

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos  
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

**Drogas Vegetais:  
Avaliação da Contaminação Microbiana e  
Pesquisa de Aflatoxinas, Ocratoxina A e Citrinina**

Adriana Bugno

Tese para obtenção do grau de  
DOUTOR

Orientador:  
Prof. Tit. Terezinha de Jesus Andreoli Pinto

São Paulo  
2006

**Ficha Catalográfica**

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e  
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Bugno, Adriana  
B931d Drogas vegetais : avaliação da contaminação microbiana e  
pesquisa de aflatoxinas, ocratoxina A e citrinina / Adriana  
Bugno. -- São Paulo, 2006.  
219p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.  
Orientador: Pinto, Terezinha de Jesus Andreoli

1. Medicamento : Controle de qualidade 2. Microbiologia  
farmacêutica I. T. II. Terezinha de Jesus Andreoli,  
orientador.

615.19015 CDD

Adriana Bugno

Drogas Vegetais. Avaliação da Contaminação Microbiana e Pesquisa de Aflatoxinas,  
Ocratoxina A e Citrinina

Comissão Julgadora  
da  
Tese para obtenção do grau de Doutor

---

Prof<sup>a</sup>. Tit. Terezinha de Jesus Andreoli Pinto  
Orientador/Presidente

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marta Hiromi Taniwaki

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Myrna Sabino

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Hérica Regina Nunes Salgado

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Telma Mary Kaneko

São Paulo, 20 de Fevereiro de 2006



Aos meus pais, Octacilio e Carlinda (*in memorium*),  
A quem devo a orientação de vida e que  
em sua sabedoria, manteve-se ao meu lado, apoiando,  
incentivando e abraçando minhas dificuldades

À minha família e amigos  
Pelo apoio, incentivo, compreensão e colaboração  
ao longo deste trabalho



À Prof. Terezinha de Jesus Andreoli Pinto  
Pela dedicada orientação, amizade, incentivo, confiança e  
principalmente, pelo exemplo de trabalho

À Dra. Myrna Sabino  
Com imensa gratidão pelo carinho, incentivo e auxílio constantes e  
sobretudo pela grande amizade

## **Agradecimentos**

É difícil expressar o meu agradecimento a todos os que compartilharam desta caminhada. Diversas pessoas contribuíram de forma especial, direta ou indiretamente, na execução deste trabalho e por isso quero deixar presente minha gratidão.

Este trabalho foi executado no Instituto Adolfo Lutz e dirijo meus agradecimentos aos Sr. Diretor Geral Dr. Carlos Adalberto de Camargo Sannazzaro, Sr. Diretor da Divisão de Bromatologia e Química Dr. Odair Zenebon e Sra. Diretora do Serviço de Medicamentos Mariangela Tirico Auricchio, pelo incentivo que tornou possível esta realização.

Aos colegas Adriana, Tatiana, Maria Lúcia, Aurélio, Janaína e Trindade, que sempre me deram uma mãozinha durante o percurso, pela amizade, carinho e auxílio constantes.

À Dulcilena de Matos, da Seção de Micologia, pela identificação dos isolados fúngicos.

Às colegas Helena M. Yano, da Seção de Farmacognosia e Julia Taeko U. Yoshida, da Seção de Meios de Cultura, pela colaboração e ajuda em muitos momentos.

A todos aqueles que por diferentes maneiras, apoiaram e colaboraram na execução deste trabalho.

“Toda a pessoa sempre é as marcas das lições  
diárias de outras tantas pessoas”



(Gonzaguinha)

## SUMÁRIO

RESUMO .....	016
ABSTRACT .....	017

### **CAPÍTULO I – Revisão de Literatura e Objetivos**

1.1 – INTRODUÇÃO .....	018
1.1.1 – Os produtos de origem vegetal no Brasil .....	023
1.1.2 – Fatores de risco associados a produtos de origem vegetal .....	024
1.1.3 – A contaminação microbiana em produtos de origem vegetal .....	027
1.1.4 – A contaminação com micotoxinas .....	036
1.1.4.1 – Aflatoxinas .....	039
1.1.4.1 – Ocratoxinas .....	044
1.1.4.1 – Citrinina .....	045
1.1.4.1 – Fumonisinias .....	046
1.1.4.1 – Zearalenona .....	047
1.2 – OBJETIVOS .....	048

### **CAPÍTULO II – Qualidade microbiológica de drogas vegetais**

2.1 – INTRODUÇÃO .....	049
2.2 – MATERIAIS E MÉTODOS .....	054
2.2.1 – Amostras .....	054
2.2.2 – Materiais .....	057
2.2.3 – Métodos .....	065
2.2.3.1 – Validação do método para enumeração de bactérias aeróbias, bolors e leveduras – técnica de plaqueamento em profundidade .....	065
2.2.3.2 – Avaliação da qualidade microbiológica .....	067
2.2.3.2.1 – Preparação das amostras .....	067
2.2.3.2.2 – Enumeração de bactérias aeróbias, bolors e leveduras ..	067

2.2.3.2.3 – Enumeração de bactérias do grupos dos coliformes e de <i>Escherichia coli</i> .....	068
2.2.3.2.4 – Identificação de bactérias .....	069
A) Pesquisa para <i>Staphylococcus aureus</i> .....	070
B) Pesquisa para <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	070
C) Pesquisa para <i>Salmonella</i> spp .....	071
D) Pesquisa para <i>Escherichia coli</i> .....	072
E) Pesquisa para outras enterobactérias .....	073
F) Pesquisa para bactérias Gram negativas não fermentadoras ....	074
G) Pesquisa para <i>Bacillus cereus</i> .....	075
2.2.3.2.5 – Identificação de fungos .....	075
2.3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	076
2.3.1 – Validação do método para enumeração de bactérias aeróbias, bolores e leveduras .....	076
2.3.2 – Avaliação quantitativa da qualidade microbiológica .....	082
2.3.3 – Avaliação qualitativa da qualidade microbiológica .....	090
2.3 – CONCLUSÃO .....	106

**CAPÍTULO III – Comparação entre método convencional de semeadura em profundidade (*pour plate*) e sistema Petrifilm<sup>®</sup> na enumeração de bactérias aeróbias e de bolores e leveduras**

3.1 – INTRODUÇÃO .....	108
3.2 – MATERIAIS E MÉTODOS .....	109
3.2.1 – Amostras .....	109
3.2.2 – Materiais .....	109
3.2.3 – Métodos .....	111
3.2.3.1 – Preparação das amostras .....	111
3.2.3.2 – Enumeração utilizando método convencional ( <i>pour plate</i> ) .....	112
3.2.3.3 – Enumeração utilizando sistema Petrifilm <sup>®</sup> .....	112
3.3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	113
3.4 – CONCLUSÃO .....	120



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

4.1 – INTRODUÇÃO .....	121
4.2 – MATERIAIS E MÉTODOS .....	123
4.2.1 – Amostras .....	123
4.2.2 – Materiais .....	123
4.2.3 – Métodos .....	125
4.2.3.1 – Preparação das amostras .....	125
4.2.3.2 – Análise micotoxicológica .....	126
4.2.3.2.1 – Extração da micotoxina .....	126
4.2.3.2.2 – Detecção da micotoxina .....	127
4.2.3.2.3 – Confirmação da identidade da micotoxina .....	127
A) Derivatização química com ácido trifluoroacético (TFA) .....	128
B) Aplicação de ácido sulfúrico (50%) .....	129
C) Cromatografia bi-dimensional .....	129
D) Exposição a vapor de NH <sub>3</sub> .....	130
4.3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	131
4.4 – CONCLUSÃO .....	140

## **CAPÍTULO V – Avaliação da contaminação com aflatoxinas, ocratoxina A e citrinina em drogas vegetais**

5.1 – INTRODUÇÃO .....	141
5.2 – PARTE A: Avaliação do desempenho do método farmacopêico para detecção de aflatoxinas em drogas vegetais .....	145
5.2.1 – MATERIAIS E MÉTODOS .....	145
5.2.1.1 – Amostras .....	145
5.2.1.2 – Materiais .....	146
5.2.1.3 – Métodos .....	148
5.2.1.3.1 – Avaliação da contaminação natural com aflatoxina B <sub>1</sub> .....	148
5.2.1.3.2 – Avaliação do desempenho dos métodos analíticos empregados na extração de aflatoxina B <sub>1</sub> em droga vegetal .....	149
A) Preparação das amostras artificialmente contaminadas .....	149

B) Extração de aflatoxina B <sub>1</sub> em droga vegetal conforme USP, 2005 .....	149
C) Extração de aflatoxina B <sub>1</sub> em droga vegetal conforme Soares e Rodriguez-Amaya, 1989 .....	150
D) Detecção .....	153
E) Confirmação da identidade .....	154
5.2.1.3.3 – Taxa de recuperação de aflatoxina B <sub>1</sub> em drogas vegetais obtida com os métodos analíticos .....	156
5.2.2 – RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	157
5.2.3 – CONCLUSÃO .....	159
5.3 – PARTE B: Pesquisa de aflatoxinas, ocratoxina A e citrinina em drogas vegetais .....	160
5.3.1 – MATERIAIS E MÉTODOS .....	160
5.3.1.1 – Amostras .....	160
5.3.1.2 – Materiais .....	161
5.3.1.3 – Métodos .....	163
5.3.2 – RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	164
5.3.3 – CONCLUSÃO .....	166
5.4 – PARTE C: Avaliação da técnica de imunoextração, utilizando coluna de imunoafinidade Aflatest <sup>®</sup> , para detecção de aflatoxinas em drogas vegetais .....	168
5.4.1 – MATERIAIS E MÉTODOS .....	170
5.4.1.1 – Amostras .....	170
5.4.1.2 – Materiais .....	171
5.4.1.3 – Métodos .....	173
5.4.1.3.1 – Preparação das amostras artificialmente contaminadas ...	173
5.4.1.3.2 – Imunoextração .....	173
5.4.1.3.3 – Detecção .....	176
5.4.1.3.4 – Taxa de recuperação de aflatoxina B <sub>1</sub> em drogas vegetais obtida por imunoextração .....	177
5.4.2 – RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	178

