
Avaliação da contaminação fúngica de plantas medicinais comercializadas na cidade de Bauru, SP

Evaluation of fungal contamination of medicinal plants commercialized in Bauru, SP

Patricia Sawao Konda¹

Gislaine Aparecida Querino²

Priscila Raquel Martins³

RESUMO

O aumento no uso de plantas medicinais como recurso terapêutico frente à sua oferta insuficiente conduziu a uma queda em sua qualidade. A contaminação microbiana pode levar ao comprometimento do desempenho do produto e ser prejudicial à saúde. A crescente demanda evidencia a necessidade de um eficiente controle microbiológico para garantir seu uso com segurança e eficácia. O objetivo deste trabalho foi avaliar os níveis de contaminação fúngica de plantas medicinais comercializadas na cidade de Bauru. Foram avaliadas cinco amostras de quatro espécies vegetais: *Matricaria recutita* (camomila), *Lippia alba* (falsa melissa), *Mikania glomerata* (guaco) e *Cassia acutifolia delile* (sene) preparadas por dois métodos: maceração e infusão. Das cinco amostras analisadas, duas apresentaram contaminação acima dos limites permitidos pela Farmacopeia Brasileira, enquanto

1. Acadêmica do curso de Biomedicina das Faculdades Integradas de Bauru.

2. Docente das Faculdades Integradas de Bauru.

3. Orientadora - Doutora em Patologia e docente das Faculdades Integradas de Bauru.

que apenas uma delas apresentou contaminação superior ao estabelecido pela Organização Mundial da Saúde. Observou-se que após a adição de água em ebulição houve uma diminuição significativa na presença dos fungos. O microcultivo demonstrou a presença de *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp. Frente ao exposto, percebemos a importância de se realizar um controle de qualidade microbiológico mais rigoroso das plantas medicinais e da implantação de fiscalização mais efetiva para garantir a segurança e eficácia desses produtos.

Palavras-chave: controle de qualidade; plantas medicinais; fungos.

ABSTRACT

The increase in the use of medicinal plants as therapeutic use against the insufficient supply of them led to a decay in quality. Microbial contamination can lead to impaired performance of the product and be harmful to health. The growing demand highlights the need for an effective microbiological control to ensure its use with safety and efficacy. The aim of this study was to evaluate the levels of fungal contamination of medicinal plants commercialized in Bauru. We evaluated five samples of four species: *Matricaria recutita* (chamomile), *Lippia alba* (false melissa), *Mikania glomerata* ("guaco") and *Cassia acutifolia delile* (senna) prepared by two methods: maceration and infusion. The five samples analyzed, two were contaminated above the limits allowed by Brazilian Pharmacopoeia, while only one showed contamination above the established by World Health Organization. It was observed that after the addition of boiling water there was a significant decrease in the presence of fungi. The microculture showed the presence of *Aspergillus* sp. and *Penicillium* sp. Based on these, we perceive the importance of conducting a quality control microbiological strictest of medicinal plants and the implementation of more effective supervision to ensure the safety and efficacy of these products.

Keywords: quality control; medicinal plants; fungi.

INTRODUÇÃO

A utilização de plantas medicinais como recurso terapêutico é muito antiga e seu uso vem crescendo principalmente nos países em desenvolvimento. Além da busca por uma vida mais saudável e naturalista, o alto custo de fármacos sintéticos também contribui para esse crescimento.

O aumento na procura de plantas medicinais frente à oferta insuficiente das mesmas conduziu a uma queda de sua qualidade. Muitos produtores desconhecem os cuidados que se deve ter nas diversas etapas para a obtenção de matérias-primas e/ou produtos de qualidade adequada e não têm a orientação de profissionais capacitados (1).

