

# **CAPÍTULO IV – Investigação do potencial toxigênico de fungos isolados em drogas vegetais**

## **4.1 – INTRODUÇÃO**

A identificação das espécies fúngicas contaminantes é um importante sinalizador quanto à possível presença de micotoxinas em produtos. Entretanto, seu isolamento e identificação nem sempre está associado à detecção de micotoxinas, considerando que o fungo pode não ter sido exposto a condições favoráveis que permitam a produção de toxinas e que existem dentro de uma mesma espécie cepas que não possuem a capacidade para a síntese de micotoxinas, sendo, portanto sugerida a avaliação de seu potencial toxigênico (BRAGULAT *et al*, 2001; CHOURASIA, 1995; CORRÊA *et al*, 1997; COSTA e SCUSSEL, 2002; FARIAS *et al*, 2000; GELLI *et al*, 1990; HARA *et al*, 1974; HESSELTINE *et al*, 1966; LIN e DIANESE, 1976; LLEWELLYN *et al*, 1981; PITT *et al*, 2000; ROY *et al*, 1988; ROY e CHOURASIA, 1989; ROY e KUMARI, 1991; STOLOFF, 1979; YONG e COUSIN, 2001).

Para a verificação do potencial toxigênico de cepas isoladas de produtos, são fornecidas condições adequadas ao desenvolvimento e à produção de toxina.

Em seguida a toxina é extraída com solvente orgânico, como clorofórmio ou diclorometano, e o extrato submetido a técnicas cromatográficas para avaliar a presença de micotoxinas (ASSANTE *et al*, 1981; BRAGULAT *et al*, 2001; CHOURASIA, 1995; CORRÊA *et al*, 1997; COSTA e SCUSSEL, 2002; CVETNIC e PEPELJNJAK, 1997;

EFUNTOYE, 1999; ELSHAFIE *et al*, 1999, 2002; FARIAS *et al*, 2000; GARRIDO *et al*, 1992; GELLI *et al*, 1990; HARA *et al*, 1974; HESSELTINE *et al*, 1966; LIN e DIANESE, 1976; LLEWELLYN *et al*, 1981; LUTOMSKI e KEDZIA, 1980; NUÑEZ *et al*, 1996; PARDO *et al*, 2004; ROY *et al*, 1988; ROY e CHOURASIA, 1989; ROY e KUMARI, 1991; RUIZ *et al*, 1996; SHOTWELL *et al*, 1966; SORENSON *et al*, 1967).

A verificação do potencial micotoxigênico pode ser realizada pela inoculação dos isolados fúngicos em meios de cultura:

- Líquidos, como:

- a) *Yeast Extract and Sucrose Medium* (YES), utilizado por BRAGULAT *et al*, 2001; BRESLER *et al*, 1995; CHOURASIA, 1995; ELSHAFIE *et al*, 1999, 2002; GELLI *et al*, 1990; LUTOMSKI e KEDZIA, 1980 e por REN *et al*, 1999;

- b) Meio SMKY, utilizado por CHOURASIA, 1995; EFUNTOYE, 1999; ROY *et al*, 1988; ROY e CHOURASIA, 1989 e por ROY e KUMARI, 1991;

- Sólidos, entre os quais podem ser citados:

- a) *Aflatoxin Producing Ability Medium* (APA), desenvolvido nos Estados Unidos em 1974 para detecção rápida de aflatoxigenicidade, utilizado por ASSANTE *et al*, 1981; CVETNIC e PEPELJNJAK, 1997; GARRIDO *et al*, 1992; HARA *et al*, 1974 e por RUIZ *et al*, 1996;

- b) *Malt Extract Agar* (MEA), utilizado por NUÑEZ *et al*, 1996 e por REN *et al*, 1999;

- c) Agar Côco (*Coconut Agar Medium*, CAM), desenvolvido no Brasil por Lin e Dianese (1976) para detecção de fungos produtores de aflatoxinas, ocratoxinas e citrinina, utilizado por CORRÊA *et al*, 1997; COSTA e SCUSSEL, 2002; e por FARIAS *et al*, 2000.