5.4.3 – CONCLUSÃO .....	181
5.5 – PARTE D: Pesquisa de aflatoxina B <sub>1</sub> em extrato fluido de alcachofra artificialmente contaminada com cepa aflatoxigênica de <i>Aspergillus flavus</i> .....	182
5.5.1 – MATERIAIS E MÉTODOS .....	182
5.5.1.1 – Amostra .....	182
5.5.1.2 – Materiais .....	183
5.5.1.3 – Métodos .....	185
5.5.1.3.1 – Preparação do inóculo de <i>Aspergillus flavus</i> .....	185
5.5.1.3.2 – Contaminação artificial de alcachofra, matéria-prima, com <i>Aspergillus flavus</i> .....	186
5.5.1.3.3 – Preparação de extrato fluido de alcachofra .....	186
5.5.1.3.4 – Avaliação da presença de aflatoxina B <sub>1</sub> em alcachofra, matéria-prima vegetal .....	187
5.5.1.3.5 – Avaliação da presença de aflatoxina B <sub>1</sub> em extrato fluido de alcachofra.....	188
5.5.2 – RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	188
5.5.3 – CONCLUSÃO .....	189
6 – CONCLUSÃO FINAL .....	190
7 - BIBLIOGRAFIA .....	192

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 -	Estruturas químicas das principais aflatoxinas .....	040
Figura 1.2 -	A biotransformação da aflatoxina B <sub>1</sub> .....	043
Figura 1.3 -	Estrutura química da ocratoxina A .....	044
Figura 1.4 -	Estrutura química da citrinina .....	046
Figura 1.5 -	Estrutura química da fumonisina B <sub>1</sub> .....	046
Figura 1.6 -	Estrutura química da zearalenona .....	047
Figura 2.1 -	Interpretação do Meio Rugai e Araújo, modificado por Pessoa e Silva .....	062
Figura 2.2 -	Freqüência de distribuição das amostras de drogas vegetais de acordo com a população média obtida na enumeração de bactérias (A) e de bolores e leveduras (B) .....	087
Figura 2.3 -	Freqüência de distribuição das amostras de drogas vegetais de acordo com o tipo de microrganismo detectado .....	099
Figura 3.1 -	Gráficos de correlação entre os métodos para enumeração de bactérias (A) e de bolores e leveduras (B) utilizando técnica de semeadura em profundidade (método convencional) e sistema Petrifilm® .....	117
Figura 4.1 -	Esquema para desenvolvimento de cromatografia bi-dimensional ...	130
Figura 4.2 -	Porcentagem de isolados fúngicos detectados em drogas vegetais em função do gênero .....	132
Figura 4.3 -	Distribuição das espécies de <i>Aspergillus</i> e <i>Penicillium</i> detectados em drogas vegetais .....	132
Figura 4.4 -	Placa cromatográfica obtida na avaliação do potencial aflatoxigênico de cinco cepas de <i>Aspergillus</i> isoladas em drogas vegetais .....	136
Figura 4.5 -	Distribuição dos isolados toxigênicos detectados em drogas vegetais em função do tipo de micotoxina produzida .....	137
Figura 5.1 -	Esquema dos procedimentos para extração utilizados na detecção de aflatoxinas em drogas vegetais .....	152

Figura 5.2 -	Placa cromatográfica obtida na avaliação de método farmacopêico para detecção de aflatoxina B <sub>1</sub> em drogas vegetais .....	154
Figura 5.3 -	Placa obtida com a técnica de cromatografia bi-dimensional, sendo (A) cromatograma obtido após o primeiro sistema de solventes, composto por tolueno, acetato de etila e ácido fórmico (50:40:10 v/v/v) e (B) cromatograma obtido após o segundo sistema de solventes, composto por clorofórmio e acetona (90:10 v/v) .....	155
Figura 5.4 -	Curva de regressão linear obtida na comparação da eficiência de extração entre os métodos USP, 2005 (Método I) e descrito por Soares e Rodriguez-Amaya (Método II) .....	158
Figura 5.5 -	Esquema do princípio de utilização de colunas de imunoafinidade .	169
Figura 5.6 -	Esquema do procedimento para imunoextração de aflatoxina B <sub>1</sub> em drogas vegetais, utilizando colunas de imunoafinidade AflaTest <sup>®</sup> ...	175
Figura 5.7 -	Placa cromatográfica obtida na avaliação da técnica de imunoextração em relação ao método farmacopêico para detecção de aflatoxina B <sub>1</sub> em amostra de alcachofra, sendo que (A) representa extrato obtido por método oficial e (B), o extrato obtido por imunoextração .....	180

## LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 - Amostras de drogas vegetais utilizadas no estudo de avaliação da contaminação microbiana e da presença de aflatoxinas, ocratoxina A e citrinina .....	055
Tabela 2.2 - Taxas de Recuperação (R) de <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Salmonella Choleraesuis</i> , <i>Escherichia coli</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , obtidas na validação de metodologia de contagem microbiana .....	077
Tabela 2.3 - Taxas de Recuperação (R) de <i>Candida albicans</i> e <i>Aspergillus niger</i> , obtidas na validação de metodologia de contagem microbiana .....	080
Tabela 2.4 - Valores médios obtidos na enumeração de microrganismos .....	083
Tabela 2.5 - Distribuição das amostras de drogas vegetais de acordo com a população microbiana obtida .....	086
Tabela 2.6 - Incidência de bactérias isoladas em drogas vegetais .....	091
Tabela 2.7 - Incidência de fungos isolados em drogas vegetais .....	095
Tabela 2.8 - Drogas vegetais que apresentaram as espécies microbianas consideradas indicadores de risco .....	104
Tabela 3.1 - Valores médios obtidos na enumeração de microrganismos utilizando método convencional e sistema Petrifilm® .....	113
Tabela 3.2 - Dados da análise estatística entre os métodos de enumeração de microrganismos em drogas vegetais, utilizando método convencional e sistema Petrifilm® .....	118
Tabela 4.1 - Incidência de fungos produtores de aflatoxinas, ocratoxina A e citrinina isolados em drogas vegetais .....	134
Tabela 5.1 - Recuperação de aflatoxina B <sub>1</sub> (AFB <sub>1</sub> ) obtida por método farmacopêico (Método I) e por método descrito por Soares e Rodriguez-Amaya (Método II) .....	157
Tabela 5.2 - Recuperação de aflatoxina B <sub>1</sub> (AFB <sub>1</sub> ) obtida por imunoextração utilizando coluna AflaTest® .....	178

Tabela 5.3 - Comparação entre as taxas de recuperação de aflatoxina B <sub>1</sub> em drogas vegetais obtidas por imunoextração e por extração farmacopêica .....	179
---	-----

## RESUMO

O aumento na demanda, a falta de fiscalização sanitária efetiva e de especificações adequadas para verificar a qualidade de drogas vegetais são fatores que contribuem para o acesso a produtos sem garantia da qualidade e segurança. Embora sejam consideradas seguras por sua origem natural, as drogas vegetais apresentam elevadas cargas microbianas e podem oferecer riscos potenciais aos usuários, tanto pela presença de microrganismos potencialmente patogênicos, quanto pela contaminação com toxinas. O objetivo deste estudo foi avaliar a contaminação microbiana presente em 91 amostras de drogas vegetais, o potencial toxigênico de fungos isolados e a presença de aflatoxinas, ocratoxina A e citrinina nestas amostras. Os resultados obtidos demonstraram que 73,6% das amostras apresentaram populações microbianas superiores a  $2 \times 10^3$  UFC de bactérias aeróbias/g e  $2 \times 10^2$  UFC de bolores e leveduras/g e que 81,3% apresentaram ao menos um dos microrganismos considerados indicadores de risco. Com relação à contaminação fúngica, observou-se o predomínio dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, sendo que a análise micotoxicológica revelou que 21,49% apresentaram capacidade para produção de aflatoxinas, ocratoxina A e citrinina. Apesar de fungos toxigênicos terem sido detectados em 35 amostras de drogas vegetais, a análise micotoxicológica, realizada conforme Farmacopéia Americana, não revelou a presença de aflatoxinas, ocratoxina A e citrinina em nenhuma das amostras de drogas vegetais, indicando que os microrganismos podem não terem sido submetidos a condições favoráveis à expressão de sua capacidade toxigênica.



