTRO; PAPALIA, 2012; FERREIRA et al., 2013; KHORSHIDIAN et al., 2018). A grande maioria desses compostos são classificados como substâncias terpenóides. Especulasse que o mecanismo de ação desta classe de compostos esteja envolvido na ruptura da membrana e também na destruição de mitocôndrias de células fúngicas (LAGROUH; DAKKA; BAKRI, 2017). Já com relação às substâncias envolvidas com a ação detoxificante, há controvérsias e escassez de estudos. Não se sabe ao certo se a ação de modificação das micotoxinas ocorre devido a compostos químicos dos extratos ou enzimas atuantes. De acordo com alguns autores, substâncias como os alcaloides poderiam estar envolvidas na modificação estrutural das moléculas (VIJAYANANDRAJ et al., 2014).

b) Análise das amostras

Neste estudo o extrato aquoso das folhas de maracujá, araçá, alecrim e orégano foram analisados segundo sua habilidade de detoxificar AFB₁, OTA e ZEN. As concentrações iniciais de OTA e ZEN (16,67 ng/mL para cada micotoxina) não diferenciaram de seus respectivos controles para todos os tempos de incubação (dados não mostrados), indicando a ausência de efeito de degradação nessas micotoxinas. No entanto, foi observada uma redução de AFB₁ dependente do tempo de incubação para todas as plantas testadas, como apresentado na Tabela 3. Iram et al. (2016) estudando extratos de *Ocimum basilicum* (manjerição) e *Cassia fistula* (cássia imperial) encontraram resultados semelhantes com relação ao período de incubação maiores que 72h em que foram analisadas a detoxificação das aflatoxinas B₁ e B₂. Quanto maior o tempo de incubação maior a porcentagem de redução encontrada. Os mesmos autores confirmam que o efeito de redução de toxicidade se deu pela remoção da dupla ligação no anel furânico terminal e na modificação do grupo lactona. Na molécula de AFB₁ a presença de dupla ligação no anel furânico terminal é relacionada as atividades tóxicas e carcinogênicas encontradas (WANG et al., 2011). Portanto, há evidências de que quanto maior o período de incubação com os extratos de plantas, maior será a modificação na estrutura molecular das aflatoxinas, dessa forma, reduzindo sua toxicidade progressivamente. Outros estudos encontrados na literatura também suportam a ideia de que o mecanismo de ação dos

extratos de plantas está envolvido na modificação da estrutura do anel de lactona (VELAZHAHAN et al., 2010; VIJAYANANDRAJ et al., 2014).

Tabela 2 - Compostos químicos encontrados nos extratos de folhas das plantas após a análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas.

Extrato do folhas	Composto químico	Porcentagem (%)
Maracujá doce (<i>Passiflora alata</i>)	Isononane	31,3
	3-Ethyl-2-methylhexane	16,8
	Methyl-2-methylundecanoate	12,9
	Heptanenitrile	11,4
Araçá (<i>Psidium cattleianum</i>)	Isocaryophyllene	28,9
	Eucaliptol	11,7
	Naphthalene	7,6
	gamma Muurolene	7,2
	Humulene	5,9
	2,6,10,10-Tetramethylbicyclo[7.2.0]undeca-2,6-diene	5,8
	Allo-aromadendrene	5,4
	Cycloheptane	5,0
Alecrim (<i>Rosmarinus officinalis</i>)	Camphor	39,7
	Verbenona	34,5
	Borneol	6,7
Orégano (<i>Origanum vulgare</i>)	Terpinen-4-ol	25,8
	Oxalic acid, isohexyl neopentyl ester	22,9
	8-Methylundec-1-ene	20,3
	Carvacrol	11,4

Fonte: Autoria própria

Tabela 3 - Concentrações de aflatoxina B₁ (ng/mL) em extratos aquosos de plantas no ensaio de descontaminação de acordo com o período de incubação¹.

