



**FUNGOS PRODUTORES DE MICOTOXINAS EM MEDICAMENTOS
FITOTERÁPICOS**

ANA CRISTINA REGIS DE BARROS CORREIA

**RECIFE
FEVEREIRO/2012**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE FUNGOS

**FUNGOS PRODUTORES DE MICOTOXINAS EM MEDICAMENTOS
FITOTERÁPICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos do Departamento de Micologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biologia de Fungos.

Área de Concentração Taxonomia

NOME ANA CRISTINA REGIS DE
BARROS CORREIA

Orientador Cristina Maria de Souza
Motta

Co-orientador Bruno Severo Gomes

RECIFE
FEVEREIRO/2012

Correia, Ana Cristina Regis de Barros

Fungos produtores de micotoxinas em medicamentos fitoterápicos/ Ana Cristina Regis de Barros Correia. – Recife: O Autor, 2012.

82 folhas :il., fig., tab.

Orientadora: Cristina Maria de Souza Motta

Coorientador: Bruno Severo Gomes

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas. Biologia de Fungos, 2012.

Inclui bibliografia e apêndice

1. Fungos- toxicologia 2. Contaminação por microorganismos 3. Micotoxinas I. Motta, Cristina Maria de Souza II. Gomes, Bruno Severo III. Título.

579.5 CDD (22.ed)

UFPE/CCB-2012-106

**FUNGOS PRODUTORES DE MICOTOXINAS EM MEDICAMENTOS
FITOTERAPICOS**

ANA CRISTINA REGIS DE BARROS CORREIA

Data da defesa: 16 de fevereiro de 2012

COMISSÃO EXAMINADORA

MEMBROS TITULARES

Dra. Cristina Maria de Souza Motta – (Orientador)

Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Gerson Antonio Pianetti – Examinador Externo

Universidade Federal de Minas Gerais

Dra. Oliane Maria Correia Magalhães – Examinador Interno

Universidade Federal de Pernambuco

A Rômulo com todo amor do mundo.

**Aos meus pais, *in memoriam*, a quem devo a existência, formação
e orientação de vida.**

Agradecimentos

Acima de tudo e de todos, agradeço a **Deus** pela dádiva da vida e por, em momentos aflitivos, proporcionou-me à paz e a serenidade para a conclusão deste trabalho.

Ao **meu filho Rômulo Jales e a minha nora Camila Jales**, por serem muito mais do que pedi a Deus, pelo incentivo e por terem tornado mais doces os inúmeros momentos dedicados a este trabalho.

À **minha família**, que é a minha rocha, pelo amor incondicional e apoio sempre demonstrado.

À **Cristina Maria de Souza Motta**, minha orientadora, por fazer parte da minha vida profissional e pessoal. Uma pessoa fantástica, engraçada, humana. Obrigada pela confiança, incentivo e aprimoramento deste trabalho.

Ao meu Co-Orientador, **Bruno Severo**, pelo apoio, incentivo e amizade.

A **Eliana Barbosa da Silva Nogueira**, uma amiga que por vários motivos serei eternamente grata, principalmente pela sua fé inabalável, meu anjo da guarda. Muito obrigada pela sua convivência e apoio durante esta pesquisa.

A Dra. **Miracy Muniz de Albuquerque** Coordenadora do Núcleo de Controle de Qualidade de Medicamentos e Correlatos do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco por permitir a utilização das instalações laboratoriais para a realização dos trabalhos práticos e compreensão pelas minhas ausências.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos do Departamento de Micologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco** pela oportunidade de realização desta etapa da minha formação acadêmica.

À **Maria José dos Santos Fernandes**, por sua dedicação e amor a pesquisa e principalmente pela paciência em me ensinar. Muitíssimo obrigada pela convivência e por identificar os fungos.

À Professora Dra. **Elaine Malosso**, Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos.

À Professora Dra. **Oliane Maria Correia Magalhães**, pelos ensinamentos transmitidos, confiança e apoio durante o Curso.

À **Financiadora de Estudos e Projetos – FINEP e a Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco – FACEPE** através da Micoteca URM, pela ajuda financeira para a realização desta pesquisa.

Ao **Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste – CETENE**, pelas imagens de Microscopia eletrônica de varredura - MEV

A todos os **Professores da Pós-Graduação**, pelos ensinamentos transmitidos.

Aos **Colegas de Curso**, pela amizade, partilhada.

À **queles** que direta ou indiretamente contribuíram para realização desta dissertação.

“A alegria que se tem em pensar e aprender faz-nos pensar e aprender ainda mais”.

Aristóteles

RESUMO

Os medicamentos fitoterápicos são considerados seguros e utilizados pela maioria da população por serem de origem natural. A presença de fungos nestes medicamentos deve ser cuidadosamente investigada ou monitorada, pois podem estar contaminados com espécies toxigênicas. Entre as drogas vegetais que tem maior número de pedidos de registro na Vigilância Sanitária estão a castanha-da-índia e a alcachofra nas formas farmacêuticas comprimido e cápsula. Este estudo teve como objetivos comparar a eficiência de diferentes meios de cultura para enumeração de fungos em medicamentos a base de castanha-da-índia e alcachofra; determinar a forma mais susceptível (comprimido, cápsula e solução oral) à presença de fungos; detectar espécies toxigênicas de *Aspergillus* e respectivos teleomorfos e *Penicillium*; e avaliar a capacidade de produzir micotoxinas *in vitro*. Os resultados mostram contaminação por fungos em três medicamentos de castanha-da-índia, sendo um comprimido e duas cápsulas e um comprimido de alcachofra, sendo estas as formas mais susceptíveis à presença de fungos. Não houve diferença significativa entre os meios ágar Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol, ágar Dicloran Glicerol 18% e ágar Sabouraud-dextrose. Os fungos mais frequentes foram *Aspergillus*, *Emericella*, *Eurotium* e *Penicillium*, destes 44,66% de *Aspergillus* e respectivos teleomorfos e 66,66% de *Penicillium* foram toxigênicos. A evidência da presença de fungos toxigênicos e patogênicos em medicamentos fitoterápicos reforça a importância do controle microbiológico na fabricação destes produtos, minimizando os riscos a saúde pública.

Palavras-chave: alcachofra, castanha-da-índia, contaminação, meios de cultura, micotoxinas.

ABSTRACT

Phytotherapeutic medicinal products are considered safe and used by the majority of the population because they are of natural origin. The presence of fungi in these medicinal products must be carefully investigated or monitored, as they may be contaminated with toxigenic species. Among the plant drugs that has highest number of requests to record in health surveillance are chestnuts from India and the artichoke in pharmaceutical Tablet and capsule forms. This study had as objectives to compare the efficiency of different culture media for enumeration of fungi on chestnut base medicines from India and artichoke; determine the most likely (tablet, capsule and oral solution) the presence of fungi; detect toxigenic species and their teleomorphs of *Aspergillus* and *Penicillium*; and assess the ability to produce mycotoxins in vitro. The results show contamination by fungi in three chestnut medicines from India, being a pill and two caps and one tablet of artichoke, being these shapes more susceptible to fungi. There was no significant difference between the media Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol agar, Dichloran Glycerol 18% agar and Sabouraud dextrose agar. Most frequent were fungi, *Aspergillus* and *Penicillium*, *Emericella*, *Eurotium* these 44.66% of *Aspergillus* and their teleomorphs and 66.66% of *Penicillium* were toxigenic. The evidence of the presence of toxigenics fungi and pathogenic in medicines phytotherapic reinforces the importance of microbiological control in the manufacture of these products, minimizing the risks to public health.

Key-words: artichoke, contamination, culture media, horse chestnut, mycotoxins.

Lista de Abreviaturas

ANVISA	– Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CCD	– Cromatografia de camada delgada
CLAE	– Cromatografia líquida de alta eficiência
CYA	– Ágar Czapek Extrato de Levedura
CY20S	– Ágar Czapek Extrato de Levedura Sacarose
DG18	– Ágar Dicloran Glicerol 18%
DRBC	– Ágar Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol
G25N	– Ágar Nitrato Glicerol 25%
MEA	– Ágar Extrato de Malte
ppb	– Partes por bilhão
SDA	– Ágar Sabouraud-dextrose
UFC	– Unidades formadoras de colônias
WHO	– World Health Organization

Lista de Figuras

Capítulo 2	Pág.
Figura 1 – Esquema geral de preparação de formas farmacêuticas fitoterápicas.....	18
 Capítulo 3	
Figura 1 – Número de UFC de fungos nos diferentes meios de culturas para cada droga vegetal.....	44
 Capítulo 4	
Figura 1 – Relação numérica de espécies de fungos em comum entre os meios de cultura e aquelas que foram isoladas em apenas um dos meios de cultura isolados de medicamentos fitoterápicos a base de castanha-da-índia e alcachofra.	55
Figura 2 – Características macroscópicas nos meios de cultura MEA (Ágar extrato de malte), CYA (Ágar Czapek extrato de levedura) e CY20S (Ágar Czapek extrato de levedura sacarose) e microscópicas das espécies <i>Aspergillus flavus</i> (AF) 10000x, <i>A. ochraceus</i> (AO) 10000x, <i>A. sydowii</i> (AS) 5000x, <i>Emmericella varicolor</i> (EV) 6000x, <i>Eurotium chevalieri</i> (EC) 12000x, <i>E. repens</i> (EV) 7000x, <i>A. carbonarius</i> (AC) 5000x e MEA, CYA e G25N (Ágar Nitrato Glicerol 25%) para <i>Penicillium waksmanii</i> (PW) 20000x isoladas de medicamentos fitoterápicos.....	55
Figura 3 – Número de isolados por espécie e de isolados toxigênicos dos medicamentos fitoterápicos constituídos pelas formas farmacêuticas cápsula, comprimido e solução oral, à base castanha-da-índia e de alcachofra.....	56
Figura 4 - Características macroscópicas do meio Ágar Coco, cultivo 25°C/72h, após exposição à luz UV (360 nm) de espécies isoladas dos medicamentos fitoterápicos à base de castanha-da-índia e alcachofra.....	57