## ABSTRACT

The increase in the demand, the lack of effective sanitary fiscalization and adjusted specifications to verify the quality of crude herbal drugs are factors that contribute for accessing products without guarantee of the quality and safety. Although they are considered safe by their natural origin, herbal drugs present high microbial loads and can offer potential risks to the users, as much for the presence of potentially pathogenic microorganisms, how much for the contamination with toxins. The goal of this study was evaluate the microbial contamination present in 91 samples of crude herbal drugs, the toxigenic potential of fungal isolates and the presence of aflatoxins, ochratoxin A and citrinin in these samples. The obtained results demonstrated 73.6% of the samples presented microbial populations higher than  $2 \times 10^3$  CFU of aerobic bacteria/g and  $2 \times 10^2$  CFU of yeast and molds/g and 81.3% presented at least one of the microorganisms considered as risk indicators. With regard to the fungal contamination, the *Aspergillus* and *Penicillium* genera were predominant and the mycotoxicological analysis revealed that 21.49% of these isolates presented ability for aflatoxins, ochratoxin A and citrinin production. Although toxigenic fungi have been detected in 35 samples of herbal drugs, the mycotoxicological analysis, carried through as The United States Pharmacopeia, showed no detection of aflatoxins, ochratoxin A or citrinin in any samples of herbal drugs, indicating that these fungi can not have been submitted a favorable conditions to the expression of their toxigenic ability.

# Drogas Vegetais: Avaliação da Contaminação Microbiana e Pesquisa de Aflatoxinas, Ocratoxina A e Citrinina

## CAPÍTULO I – Revisão de Literatura e Objetivos

### 1.1 – INTRODUÇÃO

Produtos naturais com propriedades terapêuticas são utilizados desde o início da história da civilização humana, sendo durante muito tempo, o principal recurso terapêutico empregado na prevenção, no tratamento, na cura de distúrbios, disfunções ou doenças em homens e animais (CAPASSO, 1986; CHOI *et al*, 2002; GARCIA *et al*, 2003; KOROLKOVAS, 1996; RATES, 2001; VEIGA *et al*, 2005).

Por definição, drogas vegetais são plantas medicinais ou suas partes, que após processos de coleta, estabilização e secagem estão em condições de serem utilizadas como medicamentos. As preparações derivadas de droga vegetal são produtos da extração da matéria-prima vegetal, como por exemplo, extratos, tinturas e exsudatos, enquanto que fitoterápicos correspondem a medicamentos obtidos exclusivamente de matérias-primas vegetais, sendo caracterizados pelo conhecimento de sua eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade (BRASIL, 2004).

A medicina popular e o conhecimento sobre o uso de plantas são o resultado de várias influências culturais: os povos primitivos iniciaram a configuração de conhecimentos através da identificação de gêneros e espécies vegetais, bem como das partes que melhor se adequavam ao uso medicinal e da utilização de técnicas de extração e conservação; estes conhecimentos foram, lentamente, sendo convertidos em memória coletiva e repassados às gerações seguintes (GARCIA *et al*, 2003; KOROLKOVAS, 1996; RATES, 2001).

A Revolução Industrial e o desenvolvimento da química orgânica provocaram a substituição dos medicamentos vegetais por produtos contendo princípio ativos deles extraídos ou seus derivados sintéticos (CAPASSO, 1986; DORES *et al*, 2003; KOROLKOVAS, 1996; RATES, 2001). O desenvolvimento da síntese química aumentou consideravelmente o número de substâncias ativas novas e de modificações estruturais que as tornavam mais potentes e seguras (CAPASSO, 1986; RATES, 2001); a indústria farmacêutica, inicialmente limitada a reproduzir constituintes ativos presentes em drogas vegetais, ao estabelecer uma relação entre estrutura química e atividade biológica, passou a investir na síntese de compostos análogos, modificações estruturais e finalmente, na síntese de novas moléculas (CAPASSO, 1986; RATES, 2001). Além disso, ao longo do desenvolvimento da cultura humana, os produtos naturais passaram a apresentar um significado místico e esta abordagem era oposta ao novo *modus vivendi* das sociedades industrializadas, que consideravam a utilização de produtos naturais como opção de pessoas incultas e de baixa renda e não aferiam a estes produtos qualquer valor farmacológico (RATES, 2001).

Entretanto, se considerado o impacto da descoberta da penicilina no desenvolvimento de terapias antimicrobianas, a importância de produtos naturais se torna evidente (RATES, 2001). As plantas continuam sendo importantes no desenvolvimento de novas drogas, como o taxol, um diterpenóide obtido de *Taxus brevifolia*, ou o etoposídeo, um composto semi-sintético baseado na estrutura da podofilotoxina obtida de *Podophyllum* spp, ou ainda, a reserpina, originalmente extraída da *Rauwolfia serpentina*, a digoxina obtida a partir da *Digitalis* spp, quinina e quinidina a partir da *Chinchona* spp, vincristina e vinblastina a partir da *Catharanthus roseus*, atropina a partir da *Atropa belladonna* e, morfina e codeína a partir da *Papaver somniferum* (GARCIA *et al*, 2003; RATES, 2001; SARDESAI, 2002). Cerca de 25% a 30% dos fármacos prescritos são derivados de plantas (CALIXTO, 2000, 2005; CHAN, 2003; RATES, 2001; SARDESAI, 2002). Dos 252 fármacos considerados básicos ou essenciais pela Organização Mundial da Saúde (OMS), que considera as plantas medicinais como a melhor e maior fonte de obtenção de fármacos para a humanidade, 11% são exclusivamente de origem vegetal e existe um número considerável de fármacos sintéticos obtidos a partir de precursores naturais (CALIXTO, 2000; GARCIA *et al*, 2003; RATES, 2001).

O crescimento da indústria farmacêutica e o desenvolvimento de novos e mais eficazes fármacos sintéticos não diminuíram a importância das plantas medicinais. Ao contrário, nas últimas décadas tem sido verificado progressivo aumento na demanda por plantas medicinais e produtos derivados não apenas nos países em desenvolvimento, mas também em países industrializados, especialmente na França, Itália, Inglaterra, Espanha e, mais recentemente nos Estados Unidos (ABU-IRMAILEH e AFIFI, 2003; BENT e KO, 2004; BRANDÃO *et al*, 1998; CALIXTO, 2000, 2005;

CAPASSO, 1986; CHAN, 2003; DE SMET, 2004; ELVIN-LEWIS, 2001; ERNST, 2000; FENNELL *et al*, 2004; GIVEON *et al*, 2004; GOLDBECK-WOOD *et al*, 1996; MAHADY, 2001; MENNITI-IPPOLITO *et al*, 2002; RATES, 2001; SARDESAI, 2002; SONAGLIO *et al*, 1992; ZOLLMAN e VICKERS, 1999). De acordo com a Organização Mundial da Saúde, entre 65% e 80% da população mundial utilizam a medicina tradicional na atenção primária à saúde, prática que envolve principalmente a utilização de plantas medicinais e de preparações de origem vegetal (BENT e KO, 2004; CALIXTO, 2000, 2005; CHAN, 2003; RATES, 2001; SARDESAI, 2002; VEIGA *et al*, 2005).

Vários são os fatores econômicos, sociais e culturais que influenciam a utilização de plantas medicinais e terapias alternativas:

- o alto custo dos medicamentos convencionais torna o acesso proibitivo à parte da população, que encontra, muitas vezes, nas plantas medicinais e preparações derivadas, seu único recurso terapêutico (CALIXTO, 2000, 2005; FENNELL *et al*, 2004; MAHADY, 2001; MENNITI-IPPOLITO *et al*, 2002; SONAGLIO *et al*, 1992; RATES, 2001; VEIGA *et al*, 2005);
- a insatisfação com a medicina convencional, considerada ineficiente (ABU-IRMAILEH e AFIFI, 2003; CALIXTO, 2000; CAPASSO, 1986; CHAN, 2003; ELVIN-LEWIS, 2001; MAHADY, 2001; MENNITI-IPPOLITO *et al*, 2002; RATES, 2001; SARDESAI, 2001; ZOLLMAN e VICKERS, 1999);
- a preocupação com os efeitos adversos de medicamentos convencionais e a crença que medicamentos naturais são mais seguros e saudáveis (ABU-IRMAILEH e AFIFI, 2003; CALIXTO, 2000; CAPASSO, 1986; CHAN, 2003; DENG, 2002; ELVIN-LEWIS, 2001; MAHADY, 2001; MENNITI-IPPOLITO *et al*,

- a preferência por terapias alternativas, na busca do controle pessoal sobre a saúde e de conforto psicológico obtido por uma melhor relação médico-paciente (ABU-IRMAILEH e AFIFI, 2003; CALIXTO, 2000; ELVIN-LEWIS, 2001; MENNITI-IPPOLITO *et al*, 2002; RATES, 2001; SARDESAI, 2002; ZOLLMAN e VICKERS, 1999).

A movimentação no mercado de produtos de origem vegetal reflete o crescente interesse por tais produtos, que resultou no aumento do comércio internacional, atraindo o interesse das indústrias farmacêuticas, inclusive multinacionais, para o comércio de produtos de origem vegetal. Estima-se que, em 1997, o mercado mundial movimentou cerca de US\$ 10 bilhões, com crescimento de 6,5% ao ano (CALIXTO, 2000; RATES, 2001). Neste mesmo ano, o mercado europeu movimentou cerca de US\$ 7 bilhões, sendo US\$ 3,5 bilhões na Alemanha, US\$ 1,8 bilhão na França, US\$ 800 milhões na Itália, US\$ 500 milhões no Reino Unido, US\$ 300 milhões na Espanha e cerca de US\$ 100 milhões nos países nórdicos. Os mercados na Ásia e no Japão alcançam cerca de US\$ 2,3 bilhões e US\$ 2,1 bilhões, respectivamente (CALIXTO, 2000; RATES, 2001; VEIGA *et al*, 2005). Entretanto, nenhum outro país obteve crescimento maior que o mercado dos Estados Unidos, que verificou aumento de 25% ao ano, passando de US\$ 1 bilhão, em 1994, para US\$ 4 bilhões em 1998 e para US\$ 6,3 bilhões em 2000 (BENT e KO, 2004; CALIXTO, 2000; CHAN, 2003; MAHADY, 2001; SIMÕES e SCHENKEL, 2002).