A identificação e a pureza da droga vegetal, assim como a avaliação de seus princípios ativos, são tarefas indispensáveis àqueles que buscam obter produtos de boa qualidade (2). Além das preocupações em relação às falsificações e adulterações, a crescente demanda evidencia também a necessidade de um eficiente controle microbiológico dos medicamentos fitoterápicos para garantir o uso com segurança

e eficácia. As drogas vegetais estão naturalmente sujeitas à contaminação por microrganismos provenientes do solo e da água (3). A contaminação também pode ocorrer durante o processamento ou ser intensificada por condições inadequadas de secagem e armazenamento, nas quais o material vegetal fica exposto à poeira, umidade e calor (4).

A falta de boas práticas na produção e comercialização de plantas medicinais e fitoterápicos, associada à ausência de farmacovigilância, contribui para quedas significativas na qualidade dos fitoterápicos (5).

A contaminação microbiana pode levar ao comprometimento do desempenho do produto, devido à quebra da estabilidade da formulação, à alteração das características físicas e à presença de micotoxinas e toxinas bacterianas (6), que podem ser prejudiciais à saúde humana, uma vez que esses contaminantes podem causar doenças quando introduzidos por via oral ou inalados.

No Brasil, o Ministério da Saúde instituiu em 1995 a Portaria n.º 6, que regulamentava o registro de produtos fitoterápicos para fins comerciais. Em seguida, vieram as Resoluções de Diretoria Colegiada (RDC) da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) - RDC 17, de 2000, e mais recentemente a RDC 48, publicada em 2004 (7). Segundo a RDC 48/04, é considerado fitoterápico o medicamento obtido por processos tecnologicamente adequados, empregando exclusivamente matérias-primas ativas vegetais, necessitando assim da existência de estudos de segurança, eficácia e qualidade, prévios ao registro do fitoterápico (7).

Em 2010, foi publicada a RDC 10 da ANVISA sobre a notificação de drogas vegetais, assim consideradas as plantas medicinais ou suas partes que contenham as substâncias responsáveis pela ação terapêutica, após processos de coleta, estabilização e secagem, íntegras, rasuradas, trituradas ou pulverizadas. Os produtos de que trata esta resolução destinam-se ao uso oral ou tópico da droga vegetal para o preparo de infusões, decocções e macerações (8).

Neste sentido, Schutz et al. (2008) (9) analisaram, no estado do Paraná, amostras de ginkgo biloba (*Ginkgo biloba*), cáscara sagrada (*Rhamnus purshiana*) e sene (*Cassia angustifolia*) e encontraram uma contaminação fúngica acima dos limites aceitáveis pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e Farmacopeia Brasileira. Contaminação acima desses limites preconizados também foi relatada em outros estudos como o realizado na cidade de Campinas, estado de São Paulo, por Rocha et al. (2004) (10), com a análise de folhas de sene (*Cassia acutifolia Delile*), *Peumus boldus* (*Molina*) Lyons (boldo-do-Chile), e também por Carvalho et al. (2009) (11), que analisaram camomila, erva-doce e erva-mate. Contagens elevadas de fungos constituem um risco

para a saúde, em virtude da possibilidade desses serem produtores de micotoxinas, como a aflatoxina, que é uma substância cancerígena (4).

Níveis de contaminação fora dos limites estabelecidos para microrganismos aeróbios, como *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, foram relatados por Zaroni et al. (2004) (1), na análise de 72 amostras de plantas medicinais produzidas no estado do Paraná.

Estudos sobre a análise da qualidade microbiológica de drogas vegetais e dos produtos delas obtidos foram realizados também em outros países, como Portugal e Áustria, e também mostraram contaminação acima dos limites preconizados (12, 13).