Extratos de folhas	Período de Incubação (h)			
	12	24	36	48
Maracujá “doce” (<i>Passiflora alata</i> , Curtis)	16,4 ± 0,07	13,55 ± 0	11,0 ± 0,08	10,15 ± 0
Araçá (<i>Psidium cattleianum</i> , Sabine)	15,27 ± 0	12,9 ± 0,08	10,3 ± 0,12	9,07 ± 0,02
Alecrim (<i>Rosmarinus officinalis</i> , L.)	11,9 ± 0,16	8,02 ± 0,14	6,55 ± 0	5,05 ± 0,08
Orégano (<i>Origanum vulgare</i> , L.)	14,02 ± 0,16	12,05 ± 0,05	10,3 ± 0,09	7,85 ± 0,13

¹ Valores expressos como média ± desvio padrão das amostras analisadas em triplicata.

Fonte: Autoria própria

As reduções percentuais de AFB₁ nos extratos aquosos das folhas nos ensaios de descontaminação em diferentes tempos de incubação são apresentadas na Tabela 4. As taxas de degradação foram comparadas com o experimento controle nas mesmas condições de incubação. Os quatro extratos apresentaram algum efeito contra o AFB₁ com diferentes taxas de redução de toxinas, de acordo com o tempo de incubação. O extrato mais eficiente e com as maiores porcentagens de redução de AFB₁ foi o alecrim com uma degradação média de 60,3 ± 2,9% após 48 h de incubação. O segundo extrato com maior percentual foi o orégano, com 38,3 ± 4,6%, não diferindo estatisticamente do araçá com 30 ± 2,0%. No presente estudo, observou-se que a melhor redução de aflatoxinas ocorreu às 48 horas de incubação. O extrato de alecrim não demonstrou diferença entre si nos tempos de 24, 36 ou 48 h (P>0,05). Ao comparar os diferentes extratos no período de 48 h, com exceção do araçá, todos mostraram um aumento no percentual de redução.

Tabela 4 - Porcentagem de redução de aflatoxina B₁ (AFB₁) em extratos aquosos das plantas provenientes de folhas no ensaio de descontaminação em diferentes tempos de incubação ¹.

Extratos de folhas	Redução de AFB ₁ (%) ²			
	12 h ³	24 h	36 h	48 h
Maracujá doce (<i>Passiflora alata</i> , Curtis)	0 ^{cA}	5,0 ± 6,9 ^{cA}	10,3 ± 9,3 ^{cA}	12,7 ± 10,9 ^{cA}
Araçá (<i>Psidium cattleianum</i> , Sabine)	9,0 ± 5,2 ^{bB}	18,7 ± 4,7 ^{bcB}	30,7 ± 3,8 ^{bA}	30,0 ± 2,0 ^{bA}
Alecrim (<i>Rosmarinus officinalis</i> , L.)	31,3 ± 8,7 ^{aB}	49,0 ± 5,6 ^{aA}	51,3 ± 2,3 ^{aA}	60,3 ± 2,9 ^{aA}
Orégano (<i>Origanum vulgare</i> , L.)	18,7 ± 9,3 ^{abB}	22,7 ± 5,5 ^{bB}	26,0 ± 3,0 ^{bAB}	38,3 ± 4,6 ^{bA}

¹ Valores expressos como média ± desvio padrão das amostras analisadas em triplicata.

² Porcentagem de redução de AFB₁ em extratos de folhas contendo 16,67ng AFB₁/mL no tempo 0.

³ Períodos de incubação de extratos de plantas com AFB₁ (12, 24, 36 ou 48 h).

^{a-c} Na mesma coluna, médias seguidas de diferentes letras minúsculas diferem significativamente (P<0,05).

^{A-B} Na mesma linha, medias seguidas de diferentes letras maiúsculas diferem significativamente (P<0,05).