Lista de Tabelas

Capítulo 2	Pág.
Tabela 1 – Designação, parte usada, indicação terapêutica, origem e cultivo de alcachofra e castanha-da-índia.....	20
Tabela 2 – Limites microbianos para produtos farmacêuticos não estéreis de uso oral.....	23
 Capítulo 3	
Tabela 1 – Valores médios obtidos na enumeração de fungos presentes em medicamento fitoterápico à base de castanha-da-índia, nas formas farmacêuticas comprimido, cápsula e solução oral, de cada fabricante, nos três diferentes meios de cultura	42
Tabela 2 – Valores médios obtidos na enumeração de fungos presentes em medicamento fitoterápico a base de alcachofra, nas formas farmacêuticas comprimido, cápsula e solução oral, de cada fabricante, nos três diferentes meios de cultura.....	42
Tabela 3 – Interações entre os efeitos relacionados ao fabricante, forma farmacêutica e meio de cultura, utilizando o medicamento à base de castanha-da-índia.....	43
Tabela 4 – Interações entre os efeitos relacionados ao fabricante, forma farmacêutica e meio de cultura, utilizando o medicamento à base de alcachofra.....	44
 Capítulo 4	
Tabela 1 – Relação das espécies de fungos isoladas de medicamentos fitoterápicos a base de castanha da índia e alcachofra, nos meios de cultura ágar Dicloran Rosa de Bengala (DRBC), ágar Dicloran Glicerol 18% (DG18) e ágar Sabouraud Dextrose (SDA)	54
Tabela 2 – Número de fungos isolados de fungos de medicamentos fitoterápicos à base de castanha-da-índia e alcachofra, nas formas farmacêuticas comprimido, cápsula e solução oral com resultados positivos quanto à capacidade de produzir micotoxinas em ágar coco.....	58
Tabela 3 – Relação entre o percentual de umidade, número de isolados e o número de fungos toxigênicos procedentes dos medicamentos fitoterápicos a base de castanha-da-índia e alcachofra, nas formas farmacêuticas comprimido, cápsula.....	59

Sumário

	Pág.
1. INTRODUÇÃO.....	14
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	16
2.1 Medicamento Fitoterápico.....	16
2.2 Etapas de Obtenção do Medicamento Fitoterápico.....	18
2.3 Droga Vegetal.....	20
2.3.1 Castanha da índia (<i>Aescullus hippocastanum</i> L., Hippocastanaceae).....	21
2.3.2 Alcachofra (<i>Cynara scolymus</i> L., Asteraceae).....	21
2.4 Controle de Qualidade Microbiológico de Medicamentos Fitoterápicos.....	22
2.5 Legislação para Medicamento Fitoterápico.....	26
2.6 Contaminação Microbiana de Medicamentos Fitoterápicos.....	28
2.7 Presença de Fungos Toxigênicos e Micotoxinas em Plantas Medicinais e em Drogas Vegetais	33
3. ENUMERAÇÃO DE FUNGOS PRESENTES EM MEDICAMENTOS FITOTERÁPICOS USANDO DIFERENTES MEIOS DE CULTURA.....	37
Resumo.....	38
Introdução.....	39
Material e Métodos.....	40
Análise Estatística.....	41
Resultados.....	41
Comparação da Contagem de Fungos dos Meios de Cultura.....	43
Discussão.....	44
4. CONTAMINAÇÃO, DIVERSIDADE E POTENCIAL TOXIGÊNICO DE FUNGOS ISOLADOS EM MEDICAMENTOS FITOTERÁPICOS	48
Resumo.....	49
Introdução.....	49
Material e Métodos.....	51

Medicamentos Fitoterápicos.....	51
Isolamento e Identificação de Fungos.....	52
Detecção de Micotoxinas.....	52
Resultados.....	53
Comparação da Diversidade de Isolados de Fungos dos Meios de Cultura Utilizados.....	53
Avaliação da Capacidade Micotoxigênica.....	56
Discussão.....	59
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	64
REFERÊNCIAS.....	66
APÊNDICE – RELAÇÃO DAS ESPÉCIES DEPOSITADAS NA MICOTECA URM.....	81

1. INTRODUÇÃO

O homem, assim como os outros animais irracionais, utilizava as plantas de forma intuitiva há mais de 5000 anos como recurso terapêutico na prevenção, tratamento e cura de doenças. E, ao longo dos anos, descobriam quais as nocivas e quais as terapêuticas. Dentre todas as terapias complementares, a fitoterapia – a prática do uso de plantas ou suas partes com finalidade terapêutica – se generalizou em todo mundo como tratamento alternativo (Feltrow, 2000; Foglio *et al.*, 2006; Korokolvas, 1996; Rates, 2001; Springfield *et al.*, 2005).

Com o passar do tempo, as plantas continuam importantes para o desenvolvimento de novas drogas e, dos fármacos prescritos, 30% são derivados de plantas. Simões *et al.* (2004), comentavam que o crescimento do mercado de medicamentos fitoterápicos no Brasil era cerca de 15% ao ano enquanto que para os medicamentos alopatas de aproximadamente 4%. Com relação aos 252 fármacos considerados essenciais pela Organização Mundial da Saúde, 11% são exclusivamente de origem vegetal (Calixto, 2000; Chan, 2003; Rates, 2001).

O Brasil detém cerca de 18% das 250.000 espécies vegetais em nível mundial, das quais 17.000 são endêmicas (Martins; Figueiredo, 2009). O interesse pelo uso de plantas medicinais, “medicina popular”, como substituto dos medicamentos industrializados, de certa forma enfatiza o que Karl Friededrich Burchard em 1800 mencionava: “a história da medicina é a história dos diferentes métodos utilizados em várias épocas para curar as doenças” (Rosen, 1979, *apud* Leite, 2009, p. 3).

A segurança das especialidades fitoterápicas começa pelos ensaios que comprovam a identidade da planta e a ausência de contaminantes de qualquer natureza. A qualidade deve ser alcançada mediante o controle das matérias-primas, dos produtos acabados, materiais de embalagem, formulação farmacêutica e estudo de estabilidade. Devem ser inseridos no conceito de qualidade de medicamentos, ensaios que envolvam controle microbiológico e pesquisa de toxinas produzidas por fungos filamentosos (Brasil, 2004; 2010b; Bugno *et al.*, 2005; Simões *et al.*, 2004).

A presença de fungos deve ser investigada e/ou monitorada, considerando que algumas espécies produzem toxinas, especialmente aflatoxinas. Estas toxinas, se presentes, podem ser perigosas à saúde mesmo se forem absorvidas em pequenas quantidades. A presença de

fungos potencialmente toxigênicos encontrados em produtos farmacêuticos, deve ser considerada como um indicativo em potencial para contaminação por micotoxinas. O isolamento e a identificação destes fungos, entretanto, nem sempre estão associados à detecção de micotoxinas (Aziz *et al.*, 1997; Bugno *et al.*, 2006; Khan *et al.*, 2006; Rizzo *et al.*, 2004).

No Brasil, a preocupação com a contaminação de materiais vegetais vem desde a década de 80 com estudos sobre qualidade microbiológica (Fisher *et al.*, 1996). Para que a população tenha acesso aos fitoterápicos de qualidade, que exerçam efetivamente sua função com a segurança necessária, é preciso que sejam elaborados com Garantia da Qualidade afim de que o medicamento seja seguro e eficaz (Brasil, 2007; 2010b).

Neste estudo, foram selecionados para detecção da presença e potencial micotoxigênico de fungos, medicamentos fitoterápicos com princípios ativos de castanha-da-índia (*Aesculus hippocastanum* L.) e de alcachofra (*Cynara scolymus* L.) por terem maior número de pedido de registro na Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA (Carvalho *et al.*, 2008); apresentarem três formas farmacêuticas de uso oral (comprimido, cápsula e solução oral) e estarem disponíveis no mercado local.

Este trabalho teve, pois, como objetivos:

- quantificar, isolar e identificar os fungos presentes em medicamentos fitoterápicos, cada um deles constituídos por um princípio ativo diferente, castanha da índia ou alcachofra, nos medicamentos fitoterápicos orais sólidos (comprimidos e cápsulas) e líquido;
- selecionar meios de cultura adequados para o isolamento de fungos presentes em fitoterápicos;
- verificar *in vitro* o potencial micotoxigênico dos fungos isolados dos medicamentos fitoterápicos de uso oral e
- indicar a forma farmacêutica mais susceptível à presença de fungos, destacando os produtores de micotoxinas.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

As drogas vegetais, quer como insumo farmacêutico quer como extrato, tiveram o consumo aumentado, nos últimos anos. O Brasil com cerca de 50 000 espécies vegetais corresponde a mais ou menos 20% de toda flora mundial (Rates, 2001). A Organização Mundial de Saúde em 2005 estimava que cerca de 20% da população mundial utilizava, de certa forma, a fitoterapia (Springfield *et al.*, 2005). A expansão da fitoterapia no Brasil pode ter sido instigada pela propaganda, divulgação nos meios de comunicação, estímulos provenientes de órgãos governamentais, busca de produtos “naturais”, aliada às comprovações científicas das propriedades farmacológicas das plantas medicinais usadas tradicionalmente (Brasil 2010a; Carvalho *et al.*, 2008; Carvalho, 2011; Silveira *et al.*, 2008).

No Brasil, a fitoterapia, do grego *phyton* (Κοιτάζω) significa planta e *therapia* (θεραπεία) tratamento, é uma opção medicamentosa apropriada às necessidades no atendimento primário à saúde. Fitoterapia é a terapêutica caracterizada pelo uso de plantas medicinais em suas diferentes formas farmacêuticas, sem a utilização de substâncias ativas isoladas, ainda que de origem vegetal (Brasil 2002a; Brasil, 2006a; 2006b; Eldin; Dunford, 2001 *apud* Souza-Moreira *et al.*, 2010, p.435).