Considerando a crescente utilização de plantas medicinais como recurso terapêutico e, dada à importância da qualidade microbiológica das mesmas, o objetivo do presente estudo foi verificar a presença de contaminação fúngica em amostras das principais plantas medicinais comercializadas em feiras livres e pequenos estabelecimentos comerciais da cidade de Bauru, estado de São Paulo, Brasil, visando a contribuir para a melhoria do perfil de qualidade desses fitoterápicos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostras: Foram utilizadas para este estudo cinco amostras de quatro espécies vegetais diferentes: *Matricaria recutita* (camomila), *Lippia alba* (falsa melissa), *Mikania glomerata* (guaco) e *Cassia acutifolia Delile* (sene), adquiridas em feiras livres e em um estabelecimento fixo da cidade de Bauru. Da planta medicinal, *Matricaria recutita* (camomila), foram analisadas duas amostras; uma vendida a granel e a outra vendida já embalada. A escolha da planta testada foi baseada na espécie mais vendida, segundo os comerciantes.

Preparo dos chás: O material analisado foi preparado através de dois métodos: maceração e infusão. Para cada método de preparo foram pesados 10 g de cada amostra. No método de maceração, os dez gramas de cada amostra foram macerados e misturados a 90 ml de solução salina estéril e homogeneizados pelo processo de agitação. Dessa diluição, retirou-se 1,0 ml para misturar em mais 9,0 ml de solução salina estéril. Este processo foi efetuado mais uma vez, chegando-se a diluição 10^{-3} . Para o método de infusão, foi adicionada aos 10 g da amostra uma solução salina em ebulição e, após 3 minutos, efetuadas as diluições seriadas.

Cultivo: De cada diluição, foi retirado 1,0 ml, que foi semeado em dois tipos de ágar diferentes pelo método de semeadura em profundidade. Esta etapa foi realizada em triplicata. Os meios de cultura utilizados foram o ágar *Sabouraud Dextrose* e o ágar DRBC (*Dicloran Rosa Bengala Cloranfenicol*). As placas foram então incubadas a 25°C por sete dias. Após este período, efetuou-se a contagem das unidades formadoras de colônias (UFCs). Posteriormente, amostras dos fungos obtidos foram repicadas para manutenção dos mesmos em tubos de ensaio contendo ágar *Sabouraud Dextrose*.

Microcultivo: Para a técnica do microcultivo em lâmina, placas de petri contendo um suporte e uma lâmina foram previamente autoclavados. Sobre a lâmina, colocou-se um cubo de ágar Batata Dextrose de aproximadamente 1 cm². A amostra do fungo em análise foi repicada nas quatro faces laterais do cubo de ágar e uma lamínula foi colocada sobre ele. Para evitar o ressecamento do meio, foi colocado em cada placa algodão embebido em água destilada estéril. As placas foram incubadas por sete dias a 25°C. Após este período, foram montadas lâminas permanentes com o corante lactofenol azul de algodão, posteriormente observadas ao microscópio com aumento de 400 vezes, para a identificação dos gêneros dos fungos.

RESULTADOS

Para a determinação das UFCs dos fungos presentes nas amostras, foram utilizados dois meios de cultura - o ágar *Sabouraud Dextrose* e o ágar *Dicloran Rosa Bengala Cloranfenicol* (DRBC). Dentre os meios utilizados, o que permitiu melhor visualização das colônias foi o DRBC, isso porque o *Dicloran* e o *Rosa Bengala* presentes na sua formulação restringem o diâmetro das colônias e permitem ainda que colônias com crescimento lento também se desenvolvam (14). O ágar DRBC mostrou-se melhor também para a análise das características macromorfológicas das colônias, como coloração e textura. Nas culturas feitas em ágar *Sabouraud Dextrose* houve crescimento fúngico, porém a visualização das colônias foi dificultada pelo crescimento rápido de algumas espécies de fungos presentes nas amostras (dados não demonstrados).

Os resultados obtidos mostram que, das cinco amostras testadas, duas apresentaram contaminação acima dos limites permitidos pela Farmacopeia Brasileira, sendo elas a de camomila vendida a granel e a amostra de sene. Levando-

se em consideração os limites estabelecidos pela OMS, apenas a de sene apresentou nível superior.