Fonte: Autoria própria

O maracujá doce, *Passiflora alata*, é uma planta nativa brasileira com diversas preparações farmacológicas já registradas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA (NORIEGA et al., 2011). Apesar de possuir alguns efeitos calmantes e anti-inflamatórios já conhecidos e comprovados por pesquisas (VARGAS et al., 2007), sua ação antimicrobiana e antioxidante é desconhecida. Dentre as três espécies de *Passiflora* mais comuns (*P. edulis*, *P. alata* e *P. incarnata*) a oficial brasileira é a menos estudada (PEREIRA; VILEGAS, 2000). Apesar de terem sido encontradas porcentagens de redução para AFB₁ com o extrato de maracujá (12,7±10,9%), estatisticamente os resultados não diferem entre si demonstrando uma ação não significativa da planta na descontaminação. A análise dos compostos da planta revelou a presença de poucos compostos biologicamente ativos, condizendo com os resultados encontrados. O composto de maior concentração foi o

isononane (31,29%) um hidrocarboneto também presente na erva-de-São-João (*Hypericum perforatum*) vinculado a efeitos psicotróficos e a neutralização de determinadas toxinas em venenos de cobras (SAMY; GOPALAKRISHNAKONE; CHOW, 2012), mas sem nenhum registro em literatura sobre ação antimicrobiana.

O araquá, *P. catleianum*, apresentou redução de toxicidade para AFB₁ apesar de em baixas porcentagens. Segundo nossas análises a ação dessa planta só foi efetiva a partir de 36h de incubação não tendo diferença estatística entre os períodos de 36 e 48hs. Os resultados foram parecidos dos encontrados com o orégano. O araquá é uma planta nativa brasileira popularmente utilizada para diversos fins, inclusive recentemente, para atividade antimicrobiana e antioxidante (DENARDIN et al., 2015; MEDINA et al., 2011; SCUR et al., 2016). Em um trabalho realizado por nosso grupo de pesquisa o araquá revelou a melhor ação antimicrobiana com baixas concentrações necessárias para inibir bactérias patogênicas em comparação com as outras quatro plantas (resultados não publicados/ não mostrados). A análise de seus compostos revelou a presença de diversos tipos de hidrocarbonetos e terpenos, vinculados à ação antimicrobiana.

As plantas do gênero *Ocimum* são reconhecidas pela ação contra microrganismos, seus principais compostos bioativos são cariofileno, eucaliptol, gama muurolene (PANDEY; SINGH; TRIPATHI, 2014). O extrato de araquá estudado também revelou a presença desses compostos indicando um bom potencial de ação antimicrobiana. No entanto, não foi possível identificar quais moléculas foram responsáveis pela ação detoxificante de AFB₁. Até o momento, não existe descrição na literatura, além do presente estudo, sobre o efeito de detoxificação causado pelo araquá. Ainda não se sabe ao certo se este efeito está vinculado a compostos químicos ou a enzimas presentes nos extratos de determinadas plantas (LOI et al., 2017; NWAGU; IRE, 2011). Por ser um estudo prévio de possível atividade detoxificante, apesar dos resultados do araquá não terem sido expressivos, não devem servir para descartar as possibilidades de utilização futuras desta planta para detoxificação de aflatoxinas.

Velazhahan et al. (2010) após testarem os extratos aquosos de folhas e sementes de *Trachyspermum ammi* (ajowan) analisaram os produtos resultantes da degradação de AFG₁. Foi sugerido que o princípio atrelado a detoxificação seja um composto de alto peso molecular (não - dialisável), sensível a temperaturas acima de 100 °C e solúvel em água. O mesmo foi encontrado por Vijayanandraj et al. (2014) analisando os compostos da degradação de AFB₁ pelo extrato de folhas de *Adhatoda vasica* Nees. Os mesmos autores afirmam que alcaloides já foram detectados nas folhas dessa espécie de planta, em extratos brutos e parcialmente purificados, (KAPGATE; PATIL, 2017) sugerindo que o princípio da

detoxificação esteja vinculado a essas moléculas. Nenhum dos extratos estudados revelaram presença significativa de alcaloides em seus compostos bioativos. Talvez essa seja uma das explicações para os resultados encontrados não terem sido tão elevados no percentual de redução quando comparados a outros estudos com extratos aquosos de plantas (IRAM et al., 2015; VELAZHAHAN et al., 2010; VIJAYANANDRAJ et al., 2014).