Segundo a Associação Brasileira das Empresas do Setor Fitoterápico (ABIFISA), estima-se que aproximadamente 80% da população brasileira utiliza plantas medicinais como único recurso terapêutico; na maioria das vezes usadas de acordo com tradição popular, por automedicação, às vezes de procedência e qualidade questionável e de fácil acesso em cada região do país (Rates, 2001). A automedicação com um produto, mesmo de baixa toxicidade, pode ocasionar problemas graves desde que existam outros fatores de risco tais como contraindicações ou uso associado a outros medicamentos, pode ter como consequência doenças iatrogênicas (alterações patológica provocadas no paciente por tratamento de qualquer tipo), resistência aos antibióticos dentre outras (Campesato, 2005; Oliveira, 2011; Pires; Araújo, 2011; Saad *et al.*, 2006).

2.1 Medicamento Fitoterápico

A administração de agentes terapêuticos necessita da sua incorporação a uma forma farmacêutica, caracterizada pelo estado físico de apresentação (cápsula, comprimido e solução oral). A forma farmacêutica juntamente com a via de administração tem como

objetivo veicular, no caso dos medicamentos fitoterápicos, de forma correta o princípio ativo que compõem a droga vegetal (Ferreira; Leite, 2009; Sonaglio *et al.*, 2004).

Uma forma farmacêutica é o estado final de apresentação dos princípios ativos farmacêuticos após uma ou mais operações farmacêuticas executadas com a adição ou não de excipientes apropriados a fim de facilitar a sua utilização e obter o efeito terapêutico desejado, com características apropriadas a uma determinada via de administração (Brasil 2010c, p. 44).

Medicamento é um produto farmacêutico, obtido por processos tecnologicamente adequados ou elaborados, com finalidade profilática, curativa, paliativa ou para fins de diagnóstico (Brasil 2010b, p. 2). Enquanto que, medicamento fitoterápico é obtido empregando-se exclusivamente droga vegetal (planta medicinal, ou suas partes, que contenham as substâncias, ou classes de substâncias, responsáveis pela ação terapêutica, após processos de coleta, estabilização e/ou secagem, podendo ser íntegra, rasurada, triturada ou pulverizada;) ou derivado vegetal (produtos de extração da droga vegetal: extrato, tintura, óleo, cera, exsudado e outros), com as mesmas finalidades anterior. Para caracterização como medicamento fitoterápico é necessário o conhecimento da sua eficácia e dos riscos de seu uso, assim como, da reprodutibilidade e constância de sua qualidade obtida por meio de levantamentos etnofarmacológicos, de utilização, documentações tecnocientíficas ou evidências clínicas. O medicamento fitoterápico monopreparado é constituído por somente uma planta medicinal. Não se considera medicamento fitoterápico aquele que, na sua composição, inclua substâncias ativas isoladas, de qualquer origem, nem as associações destas com extratos vegetais (Brasil, 2007; 2010; 2010b; Simões *et al.*, 2004).

Extratos vegetais são preparações líquidas, semissólidas ou sólidas obtidas por extração seletiva dos princípios ativos das drogas vegetais, através de solventes (etanol, água e outros meios de extração). O material utilizado pode sofrer tratamento preliminar, tais como: inativação enzimática, moagem entre outros. A Farmacopeia Brasileira (Brasil, 2010c), define:

Extrato fluido é a preparação líquida obtida de drogas vegetais por extração com líquido apropriado ou por dissolução do extrato seco correspondente, em que, exceto quando indicado de maneira diferente, uma parte do extrato, em massa ou volume corresponde a uma parte, em massa, da droga, seca utilizada na sua preparação. [...] Se necessário podem ser adicionados conservantes inibidores do crescimento microbiano.

Extrato seco é a preparação sólida; obtida por evaporação do solvente utilizado na sua preparação. Apresenta, no mínimo, 95% de resíduo seco,

calculado como porcentagem de massa. Podem ser adicionados de materiais inertes adequados.

2.2. Etapas de Obtenção do Medicamento Fitoterápico

Na obtenção de um medicamento devem ser cumpridas várias etapas anteriormente desenvolvidas. Durante este processo estão envolvidos os conceitos de qualidade estabelecidos por normas nacionais como Boas Práticas de Fabricação e Boas Práticas de Manipulação com a finalidade de se obter um produto farmacêutico adequado ao fabricante, ao usuário e à vigilância sanitária (Brasil, 2007; 2010b).

A maioria das drogas vegetais pode ser encontrada sob a forma de extrato líquido ou seco. Estes extratos vegetais podem ser veiculados, praticamente, em todas as formas farmacêuticas (Figura 1), de maneira a satisfazer tanto as preferências dos pacientes como a do médico ou a uma imperativa situação clínica. O importante é que a forma farmacêutica escolhida possa mascarar as características organolépticas indesejáveis como, por exemplo, o sabor amargo e que haja proteção dos princípios ativos quimicamente instáveis à influência direta do ar e da umidade (Ansel *et al.*, 2000; Ferreira; Leite, 2009; Prista *et al.*, 1996).

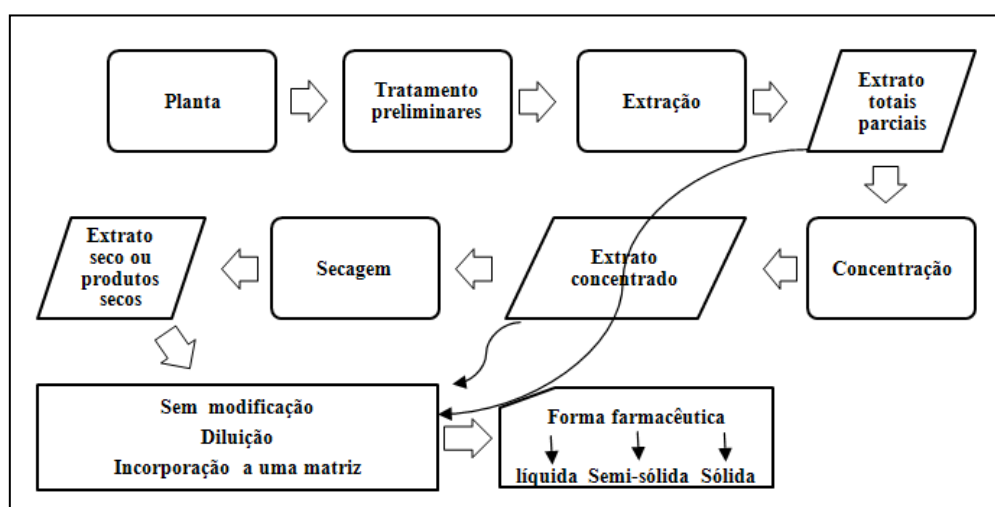


Figura 1. Esquema geral de preparação de formas farmacêuticas fitoterápicas. Adaptado de Sonaglio *et al.* (2004).

Os insumos para fabricação destes medicamentos, ou seja, as matérias-primas ativas ou adjuvantes influenciam diretamente na qualidade do medicamento. Quando a matéria-prima é de origem vegetal, cuidados especiais são exigidos tanto no armazenamento quanto durante sua transformação em extratos. O teor da substância ativa e a carga microbiana são influenciados pelo conteúdo de água do material vegetal (Ferreira; Leite, 2009).

Dentre as formas farmacêuticas, as líquidas estão entre as mais utilizadas na fitoterapia por serem de fácil deglutição, característica importante para pacientes geriátricos, crianças e enfermos. Nesta forma, além do extrato vegetal, faz parte o veículo (componente com maior quantidade) e os adjuvantes. O veículo pode ser a água purificada, glicerina, xarope de sacarose e sorbitol. Os adjuvantes têm a função de garantir a estabilidade da forma farmacêutica, de forma a auxiliar na solubilização do fármaco, retardar ou impedir a hidrólise ou oxidação e, evitar desenvolvimento de micro-organismos (Ferreira; Leite, 2009; Prista *et al.*, 1996).

Uma das formas líquidas de maior aceitação é o xarope. Apresenta boa estabilidade microbiológica, mantendo dentro dos limites especificados à resistência ao crescimento microbiano do produto, porém, devido a seu alto teor de sacarose (60-80%, p/v) não é recomendado pelos dentistas e pediatras e, é contra-indicado à pacientes diabéticos. Estas limitações conduzem a substituição por formulações em que se adicionam adjuvantes espessantes (carboximetilcelulose) e edulcorantes (sorbitol) apropriados àqueles pacientes, que neste caso, se faz uso obrigatório de conservantes em concentrações efetivas (Ferreira; Leite, 2009; Pinto *et al.*, 2010).

A forma de preparação de maior aceitação é a cápsula. Por definição, é uma forma farmacêutica sólida em que o princípio ativo e os excipientes estão contidos em um invólucro solúvel duro ou mole, de formatos e tamanhos variados, usualmente contendo uma dose única do princípio ativo (Brasil, 2010c).

As cápsulas normalmente são compostas de gelatina, mistura de gelatina, açúcar e água, mas pode, também, ser de amido entre outras substâncias (Brasil, 2010c). A gelatina, embora estável ao ar, está susceptível a decomposição microbiana quando umedecida. Em geral apresenta 13% a 16% de umidade que pode ser absorvida ou liberada pela cápsula, dependendo das condições ambientais, oferecendo pouca proteção aos produtos higroscópicos. A presença de umidade excessiva dos adjuvantes farmacêuticos e dos constituintes ativos pode acarretar o amolecimento dos invólucros, passagem de constituintes através da parede da cápsula e favorecer o crescimento de micro-organismos (Allen *et al.*, 2007, *apud* Ferreira; Leite, 2009, p. 206).