## 4.2 – MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.2.1 – Amostras

Durante a avaliação da qualidade microbiana de drogas vegetais (Capítulo II), foram isolados 248 fungos de diversos gêneros, sendo que 223 destes isolados foram identificados como pertencentes aos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*. Todos estes 223 isolados fúngicos foram avaliados quanto ao seu potencial em produzir aflatoxinas (AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> e AFG<sub>2</sub>), ocratoxina A e citrinina.

### 4.2.2 – Materiais

- Meios de cultura

Agar Côco (conforme LIN e DIANESE, 1976)

Composição: Leite de côco – marca socôco (230 mL/L) e Agar (20 g/L)

- Reagentes

Acetato de etila PA, Merck

Acetona PA, Merck

Ácido fórmico PA, Merck

Ácido trifluoroacético, Sigma

Clorofórmio PA, Merck

Clorofórmio PA, Merck

Solução de ácido sulfúrico a 50%

Solução etanólica de BF<sub>3</sub>

Tolueno PA, Merck

- **Padrão de micotoxinas**

Aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub>, Sigma

Ocratoxina A, Sigma

Citrinina, Sigma

- **Insumos**

Agulha bacteriológica

Cromatofolha de alumínio, Merck

(20 x 20) cm, coberta com camada de 0,25 mm de espessura de silicagel G60 sem indicador de fluorescência

Espátulas

Frascos de vidro, boca larga

Microseringas, com capacidade para 1 µL e 10 µL, Hamilton

Papel de filtro, Whatman

Placas de Petri, 15 x 100 mm, estéreis

Ponteiras descartáveis, com capacidade para 1000 µL

Tubos de ensaio, 25 x 150 mm

- **Equipamentos**

Agitador mecânico tipo Shaker, Innova 4230, New Brunswick Scientific

Balança semi-analítica, Micronal

Banho-maria a 80°C, alocado em capela de segurança química

Câmara para visualização com lâmpada UV (365 nm), Camag

Cuba cromatográfica, Camag

Freezer, Brastemp

Incubadora BOD,  $26 \pm 1$  °C, Fanem

Pipetador monocanal, volume variável, 100 a1000 µL, Boeco

#### **4.2.3 – Métodos**

##### **4.2.3.1 – Preparação da amostra**

Para a avaliação do potencial aflatoxigênico e ocratoxigênico, cada um dos fungos isolados foi inoculado, com auxílio de agulha bacteriológica, no centro de placa contendo Agar Coco apresentando pH  $7,0 \pm 0,1$  e incubado a  $(26 \pm 1)$  °C por 10 dias.

Para a avaliação do potencial para produzir citrinina, cada um dos fungos isolados foi inoculado, com auxílio de agulha bacteriológica, no centro de placa

contendo Agar Coco apresentando pH  $5,0 \pm 0,1$  e incubado a  $(26 \pm 1)$  °C por 10 dias (COSTA e SCUSSEL, 2002; LIN e DIANESE, 1976).

#### **4.2.3.2 – Análise micotoxicológica**

##### **4.2.3.2.1 – Extração da micotoxina**

Após o período de incubação, cada colônia desenvolvida e o meio de cultura foram transferidos para frasco em vidro de boca larga, pesados e macerados com clorofórmio, na proporção de 3,0 mL para cada 1,0 g de material.

O macerado foi mantido em agitação por 30 minutos, em agitador mecânico horizontal tipo *Shaker* e então filtrado, em papel de filtro, sendo o filtrado recolhido em tubo de ensaio e evaporado em banho-maria a 80°C alocado em capela de segurança química.

O resíduo obtido foi, então, armazenado em freezer até o momento de ser realizada a análise.

#### 4.2.3.2.2 – Detecção da micotoxina

As micotoxinas foram detectadas por cromatografia em camada delgada, conforme descrito por Soares e Rodriguez-Amaya (1989).

Foram marcados quatro *spots* na cromatofolha, localizados a 2,0 cm da base inferior da placa e com distância mínima de 1,0 cm entre eles.