Gorran et al. (2013) estudaram três plantas medicinais pertencentes a família Lamiaceae: *Thymus daenensis*, *Satureja khozistanica*, *Satureja macrosiphonia* e encontraram degradação de AFB₁ com extratos aquosos. O extrato de *T. daenensis* na concentração de 1000mg/L demonstrou uma porcentagem de redução de 73,25% em 24h de incubação. Segundo os mesmos autores essa espécie é endêmica no Irã e utilizada em diversas aplicações como produtos farmacêuticos, cosméticos, perfumaria e inclusive alimentos. As duas plantas da família Lamiaceae analisadas neste trabalho, alecrim e orégano, também são muito conhecidas e utilizadas principalmente na culinária brasileira e provavelmente não possuem propriedades toxinas quando ingeridas em doses controladas (BORGES et al., 2019; GULDIKEN et al., 2018). Os resultados encontrados podem sugerir uma possível utilização dessas plantas para o controle de aflatoxinas em substratos contaminados, no entanto mais estudos ainda precisam ser realizados para confirmar tais efeitos.

De acordo com Nwagu et al. (2011) alguns extratos de plantas já foram testados para controlar o crescimento de fungos produtores de OTA. Alguns dos óleos essenciais e extratos já testados foram orégano, louro, cravo, canela e tomilho. Romero et al. (2009) demonstrou a inibição do crescimento de *A. carbonarius* e da biossíntese de OTA por compostos flavonoides e não-flavonoides. Os mesmos autores ainda afirmam que a presença de compostos fenólicos foram os responsáveis pela total inibição da produção da toxina pelo fungo. No entanto, estudos que relatam a degradação dessa micotoxina previamente formada não foram encontrados. Apesar dos resultados encontrados não terem sido satisfatórios e as plantas estudadas não demonstrarem ação na degradação de OTA, novas investigações precisam ser feitas neste sentido. Estimasse que a ação de degradação esteja relacionada com o efeito antimicrobiano e de biossíntese da toxina, portanto podem existir plantas que possuam a habilidade de detoxificar a micotoxina previamente formada.

Com relação a ZEA, o presente estudo não identificou ação detoxificante com nenhum dos quatro extratos testados. O mesmo resultado foi encontrado por Perczak et al. (2016) quando avaliado o óleo essencial de alecrim. No entanto, o mesmo estudo avaliou outros óleos essenciais de diferentes plantas: madeira de cedro (*Juniperus virginiana*), folha e casca da canela (*Cinnamomum zeylanicum*), casca do limão (*Citrus limonum*), casca da toranja

(*Citrus paradisi*), casca do pomelo (*Citrus grandis*), folha de eucalipto (*Eucalyptus radiata*) e folha da palmarosa (*Cymbopogon martinii*), todos com ação na redução da toxina. Segundo os mesmos autores o tempo de incubação teve influência na detoxificação, ou seja, quando maior o tempo de incubação maiores porcentagens de degradação de ZEA foram encontradas. Semelhante ao encontrado para a degradação de AFB₁. Ainda que o presente estudo não tenha encontrado resultados para a degradação de ZEA, de acordo com a literatura já se sabe que algumas plantas possuem essa habilidade, portanto existem perspectivas futuras no uso desses extratos para o auxílio na descontaminação de alimentos.