A forma farmacêutica comprimido contém a dose de componentes ativos individualizados na própria forma, obtidos com compactação de matérias-primas sólidas. É a forma mais vantajosa para incorporar matérias-primas de origem vegetal higroscópicas, pela possibilidade de adição de revestimento de camadas múltiplas de sacarose ou uma

película de polímero sintético, que confere proteção a droga vegetal da umidade ambiental, das enzimas e do pH digestivo (Ferreira; Leite, 2009).

Na produção dos comprimidos estão envolvidas várias etapas críticas: mistura, molhagem, granulação, secagem, compressão, revestimento (ou não). São adicionados excipientes isto é, substâncias que não apresentam atividade farmacológica, para assegurar a estabilidade, biodisponibilidade, aceitabilidade e facilidade de administração. O excipiente é formado por mais de um componente, o qual tem função distinta, por exemplo: absorvente (dióxido de silício coloidal), diluente (amido, celulose, lactose), antiaderente (estearato de magnésio), etc. (Ferreira; Leite, 2009; Prista *et al.*, 1996).

2.3 Droga Vegetal

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) no ano de 2008 havia registrado 512 medicamentos fitoterápicos, destes 432 eram fitoterápicos monopreparados e 80 compostos. As espécies vegetais com maior número de derivados registrados foram o ginkgo (*Ginkgo biloba* L.), a castanha-da-índia (*Aesculus hippocastanum* L.) e alcachofra (*Cynara scolymus* L.), com 33, 29 e 21 registros, respectivamente. As principais formas farmacêuticas cadastradas foram as cápsulas (47,1%) e os comprimidos (20,62%) (Bara *et al.*, 2006; Carvalho *et al.*, 2008; Carvalho, 2011).

Tabela 1. Designação, parte usada, indicação terapêutica, origem e cultivo de castanha-da-índia e alcachofra

Nome da planta	Parte da planta	Indicação terapêutica	Origem	Cultivo
Castanha-da-índia <i>Aesculus hippocastanum</i> L.	Sementes	Vasoconstrictor periférico. Modificador da permeabilidade capilar;	Montanhas da Península Balcânica	Em regiões extratropicais.
Alcachofra <i>Cynara scolymus</i> L.	Folhas	Colerético, colagogo, diurético, laxativo	Regiões do Mediterrâneo	Sul da Europa, Ásia e na América do Sul, principalmente no Brasil

Fonte: Moreira Filho (1972); Índice terapêutico fitoterápico (2008).

Embora a castanha-da-índia e alcachofra sejam plantas empregadas tradicionalmente na fitoterapia como matéria-prima, seu uso requer critérios, uma vez que apresentam contraindicações e podem levar a reações adversas severas. A alcachofra pode interferir no sistema imune e promover reações alérgicas e no metabolismo como perda de apetite; a castanha-da-índia pode ocasionar desconforto gastrointestinal, tontura, náusea e cefaleia (Alexandre *et al.*, 2005; European Medicines Agency Science Medicine Health, 2009; Índice Terapêutico Fitoterápico, 2008; Feltrow, 2000; Turolla; Nascimento, 2006).

2.3.1 Castanha-da-índia (*Aesculus hippocastanum* L., Hippocastanaceae)

As sementes de castanha-da-índia são utilizadas na medicina alternativa em várias partes do mundo. É uma planta utilizada no tratamento de insuficiência venosa crônica, varizes, dores e sensação de peso nas pernas, hemorroidas e flebites. Estudos clínicos, comprovaram as atividades antiedematosa, anti-inflamatória e venotônica do extrato padronizado da planta (European Medicines Agency Science Medicine Health, 2009; Feltrow, 2000; Índice Terapêutico Fitoterápico, 2008).

É constituída de: amido, ácidos graxos, proteínas, celulose, açúcares redutores, cinzas, cumarinas (esculetina, glucosídeos fraxetin, escopoletina), flavonoides (kaempferol, quercetina, astragalin, isoquercetina, rutina, leucocianidina), saponinas triterpênicas (escina, alfa e beta escina), taninos, polissacarídeos (amido) e outros constituintes (alantoína, aminoácidos como adenina, adenosina e guanina, colina, ácido cítrico, fitosterol). Os princípios-ativo responsáveis pelo efeito anti-exudativo vascular e aumento do tônus venoso são as hidroxycumarinas, as saponinas triterpênicas e a grande quantidade dos taninos (Martins; Brandão, 2006; Ocokoljic *et al.*, 2011).

2.3.2 Alcachofra (*Cynara scolymus* L., Asteraceae)

Alcachofra, não é só uma planta alimentícia indicada para os diabéticos, mas também uma importante planta medicinal que recebeu dos médicos árabes medievais o nome de al-kharsaf. A alcachofra possui a seguinte composição química: cinarina, sais minerais, ácido clorogênico, ácido cafeico, mucilagem pectina, tanino, ácidos orgânicos: málico glicérico e glicólico, glicosídeo A e glicosídeo B (colerético), componentes flavônicos glicosídeos, cinaropicrina (constituente amargo) enzimas e vitaminas (European Medicines Agency Science Medicine Health, 2010; Noldin *et al.*, 2003).

A cinarina é a principal responsável pela atividade colagoga e colerética, por aumentar a secreção biliar. Os compostos polifenólicos aumentam a eficiência metabólica do fígado enquanto que, a cinarina abaixa significativamente a taxa de colesterol através de uma estimulação metabólica enzimática, além de possuir propriedades anti-hepatotóxicas. Assim, a alcachofra é usada para casos de hiperlipidemia e ateromatose no interior dos tecidos adipóides (Alexandre *et al.*, 2005; Almança; Carvalho, 2003; European Medicines Agency Science Medicine Health, 2010; Noldin *et al.*, 2003, Santos *et al.*, 2007).

2.4 Controle de Qualidade Microbiológico de Medicamentos Fitoterápicos

O aprimoramento da tecnologia farmacêutica na área de fitoterápicos permitiu um melhor controle de qualidade de fármacos baseado em tecnologias modernas de identificação, determinação e quantificação de compostos químicos, tornando possível a fabricação de fitofármacos seguros e eficazes. Devido à complexidade dos medicamentos fitoterápicos, os ensaios farmacopeicos não estão disponíveis para a maioria das drogas vegetais o que possibilita a adulteração das mesmas (Bent; Ko, 2004; Calixto, 2000; Carvalho *et al.*, 2006).

As primeiras citações sobre limites microbianos ocorreram, de forma vaga, na 11ª e na 12ª edição da Farmacopeia Americana e, com algumas modificações na 13ª edição (The Pharmacopeia of The United States of America, 1936; 1942; 1947). Este compêndio enquadra as drogas vegetais e os medicamentos fitoterápicos como suplemento alimentar e, atualmente estabelece atributos para a matéria-prima de origem vegetal, bem como para derivados vegetais assim como para cápsula de Ginseng americano (*Panax quinquefolium* L.). Ainda faz referência para teste de aflatoxinas, especialmente se o material for obtido de raízes ou rizomas (raiz de *Withania somnifera* (L.) Dunal; complexo purificado de *Curcuma longa* Linné.; extrato seco de *Glycine max* Merr e extrato de *Lycopersicon esculentum* Mill (tomate) com licopeno. Este último com limites especificados para: aflatoxina total de 4 µg/kg e não mais que 2 µg/kg de Aflatoxina B1). Também estabelece, de forma inespecífica, limite máximo de aflatoxinas totais de 20 ppb e para aflatoxina B1, 5 ppb. O teste para aflatoxina, sempre que necessário, é incluído na monografia individual quando existe histórico de contaminação com micotoxinas (The United States Pharmacopeia, 2008; 2011).

A Farmacopeia Brasileira, na sua 2ª edição (Farmacopeia dos Estados Unidos do Brasil, 1959), introduziu o método para "exame bacteriológico da gelatina" incluindo contagem total e pesquisa de coliformes, além da contagem bacteriana e fúngica, na monografia de levedura seca. Na 3ª edição da Farmacopeia Brasileira (1977), não constam os limites microbianos para a mesma matéria-prima. Porém, somente na 4ª edição (1988), foi apresentado o procedimento analítico para controle microbiológico de medicamentos não estéreis, descrito nos capítulos "Contagem de micro-organismos viáveis em produtos que não necessitam cumprir com o teste de esterilidade", tratando da quantificação de bactérias e fungos e "Método geral para pesquisa e identificação de patógenos", porém não incluiu nas monografias.

Atualmente, a Farmacopeia Brasileira (Brasil, 2010c) preconiza para produtos de origem vegetal limites para contagem de micro-organismos viáveis e pesquisa de micro-organismos patogênicos (Tabela 2). Recomenda ainda que, ao avaliar os resultados dos testes microbiológicos, devem ser considerados no contexto do uso do produto o número e os tipos de micro-organismos presentes, além daqueles expressamente proibidos. Não manteve, entretanto, as recomendações da edição anterior (Farmacopeia Brasileira, 1988), que para produtos de uso oral era indesejável a presença de *Bacillus cereus*, *Enterobacter* sp., *Candida albicans*, *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus* assim como não específica, de forma geral, a ausência de fungos potencialmente produtores de toxinas.