### 1.1.1 – Os produtos de origem vegetal no Brasil

Os países da América Latina, juntos, possuem grande parte da biodiversidade do mundo (CALIXTO, 2005). O Brasil é reconhecido como o país com a maior extensão geográfica de sua flora, caracterizada pela grande biodiversidade, possuindo 60.000 espécies vegetais, que correspondem de 20% a 22% de toda flora mundial conhecida e a 75% das espécies existentes nas grandes florestas (CALIXTO, 2005; GARCIA *et al*, 2003; RATES, 2001; SIMÕES e SCHENKEL, 2002).

Aproximadamente 20% da população brasileira é responsável por 63% do consumo de medicamentos disponíveis, sendo o que o restante da população encontra nos produtos de origem natural, principalmente nas plantas medicinais, a única fonte de recursos terapêuticos (SIMÕES, 2000). Na maioria dos casos, as plantas medicinais são utilizadas de acordo com a tradição popular, desenvolvida por nativos ou trazida ao país por europeus, africanos e asiáticos, ocorrendo por automedicação e sem qualquer preocupação quanto a procedência e qualidade da droga vegetal, preparação derivada ou fitoterápico (RATES, 2001; SCHENKEL *et al*, 1986; SIMÕES e SCHENKEL, 2002).

A biodiversidade, característica do país, certamente se constitui em condição favorável para que se viabilizem tratamentos utilizando produtos de origem vegetal (GARCIA *et al*, 2003; KOROLKOVAS, 1996; RATES, 2001; SIMÕES e SCHENKEL, 2002). Além disso, em um país onde a população carente tem dificuldades para obter medicamentos convencionais, o uso criterioso da fitoterapia no sistema público de saúde pode ser considerado como alternativa para a redução de custos dos

medicamentos. No entanto, a utilização destes recursos terapêuticos requer sólido conhecimento científico sobre as plantas, seus efeitos terapêuticos e tóxicos, bem como de investimentos científicos e tecnológicos para a transformação de drogas vegetais em medicamentos industrializados (CALIXTO, 2000; RATES, 2001; SIMÕES e SCHENKEL, 2002).

Apesar de apresentar a maior biodiversidade do planeta, o Brasil não ocupa a mesma posição de destaque na produção de fitoterápicos, quando comparado a países como China, Índia e Alemanha: o mercado para terapias a base de plantas medicinais movimenta, no Brasil, cerca de US\$ 500 milhões e o setor fitoterápico representa menos de 7% do mercado de medicamentos no país. Problemas econômicos, culturais e sociais, a falta de planejamento que garanta a utilização racional dos recursos naturais e o difícil acesso a informações científicas que permitam assegurar a qualidade, eficácia e segurança, são algumas das dificuldades encontradas e que, freqüentemente, resultam em produtos cuja qualidade não atendem a requisitos mínimos (CALIXTO, 2000, 2005; RATES, 2001; SIMÕES e SCHENKEL, 2002; SONAGLIO *et al*, 1992).

### **1.1.2 – Fatores de risco associados a produtos de origem vegetal**

A utilização de drogas vegetais e preparações de origem vegetal como recurso terapêutico implica na necessidade de comprovação da qualidade, segurança e



eficácia (CHAN, 2003; CHOI *et al*, 2002; ELVIN-LEWIS, 2001; MAHADY, 2001; POZETTI, 1995; SONAGLIO *et al*, 1992).

Os produtos de origem vegetal são freqüentemente considerados seguros por sua origem natural (BENT e KO, 2004; CALIXTO, 2000; DE SMET, 2004; DENG, 2002; ELVIN-LEWIS, 2001; GIVEON *et al*, 2004; RATES, 2001; SONAGLIO *et al*, 1992). Entretanto, a complexidade que envolve a análise destes produtos, a falta de especificações farmacopêicas para o controle de qualidade e a pouca fiscalização sanitária contribuem para a baixa qualidade dos produtos de origem vegetal, além de possibilitar a ocorrência adulterações (BENT e KO, 2004; CALIXTO, 2000, 2005; DE SMET, 2004; DENG, 2002; ELVIN-LEWIS, 2001; ERNST, 2002 (b); GIVEON *et al*, 2004; POZETTI, 1995; RATES, 2001; SMOLINSKE, 2005; VEIGA *et al*, 2005).

O *status* legal dos medicamentos de origem vegetal varia entre os países, que adotam diferentes abordagens na sua regulação. Na Europa e Coréia, são bem estabelecidos e formalmente regulados, sendo os produtores obrigados a apresentarem provas científicas da segurança e eficácia de cada produto (BENT e KO, 2004; CALIXTO, 2000; CHOI *et al*, 2002; DE SMET, 2004; DENG, 2002; MAHADY, 2001; SARDESAI, 2002; SILANO *et al*, 2004; VEIGA *et al*, 2005). Em outros países, como nos Estados Unidos, são classificados como suplementos alimentares e afirmações quanto a propriedades terapêuticas não são permitidas, entretanto são requeridas a certificação e o controle de qualidade destes produtos (BENT e KO, 2004; DE SMET, 2004; CALIXTO, 2000; DENG, 2002; MAHADY, 2001; SARDESAI, 2002; SMOLINSKE, 2005; VEIGA *et al*, 2005). A situação é mais precária nos países em desenvolvimento, onde há grande número de produtos utilizados com

base na tradição e no conhecimento empírico sobre seu uso, além de pouca regulação (FENNEL *et al*, 2004; MAHADY, 2001; VEIGA *et al*, 2005).

São vários os relatos de produtos de origem vegetal adulterados, seja por estarem incorretamente identificadas ou substituídas por espécies diferentes com mesma indicação de uso (CALIXTO, 2000; CHAN, 2003; DE SMET, 2004; ELVIN-LEWIS, 2001; FARIAS *et al*, 1985; FENNEL *et al*, 2004; RATES, 2001; SARDESAI, 2002; SCHENKEL *et al*, 1986; SMOLINSKE, 2005; TASSANEEYAKUL *et al*, 2004; VEIGA *et al*, 2005), seja por apresentarem substâncias químicas sintéticas, como esteróides, estimulantes do sistema nervoso central, diuréticos e antibióticos (CHAN, 2003; DE SMET, 2004; DENG, 2002; ERNST, 2002; GIVEON *et al*, 2004; SARDESAI, 2002; VEIGA *et al*, 2005).

Muitos produtos podem estar contaminados com resíduos de pesticidas, metais pesados, como arsênico, chumbo, mercúrio, cádmio e tálio, microrganismos e suas toxinas (ABOU-ARAB *et al*, 1999; ALEXANDER *et al*, 1997; BENT e KO, 2004; BRANDÃO *et al*, 1998; CALIXTO, 2000; CHAN, 2003; CHOI *et al*, 2002; DE SMET, 2004; DENG, 2002; ELVIN-LEWIS, 2001; ERNST, 2002 (b); FARIAS *et al*, 1985; GIVEON *et al*, 2004; RATES, 2001; ROY e CHOURASIA, 1989; ROY e KUMARI, 1991; SARDESAI, 2002; SMOLINSKE, 2005; TASSANEEYAKUL *et al*, 2004; VEIGA *et al*, 2005).

### 1.1.3 – A contaminação microbiana em produtos de origem vegetal

O aumento do interesse por produtos de origem vegetal despertou a preocupação com a sua qualidade e segurança (CALIXTO, 2000; CHAN, 2003; CHOI *et al*, 2002; MAHADY, 2001; SONAGLIO, 1992), principalmente pela potencialidade de contaminação, considerando sua origem natural (ALEXANDER *et al*, 1997; CHAN, 2003; FISCHER *et al*, 1993, 1996).

Entre as principais fontes de contaminação, podem ser citados o ambiente e as condições em que ocorrem o cultivo e a colheita de plantas medicinais, as condições a que estão submetidas durante secagem, processamento, armazenamento e transporte (ABOU-ARAB *et al*, 1999; ABU-IRMAILEH e AFIFI, 2003; ALEXANDER *et al*, 1997; BENT e KO, 2004; BERMUDEZ *et al*, 1983; CALIXTO, 2000; CHAN, 2003; CHOURASIA, 1995; CZECH *et al*, 2001; EFUNTOYE, 1996; ELSHAFIE *et al*, 2002; FENNELL *et al*, 2004; HALT, 1998; KNEIFEL *et al*, 2002; MAGAN *et al*, 2003; MANDEEL, 2005; RATES, 2001; ROY e CHOURASIA, 1989; ROY e KUMARI, 1991; SMOLINSKE, 2005).