Das duas amostras de camomila testadas, uma foi adquirida em feira livre, comercializada já embalada (figura 1) e a outra foi comprada em um estabelecimento fixo, vendida a granel (figura 2); constatou-se maior contaminação na amostra vendida a granel.

Não foi possível quantificar o número de UFC/g na amostra de sene, devido ao crescimento confluyente com fungos da classe dos Zigomicetos (figura 3).



Figura 1 – Cultura da amostra de camomila vendida já embalada

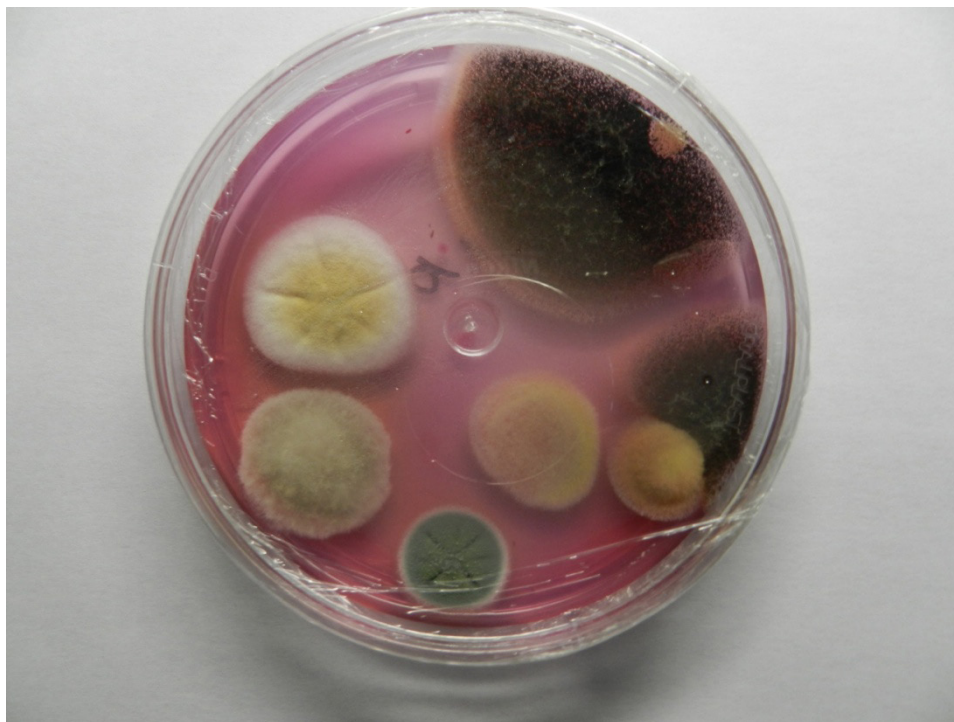


Figura 2 – Cultura da amostra de camomila vendida a granel

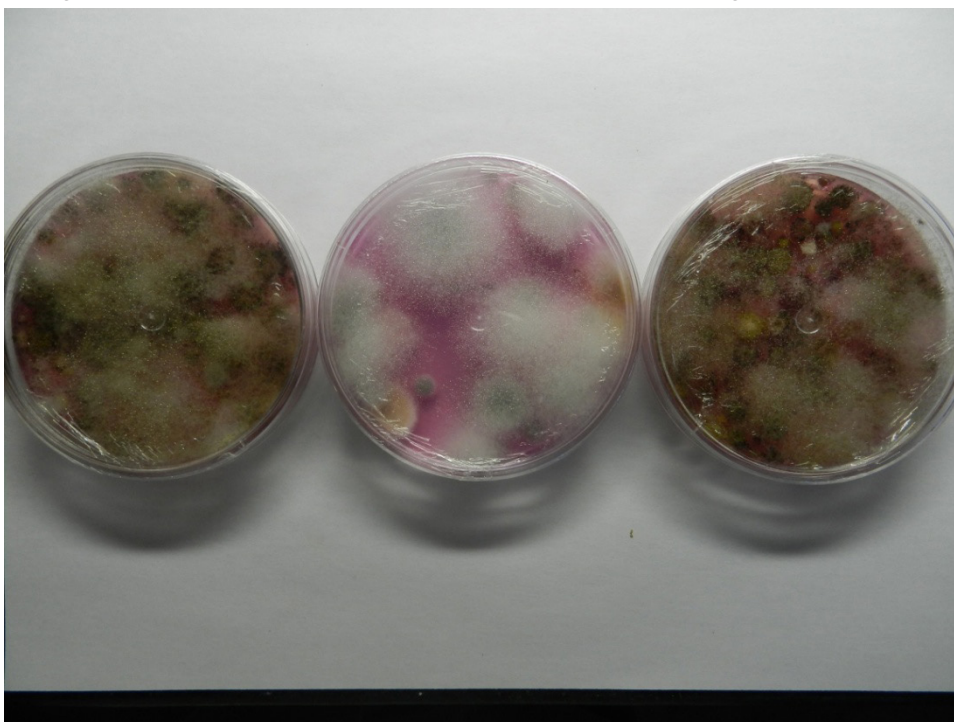