Tabela 2 – Limites microbianos para produtos farmacêuticos não estéreis de uso oral

Produtos de origem vegetal	Contagem total de bactérias aeróbias UFC/g ou mL	Contagem total de fungos filamentosos e leveduras UFC/g ou mL	Pesquisa de micro-organismos patogênicos
Preparação para uso oral contendo matéria-prima de origem natural	10^4	10^2	Ausência de <i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> em 1 g, ou mL. Ausência de <i>Salmonella</i> em 10 g, ou 10 mL. Limite máximo de 10^2 bactérias Gram negativa bile tolerante em 1g ou mL.
Drogas vegetais que serão submetidas a processos extrativos a quente	10^7	10^4	Limite máximo de 10^2 de <i>Escherichia coli</i> em 1g. Limite máximo de 10^4 bactérias Gram negativa bile tolerante em 1g. Ausência de <i>Salmonella</i> spp. em 1g.
Drogas vegetais que serão submetidas a processos extrativos a frio	10^5	10^3	Limite máximo de 10^1 de <i>Escherichia coli</i> em 1g. Limite máximo de 10^3 bactérias Gram negativa bile tolerante em 1g. Ausência de <i>Salmonella</i> spp. em 1g.
Extratos seco	10^4	10^3	Ausência de <i>Escherichia coli</i> e <i>Salmonella</i> spp.
Extrato fluido, Tintura	10^4	10^3	-

Fonte (Brasil, 2010c, p. 252). Adaptada.

Nas monografias de plantas medicinais, descritas na Farmacopeia Brasileira 5ª ed., não há exigência quanto a análise microbiológica, nem referencia a pesquisa de contaminantes toxigênicos, exceto para a monografia do Amido que especifica testes de segurança biológica como “Contagem total de micro-organismos mesófilos”. Bactérias

aeróbicas totais: no máximo 100 UFC/g. Fungos e leveduras: no máximo 100 UFC/g) e Pesquisa de micro-organismos patogênicos. Também alerta que “Contaminação acentuada por fungos pode acarretar presença de aflatoxinas no amido” (Brasil, 2010c).

Para a investigação de fungos em medicamentos e suas matérias-primas os métodos oficiais recomendam os meios de cultura ágar Sabouraud-dextrose ou sua formulação líquida ou o ágar batata (Brasil, 2010c; The United States Pharmacopeia, 2011). O meio de cultura Sabouraud-dextrose tem como características altas concentrações de carboidratos. Este meio não dispõe de inibidores de microbiota acompanhante mas, podem ser adicionados agentes inibidores. Os inibidores mais utilizados em associação com o ágar Sabouraud são: cicloheximida (500mg/L), penicilina (20.000UI/L), estreptomicina (40mg/L) ou cloranfenicol (50mg/L). O pH do meio, levemente ácido, inibe o desenvolvimento de algumas bactérias e de algumas espécies de fungos. O período de incubação deste meio é de no mínimo 3 dias a 25°C. Por outro lado, este meio pode ser inadequado para o crescimento de fungos que crescem em baixa atividade de água (Samson *et al.*, 1996).

Os meios suplementados com antibióticos e tinturas, tais como o ágar Dicloran Rosa de Bengala e Cloranfenicol (DRBC) podem ser uma alternativa eficaz para o isolamento de fungos, por apresentar pH mais elevado (5-6), ser mais efetivo na inibição de bactérias além do dicloran e a rosa de bengala controlarem a velocidade de disseminação de espécies fúngicas de crescimento rápidos (King *et al.*, 1979).

Para produtos com baixa atividade de água ($A_w = 0,95$), o meio ágar Dicloran Glicerol 18% (DG18) é indicado para quantificação de fungos moderadamente xerofílicos em substratos com umidade intermediária. Este meio permite a recuperação de todos os fungos, incluindo os de crescimento lento, que poderiam ser anulados pelo rápido crescimento de outras espécies (Hocking; Pitt, 1980).

A identificação das espécies fúngicas contaminantes é um importante sinalizador quanto à possível presença de micotoxinas em produtos. O isolamento e identificação destes micro-organismos entretanto, 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, é recomendado que seja avaliado a capacidade toxigênica (Bragulat *et al.*, 2001; Chourasia, 1995; Lin; Dianese, 1976; Pitt, 1988; Roy; Chourasia, 1989).

Vários métodos podem ser utilizados para a detecção e quantificação de micotoxinas em alimentos, plantas e, quando possível, em tecido muscular, leite, urina, soro, fezes e sangue. Os métodos existentes para determinação de micotoxinas baseiam-se em alguma medida física ou característica química das mesmas, como absorção na região do ultravioleta, fotometria fotográfica com detectores CCD ou mudança de cor quando ocorre alguma reação química (Atanda *et al.*, 2005; Bragulat *et al.*, 2001; Cutuli *et al.*, 1991; Davis *et al.*, 1987; Fente *et al.*, 2001; Filtenborg *et al.*, 1983; Filtenborg *et al.*, 1996; Ordaz *et al.*, 2003; Reif; Metzger, 1995; Ritter, 2007; Saito; Machida, 1999; Smedsgaard, 1997; Yazdani *et al.*, 2010).

Lin; Dianese (1976) e Davis *et al.* (1987) formularam meios de cultura para detectar cepas potencialmente toxigênicas. Segundo os autores, após o crescimento das colônias (3 a 5 dias/28°C), as placas são observadas sob luz ultravioleta, sendo que as cepas produtoras de aflatoxinas formam um halo azulado ou esverdeado fluorescentes em torno da colônia no meio ágar Coco. Contudo a detecção de aflatoxinas e de outras micotoxinas baseadas nas propriedades fluorescentes é inespecífica e torna-se imprescindível a realização de testes confirmatórios para assegurar as suas identidades (Abarca *et al.*, 1988; Eizendeher, 2005; Ritter, 2007).

Também para triagem de fungos toxigênicos pode ser empregada a técnica descrita em 1980 por Filtenborg e Frisvad modificada por Filtenborg *et al.* (1983) baseada na produção em meios sintéticos, seguido de extração direta da cultura fúngica e detecção por cromatografia de camada delgada (CCD). O método detecta uma escala ampla de metabólitos extracelulares (aflatoxinas, citrininas, ácido kojico, ácido micofenólico, ácido 3-nitropropionico, ocratoxina, patulina, ácido penicílico, PR-toxina e zearalenona) e micotoxinas intracelular (roquefortina C, sterigmatocistina), entre outras (Filtenborg *et al.*, 1996).

A maioria dos métodos de quantificação, utiliza a técnica de CCD, a qual é a mais conhecida, corriqueira entretanto, sensível, de baixo custo e permite o processamento de várias amostras simultaneamente. A quantificação na CCD é feita por comparação visual da intensidade de fluorescência da amostra comparada a do padrão. A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) vem substituindo nos últimos anos todas as técnicas, em especial a CCD (Eizendeher, 2005).

Em 2006, vários métodos disponíveis foram descritos por Zheng *et al.* para análise de micotoxinas por métodos rápidos, bem como outras técnicas emergentes. Os autores

ênfatizam as vantagens e as limitações dos ensaios: imuno-ensaio absorvente com enzima (ELISA); fluxo por membrana baseado em imuno-ensaios; ensaios imuno-cromatográficos; ensaios fluorométricos com imuno-afinidade e métodos com polarização fluorescente.

As técnicas analíticas para a detecção de micotoxinas são continuamente aprimoradas. Embora os custos analíticos possam constituir uma restrição à realização dos testes, esses podem ser insignificantes se comparados às consequências econômicas causadas por quebras de produção e doenças associadas à contaminação por micotoxinas (Eizendeher, 2005).

2.5 Legislação para Medicamento Fitoterápico

Desde 1967, Ministério da Saúde reconhece o papel das plantas medicinais no cenário da saúde pública. As políticas e regulamentações específicas para medicamentos à base de plantas versam sobre determinados aspectos como segurança, qualidade e eficácia (Carvalho *et al.*, 2010; Carvalho, 2011). As regulamentações que estabeleceram normas para fitoterápicos no país incluíram:

- Portaria Nº 22, de 30 de outubro de 1967, do extinto Serviço Nacional de Fiscalização da Medicina e da Farmácia (SNFMMF), continha todos os aspectos essenciais ao registro de fitoterápicos, exigências da identificação botânica das espécies vegetais usadas, padrão de qualidade e identidade, prova de eficácia e de segurança que validassem o uso e as indicações terapêuticas. Havia uma preocupação com relação às associações de espécies vegetais, mencionada como polifitoterapia (Brasil, 1967).
- Portaria Nº 06, de 31 de janeiro 1995, da Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária (SNVS), com relação a esta portaria, foi dada uma particular importância a questão das associações, impossibilitando, na prática, o registro das mesmas, a menos que apresentassem ensaios de segurança e estabilidade e que demonstrassem que os efeitos colaterais e reações adversas fossem de intensidade igual ou menor que os de cada componente isoladamente (Brasil, 1995).
- Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) Nº 17, de 24 de fevereiro de 2000 da ANVISA, a qual introduziu o conceito do uso tradicional e da história de uso como fator influente no registro. Sistematizou do aproveitamento da literatura existente sobre plantas medicinais e seus derivados, inserindo um conjunto de regras para sua qualificação e para a concessão de um registro de fitoterápico. A questão das

associações foi minimizada, admitindo-se o seu registro desde que apresentassem os mesmos requisitos exigidos para os produtos baseados em apenas uma espécie vegetal. A validação do produto deveria referir-se ao mesmo como um todo, e não inferida a partir dos dados individuais de seus componentes (Brasil, 2000).

- RDC Nº 48, de 16 de março de 2004 da ANVISA (Brasil, 2004) trata das exigências técnicas e legais para a concessão do registro e transformou os anexos da RDC 17/00 em quatro Resoluções Específicas (RE):

- RE 88 - Lista de referências bibliográficas para avaliação de segurança e eficácia (Brasil, 2004a);
- RE 89 - Lista de registro simplificado (Brasil, 2004b);
- RE 90 - Guia para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica (Brasil, 2004c) e
- RE 91 - Guia para realização de alterações, inclusões, notificações e cancelamentos pós-registro (Brasil, 2004d).

Importante destacar que, com a RDC 48/04, a lista de produtos de Registro Simplificado poderia ser revisada periodicamente e novas plantas incluídas, após estudos científicos comprovando a segurança e eficácia das mesmas (Netto *et al.* 2006).