5.4 Conclusão

No presente estudo, o melhor resultado encontrado para a degradação de AFB₁ foi obtido com o alecrim, evidenciando uma possível aplicação em substratos alimentícios. Aparentemente, os compostos presentes nos extratos das plantas apresentaram influência na atividade de degradação da micotoxina em questão. No entanto ainda não é possível confirmar tal efeito, pois o mesmo pode estar associado à existência de enzimas detoxificantes. O uso de plantas com ação anti-micotoxinas pode ser considerado uma alternativa segura para humanos e para o meio-ambiente. Este é o primeiro estudo que investigou a degradação de aflatoxinas com extratos de folhas de *Passiflora alata*, *Psidium cattleianum*, *Rosmarinus officinalis* e *Origanum vulgare*. Estudos complementares são necessários para esclarecer os mecanismos de degradação que alguns extratos de plantas possuem diretamente sobre a AFB₁.

Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

Agradecimentos

Este estudo foi financiado em parte pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código Financeiro 001.

5.5 Referências

AGÊNCIA INTERNACIONAL DE PESQUISA EM CÂNCER - IARC. **Some naturally occurring substances: food and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins.** Lyon: IARC, 1993. (Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans, 56).

AGÊNCIA INTERNACIONAL DE PESQUISA EM CÂNCER – IARC. **Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene.** Lyon: IARC, 2002.

(Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans, 82).

BORGES, R. S. et al. *Rosmarinus officinalis* essential oil: A review of its phytochemistry, anti-inflammatory activity, and mechanisms of action involved. **Journal of Ethnopharmacology**, Amsterdam, v.229, p. 29-45, 2019.

BOVO, F. et al. Efficiency of lactic acid bacteria strains for decontamination of aflatoxin M1 in phosphate buffer saline solution and in skimmed milk. **Food and Bioprocess Technology**, New York, v. 6, n. 8, p. 2230–2234, 2013.

BRINDA, R. et al. Role of adhatoda vasica (L.) nees leaf extract in the prevention of aflatoxin-induced toxicity in Wistar rats. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Oxford, v. 93, n. 11, p. 2743–2748, 2013.

CAMPAGNOLLO, F. B. et al. The prevalence and effect of unit operations for dairy products processing on the fate of aflatoxin M₁: a review. **Food Control**, London, v.68, p. 310-329, 2016.

COUNCIL FOR AGRICULTURAL SCIENCE AND TECHNOLOG - CAST. **Mycotoxins: risk in plant, animal and human systems**. Ames: CAST, 2003.

CHAYTOR, A. C. et al. Occurrence and decontamination of mycotoxins in swine feed. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, Suwon, v. 24, n. 5, p. 723–738, 2011.

DENARDIN, C. C. et al. Antioxidant capacity and bioactive compounds of four Brazilian native fruits. **Journal of Food and Drug Analysis**, Taipei, v. 23, p. 387-398, 2015.

FERREIRA, F. D. et al. Inhibitory effect of the essential oil of *Curcuma longa* L. and curcumin on aflatoxin production by *Aspergillus flavus* link. **Food Chemistry**, Oxford, v. 136, n. 2, p. 789–793, 2013.

GONELIMALI, F. D. et al. Antimicrobial properties and mechanism of action of some plant extracts against food pathogens and spoilage microorganisms. **Frontiers in Microbiology**, Boca Raton, v. 9, p. 1–9, 2018.

GORRAN, A. et al. Aflatoxin B1-reduction of *Aspergillus flavus* by three medicinal plants (Lamiaceae). **Food Control**, London, v. 31, n. 1, p. 218–223, 2013.

GULDIKEN, B. et al. Phytochemicals of herbs and spices: health versus toxicological effects. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 119, p. 37-49, 2018.

IRAM, W. et al. Mass spectrometric identification and toxicity assessment of degraded products of aflatoxin B1 and B2 by *Corymbia citriodora* aqueous extracts. **Scientific Reports**, London, v. 5, article e14672, p. 14672, 2015.