Os fatores ambientais podem interferir na qualidade de drogas vegetais e preparações derivadas não apenas por permitirem a decomposição química de seus constituintes, mas também por permitirem a contaminação por microrganismos. É esperado que drogas vegetais estejam contaminadas por amplo espectro de microrganismos, sendo vários os trabalhos que tratam sobre a contaminação microbiana de produtos naturais:

- Bermudez *et al* (1983) avaliaram a contaminação em 50 amostras de matérias-primas para uso farmacêutico. Verificaram populações superiores a  $10^3$  UFC de bactérias/g em 26,3% das amostras analisadas e populações superiores a  $10^{12}$  UFC de bolores e leveduras/g em todas as amostras analisadas, além da presença de *Bacillus cereus* e clostrídios sulfito redutores em 6% e 4% das amostras, respectivamente.
- Fischer *et al* (1993), que avaliaram 84 amostras de especialidades fitoterápicas obtidas no comércio de São Paulo, verificaram que 70,3% e 32,1% das amostras apresentaram, respectivamente, contagens superiores a  $10^3$  UFC de bactérias aeróbias/g e superiores a  $10^2$  UFC de bolores e leveduras/g, enquanto que a presença de *Escherichia coli* e *Salmonella* sp foi verificada em 6% das amostras.
- Kneifel e Berger (1994) analisaram 160 amostras de condimentos e ervas comercializados em Viena e verificaram contagens bacterianas variando entre  $8,2 \times 10^2$  e  $2,6 \times 10^7$  UFC/g, sendo que contagens superiores a  $10^3$  UFC/g foram obtidas em 94,5% das amostras; detectaram *Staphylococcus* coagulase-positiva e *Bacillus cereus* em 5% e 33,7% das amostras, respectivamente e *Salmonella arizonae*, em apenas uma amostra. Com relação à contaminação fúngica, verificaram que 11% das amostras apresentaram "alta contaminação fúngica", embora não mencionem a carga detectada.
- Santos *et al* (1995) analisaram 51 amostras de produtos fitoterápicos e verificaram contagens superiores a  $10^3$  UFC de bactérias/g e superiores a  $10^2$  UFC de bolores e leveduras/g em 33,3% e em 21,6% das amostras,

- respectivamente. Detectaram enterobactérias, *Pseudomonas aeruginosa* e *Bacillus cereus* em 21,6%, 3,9% e 3,9% das amostras e a presença de *Aspergillus spp* e *Penicillium spp*, em 23,5% e 2,0% das amostras.
- Alexander *et al* (1997) analisaram 425 especialidades fitoterápicas, sendo 250 amostras de comprimidos, 46 amostras na forma de pós e grânulos, 58 amostras de líquido oral e 71 amostras de produtos para uso tópico. Verificaram que 52,7% das amostras apresentaram contagens superiores a  $2 \times 10^3$  UFC de bactérias/g, sendo que populações bacterianas superiores a  $10^5$  UFC/g foram detectadas em 22% e em 33% das amostras de comprimidos e de pós ou grânulos, respectivamente. Com relação às populações fúngicas, contagens superiores a  $2 \times 10^2$  UFC/g foram detectadas em 6,4% das amostras, sendo que em 20% das amostras de pós ou grânulos foram detectadas populações superiores a  $10^4$  UFC/g. Não foram detectados os microrganismos *Escherichia coli*, *Salmonella sp*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* nas amostras, no entanto, verificaram a presença de *Enterobacter sp*, *Enterococcus faecalis/faecium*, *Clostridium perfringens* e *Klebsiella pneumoniae* em 21,9%, 14,6%, 4,0% e 2,8% das amostras.
  - Czech *et al* (2001) avaliaram a contaminação microbiana presente em 138 amostras de drogas vegetais, adquiridas no comércio da Áustria e Alemanha. Detectaram populações bacterianas variando entre  $10^2$  e  $10^8$  UFC/g, sendo superiores a  $2 \times 10^3$  UFC/g em cerca de 90% das amostras e populações fúngicas variando entre  $10^1$  e  $10^6$  UFC/g, sendo superiores a  $10^2$  UFC/g em cerca de 80% das amostras. Com relação aos microrganismos patogênicos,

- detectaram *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli* em 75,4%, 13,8 e em 2,9% das amostras, respectivamente.
- Martins *et al* (2001) avaliaram 62 amostras de 7 tipos de plantas medicinais, adquiridas em Lisboa, Portugal e verificaram populações médias de fungos da ordem de  $10^5$  UFC/g, além da presença de *Bacillus cereus* e *Clostridium perfringens* em 96,8% e 83,9% das amostras, respectivamente.
  - Zaroni *et al* (2004) verificaram que 79% das 72 amostras de plantas medicinais, produzidas no Estado do Paraná, não atenderam aos parâmetros microbiológicos estabelecidos pela Organização Mundial da Saúde. As contagens variaram entre  $2,0 \times 10^2$  e  $9,9 \times 10^6$  UFC de bactérias aeróbias/g e entre  $1,0 \times 10^2$  e  $8,4 \times 10^6$  UFC de bolores e leveduras/g. Não detectaram a presença de *Salmonella* sp e *Staphylococcus aureus* nas amostras, mas verificaram a presença de enterobactérias, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, respectivamente em 95,8%, 22,2% e 23,6%.

Embora a micobiota presente em produtos naturais receba tradicionalmente menor atenção que a flora bacteriana, os fungos são componentes normais da microbiota destes materiais e podem ser responsáveis por deteriorações e pela produção de micotoxinas, um perigo potencial à saúde humana, particularmente em países tropicais e subtropicais, que oferecem condições favoráveis ao crescimento fúngico e à produção de micotoxinas.

- Lutomsky e Kedzia (1980) analisaram 246 amostras de drogas vegetais e verificaram contagens superiores a  $10^2$  UFC de bolores e leveduras/g, em

- 90% das amostras. Em 50 amostras, foram predominantemente isolados, os gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Rhizopus* e *Thamnidium*.
- Em amostras de drogas vegetais provenientes do comércio de Bihar, Índia, Roy *et al* (1988) verificaram a presença de 13 espécies fúngicas, sendo *Aspergillus flavus*, *Aspergillus candidus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus luchuensis*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus nidulans*, *Fusarium moniliforme* e *Penicillium citrinum* as mais freqüentes, enquanto que Roy e Chourasia (1989) verificaram a presença de espécies de *Alternaria*, *Aspergillus*, *Curvularia*, *Fusarium*, *Penicillium* e *Rhizopus* e Roy e Kumari (1991) verificaram a presença dominante dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*.
  - Ruiz *et al* (1989) avaliaram a micoflora presente em 31 amostras de plantas medicinais da província de Havana, Cuba e detectaram a presença de 13 gêneros.
  - Em 120 amostras de especiarias adquiridas no mercado egípcio, El Kady *et al* (1992) verificaram que a população fúngica variou entre  $10^2$  e  $10^3$  UFC/g, sendo que os gêneros predominantes foram *Aspergillus* (25 espécies, entre as quais *A. flavus*, *A. niger*, *A. ochraceus*, *A. fumigatus* e *A. terreus*) e *Penicillium* (*P. chrysogenum* e *P. corylophilum*, além de outras 5 espécies).
  - Garrido *et al* (1992) verificaram contagens fúngicas superiores a  $10^2$  UFC/g em 87,5% das 124 amostras de condimentos e ervas, adquiridos em mercados espanhóis. Entre os gêneros detectados, *Aspergillus* e *Penicillium* foram os dominantes, tendo sido isolados também, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Mucor*, *Paecilomyces*, *Pullularia*, *Sporendonema*, *Syncephalastrum* e *Tricothecium*.

- Chourasia (1995) verificou a presença, principalmente de *Aspergillus* spp (em 54% das amostras) e de *Fusarium* spp, em amostras de drogas vegetais de Bhagapur, Índia. Entre os isolados de *Aspergillus* spp, foram detectados *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* e *Aspergillus ochraceus*.
- Santos *et al* (1995) analisaram 51 amostras de produtos fitoterápicos e verificaram contagens superiores a  $10^2$  UFC de bolores e leveduras/g em 21,6% das amostras, sendo detectada a presença de *Aspergillus* spp (*A. niger*, *A. fumigatus*, *A. ochraceus* e *A. ornatus*), *Erortium* spp, *Penicillium* spp, *Cladosporium* e *Paecilomyces* spp em 23,5%, 3,9%, 2,0%, 2,0% e em 2,0% das amostras, respectivamente.
- Efuntoye (1996) verificou contagens fúngicas menores que  $10^2$  UFC/g em 25% das amostras de drogas vegetais adquiridas em Ibadan, Nigéria. Vinte e oito espécies de fungos foram isolados, entre as quais *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Fusarium moniliforme*, *Trichoderma viride*, *Penicillium expansum* e *Mucor fragilis* foram as dominantes.
- Em 84 amostras de plantas medicinais analisadas por Aziz *et al* (1998), verificou-se a presença de 10 gêneros fúngicos, sendo detectados com maior frequência *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum* e *Penicillium viridicatum*.
- Halt (1998) analisou 62 amostras de drogas vegetais e 11 amostras de chás. Verificou contagens fúngicas variando entre  $10^2$  e  $10^5$  UFC/g e entre  $10^2$  e  $10^4$  UFC/g nas amostras de drogas vegetais e de chás, respectivamente. Os gêneros fúngicos predominantes foram *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Absidia*, *Alternaria*, *Cladosporium* e *Trichoderma*.