Nesse contexto, os documentos oficiais apresentados na área de fitoterápicos são: o Decreto Nº 5.813, de 22 de junho de 2006 (Brasil, 2006a), que aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF); a Portaria Nº 254 de 31 de janeiro de 2002 que aprova a Política Nacional de Atenção à Saúde dos Povos Indígenas (Brasil, 2002a) e, a Portaria 971, de 03 de maio de 2006 (Brasil, 2006), que aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC).

O objetivo da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos é garantir à população brasileira o acesso seguro e racional de plantas medicinais e fitoterápicos, promovendo o uso sustentável da biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional. Como requisitos para comprovação da segurança e eficácia destes medicamentos e alternativas ao controle da qualidade de cada etapa de produção foram republicadas as normas para registro de medicamentos fitoterápicos – Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) Nº 14, de 31 de março de 2010 (Brasil, 2010), as Boas Práticas de Fabricação e Controle de medicamentos na indústria farmacêutica – RDC Nº 17, de 16 de abril de 2010 (Brasil 2010b), e a lista de referências para comprovação da segurança e

eficácia de medicamentos fitoterápicos, na forma da Instrução Normativa IN 05, 31 de março de 2010 (Brasil, 2010a).

Com a adoção da Fitoterapia pelo Sistema Único da Saúde – SUS dá início a regulamentação do emprego da fitoterapia de base científica extraída do conjunto de plantas usadas empiricamente (Brasil, 2002a; 2006c). A maior parte dos fitoterápicos utilizados atualmente, por automedicação ou por prescrição médica, ainda não tem o seu perfil tóxico bem conhecido (Veiga-Junior, 2008; Veiga-Junior; Mello, 2008; Virgílio; Marques, 2004).

Para garantir a qualidade dos medicamentos fitoterápicos, a RDC N° 17/2010, no Título VIII – *Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos Fitoterápicos*, estabelecida pela ANVISA, direciona exclusivamente para o controle de medicamentos. O artigo 603 desta RDC determina especificações mínimas para matérias-primas vegetais e medicamentos fitoterápicos. Dentre das especificações para as matérias vegetais, o *item (f)* define testes para análise da contaminação microbiológica, resíduos de pesticidas e fumigantes, radioatividade e micotoxinas, se aplicável; e para os medicamentos fitoterápicos estão inclusos: testes para determinação de contaminação microbiológica; testes físico-químicos entre outros. (Brasil, 2010b).

2.6 Contaminação Microbiana em Medicamentos Fitoterápicos

Em função da origem da matéria-prima, os medicamentos fitoterápicos podem apresentar elevadas cargas microbianas e podem oferecer riscos potenciais aos usuários (Alexander *et al*, 1997; Chan, 2003; Fischer, 1992). Fatores como poluição na água de irrigação, atmosfera, solo, condições da coleta, manipulação, secagem e de estocagem são itens importantes a serem considerados no controle de produtos naturais. Estes fatores podem favorecer altos níveis de contaminação microbiana, por vezes patogênica, que pode ser transmitida aos produtos acabados (Abou-Arab *et al.*, 1999; Halt, 1998; Kneifel *et al*, 2002; Martins *et al*, 2001; Pinto *et al.*, 2010).

A deterioração de produtos farmacêuticos pode ocorrer em um intervalo de temperatura de -20°C a 60°C, embora sejam raros nos extremos. O efeito da temperatura durante o transporte e armazenamento de produtos deve ser considerado no clima tropical ou subtropical, posto que, alguns micro-organismos, tais como *Saccharomyces* spp., *Rhodotorula* spp. e *Geotrichum* spp. fazem uso, como substrato para seu crescimento, de algumas excipientes dos comprimidos tal como amido utilizado como agregantes e/ou desintegrantes (Obuekwe; Eichie, 2006).

O gênero *Aspergillus* comumente encontrado, com maior frequência em regiões subtropicais e tropicais possui capacidade de crescer em condições de alta temperatura e baixa atividade de água permitindo a colonização em extensa variedade de substratos. Espécies de *Penicillium* crescem preferencialmente em climas temperados; a exemplo das espécies de *Aspergillus*, também estão associados aos períodos de estocagem de matéria-prima (Chourasia; Roy, 1991; Mogensen *et al.*, 2009; Pitt, 2000).

A produção de um extrato vegetal geralmente envolve etapas desfavoráveis à sobrevivência de micro-organismos, tais como extração com solventes orgânicos e ou a elevadas temperaturas. O processo de decocção, por exemplo, em que a droga é colocada em contato com água em ebulição, pode gerar produtos com reduzida carga microbiana, no entanto, dependendo do grau de contaminação na matéria-prima inicial, esse processo pode não ser efetivo (Araújo; Ohara, 2000; Rocha, 2009; Martins *et al.*, 2001). Assim como, na operação de secagem da droga vegetal por aspersão, método muito utilizado em indústrias farmacêuticas, apesar da elevada temperatura de secagem (100° C a 200° C), o tempo de contato entre o material a ser seco e o ar quente é extremamente rápido, menos que 1 minuto, não sendo suficiente, teoricamente, para eliminar alguns micro-organismos (Furlaneto *et al.*, 2004; Remili *et al.*, 1994; Souza *et al.*, 2006). Drogas sujeitas à extração com água em temperatura ambiente, como maceração, mantem ou mesmo multiplica a carga microbiana. Extratos fluidos e tinturas, cujo processo de extração se utiliza álcool, geralmente provêm boas condições sanitárias (Kneifel *et al.*, 2002).

As características biológicas e o elevado teor de umidade podem favorecer a contaminação e o crescimento microbiano bem como o processo de obtenção do extrato vegetal e as práticas de fabricação. Em condições específicas, em geral independentes daquelas necessárias ao crescimento fúngico, a contaminação se inicia no campo e continuam durante a coleta, secagem e armazenamento da planta medicinal (Bennett; Klich, 2003; Stoloff, 1979). A carga microbiana de uma planta é o resultado de uma série de influências causada por fontes diversas, podendo facilmente ser transferida por vetores aéreos ou pelo solo (Abou-Arab *et al.*, 1999; Abu-Irmaileh; Afifi, 2003; Aziz *et al.*, 1997; Fennel *et al.*, 2004; Kneifel *et al.*, 2002; Martins *et al.*, 2001).

A verificação da qualidade das drogas vegetais, preparações derivadas e medicamentos fitoterápicos quanto a contaminação por fungos são objetos de vários trabalhos:

Anyanwu (2010) ao analisar 12 drogas vegetais pulverizadas, não especificadas pelo autor, encontrou que a contagem total de fungos foi maior que 10^4 unidades formadoras de colônia por grama (UFC/g) em duas amostras enquanto que a média para as demais foi de 10^3 UFC/g. Foram isolados vários gêneros: *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Mucor* spp., *Candida* spp., *Trichosporium* spp., com maior predominância para *Aspergillus* spp. (58,3%) e para *Penicillium* spp. (41,6%).

Schütz *et al.* (2008) analisaram 27 amostras de três espécies vegetais: ginko biloba (*Ginkgo biloba* L.), cáscara sagrada (*Rhamnus purshiana* De Candolle) e sene (*Cassia angustifolia* Vahl.). O método utilizado foi o de semeadura em profundidade (*pour plate*) e foram realizadas contagens em placas de Petri com meios seletivos além da pesquisa de micro-organismos específicos, de acordo com a *World Health Organization* (WHO). Os resultados demonstraram contaminação bacteriana que variou de $0,5 \times 10^1$ a $9,0 \times 10^4$ UFC/g, estando todas as amostras em conformidade com a WHO e cinco (18,5%) acima dos limites permitidos pela Farmacopeia Brasileira 4ª edição. A contaminação fúngica variou de $0,5 \times 10^1$ a $8,45 \times 10^4$ UFC/g, com seis (22,2%) das amostras acima dos limites da WHO e nove (33,3%) acima dos limites da Farmacopeia Brasileira 4 ed. (Farmacopeia Brasileira, 1988; World Health Organization, 2011).

Okunlola *et al.* (2007) analisaram quanto à contaminação microbiana 21 diferentes amostras de várias formas farmacêuticas: (1) comprimido, (1) suspensão, (3) cápsulas, (4) pó e (12) líquidos de produtos fitoterápicos comercializados no sul da Nigéria. Destas, 57% estavam contaminadas com fungos, sendo que das 12 formas líquidas analisadas, 06 estavam com carga fúngica entre < 10 UFC/mL a 3×10^4 UFC/mL, comprimido com 4×10^3 UFC/g; pó com $3,5 \times 10^3$ UFC/g a $1,2 \times 10^4$ UFC/g e nenhuma contaminação foi encontrada na suspensão e na cápsula.

Com objetivo de avaliar a qualidade microbiológica de xaropes produzidos na cidade de Francisco Beltrão-PR/Brasil, Moraes *et al.* (2007) avaliaram a qualidade microbiológica de xaropes fitoterápicos, quanto à presença de coliformes totais e fecais, *Staphylococcus aureus*, fungos filamentosos e leveduras, procedentes de 10 amostras coletadas de produtores de xaropes. Os resultados evidenciaram que 50% das amostras estavam contaminadas com coliformes totais e fecais. Na análise de *S. aureus* o índice de contaminação foi de 10%, com uma população de $1,5 \times 10^3$ UFC/g. Em relação a população fúngica, foi observado contaminação por fungos filamentosos e leveduras em nove amostras, que corresponde a 90%, cuja contagem variou de $1,0 \times 10^2$ a $1,0 \times 10^4$

UFC/g. Os autores concluíram que estes xaropes possuíam uma carga microbiana elevada, podendo apresentar riscos a saúde dos consumidores, porém não foram identificados os fungos .