Figura 3 – Culturas da amostra de sene preparada sob o método de maceração

Após o preparo da planta com solução salina em ebulição (infusão), constatou-se diminuição no crescimento fúngico e algumas amostras não apresentaram crescimento após este preparo. Na análise dos microcultivos, constatamos a presença de fungos do gênero *Aspergillus* sp. (figura 4) e *Penicillium* sp (figura 5), porém a análise macroscópica das colônias sugere a presença de outros gêneros de fungos, que não foram encontrados no microcultivo.

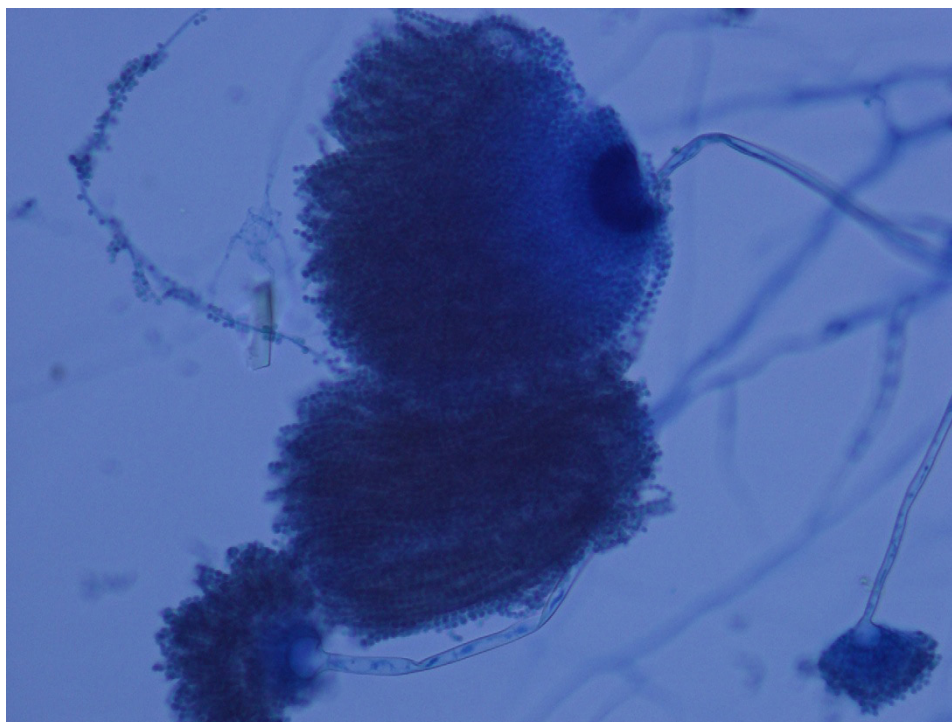


Figura 4 – *Aspergillus* sp - foto da lâmina com material obtido através do microcultivo (aumento de 400 vezes)