O resíduo obtido foi ressuspenso em 1 mL de clorofórmio e alíquota de 10 µL do extrato foi aplicada, com auxílio de microseringa, em um *spot* marcado. Em seguida, foram aplicadas alíquotas de 5 µL do padrão de ocratoxina A em um segundo *spot*, do padrão de citrinina em um terceiro *spot* e dos padrões de aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> em um quarto *spot*.

O cromatograma foi desenvolvido a temperatura ambiente, em cuba não saturada, utilizando sistema de solventes composto por tolueno, acetato de etila e ácido fórmico (50:40:10 v/v/v) e a visualização foi realizada sob luz ultravioleta (365 nm), para verificar a presença de fluorescência característica, bem como a comparação entre as distâncias R<sub>f</sub> de padrões e amostra.

#### 4.2.3.2.3 – Confirmação da identidade da micotoxina

A confirmação química da identidade da micotoxina foi realizada por técnicas adequadas.

A presença de aflatoxinas foi confirmada por derivatização com ácido trifluoroacético (SCOTT, 1995) e por aplicação de solução aquosa de ácido sulfúrico (50%) após o desenvolvimento do cromatograma (CHOURASIA, 1995; REIF e METZGER, 1995; ROY e CHOURASIA, 1989; ROY e KUMARI, 1991) ou por cromatografia bidimensional (SCOTT, 1995).

A presença de ocratoxina A foi confirmada por cromatografia bi-dimensional e por exposição do cromatograma a vapor de  $\text{NH}_3$  (SCOTT, 1995; VENTURA *et al*, 2005).

A presença de citrinina foi confirmada pela exposição do cromatograma a vapor de  $\text{NH}_3$  seguida da aplicação de solução etanólica de  $\text{BF}_3$  (CHOURASIA, 1995; ROY e KUMARI, 1991).

#### **A) Derivatização química com ácido trifluoroacético (TFA)**

Alíquotas de 10  $\mu\text{L}$  do extrato foram aplicadas, com auxílio de microsseringa, em dois *spots* marcados em placa para cromatografia. Em seguida, foram aplicadas duas alíquotas de 5  $\mu\text{L}$  dos padrões de aflatoxinas  $\text{B}_1$ ,  $\text{B}_2$ ,  $\text{G}_1$  e  $\text{G}_2$  em *spots* separados. Alíquotas de 2  $\mu\text{L}$  de TFA foram aplicadas sobre um *spot* de amostra e de cada padrão.

A placa foi mantida em câmara escura, a temperatura ambiente, por 5 minutos; em seguida foi aquecida em estufa a  $45^\circ\text{C}$  por 10 minutos e após esfriar, o cromatograma foi desenvolvido em cuba não saturada, utilizando sistema de



solventes composto por tolueno, acetato de etila e ácido fórmico (50:40:10), a temperatura ambiente.

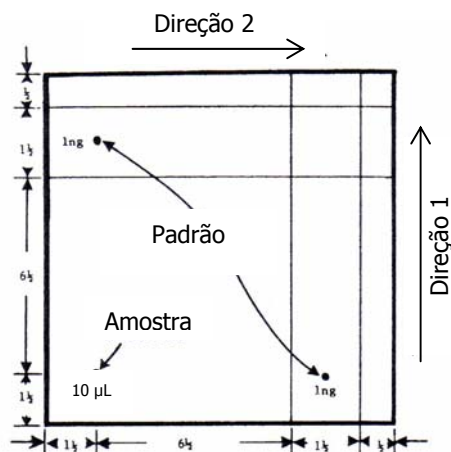
A visualização foi realizada sob luz ultravioleta (365 nm), para verificar a presença de fluorescência característica do composto derivatizado, a aflatoxina B<sub>2a</sub>, a 1/3 da distância R<sub>f</sub> da aflatoxina não derivatizada.

### **B) Aplicação de ácido sulfúrico (50%)**

Aspersão de solução aquosa de ácido sulfúrico (50%) sobre as manchas fluorescentes de aflatoxinas altera a fluorescência característica, azul ou verde, para amarela.