Alguns excipientes comuns como o amido e lactose, pós e água destilada usados na formulação de comprimidos foram analisados por Obuekwe e Eichie (2006) quanto à presença de micro-organismos. Os autores isolaram os fungos *Geotrichum* e *Aspergillus* spp., bem como duas cepas de *Staphylococcus aureus*.

Em um estudo realizado por Bugno *et al.* (2005), 93,2% de 91 amostras compostas de 65 espécies vegetais de drogas vegetais, estavam fora dos parâmetros da Farmacopeia Brasileira 4ª edição. Entre as drogas vegetais estudadas, a alcachofra (*Cynara scolymus* L.) apresentou contagem de fungos que variaram de $1,6$ a $7,3 \times 10^3$ UFC/g com presença de *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *A. fumigatus* e *Penicillium chrysogenum* e, a castanha-da-índia (*Aesculus hippocastanum* L.) apresentou $2,2 \times 10^2$ UFC/g e presença de *A. flavus*, *A. niger* e *Penicillium citrinum*.

Sánchez *et al.* (2006) analisaram malva (*Malva sylvestris* L.), poleo (*Lippia turbinata* Griseb), ruda (*Ruta chalenpensis*, L.), milho (*Zea mays*, L.), boldo (*Peumus boldus* Molina), camomila (*Matricaria chamomilla* L.) e menta (*Mentha piperita* L.) obtidas de farmácias de Santa Fe, Argentina. A contagem de fungos variou de <10 UFC/g a $1,5 \times 10^6$ UFC/g, sendo identificados *Aspergillus flavus*, *A. ochraceus*, *A. niger*, *A. fumigatus*, *A. candidus*, *A. niveus*, *A. sydowii* e *Eurotium amstelodami*.

Em uma investigação realizada quanto à qualidade microbiana de preparados fitoterápicos obtidos por decocção na cidade de Lagos na Nigéria, utilizados no tratamento de malária, fístulas e convulsões. Adeleye *et al.* (2005) observaram que o nível de contaminação por bactérias excedia na ordem de $2,6 \times 10^2$ a $2,5 \times 10^3$ UFC/mL, porém, não foram quantificados o número de fungos isolados. Entre os fungos isolados foram identificadas as leveduras: *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces* spp., *Torulopsis* sp., *Rhodotorula* spp., *Candida* spp. e *Geotrichum* spp. e espécies filamentosas como *Aspergillus fumigatus*, *A. niger*, *A. flavus* e *Rhizopus stolonifer*.

Produtos comercializados livremente por ambulantes nas ruas da cidade de Londrina (PR) foram analisados quanto à qualidade microbiológica antes e após o processo de infusão. Foram analisadas, na forma de folhas desidratadas, dez amostras de drogas vegetais: pata de vaca (*Bauhinia forficata* Link), maracujá (*Passiflora* spp.), capim santo (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf), sene (*Cassia angustifolia* Vahl.), boldo (*Peumus*

boldus Molina), espinheira santa (*Maytenus ilicifolia* (Schrader) Planch), nogueira (*Juglans forficata* Link), alcachofra (*Cynara scolymus* L.), ginseng (*Panax ginseng* C.A Mey) e ginko biloba (*Ginkgo biloba* L.). Antes da infusão a contaminação das drogas por fungos variaram de 4×10^2 a 4×10^3 UFC/g e, após infuso <10 a 10^3 UFC/g. Foram isolados *Aspergillus* spp. (47%) e *Penicillium* spp. (34%) (Furlaneto *et al.*, 2004).

Rocha *et al.* (2004) analisaram 20 amostras de folha de sene (*Cassia acutifolia* Delile) e boldo (*Peumus boldus* Molina), comercializadas em Campinas, SP, Brasil quanto à contagem e identificação de fungos filamentosos. Os autores encontraram valores que variaram de 1×10^1 UFC/g a $7,35 \times 10^3$ UFC/g e 5×10 UFC/g a $1,9 \times 10^3$ UFC/g, para as amostras de folhas de sene e boldo obtidas de mercados, respectivamente. Para aqueles oriundas de farmácia de manipulação os valores variaram de $1,1 \times 10^2$ a $6,21 \times 10^4$ UFC/g para as folhas de sene e 1×10 a 5×10^3 UFC/g para as folhas de boldo. Os fungos identificados nestas amostras foram: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Phoma*, *Cladosporium*, *Trichoderma*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Aureobasidium pullulans*, *Mycelia Sterilia*, *Acremonium* e *Moniliasitophila*.

Foram analisadas por Fischer (1992) 84 amostras de especialidades fitoterápicas obtidas no comércio de São Paulo, na forma de cápsulas, comprimido e pó, contendo 17 drogas vegetais (alcachofra, boldo, carvão medicinal, castanha-da-índia, catuaba, centelha asiática, confrei, espinheira santa, espirulina, fucus, ginseng brasileiro, ginseng coreano, guaraná, lecitina de soja, levedura de cerveja, óleo de germe de trigo, zedoria). Destacando a alcachofra, foram analisadas 05 lotes de cápsulas e 1 lote de comprimido e a contaminação para ambas formas farmacêuticas variou de < 10 UFC/g a 10^3 UFC/g e para a castanha-da-índia foram analisados 02 lotes de cápsulas a contaminação por fungo foi de <10 e 10^3 UFC/g. A autora concluiu que a contaminação fúngica para os produtos analisados, com predominância de fungos filamentosos ($4,6 \times 10^5$ UFC/g) foi inferior à bacteriana aeróbica ($5,1 \times 10^9$ UFC/g).

Zaroni *et al.* (2004) verificaram que 20 (79%) das 72 amostras de plantas medicinais, produzidas no Estado do Paraná, não atenderam aos parâmetros estabelecidos pela WHO(1998) quanto ao número de fungos, com contagem que variaram entre $1,0 \times 10^2$ e $8,4 \times 10^6$ UFC/g.

Em 2001, Czech *et al.* avaliaram a contaminação microbiana presente em 138 amostras de drogas vegetais, adquiridas no comércio da Áustria e Alemanha. Detectaram em cerca de 90% das amostras, contaminação fúngica entre 10^1 e 10^6 UFC/g, sendo

superiores a 10^2 UFC/g em cerca de 80% das amostras. Também em 2001, Martins *et al.* 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 *Clostridium perfringens* em 96,8% e 83,9% das amostras, respectivamente.

Alexander *et al.* (1997) analisaram 425 medicamentos fitoterápicos, sendo 250 amostras de comprimidos, 46 amostras na forma de pó e grânulo, 58 amostras de líquido oral e 71 amostras de produtos para uso tópico. Verificaram que 52,7% das amostras apresentaram contagens de bactérias superiores a 2×10^3 UFC/g. Com relação a quantificação de fungos, observaram contagens superiores a 2×10^2 UFC/g foram detectadas em 6,4% das amostras, sendo que em 20% das amostras de pó ou grânulo apresentaram contagem superior a 10^4 UFC/g. Em 1995, Santos *et al.* analisaram 51 amostras de produtos fitoterápicos e verificaram contagens superiores a 10^3 UFC de bactérias/g e superiores a 10^2 UFC de fungos filamentosos e leveduras/g em 33,3% e em 21,6% das amostras, respectivamente. Detectaram enterobactérias, *Pseudomonas aeruginosa* e *Bacillus cereus* e a presença de *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp., em 23,5% e 2,0% das amostras.

Materiais de origem vegetal tendem a mostrar níveis mais elevados de contaminação microbiana do que produtos sintéticos; a Farmacopeia Brasileira 5ª ed. (Brasil, 2010c) permite níveis mais elevados de contaminação microbiana em medicamentos à base de plantas do que nos sintético, dependendo do método de processamento da droga. Por exemplo, os níveis mais elevados (10^4 UFC/g) de contaminação são permitidos se a preparação final envolver adição de água fervente.

2.7 Presença de Fungos Toxigênicos e Micotoxinas em Plantas Medicinais e em drogas vegetais

A carga fúngica em produtos é normalmente tratada com menos atenção que a bacteriana. A presença de fungos em produtos farmacêuticos deve ser cuidadosamente investigada e/ou monitorada, atentando aos efeitos deletérios sobre a composição química, perda da atividade entre outros, além da capacidade de produzirem toxinas. Algumas espécies produzem toxinas, especialmente aflatoxinas. Aflatoxinas em medicamentos à base de plantas podem ser perigosas para a saúde, mesmo se eles forem absorvidos em quantidades ínfimas (Bandaranayake, 2006; Bugno *et al.*, 2006; De Smet, *et al.* 1992; Singh *et al.*, 2008).

Os fungos são organismos notáveis que produzem uma grande variedade de produtos naturais, muitas vezes chamado de metabólitos secundários. No entanto, é considerável o interesse por estes compostos, como muitos produtos naturais, devido a importância médica, industrial e agrícola. Alguns destes metabólitos são insalubres, por exemplo, micotoxinas, enquanto outros são benéficos como os antibióticos (Calvo *et al.*, 2002).

Há evidências de plantas medicinais contaminadas com fungos toxigênicos. Certos componentes de plantas são suscetíveis a transformação química quando contaminados por micro-organismos, levando a uma maior atividade enzimática, transformando alguns dos componentes em outros metabólitos não inicialmente presentes na droga vegetal. Nem todos os fungos produzem micotoxinas, mas numerosas espécies os fazem. Os fungos toxigênicos produzem variadas toxinas dependendo do substrato nos quais crescem, da presença de organismos competitivos e do teor de umidade (Singh *et al.*, 2008).

As micotoxinas são um grupo de metabólitos secundários produzidos por alguns fungos, os quais não são necessários para o crescimento e provavelmente possuem a função de limitar a competição. As toxinas destes fungos podem estar contidas nos esporos e no micélio, ou serem excretadas como exotoxinas no substrato de crescimento. Às vezes, os fungos que crescem em monocultura, em condições laboratoriais, perdem o potencial toxigênicos (Paterson; Lima, 2010).