IRAM, W. et al. Structural elucidation and toxicity assessment of degraded products of aflatoxin B1 and B2 by aqueous extracts of *Trachyspermum ammi*. **Frontiers in Microbiology**, Boca Raton, v. 7, article 346, p. 1-16, 2016.

ISMAIL, A. et al. Aflatoxin in foodstuffs: occurrence and recent advances in

decontamination. **Food Research International**, Barking, v. 113, p. 74–85, 2018.

KAPGATE, S. M.; PATIL, A. B. Adhatoda vasica: a critical review. **International Journal of Green Pharmacy**, Mumbai, v. 11, n. 4, p. S654–S662, 2017.

KHORSHIDIAN, N. et al. Potential application of essential oils as antimicrobial preservatives in cheese. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, Amsterdam, v. 45, p. 62–72, 2018.

LAGROUH, F.; DAKKA, N.; BAKRI, Y. The antifungal activity of Moroccan plants and the mechanism of action of secondary metabolites from plants. **Journal de Mycologie Médicale**, Paris, v. 27, n. 3, p. 303–311, 2017.

LOI, M. et al. Mycotoxin biotransformation by native and commercial enzymes: present and future perspectives. **Toxins**, Basel, v. 9, n. 4, p. 111, 2017. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/2072-6651/9/4/111>>. Acesso em: 31 out. 2018.

MEDINA, A. L. et al. Araçá (*Psidium cattleianum* Sabine) fruit extracts with antioxidant and antimicrobial activities and antiproliferative effect on human cancer cells. **Food Chemistry**, Oxford, v. 128, n. 4, p. 916–922, 2011.

NORIEGA, P. et al. Passiflora alata curtis: a Brazilian medicinal plant . **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas**, Santiago, v. 10, n. 5, p. 398–413, 2011.

NOSTRO, A.; PAPALIA, T. Antimicrobial activity of carvacrol: current progress and future prospectives. **Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery**, Amsterdam, v. 7, n. 1, p. 28–35, 2012.

NWAGU, T. N. T.; IRE, F. S. Ochratoxin in cocoa, health risks and methods of detoxification. **International Journal of Agricultural Research**, Pakistan, v. 6, n. 2, p. 101–118, 2011.

PANDEY, A. K.; SINGH, P.; TRIPATHI, N. N. Chemistry and bioactivities of essential oils of some Ocimum species: an overview. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, Amsterdam, v. 4, n. 9, p. 682–694, 2014.

PERCZAK, A. et al. Degradation of zearalenone by essential oils under in vitro conditions. **Frontiers in Microbiology**, Boca Raton, v. 7, p. 1224, 2016.

PEREIRA, C. A. M.; VILEGAS, J. H. Y. Constituintes químicos e farmacologia do gênero Passiflora com ênfase a P. alata Dryander., P. edulis Sims e P. incarnata L. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v. 3, n. 1, p. 1–12, 2000.

PERUMAL SAMY, R.; GOPALAKRISHNAKONE, P.; CHOW, V. T. Therapeutic application of natural inhibitors against snake venom phospholipase A(2). **Bioinformation**, Singapore, v. 8, n. 1, p. 48–57, 2012.

PONZILACQUA, B.; CORASSIN, C. H.; OLIVEIRA, C. A. F. Antifungal activity and detoxification of aflatoxins by plant extracts: potential for food applications. **The Open Food**

Science Journal, Hilversum, v. 10, n. 1, p. 24-32, 2018.

RICHARD, J. L. Some major mycotoxins and their mycotoxicoses - an overview. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 119, n. 1–2, p. 3–10, 2007.

ROMERO, S. M. et al. Inhibition of growth and ochratoxin A biosynthesis in *Aspergillus carbonarius* by flavonoid and nonflavonoid compounds. **Mycotoxin Research**, Berlin, v. 25, n. 3, p. 165–170, 2009.