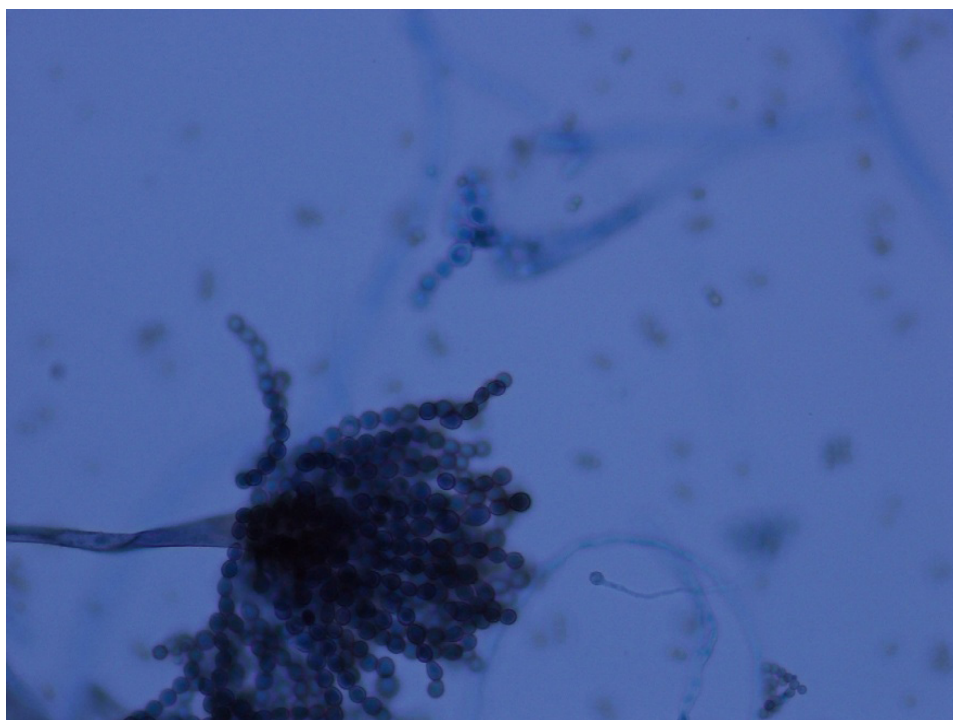


Figura 5 – *Penicillium sp* - foto da lâmina com material obtido através do microcultivo (aumento de 400 vezes)

DISCUSSÃO

A contaminação microbiana dos fármacos vegetais pode ocorrer devido à exposição a microrganismos presentes no solo e na água e ser intensificada devido a processos inadequados de secagem e armazenamento. Apesar de as plantas medicinais passarem por processo de secagem, se não adotadas práticas apropriadas os microrganismos podem permanecer no produto até que encontrem condições para voltar a crescer (15). No presente estudo, constatamos maior contaminação na amostra de camomila vendida a granel quando comparada à amostra vendida já embalada. Produtos vendidos a granel ficam mais expostos à umidade relativa do ar e tendem a absorver essa umidade, criando condições para o crescimento microbiano (4,15). A umidade e temperatura são os dois fatores que mais influenciam o crescimento fúngico e, conseqüentemente, a produção de micotoxinas (16).

O limite preconizado pela OMS para a presença de fungos e leveduras em drogas vegetais é de 10^3 UFC/g (17), e o da Farmacopeia Brasileira é de 10^2 UFC/g (18).