- Abou-Arab *et al* (1999) analisaram amostras de drogas vegetais e verificaram que os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* foram os mais frequentemente detectados. Foram isolados *Penicillium* spp, *Aspergillus crothecium*, *Aspergillus condius*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus ochraceus* e *Aspergillus terreus*, além de *Alternaria*, *Fusarium* spp, *Rhizoctonia* e *Trichoderma*.
- Em 48 amostras de chá preto (*Camellia sinensis* L.), Elshafie *et al* (1999) verificaram a presença de cinco espécies de fungos, sendo *Aspergillus niger* a espécie dominante. Outros fungos detectados foram *Aspergillus flavus*, *Penicillium* spp e *Paecilomyces* spp.
- Martins *et al* (2001), ao avaliaram 62 amostras de plantas medicinais adquiridas em Lisboa, Portugal, verificaram populações médias de fungos da ordem de  $10^5$  UFC/g e a presença de *Fusarium* spp (59,7%), *Aspergillus flavus* (22,6%), *Aspergillus glaucus* (32,2%) e *Aspergillus niger* (46,8%), além de *Penicillium* spp (61,3%), *Absidia* (21,0%), *Mucor* (37,1%), *Cladosporium* (21,0%) e *Paecilomyces* (11,3%).
- Em 105 amostras, compostas por 7 tipos de especiarias, obtidas no comércio do Sultanato de Oman, Elshafie *et al* (2002) detectaram 20 espécies fúngicas, sendo que as espécies dominantes foram *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium* spp, *Rhizopus* spp e *Syncephalastrum racemosum*.
- 52% das 152 amostras de plantas medicinais argentinas analisadas por Rizzo *et al* (2004) apresentaram contaminação com espécies de *Aspergillus*, principalmente *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, enquanto 16% das

amostras estavam contaminadas com espécies de *Fusarium* (*Fusarium verticillioides* e *Fusarium proliferatum*).

- Mandeel (2005) detectou 14 espécies fúngicas em amostras de especiarias, sendo que os gêneros dominantes foram *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Cladosporium* e *Trichoderma*.

Os fungos toxigênicos, que apresentam capacidade para produção de micotoxinas, são relativamente ubíquos e adaptados para colonizar, crescer e produzir toxinas em uma variedade de substratos quando em condições favoráveis, sendo as condições ótimas para a produção de toxinas pelas diferentes espécies de fungos bastante variadas (ASSANTE *et al*, 1981; BENNETT e KLICH, 2003; CHOURASIA e ROY, 1991; CVETNIC e PEPELJNJAK, 1997; HESSELTINE *et al*, 1966; SORENSEN *et al*, 1967; STOLOFF, 1979). Os fungos micotoxigênicos mais importantes e freqüentemente encontrados pertencem aos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* (ASSANTE *et al*, 1981; COSTA e SCUSSEL, 2002; FILTENBORG *et al*, 1996; PITT *et al*, 2000; STOLOFF, 1979; SWEENEY e DOBSON, 1998).

O gênero *Aspergillus* é largamente distribuído, embora ocorra com maior freqüência em regiões subtropicais e tropicais; sua capacidade de crescer em condições de alta temperatura e baixa atividade de água permite a colonização em extensa variedade de substratos, sendo freqüentemente encontrado como contaminante durante o armazenamento (CHOURASIA e ROY, 1991; FILTENBORG *et al*, 1996; HESSELTINE *et al*, 1966; PITT *et al*, 2000; SORENSEN *et al*, 1967; SWEENEY e DOBSON, 1998). As micotoxinas associadas com espécies de *Aspergillus* incluem as aflatoxinas, ocratoxinas, sterigmatocistina, citrinina, gliotoxina, ácido

ciclopiazônico, patulina, entre outras (FILTENBORG *et al*, 1996; SWEENEY e DOBSON, 1998).

Os membros do gênero *Penicillium* geralmente crescem e produzem micotoxinas, como citrinina, ocratoxinas, ácido ciclopiazônico e sterigmatocistina, em climas temperados e, assim como *Aspergillus*, são geralmente associados com contaminação durante a estocagem (FILTENBORG *et al*, 1996; PITT *et al*, 2000; SWEENEY e DOBSON, 1998). O gênero *Fusarium* é o mais complexo, com espécies adaptadas a vários habitats; são largamente distribuídos, mas poucas espécies são produtoras de micotoxinas, como tricotecenos, fumonisinas e zearalenona (PITT *et al*, 2000; SWEENEY e DOBSON, 1998).

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 estão associados à detecção de micotoxinas, considerando que o fungo pode não ter sido exposto a condições favoráveis à produção de toxinas e que existem cepas dentro de uma mesma espécie que não possuem 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; LLWELLYN *et al*, 1981, 1992; PITT *et al*, 2000; ROY *et al*, 1988; ROY e CHOURASIA, 1989; ROY e KUMARI, 1991; STOLOFF, 1979; YONG e COUSIN, 2001).

### 1.1.4 – A contaminação com micotoxinas

Micotoxinas são metabólitos secundários, orgânicos e complexos, com elevada toxicidade, quando em pequenas quantidades, a humanos e animais. Deve-se considerar, entretanto que nem todas as espécies fúngicas são produtoras de micotoxinas (BENNETT e KLICH, 2003; FILTENBORG et al, 1996; LACIAKOVA *et al*, 2005; PITT *et al*, 2000; REIF e METZGER, 1995; REN *et al*, 1999; RESNIK *et al*, 1995; SWEENEY e DOBSON, 1998; TRUCKSESS, 2001).

O termo *micotoxina* descreve um grupo bastante diversificado de componentes químicos, com diferentes fórmulas estruturais, propriedades químicas, físicas e toxicológicas, tendo em comum somente o fato de serem produtos de biossíntese fúngica (BENNETT e KLICH, 2003; LACIAKOVA *et al*, 2005; NORRED, 2000; PITT *et al*, 2000; RESNIK *et al*, 1995; STOLOFF, 1979; SWEENEY e DOBSON, 1998; TRUCKSESS, 2001), em condições específicas, em geral independentes daquelas necessárias ao crescimento fúngico (CHOURASIA e ROY, 1991; STOLOFF, 1979; SWEENEY e DOBSON, 1998), sendo a contaminação, freqüentemente, um processo aditivo que começa no campo e continua durante a coleta, secagem e armazenamento (CHOURASIA e ROY, 1991; LACIAKOVA *et al*, 2005; STOLOFF, 1979), influenciado por vários fatores, incluindo a atividade de água, aeração e temperatura do substrato, concentração de fungos presentes no material, interações microbianas, danos mecânicos e infestação por insetos. A presença de micotoxinas é consequência da completa interação destes fatores, embora umidade e temperatura sejam determinantes para sua produção (CAIRNS-FULLER *et al*, 2005; CHOURASIA e

ROY, 1991; ESTEBAN *et al*, 2004; MAGAN *et al*, 2003; PITT *et al*, 2000; STOLOFF, 1979; SWEENEY e DOBSON, 1998; VENTURA *et al*, 2005).

A principal via de exposição às micotoxinas é a ingestão de produtos contaminados, embora a exposição dérmica e inalatória sejam importantes vias a serem consideradas (BENNETT e KLICH, 2003; LACIAKOVA *et al*, 2005; REN *et al*, 1999; TRUCKSESS, 2001). Os efeitos toxicológicos da exposição a micotoxinas podem ser agudamente tóxicos, carcinogênicos, mutagênicos, teratogênicos e/ou imunossupressores e dependem de vários fatores, como tipo e dose da micotoxina, via e tempo de exposição e suscetibilidade da espécie, a qual, por sua vez, pode ser afetada por fatores genéticos e fisiológicos como idade, sexo, estado nutricional, estado de saúde, além de fatores ambientais como exposição a outras substâncias tóxicas (BENNETT e KLICH, 2003; LACIAKOVA *et al*, 2005; PITT *et al*, 2000). Em geral, a incidência ocorre em partes do mundo onde manipulação e armazenamento de produtos são realizados sob condições precárias, nas quais existem problemas de má nutrição e pouca regulação para proteger as populações expostas (BENNETT e KLICH, 2003).

Apesar dos avanços na avaliação de riscos, no controle e no impacto econômico e em Saúde Pública da presença de micotoxinas em alimentos, poucos são os estudos referentes à incidência de micotoxinas em drogas vegetais e fitoterápicos. No entanto, estes estudos indicam a contaminação de drogas vegetais e preparações derivadas por micotoxinas:

- Em amostras de drogas vegetais provenientes do comércio de Bihar, Índia, Roy *et al* (1988) verificaram a presença de aflatoxina B<sub>1</sub> (concentrações variando entre 0,09 e 1,20 µg/g) em 14 de 15 amostras analisadas, enquanto

- que Roy e Chourasia (1989) verificaram a presença de aflatoxinas em 30 de 37 amostras analisadas e Roy e Kumari (1991) verificaram 36 amostras positivas para aflatoxina B<sub>1</sub> (0,02 a 1,18 µg/g) e 11 amostras positivas para citrinina (0,01 a 0,76 µg/g).
- 43% das amostras de drogas vegetais analisadas por Chourasia (1995) apresentaram-se contaminadas com micotoxinas, sendo que todas apresentaram aflatoxina B<sub>1</sub> (0,05 a 0,91 µg/g); 6% das amostras, ocratoxina A (0,00 a 0,13 µg/g); 6% das amostras, citrinina (0,00 a 0,16 µg/g) e, 4% das amostras, zearalenona (0,00 a 0,11 µg/g). Das 25 amostras de drogas vegetais pulverizadas analisadas, 64%, 4% e 20%, respectivamente, apresentaram contaminação com aflatoxina B<sub>1</sub>, ocratoxina A e citrinina.
  - Reif e Metzger (1995) verificaram a presença de aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> em amostras de drogas vegetais e preparações derivadas.
  - De um total de 84 amostras de drogas vegetais analisadas por Aziz *et al* (1998), 17 amostras revelaram a presença de aflatoxina B<sub>1</sub> (10 a 160 µg/kg) e 3 amostras revelaram a presença de ocratoxina A (20 a 80 µg/kg)
  - Apenas 1 amostra de um total de sete amostras de drogas vegetais analisadas por Halt (1998) apresentou contaminação com ocratoxina A.
  - Yang *et al* (2005) verificaram a presença de aflatoxinas em 14 amostras de drogas vegetais chinesas, tendo sido detectadas aflatoxina B<sub>1</sub> em 3 amostras (1,58, 4,18 e 27,80 µg/kg), aflatoxina B<sub>2</sub> em 3 amostras (1,32, 5,16 e 4,38 µg/kg) e aflatoxina G<sub>1</sub> em uma amostra (1,31 µg/kg)

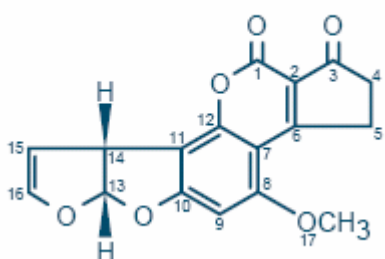
- Murtag e Yazicioglu (2004) analisaram 115 amostras de chás e drogas vegetais comercialmente disponíveis e detectaram fumonisina B<sub>1</sub> em duas amostras (0,160 e 1,487 µg/g).
- 18% das 28 amostras de fitoterápicos da Tailândia, analisadas por Tassaneeyakul *et al* (2004) apresentaram contaminação com aflatoxinas em concentrações entre 1,7 e 14,3 ng/g.