### **C) Cromatografia bi-dimensional**

Alíquota de 10 µL do extrato foi aplicada, com auxílio de microsseringa, em um *spot* marcado em placa para cromatografia, enquanto que alíquotas de 5 µL do padrão de ocratoxina A foram aplicadas *spots* marcados (Figura 4.1).



**FIGURA 4.1 – Esquema para desenvolvimento de cromatografia bi-dimensional**

O cromatograma foi desenvolvido a temperatura ambiente, em cuba não saturada, utilizando primeiro sistema de solventes composto por tolueno, acetato de etila e ácido fórmico (50:40:10 v/v/v).

Após o desenvolvimento do cromatograma, este foi mantido em temperatura ambiente, em capela de segurança química, para a evaporação dos solventes e então, desenvolvido em segundo sistema de solventes composto por clorofórmio e acetona (90:10 v/v).

A visualização foi realizada sob luz ultravioleta (365 nm), para verificar a presença de fluorescência característica, bem como a comparação entre as distâncias  $R_f$  de padrões e amostra.

#### **D) Exposição a vapor de $NH_3$**

A exposição do cromatograma a vapores de  $NH_3$  altera a fluorescência característica da ocratoxina A, aumentando sua intensidade. No caso de citrinina, a

exposição a vapor de  $\text{NH}_3$  faz desaparecer sua fluorescência amarela característica e quando aplicada solução etanólica de  $\text{BF}_3$ , aparece fluorescência verde.

#### **4.3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Durante a avaliação da qualidade microbiológica de drogas vegetais, os isolados fúngicos (N=248) apresentaram-se distribuídos em dez gêneros, sendo os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* mais freqüentemente detectados em relação aos demais, correspondendo a 72,2% e 17,7% do total de isolados, respectivamente (Figura 4.2).

Estes resultados apresentaram-se em conformidade com os resultados obtidos em outros estudos (ABOU-ARAB *et al*, 1999; AZIZ *et al*, 1998; CHOURASIA, 1995; EFUNTOYE, 1996; ELSHAFIE *et al*, 1999, 2002; GARRIDO *et al*, 1992; HALT, 1998; LUTOMSKI e KEDZIA, 1980; MANDEEL, 2005; MARTINS *et al*, 2001; RIZZO *et al*, 2004; ROY *et al*, 1988; ROY e CHOURASIA, 1989; ROY e KUMARI, 1991; SANTOS *et al*, 1995).

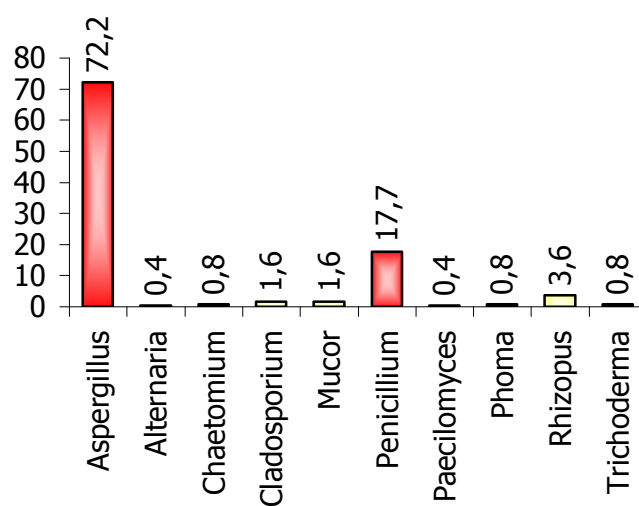


FIGURA 4.2 – Porcentagem de isolados fúngicos detectados em drogas vegetais em função do gênero

A Figura 4.3 apresenta a distribuição das espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* detectados em amostras de drogas vegetais.