SANDOSSKUMAR, R. et al. Inhibition of *Aspergillus flavus* growth and detoxification of aflatoxin B1 by the medicinal plant zimmu (*Allium sativum* L. x *Allium cepa* L.). **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Seoul, v. 23, n. 7, p. 1007–1014, 29 maio 2007.

SAS INSTITUTE. **SAS user's guide**: statistics. Cary: SAS Institute Inc. 1992.

SCUR, M. et al. Antimicrobial and antioxidant activity of essential oil and different plant extracts of *Psidium cattleianum* Sabine. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 76, n. 1, p. 101–108, 2016.

SOKOVIĆ, M. et al. Antibacterial effects of the essential oils of commonly consumed medicinal herbs using an in vitro model. **Molecules**, Basel, v. 15, n. 11, p. 7532–7546, 2010.

VARGAS, A. J. et al. *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* spray-dried aqueous extracts inhibit inflammation in mouse model of pleurisy. **Fitoterapia**, Milano, v. 78, n. 2, p. 112–119, 2007.

VASIĆ, S. M. et al. Biological activities of extracts from cultivated granadilla *Passiflora alata*. **EXCLI Journal**, Mainz, v. 11, p. 208–218, 2012.

VELAZHAHAN, R. et al. Detoxification of aflatoxins by seed extracts of the medicinal plant, *Trachyspermum ammi* (L.) Sprague ex Turrill - structural analysis and biological toxicity of degradation product of aflatoxin G1. **Food Control**, London, v. 21, n. 5, p. 719–725, 2010.

VIJAYANANDRAJ, S. et al. Detoxification of aflatoxin B1 by an aqueous extract from leaves of *Adhatoda vasica* Nees. **Microbiological Research**, Berlin, v. 169, n. 4, p. 294–300, 2014.

WANG, F. et al. Structure elucidation and toxicity analyses of the radiolytic products of aflatoxin B1 in methanol–water solution. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 192, n. 3, p. 1192–1202, 2011.

ZHOU, G. et al. Detoxification of aflatoxin B₁ by *Zygosaccharomyces rouxii* with solid state fermentation in peanut meal. **Toxins**, Basel, v.42, p. 1-9, 2017.

WU, Q. et al. Biological degradation of aflatoxins. **Drug Metabolism Reviews**, New York, v. 41, n. 1, p. 1–7, 2009.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O uso de plantas medicinais é uma prática conhecida empiricamente há anos. O presente estudo demonstrou que o extrato etanólico de araçá (*Psidium cattleianum*) teve bom desempenho na ação antimicrobiana contra *S. aureus*. De acordo com literatura, os resultados de concentração inibitória mínima foram satisfatórios e de forte inibição para essa espécie de planta. Já em relação ao extrato de maracujá doce (*Passiflora alata*) não foi observado nenhum efeito inibitório para nenhum dos microrganismos patogênicos testados, resultado atribuído aos compostos bioativos ausentes no extrato.

As plantas que apresentaram efeito antimicrobiano também demonstraram degradação de AFB₁ em diferentes graus. O extrato aquoso com maior efeito de detoxificação foi o alecrim (*Rosemary officinalis*). A análise de seus compostos revelou presença de substâncias bioativas já consagradas e conhecidas na literatura que podem estar relacionadas à atividade de degradação. O extrato de orégano (*Origanum vulgare*) e de araçá apresentaram efeito de degradação em menores quantidades. Foi constatado que a porcentagem de degradação aumentou com o período de incubação extrato – micotoxina, independentemente do tipo de extrato.

Os resultados ressaltam a importância que tais espécies de plantas possam vir a ter no controle de microrganismos e aflatoxinas presentes em alimentos. No entanto, novos estudos precisam ser realizados com a finalidade de confirmar estas ações diretamente *in vivo*, o grau de toxicidade e as concentrações necessárias para inibição. Esse estudo confirma que algumas espécies podem ser boas alternativas no desenvolvimento de novas tecnologias para prevenção e tratamento de alimentos contaminados por serem extratos biodegradáveis, biologicamente seguros, renováveis e de baixo custo.