#### 1.1.4.1 – Aflatoxinas

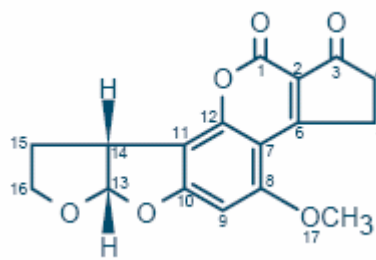
A descoberta das aflatoxinas, em 1960, marca o início da moderna era da micotoxicologia (BOUTRIF e BESSY, 2000; NORRED, 2000). Na Inglaterra, uma síndrome, então denominada de “Turkey X disease”, resultou na morte de cerca de 100.000 perus, 14.000 patos e milhares de perdizes e faisões. A causa das mortes foi atribuída à ração oferecida aos animais, contendo farelo de amendoim altamente contaminado com *Aspergillus flavus*. Análises posteriores na ração, utilizando técnicas de cromatografia em papel e em camada delgada, revelaram uma série de componentes fluorescentes, depois denominados de aflatoxinas, responsáveis pelas ocorrências (BENNETT e KLICH, 2003; BOUTRIF e BESSY, 2000; NORRED, 2000; RUSTOM, 1997; SHEPHARD, 2000).

As principais aflatoxinas, aquelas de interesse médico-sanitário, são as aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub>, denominadas de acordo com a fluorescência, azul (B) ou verde (G), emitida sob luz ultravioleta e com a mobilidade relativa obtida na

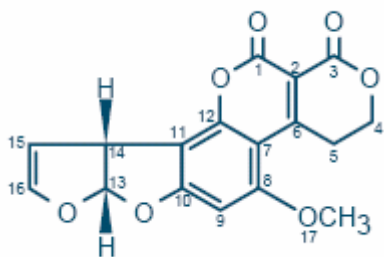
cromatografia em camada delgada, além de dois produtos de biotransformação, identificados como M<sub>1</sub> e M<sub>2</sub> (BENNETT e KLICH, 2003; GELLI *et al*, 1990; OLIVEIRA e GERMANO, 1997; PITTET, 2000; SWEENEY e DOBSON, 1998). A Figura 1.1 apresenta a estrutura química das aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> e M<sub>1</sub>.



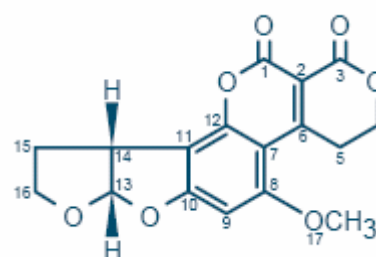
**Aflatoxina B<sub>1</sub>**



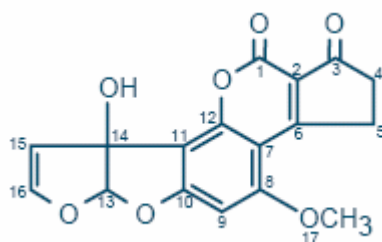
**Aflatoxina B<sub>2</sub>**



**Aflatoxina G<sub>1</sub>**



**Aflatoxina G<sub>2</sub>**



**Aflatoxina M<sub>1</sub>**

Fonte: CAST, 2003

**FIGURA 1.1 – Estruturas químicas das principais aflatoxinas**



As aflatoxinas são derivados difuranocumarínicos, produzidos por espécies de *Aspergillus*, principalmente *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* e *Aspergillus nomius* (BENNETT e KLICH, 2003; BOUTRIF e BESSY, 2000; HESSELTINE *et al*, 1970; OLIVEIRA e GERMANO, 1997; PITTET, 2000; RUSTOM, 1997; SWEENEY e DOBSON, 1998). *Aspergillus bombycis*, *Aspergillus ochraceoroseus* e *Aspergillus pseudotamari* também são conhecidas como espécies aflatoxigênicas, encontradas com menores frequências (BENNETT E KLICH, 2003).

As aflatoxinas caracterizam-se por elevada toxicidade, com efeitos tóxicos agudos em doses muito pequenas, e carcinogenicidade em humanos e animais, sendo a aflatoxina B<sub>1</sub> o mais potente hepatocarcinógeno natural conhecido e freqüentemente a principal aflatoxina produzida pelas cepas toxigênicas (BENNETT e KLICH, 2003; BOUTRIF e BESSY, 2000; NORRED, 2000; OLIVEIRA e GERMANO, 1997; PITT *et al*, 2000; PITTET, 2000; REIF e METZGER, 1995; RUSTOM, 1997; SWEENEY e DOBSON, 1998).

Existem hipóteses de que doenças como o *kwashiokor* e a síndrome de Reye estejam associadas à ingestão de alimentos contaminados por aflatoxinas (BENNETT e KLICH, 2003; OLIVEIRA e GERMANO, 1997), além de evidências de estarem envolvidas na etiologia do câncer hepático, conseqüente à ingestão de produtos contaminados (BENNETT e KLICH, 2003; OLIVEIRA e GERMANO, 1997; PITT *et al*, 2000).

As aflatoxinas são absorvidas no trato gastrintestinal e biotransformadas no fígado, conforme apresentado na Figura 1.2. A biotransformação ocorre pela ação de enzimas microssomais pertencentes à superfamília de enzimas do citocromo P-450, resultado em um composto reativo 8,9-epóxido, capaz de reagir, através de ligações

covalentes, com sítios nucleofílicos de macromoléculas como ácido desoxirribonucléico (DNA), ácido ribonucléico (RNA) e proteínas. A ligação do derivado epóxido com guaninas da molécula de DNA, na posição N7, forma adutos, os quais representam a lesão bioquímica primária produzida por aflatoxinas, modificando a estrutura do DNA e, conseqüentemente, sua atividade biológica, resultando em efeitos mutagênicos e carcinogênicos (BENNETT e KLICH, 2003; OLIVEIRA e GERMANO, 1997; PITT *et al*, 2000). As aflatoxinas são, portanto, pró-carcinógenos, os quais requerem ativação metabólica para manifestar seus efeitos tóxicos (OLIVEIRA e GERMANO, 1997). Além da epoxidação, a biotransformação das aflatoxinas inclui a formação de metabólitos hidroxilados, menos ativos, como as aflatoxinas M, Q e P, hidrossolúveis e que podem ser rapidamente excretadas (BENNETT e KLICH, 2003; OLIVEIRA e GERMANO, 1997; PITT *et al*, 2000).