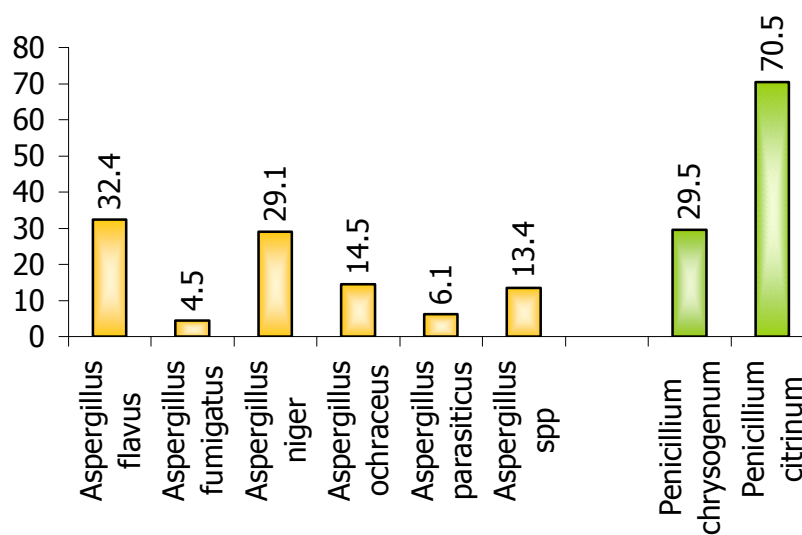


FIGURA 4.3 – Distribuição das espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* detectados em drogas vegetais

Todos estes isolados foram avaliados quanto ao seu potencial em produzir aflatoxinas, ocratoxina A e citrinina, sendo os resultados da análise micotoxicológica apresentados na Tabela 4.1.

Os números que aparecem no corpo da Tabela representam o número de amostras analisadas em que foram detectados isolados fúngicos produtores de aflatoxina B<sub>1</sub> ou aflatoxinas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> (a); aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> (b); ocratoxina A (c) e citrinina (d).

TABELA 4.1 – Incidência de fungos produtores de aflatoxinas, ocratoxina A e citrinina, isolados em drogas vegetais

Planta	Fornecedor	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Aspergillus parasiticus</i>	<i>Aspergillus ochraceus</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Aspergillus</i> spp	<i>Penicillium citrinum</i>	<i>Penicillium Chrysogenum</i>
Abutua	A	---	---	---	---	---	1 <sup>(d)</sup>	---	---
Alcachofra	B	1 <sup>(a)</sup>	---	---	---	---	---	---	---
Alcachofra	C	1 <sup>(a)</sup>	---	---	---	---	---	---	---
Alteia	D	---	1 <sup>(b)</sup>	---	---	---	---	---	---
Angélica	C	---	---	1 <sup>(c)</sup>	---	---	---	---	---
Boldo-do-Chile	A	---	---	1 <sup>(c)</sup>	---	---	---	---	---
Calumba	A	1 <sup>(a)</sup>	---	1 <sup>(c)</sup>	---	---	---	---	---
Caroba	B	---	1 <sup>(b)</sup>	---	---	---	---	---	---
Catuaba	A	---	---	---	---	---	---	1 <sup>(d)</sup>	---
Catuaba	E	---	1 <sup>(b)</sup>	---	---	---	---	1 <sup>(d)</sup>	---
Cavalinha	A	---	1 <sup>(b)</sup>	---	---	---	---	1 <sup>(d)</sup>	---
Centáurea menor	A	1 <sup>(a)</sup>	---	---	---	---	---	---	---
Chá-de-Bugre	D	---	---	---	---	---	---	1 <sup>(d)</sup>	---
Chapéu-de-couro	B	1 <sup>(a)</sup>	---	---	---	---	---	---	---
Escamônea	A	1 <sup>(a)</sup>	---	1 <sup>(c)</sup>	---	---	---	---	---
Espinheira Santa	B	---	---	---	---	---	---	1 <sup>(d)</sup>	---
Estigma de milho	B	---	1 <sup>(b)</sup>	---	---	---	---	---	---
Ginkgo biloba	D	---	---	---	---	---	---	1 <sup>(d)</sup>	---
Guaraná	C	1 <sup>(a)</sup>	---	1 <sup>(c)</sup>	---	---	---	1 <sup>(d)</sup>	---
Guaraná	D	1 <sup>(a)</sup>	---	---	1 <sup>(c)</sup>	---	---	---	---
Guaraná	E	---	---	1 <sup>(c)</sup>	---	---	1 <sup>(d)</sup>	---	---
Hissopo	A	1 <sup>(a)</sup>	---	---	---	---	---	---	---
Jaborandi	C	---	---	---	---	---	---	1 <sup>(d)</sup>	---
Jurubeba	A	---	---	---	1 <sup>(c)</sup>	---	---	1 <sup>(d)</sup>	---
Losna	A	---	---	---	---	---	---	1 <sup>(d)</sup>	---
Macela	C	1 <sup>(a)</sup>	---	---	---	---	---	---	---
Malva	C	---	---	---	---	---	---	1 <sup>(d)</sup>	---
Marapuama	D	1 <sup>(a)</sup>	---	---	---	---	---	---	---
Quássia	A	1 <sup>(a)</sup>	---	1 <sup>(c)</sup>	---	---	---	1 <sup>(d)</sup>	---