A contaminação fúngica acima do preconizado constitui um risco adicional, devido à possível presença de fungos produtores de metabólitos secundários - as

micotoxinas; essas toxinas suprimem a imunidade e favorecem infecções oportunistas (19). Foram identificados fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* nas amostras analisadas, corroborando o que dizem Araújo e Ohara (2000) (4), sobre serem esses os fungos mais encontrados em plantas medicinais. É o que constataram Bernardi et al. (2005) (20) em estudo realizado em Pelotas-RS, na análise de contaminação fúngica em amostras de erva-mate, e Carvalho et al. (2009) (11) em Curitiba, em estudo com amostras de camomila, erva-doce e erva-mate. Aflatoxinas, que são produzidas por *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* são hepatotóxicas e carcinogênicas. Ocratoxinas produzidas por algumas espécies de *Aspergillus spp* e de *Penicillium spp* são associadas a nefropatias (19).

Assim como neste estudo, outras pesquisas analisaram as amostras preparadas de duas formas, *in natura* e após infusão, e constataram uma diminuição nos níveis de contaminação fúngica após preparo com água em ebulição. Embora o tratamento por aquecimento se mostre eficaz para a inibição dos bolores, o consumo de plantas medicinais com níveis elevados de contaminação fúngica mesmo na forma de chás é preocupante. A aflatoxina pode permanecer na amostra mesmo após o aquecimento e destruição dos fungos. Esta toxina é termoestável e pouca ou nenhuma aflatoxina é destruída em condições normais de cozimento (16). Assim como a aflatoxina, a ocratoxina A também é termoestável (15).

Fungos dos gêneros *Acremonium*, *Alternaria*, *Mucor*, *Rhizopus* e *Fusarium* também são relatados como contaminantes de plantas medicinais. *Mucor spp* e *Rhizopus spp* pertencem à classe dos Zigomicetos, são fungos de crescimento rápido e encontrados no solo e em materiais vegetais. Infecções do trato gastrointestinal podem ser adquiridas pela ingestão de alimentos ou bebidas contaminados por esporos destes fungos (22). Fungos do gênero *Fusarium* também são produtores de micotoxinas e associados a hemorragias da pele e mucosas e afecções da cavidade bucal e faríngea (19).

De acordo com Maziero & Bersot (2010) (23), o melhor método para controlar a contaminação de micotoxinas nos alimentos é prevenir o crescimento de fungos através da adoção de boas práticas de produção de alimentos.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos demonstraram que, embora os produtos vendidos a granel estejam mais expostos a contaminação, níveis elevados de contaminantes

também são encontrados em produtos já embalados, ressaltando a importância de mais fiscalização nas diversas etapas do processamento como na produção, armazenamento e comercialização. Apesar de níveis de contaminação fúngica acima dos limites preconizados terem sido encontrados na amostra de camomila (vendida a granel) e de sene, o preparo com solução salina em ebulição (infusão) mostrou-se eficaz para a diminuição ou eliminação destes contaminantes.

Levando-se em consideração que as plantas medicinais estão expostas à contaminação por fungos produtores de micotoxinas e que algumas delas não podem ser eliminadas somente pelo tratamento por aquecimento, enfatizamos a necessidade da realização de um maior controle de qualidade microbiológico dos fitoterápicos e de uma implantação de fiscalização efetiva, para garantir a segurança e eficácia destes produtos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Zaroni M, Pontarolo R, Abrahão WSM, Fávero MLD, Correa Junior C, Stremel DP. Qualidade microbiológica das plantas medicinais produzidas no estado do Paraná. Rev Bras Farmacogn. 2004; 14 (1): 29-39.
- 2- Oliveira F de, Akisue G, Akisue MK. Farmacognosia. São Paulo: Atheneu; 1991 apud Zaroni M, Pontarolo R, Abrahão WSM, Fávero MLD, Correa Junior C. Stremel DP. Qualidade microbiológica das plantas medicinais produzidas no estado do Paraná. Rev. Bras. Farmacogn. 2004; 14(1): 29-39.
- 3- Furlaneto L, Marins V D, Endo R. Qualidade microbiológica de drogas vegetais comercializadas nas ruas da cidade de Londrina/PR e de seus insumos. Saúde em Rev. 2003; 5: 49-52.
- 4- Araújo ALA, Ohara MT. Qualidade microbiológica de drogas vegetais comercializadas em feiras de São Paulo e de infusos derivados. Rev. Bras. Ciênc. Farm. 2000; 36 (1): 129-37.
- 5- Barbosa CKR, Costa JPR, Bonfim FPG, Almeida AC, Martins ER. Qualidade microbiológica de plantas medicinais, cultivadas e comercializadas em Montes Claros, MG. Revista Biotemas. 2010; 23(1): 77- 81.