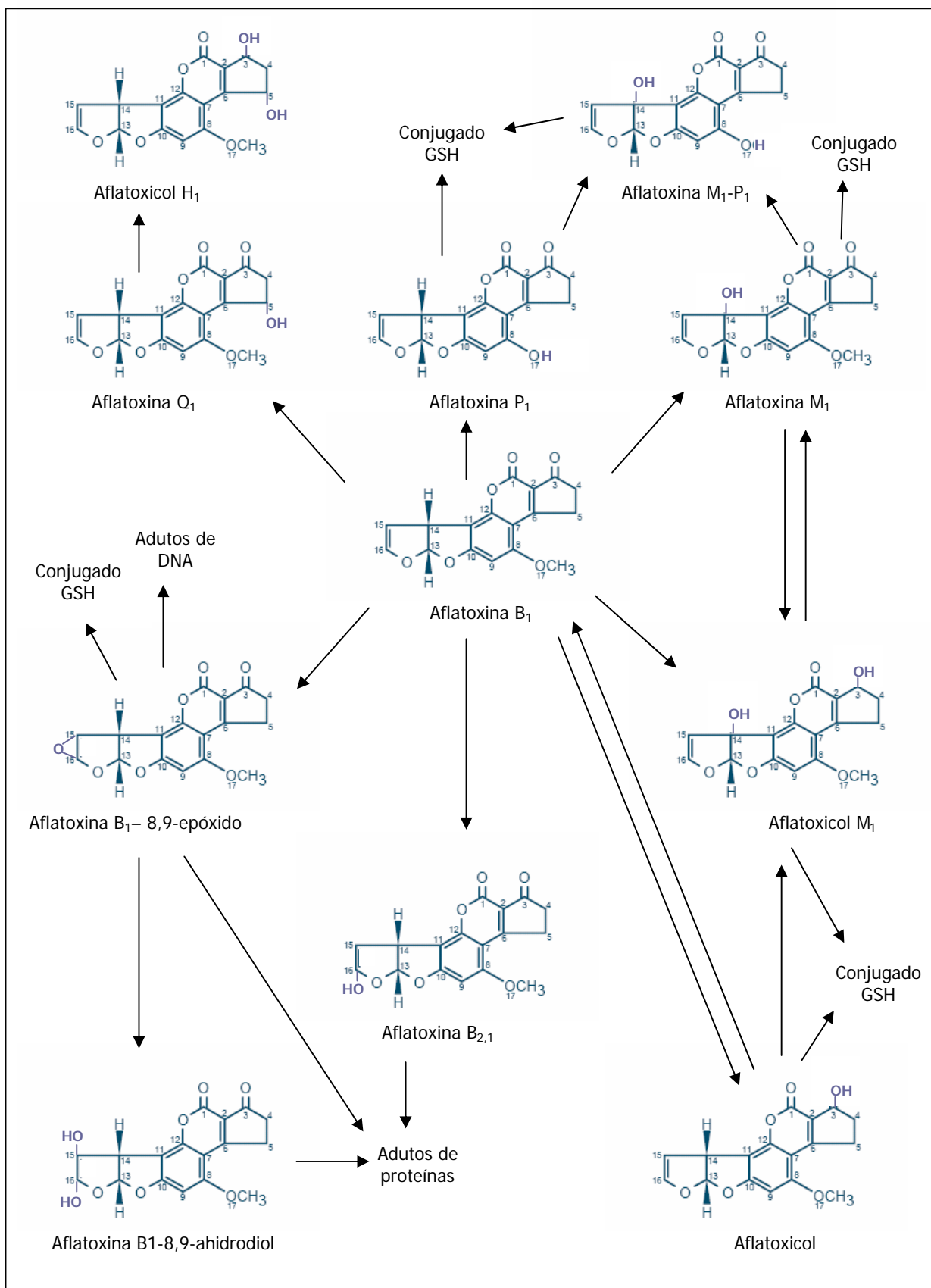
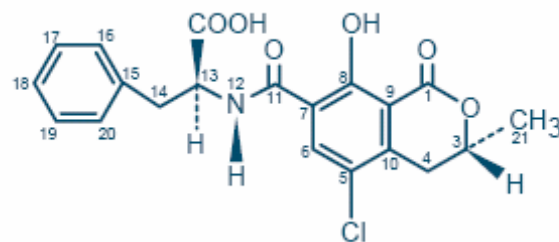


FIGURA 1.2 – A biotransformação de aflatoxina B<sub>1</sub>

### 1.1.4.2 – Ocratoxinas

As ocratoxinas constituem outro grupo de micotoxinas de extrema importância, sendo o segundo grupo mais estudado após a descoberta das aflatoxinas. (BRAGULAT *et al*, 2001; PITTET, 2000; SPEIJERS, 2000; SWEENEY e DOBSON, 1998).

A ocratoxina A (Figura 1.3), descoberta em 1965, é reconhecida como a mais tóxica micotoxina deste grupo, apresentando propriedades nefrotóxicas, hepatotóxicas e imunotóxicas, além de potenciais propriedades carcinogênicas e genotóxicas (BENNETT e KLICH, 2003; PARDO *et al*, 2004; PITT *et al*, 2000; PITTET, 2000; SPEIJERS, 2000; SWEENEY e DOBSON, 1998; VENTURA *et al*, 2005). É produzida por espécies de *Penicillium*, principalmente *Penicillium verrucosum*, em climas temperados ou frios, enquanto que em climas tropicais, por várias espécies de *Aspergillus*, principalmente por *Aspergillus ochraceus*, mas também por *Aspergillus alliaceus*, *Aspergillus auricomus*, *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus glaucus*, *Aspergillus melleus* e *Aspergillus niger* (ABARCA *et al*, 2001; BENNETT e KLICH, 2003; MOLINIE *et al*, 2005; PARDO *et al*, 2004; VENTURA *et al*, 2005).



Fonte: CAST, 2003

FIGURA 1.3 – Estrutura química da ocratoxina A

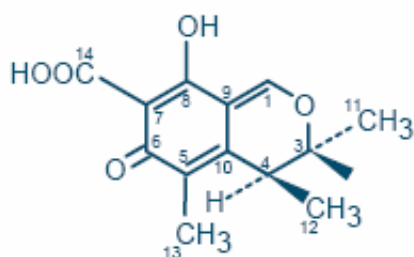
Existem estudos que associam as ocratoxinas à doença chamada nefropatia endêmica dos Balcãs, uma progressiva nefrite crônica em populações que viviam às margens do Rio Danúbio, em áreas da Romênia, Bulgária e antiga Iugoslávia (BENNETT e KLICH, 2003).

Os efeitos nefrotóxicos da ocratoxina A estão relacionados com a formação de complexos com ferro produzindo radicais hidroxila, os quais promovem lipoperoxidação. O dano renal é morfológicamente caracterizado por atrofia do túbulo proximal, fibrose e esclerose e, funcionalmente, por incapacidade da função tubular (BENNETT e KLICH, 2003; PITT *et al*, 2000).

#### **1.1.4.3 – Citrinina**

Foi isolada pela primeira vez, antes da 2ª Guerra Mundial, a partir de *Penicillium citrinum*. Em seguida, foram identificadas várias espécies de *Penicillium* e *Aspergillus* produtoras de citrinina, entre as quais *Aspergillus terreus*, *Aspergillus niveus*, *Aspergillus oryzae* e algumas cepas de *Penicillium camemberti* e, mais recentemente, *Monascus ruber* e *Monascus purpureus* (BENNETT e KLICH, 2003; MOLINIE *et al*, 2005; SWEENEY e DOBSON, 1998).

A citrinina (Figura 1.4) atua como uma nefrotoxina para todas as espécies animais estudadas, mas sua toxicidade aguda varia entre diferentes espécies, além de poder apresentar ação sinérgica com ocratoxina A (BENNETT e KLICH, 2003).

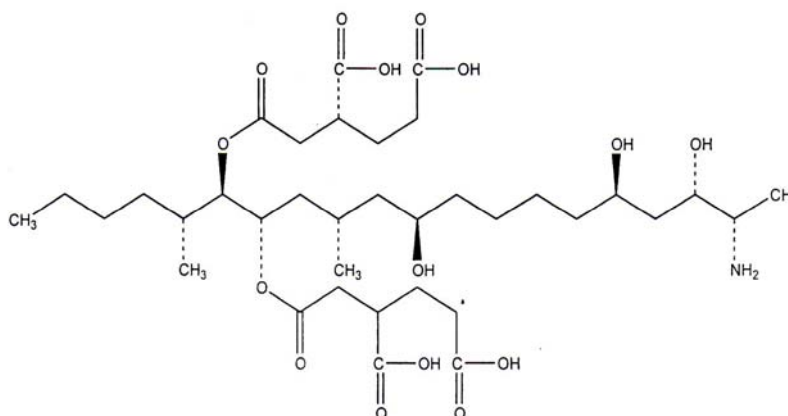


Fonte: CAST, 2003

FIGURA 1.4 – Estrutura química da citrinina

#### 1.1.4.4 – Fumonisinias

Descritas e caracterizadas em 1988, as fumonisinias são produzidas por várias espécies de *Fusarium*, principalmente *Fusarium verticillioides* (anteriormente denominado *Fusarium moniliforme*), *Fusarium proliferatum* e *Fusarium nygamai*, além de *Alternaria alternata*, sendo a fumonisinina B1 (Figura 1.5) a mais produzida (BENNETT e KLICH, 2003; NORRED, 2000; PITT *et al*, 2000; SWEENEY e DOBSON, 1998).



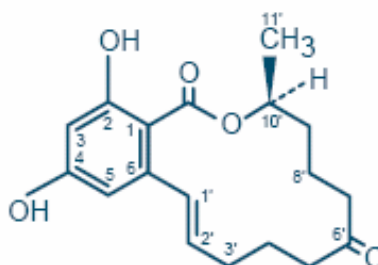
Fonte: CAST, 2003

FIGURA 1.5 – Estrutura química da fumonisinina B<sub>1</sub>

Estão relacionadas à ocorrência de leucoencefalomalacia em equinos e coelhos, edema pulmonar em porcos e efeito tóxico no sistema nervoso, fígado, pâncreas, rins e pulmão de várias espécies animais. Em humanos, existe correlação entre a ingestão de fumonisinas e a ocorrência de câncer de esôfago. Alteram o metabolismo de esfingolipídios por inibição da enzima ceramida sintetase, sendo que o bloqueio da síntese de esfingolipídios e o acúmulo de esfingosina alteram a regulação celular, ocasionando disfunções neurológicas em humanos (BENNETT e KLICH, 2003; NORRED, 2000; PITT *et al*, 2000).

#### 1.1.4.5 – Zearalenona

Zearalenona (Figura 1.6) é um derivado estrogênico produzido por diferentes espécies de *Fusarium*, entre as quais podem ser citadas *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium equiseti* e *Fusarium crookwellense* (BENNETT e KLICH, 2003).



Fonte: CAST, 2003

FIGURA 1.6 – Estrutura química da zearalenona

## 1.2 – OBJETIVOS

O presente estudo tem como objetivos:

- a) Investigar a qualidade microbiológica de amostras de drogas vegetais;
- b) Isolar e identificar as principais espécies contaminantes;
- c) Identificar o potencial toxigênico dos fungos isolados;
- d) Avaliar a presença de aflatoxinas, ocratoxina A e citrinina em amostras de drogas vegetais e em preparações derivadas