continua

Continuação da Tabela 4.1

Planta	Fornecedor	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Aspergillus parasiticus</i>	<i>Aspergillus ochraceus</i>	<i>Aspergillus Niger</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Aspergillus spp</i>	<i>Penicillium citrinum</i>	<i>Penicillium Chrysogenum</i>
Quebra-pedra	E	1 <sup>(a)</sup>	---	---	---	---	---	---	---
Quina amarela	A	1 <sup>(a)</sup>	---	---	---	---	---	---	---
Ratânia	A	1 <sup>(a)</sup>	---	---	---	---	---	1 <sup>(d)</sup>	---
Sene	A	---	---	---	---	---	---	1 <sup>(d)</sup>	---
Sucupira	A	1 <sup>(a)</sup>	---	1 <sup>(c)</sup>	---	---	---	1 <sup>(d)</sup>	---
Uva ursi	A	---	---	1 <sup>(c)</sup>	---	---	---	---	---
Total	35	16	5	9	2	0	2	15	0

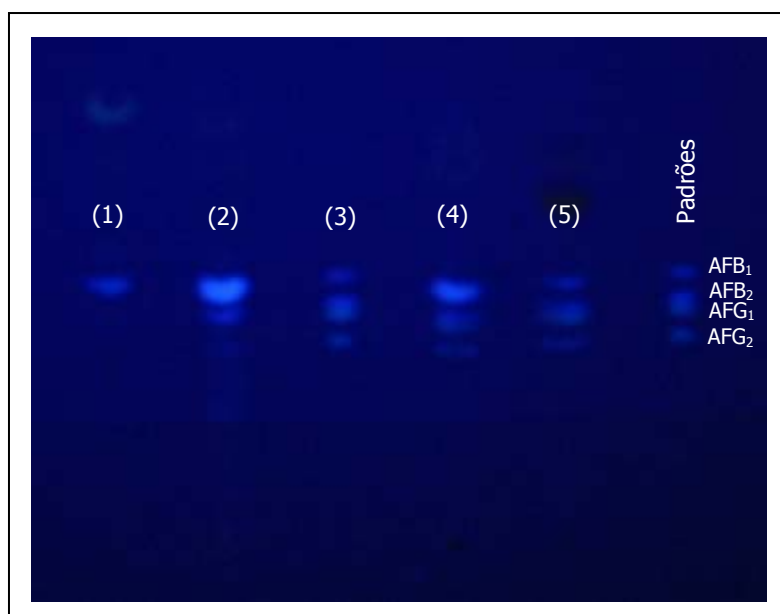
(a) Aflatoxina B<sub>1</sub> ou Aflatoxinas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>