- 6- Oliveira F de, Akisue G, Akisue MK. Farmacognosia. São Paulo: Atheneu; 1991 apud Schutz MV, Velasquez CC, Abegg MA. Avaliação da qualidade microbiológica das drogas vegetais mais comercializadas em farmácias de manipulação de Toledo - PR. Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR. 2008; 12(3): 181-6.
- 7- Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Consolidado de Normas da COFID. Brasília, 2009.
- 8- Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº10 de 09 de março de 2010. Dispõe sobre a notificação de drogas vegetais junto à Anvisa. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 10 de março de 2010.
- 9- Schutz MV, Velasquez CC, Abegg MA. Avaliação da qualidade microbiológica das drogas vegetais mais comercializadas em farmácias de manipulação de Toledo - PR. Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR. 2008; 12(3): 181-6.
- 10- Rocha LO, Soares MMSR, Corrêa CL. Análise da contaminação fúngica em amostras de *Cassia acutifolia Delile* (sene) e *Peumus boldus (Molina) Lyons* (boldo-do-Chile) comercializadas na cidade de Campinas, Brasil. Rev. Bras. de Ciênc. Farm. 2004; 40(4): 521-7.
- 11- Carvalho S, Stuart RM, Pimentel IC, Dalzoto PR, Gabardo J, Zawadneak MAC. Contaminação fúngica em chás de camomila, erva-doce e erva-mate. Rev Inst Adolfo Lutz. 2009; 68(1): 91-5.
- 12- Martins HM, Martins ML, Dias MI, Bernardo F. Evaluation of microbiological quality of medicinal plants used in natural infusions. In J Food Microbiol. 2001; 69: 149-53.
- 13- Czech E, Kneifel W, Koop B. Microbiological status of commercially available medicinal herbal drugs – a screening study. Plant Med. 2001; 67(3): 263-9.
- 14- Lazaretti KES, Beux MR, Pimentel IC, Talamini A, Gabardo J. Comparação entre os meios de cultura para contagem de fungos no controle microbiológico de erva-mate. Bol. Centro Pesq. Process. Aliment. 2000; 18(2): 163-7.
- 15- Jay JM. Microbiologia de Alimentos. 6. ed. Porto Alegre: Artmed; 2005.
- 16- World Health Organization (WHO). Mycotoxins (Environmental Criteria, 11): WHO. Report 1979. Geneva; 1979.
- 17- World Health Organization (WHO). Quality control methods for medicinal plants materials: WHO. Report 1998. Geneva; 1998.

- 18- Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Farmacopeia Brasileira. 5. ed. Brasília: Anvisa; 2010. 1v.
- 19- Lacaz CS, Porto E, Martins JEC, Heins-Vaccari EM, Melo NT. Tratado de Micologia Médica Lacaz. 9. ed. São Paulo: Sarvier; 2002.
- 20- Bernardi E, Caldeira MF, Nascimento JS. Identificação de fungos filamentosos em erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). Arq Inst Biol. 2005; 72(4): 489-93.
- 21- Sidrim JJC, Rocha MFG. Micologia Médica à Luz de Autores Contemporâneos. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004.
- 22- Maziero MT, Bersot LS. Micotoxinas em alimentos produzidos no Brasil. Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais. 2010; 12(1): 89-99.