ANEXOS

Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Certidão
Cadastro nº A061748

Declaramos, nos termos do art. 41 do Decreto nº 8.772/2016, que o cadastro de acesso ao patrimônio genético ou conhecimento tradicional associado, abaixo identificado e resumido, no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado foi submetido ao procedimento administrativo de verificação e não foi objeto de requerimentos admitidos de verificação de indícios de irregularidades ou, caso tenha sido, o requerimento de verificação não foi acatado pelo CGen.

Número do cadastro: **A061748**
Usuário: **Bárbara Ponzilacqua Silva**
CPF/CNPJ: **384.341.908-69**
Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**
Finalidade do Acesso: **Pesquisa**

Espécie

Passiflora alata
Origanum vulgare
Rosmarinus officinalis
Psidium cattleianum

Título da Atividade: **Avaliação de extratos de plantas quanto à atividade antimicrobiana e à detoxificação de aflatoxina B1**

Equipe

Bárbara Ponzilacqua Silva **INDEPENDENTE**
Carlos Augusto Fernandes de Oliveira **Reitoria da Universidade de São Paulo**

Parceiras Nacionais

63.025.530/0097-56 / Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da USP

Data do Cadastro: **12/03/2018 13:12:57**
Situação do Cadastro: **Concluído**

Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **18:33** de **01/11/2018**.

**SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
ASSOCIADO - SISGEN**

Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Comprovante de Cadastro de Acesso

Cadastro nº A061748

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro: **A061748**
Usuário: **Bárbara Ponzilacqua Silva**
CPF/CNPJ: **384.341.908-69**
Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**
Finalidade do Acesso: **Pesquisa**

Espécie

Passiflora alata
Origanum vulgare
Rosmarinus officinalis
Psidium cattleianum

Título da Atividade: **Avaliação de extratos de plantas quanto à atividade antimicrobiana e à detoxificação de aflatoxina B1**

Equipe

Bárbara Ponzilacqua Silva	INDEPENDENTE
Carlos Augusto Fernandes de Oliveira	Reitoria da Universidade de São Paulo

Parceiras Nacionais

63.025.530/0097-56 / Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da USP

Data do Cadastro: **12/03/2018 13:12:57**
Situação do Cadastro: **Concluído**

Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **18:35** de **01/11/2018**.

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
ASSOCIADO - **SISGEN**

Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Comprovante de Cadastro de Acesso

Cadastro nº A438604

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro: **A438604**
Usuário: **Reitoria da Universidade de São Paulo**
CPF/CNPJ: **63.025.530/0001-04**
Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**
Finalidade do Acesso: **Pesquisa**

Espécie

Passiflora alata
Origanum vulgare
Rosmarinus officinalis
Psidium cattleianum

Título da Atividade: **Avaliação de extratos de plantas quanto à atividade antimicrobiana e à detoxificação de aflatoxina B1**

Equipe

Carlos Augusto Fernandes de Oliveira **Reitoria da Universidade de São Paulo**
Bárbara Ponzilacqua Silva **Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da U**

Envios de Amostra

Espécie: **Passiflora alata**
Tipo do Patrimônio Genético: **-**
Forma do Patrimônio Genético: **Outra**

Instituição Destinatária: **University of Missouri**
Sede da Instituição Destinatária: **1600 East Rolins Street, Columbia, Missouri, 65211, Estados Unidos**
Espécie: **Psidium cattleianum**
Tipo do Patrimônio Genético: **-**
Forma do Patrimônio Genético: **Outra**
Instituição Destinatária: **University of Missouri**
Sede da Instituição Destinatária: **1600 East Rollins Street, Columbia, Missouri, 65211, Estados Unidos**

Data do Cadastro: **02/05/2018 16:46:10**
Situação do Cadastro: **Concluído**

Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **10:05** de **12/05/2018**.

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
ASSOCIADO - **SISGEN**