(b) Aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub>

(c) Ocratoxina A

(d) Citrinina

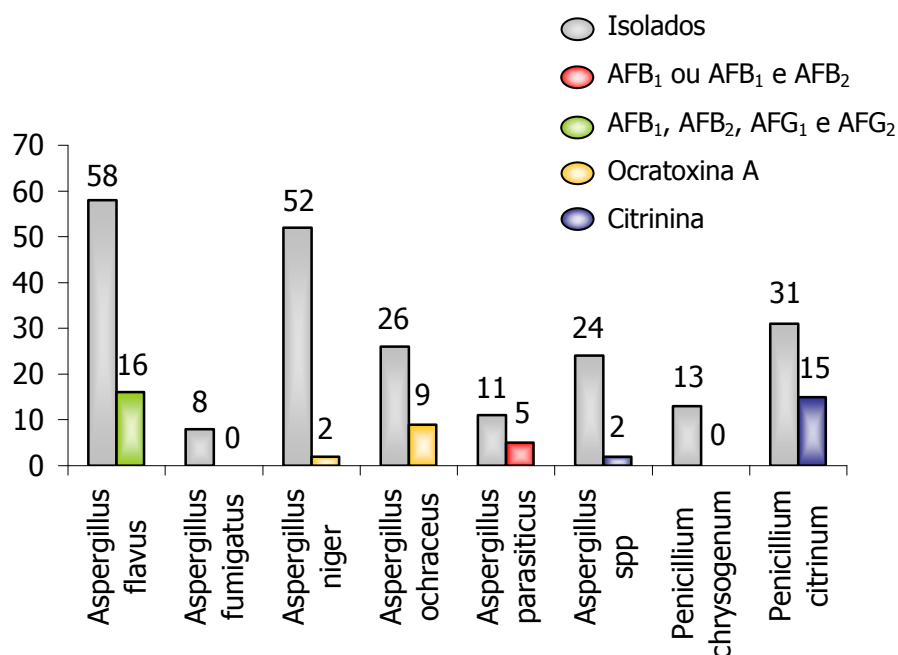
A Figura 4.4 apresenta uma placa cromatográfica obtida na avaliação do potencial aflatoxigênico de cinco extratos de *Aspergillus*, sendo um isolado identificado como produtor de aflatoxina B<sub>1</sub> (1), um isolado identificado como produtor de aflatoxinas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> (2) e três isolados identificados como produtores das aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> (3-5).



**FIGURA 4.4** – Placa cromatográfica obtida na avaliação do potencial aflatoxigênico de cinco cepas de *Aspergillus* isoladas em drogas vegetais

Figura 4.5 apresenta a distribuição dos isolados produtores de micotoxinas de acordo com o tipo de micotoxina produzida.





**FIGURA 4.5 – Distribuição dos isolados toxigênicos detectados em drogas vegetais em função do tipo de micotoxina produzida**

A avaliação dos resultados, representados na Figura 4.5, revelou que 49 dos 223 fungos isolados em drogas vegetais apresentaram capacidade de produzir micotoxinas, o que corresponde a 21,97%. Destes 49 isolados:

- 42,9% demonstraram ser aflatoxigênicos;
- 22,4% demonstraram ser ocratoxigênicos; e
- 34,7% demonstraram capacidade para produção de citrinina.

Os resultados representados na Figura 4.5 também permitiram verificar que:

- 27,6% e 45,5% dos isolados de *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, respectivamente, foram identificados como produtores de aflatoxinas;

- 34,6% dos isolados de *Aspergillus ochraceus* e 3,8% dos isolados de *Aspergillus niger* foram identificados como produtores de ocratoxina A; e
- 8,3% dos isolados de *Aspergillus* spp e 34,1% dos isolados de *Penicillium citrinum* foram identificados como produtores de citrinina.

Vários estudos verificaram a presença de cepas produtoras de micotoxinas em produtos naturais:

- Rizzo *et al* (2004) verificaram que *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* foram espécies predominantes em amostras de plantas medicinais e que 50% destes apresentaram capacidade de produzir aflatoxinas; 26% dos isolados de *Aspergillus alliaceus*, *Aspergillus ochraceus* e *Aspergillus sclerotiorum* apresentaram potencial de produção de ocratoxina A e 27,5% de *Fusarium verticillioides* e *Fusarium proliferatum* apresentaram capacidade de produzir fumonisina B<sub>2</sub>.
- 45% das cepas de *Aspergillus flavus* isoladas por Elshafie *et al* (2002) e 49% das cepas de *Aspergillus flavus* isoladas por Llewellyn *et al* (1992) apresentaram potencial de produção de aflatoxina B<sub>1</sub>.
- Efuntoye (1999) avaliou o potencial de 44 cepas de *Aspergillus flavus*, 16 cepas de *Aspergillus parasiticus* e 20 cepas de *Aspergillus ochraceus*, isoladas de amostras de drogas vegetais e verificou que 24 cepas de *Aspergillus flavus* produziram aflatoxina B<sub>1</sub>, 18 cepas produziram aflatoxinas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> e 1 cepa produziu aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub>; 6 cepas de *Aspergillus parasiticus* produziram aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> e 12 cepas de *Aspergillus ochraceus* produziram ocratoxina A.

- Aziz *et al* (1998) detectaram a presença, em plantas medicinais, de *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* e *Aspergillus oryzae* produtores de aflatoxinas; *Aspergillus ochraceus*, *Penicillium viridicatum* e *Penicillium variable*, produtores de ocratoxina A e *Penicillium viridicatum*, *Penicillium chrysogenum* e *Penicillium commune* produtores de ácido penicílico.
- Chourasia (1995) verificou 42% das cepas de *Aspergillus flavus* produtoras de aflatoxina B<sub>1</sub> e 8%, produtoras de aflatoxinas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>; 45% de cepas de *Aspergillus parasiticus* produtoras de aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> e G<sub>1</sub>; 15% de cepas de *Aspergillus ochraceus* produtoras de ocratoxina A e 27% de cepas de *Fusarium oxysporum* produtoras de zearalenonas.
- Garrido *et al* (1992), que identificaram 15 espécies de *Aspergillus*, ao avaliarem o potencial toxigênico de 13 isolados de *Aspergillus flavus*, verificaram a capacidade de produção de aflatoxinas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> em 30,8% destes isolados.
- Cerca de 50% das cepas de *Aspergillus flavus* e 20% das cepas de *Penicillium citrinum* isoladas por Roy e Kumari (1991) apresentaram capacidade em produzir aflatoxina B<sub>1</sub> e citrinina, respectivamente.
- Roy e Chourasia (1989) e Roy *et al* (1988) verificaram, respectivamente, que 42% e 31% das cepas de *Aspergillus flavus*, detectadas em drogas vegetais, produziram aflatoxina B<sub>1</sub>.

Por outro lado, alguns autores não detectaram cepas toxigênicas, como Elshafie *et al* (1999) ao avaliaram o potencial aflatoxigênico de 25 cepas de *Aspergillus flavus* isoladas em amostras de chás, ou detectaram baixa ocorrência,

como Lutomski e Kedzia (1980), ao estudarem o potencial para produção de aflatoxinas, ocratoxina A e sterigmatocistina de 75 isolados de *Aspergillus* e 28 isolados de *Penicillium*, verificaram apenas dois isolados de *Aspergillus* com capacidade de produzir aflatoxinas, enquanto Hitokoto *et al* (1978) detectaram apenas três cepas toxigênicas de *Aspergillus flavus* isolados em amostras de drogas vegetais pulverizadas.

Embora a presença de fungos toxigênicos não implique na detecção de micotoxinas em um produto, sua presença indica o potencial para que a contaminação ocorra, principalmente em longos períodos de estocagem, que podem oferecer condições adequadas ao crescimento fúngico e à expressão da habilidade de produzir micotoxinas.

#### **4.4 – CONCLUSÃO**

Os resultados obtidos demonstram a potencialidade de contaminação por micotoxinas em drogas vegetais e fitoterápicos. 89,9% das cepas isoladas em 91 amostras de drogas vegetais corresponderam a gêneros de importância do ponto de vista micotoxicológico (*Aspergillus* e *Penicillium*), sendo que 21,97% destas cepas comprovaram a capacidade em produzir micotoxinas, como aflatoxinas (42,9%), ocratoxina A (22,4%) e citrinina (34,7%).