As principais classes de micotoxinas são aflatoxinas, tricotecenos, fumonisinas, zearalenona, ocratoxinas e alcaloides ergo. As toxinas são produzidas principalmente pelos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Claviceps* e *Fusarium*. A exposição humana às micotoxinas pelo consumo de alimentos ou fitoterápico é uma questão de saúde pública em todo o mundo. As micotoxinas tanto podem ser inaladas em ambiente contaminado por fungos, pelo contato dérmico com material contaminado como por ingestão de esporos contendo toxinas através de alimentos e bebidas (Paterson; Lima, 2010).

Segundo a *International Agency for Research on Cancer* – IARC (2002) as aflatoxinas pertencem ao Grupo 1 – carcinogênica; enquanto que ocratoxina A é classificada no Grupo 2b – possivelmente carcinogênica. As aflatoxinas são termorresistentes (>250°C); porém radiação com UV transforma aflatoxina B₁ em aflatoxina B₂, que é menos tóxica, podendo ser eliminada pela radiação gama com dose de 10 kGy (Aquino, 2007; Paterson; Lima, 2010; Prado *et al.*, 2009).

O efeito que a aflatoxina pode causar depende da dose e da frequência com que é ingerida e pode ser agudo ou subagudo. O efeito agudo é resultante da ingestão de doses

geralmente muito elevadas, é de manifestação e percepção rápidas, podendo levar o animal a morte, porque causa alterações irreversíveis. O efeito subagudo é o resultado da ingestão de doses não elevadas que provoca distúrbios e alterações nos órgãos do homem e dos animais (uns mais susceptíveis que outros), da idade (os mais jovens são mais afetados), do estado nutricional e, também, do sexo. A aflatoxina pode provocar cirrose, necrose do fígado, proliferação dos canais biliares, síndrome de Reye (encefalopatia com degeneração gordurosa do cérebro), hemorragia nos rins e lesões sérias na pele, pelo contato direto. Além disso, os produtos do seu metabolismo, no organismo, interferem com o sistema imunológico do homem ou animal, diminuindo a resistência imunológica (Bennett; Klich, 2003; Kamei; Watanabe, 2005; Paterson; Lima, 2010; Pitt, 2000).

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 micro-organismos toxigênicos. Diversos trabalhos relatam a presença de micotoxinas e fungos toxigênicos em especiarias, em drogas e substratos de plantas medicinais (Aziz *et al.*, 1997; Khan *et al.*, 2006; Rizzo *et al.*, 2004).

Ao analisar 62 amostras de drogas vegetais e 11 amostras de chás, Halt (1998) obteve contagens fúngicas variando entre 10^2 e 10^5 e entre 10^2 e 10^4 UFC/g, respectivamente. O autor isolou *Aspergillus* e *Penicillium* como dois gêneros predominantes. Da mesma forma, Abou-Arab *et al.* (1999) analisaram amostras de drogas vegetais e verificaram que estes gêneros foram os mais isolados.

Roy e Chourasia (1989) demonstraram a presença de aflatoxinas em 14 de 15 amostras de plantas medicinais, estudadas na Índia, sendo encontradas as seguintes espécies fúngicas: *Aspergillus flavus*, *A. candidus*, *A. niger*, *A. luchuensis*, *A. ochraceus*, *A. nidulans*, *Fusarium verticillioides*, *F. oxysporum*, *Curvularia lunata*, *Penicillium citrinum*, *Alternaria alternata* e *Rhizopus stolonifer*.

Em 2008, Singh *et al.* analisaram 6 drogas vegetais, e isolaram 858 fungos. Entre os 32 isolados de *Aspergillus flavus*, 13 foram produtores de aflatoxinas.

Espécies de *Penicillium* crescem e produzem micotoxinas, como citrinina, ocratoxinas, ácido ciclopiazônico e sterigmatocistina, preferencialmente em climas temperados e também estão associados aos períodos de estocagem de matéria prima (Pitt, 2000).

Ao analisarem amostras não irradiadas de *Ginkgo biloba* e guaraná (*Paullinia cupana* Kunth), Soriani *et al.* (2005) encontraram valores elevados de fungos sendo 10^3 para *Ginkgo biloba* e 10^6 UFC/g para guaraná. Os autores também detectaram a presença de toxinas (ocratoxinas) associadas ao gênero *Penicillium* spp.

Lutonsky e Kedzia (1980) ao analisarem 50 amostras de drogas vegetais, verificaram contagens superiores a 10^2 UFC/g de fungos filamentosos e leveduras em 90% das amostras. Cerca de 50% dos 246 fungos isolados pertenciam os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*. Resultado semelhante foi encontrado por Rizzo *et al.* (2004) ao analisarem 152 amostras de plantas medicinais, as quais 52% estavam contaminadas com espécies de *Aspergillus*.

A presença de 10 gêneros fúngicos, com maior frequência *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, *A. niger*, *Fusarium oxysporum* e *Penicillium viridicatum*, foram detectados em 84 amostras de plantas medicinais, coletadas por Aziz *et al.* (1997), no Cairo (Egito).

Martins *et al.* (2001) avaliaram 62 amostras de plantas medicinais, adquiridas em Lisboa (Portugal) e verificaram a presença de *Fusarium* spp. (59,7%), *Aspergillus flavus* (22,6%), *A. glaucus* (32,2%) e *A. niger* (46,8%), além de *Penicillium* spp. (61,3%).

Para detecção e enumeração de micro-organismos usando meio de cultura padrão, Abou-Donia (2008) analisou 303 amostras de diferentes tipos de especiarias e plantas medicinais coletadas aleatoriamente no Egito. Também verificou, carga micológica e presença de aflatoxinas. Foi observada uma contaminação por fungos entre 10 a 10^4 UFC/g. Todas as amostras estavam contaminadas com fungos e os gêneros mais frequentemente encontrados foram *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium* e outros menos frequentes (*Alternaria*, *Absidia* spp., *Mucor* spp., *Rhizoctonia* e *Cladosporium* spp.).

3. ENUMERAÇÃO DOS FUNGOS PRESENTES EM MEDICAMENTOS FITOTERÁPICOS USANDO DIFERENTES MEIOS DE CULTURA

Artigo submetido ao
Brazilian Journal of Microbiology

ENUMERAÇÃO DOS FUNGOS PRESENTES EM MEDICAMENTOS FITOTERÁPICOS USANDO DIFERENTES MEIOS DE CULTURA¹

RESUMO

Com o estudo avaliou-se a qualidade micológica de comprimidos, cápsulas e soluções de uso oral de medicamentos fitoterápicos à base de castanha-da-índia e alcachofra, em três meios de cultura ágar Dicloran Rosa de Bengala (DRBC), ágar Dicloran Glicerol 18% (DG18) e ágar Sabouraud-dextrose (SDA) seguindo método descrito na Farmacopeia Brasileira 5ª edição. Para cada forma farmacêutica foram selecionados três diferentes fabricantes. De cada fabricante foram utilizadas 10 amostras pertencentes ao mesmo lote, totalizando 30 amostras para cada forma farmacêutica e 90 para cada princípio ativo. Três medicamentos à base de castanha-da-índia estavam fora das especificações da Farmacopeia Brasileira com valores médios para um lote de comprimido com $1,26 \times 10^3$ UFC/g; $1,39 \times 10^3$ UFC/g e $1,36 \times 10^3$ UFC/g para os meios de cultura DRBC, DG18 e SDA, respectivamente e dois lotes para cápsulas, sendo um com <10 UFC/g; $8,4 \times 10^2$ UFC/g e $3,9 \times 10^2$ UFC/g e a outra com $1,27 \times 10^3$ UFC/g; $2,44 \times 10^3$ UFC/g e $1,53 \times 10^3$ UFC/g para os meios de cultura DRBC, DG18 e SDA, respectivamente. Para os medicamentos a base de alcachofra, um lote de comprimido apresentou contagem para os meios de cultura DRBC, DG18 e SDA de $2,9 \times 10^2$ UFC/g; $3,6 \times 10^2$ UFC/g e $3,3 \times 10^2$ UFC/g, respectivamente e um lote de solução oral $2,3 \times 10$ UFC/mL; < 10 UFC/ml e $1,8 \times 10^2$ UFC/ml, para os meios de cultura DRBC, DG18 e SDA, respectivamente. Houve diferença estatística significativa entre os meios de cultura utilizados quanto ao número de UFC obtido apenas para os medicamentos à base de castanha-da-índia. Dependentes do fabricante, as cápsulas e os comprimidos foram mais susceptíveis à contaminação.

Palavras-chave: droga vegetal, contaminação, meio de cultura, medicamentos fitoterápicos.

¹ Artigo submetido como Barros-Correia ACR, Souza-Motta CM. Enumeração dos fungos presentes em medicamentos fitoterápicos usando diferentes meios de cultura, *Brazilian Journal of Microbiology*.

INTRODUÇÃO

A fitoterapia é um método alternativo e complementar da medicina, em elevada ascensão em países desenvolvidos e em desenvolvimento. A Organização Mundial de Saúde estima que aproximadamente 70-80% da população do mundo, particularmente nos países em desenvolvimento, utilizam alternativas não-convencionais, principalmente de fontes herbáceas, como tratamento preliminar e por considerarem seguros devido à sua origem natural (Brasil, 2006c; Calixto, 2000).

Para a produção de medicamentos fitoterápicos, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) exige que as empresas produtoras de medicamentos tenham implantado as normas de boas práticas de fabricação (Brasil, 2010b). O cumprimento das diretrizes regulamentadoras é necessário para que possa evitar e prevenir os riscos na qualidade e segurança dos produtos. A qualidade microbiológica de produtos constitui uma das características essenciais em relação à segurança e eficácia, pois presença de micro-organismos expõe o medicamento fitoterápico, não apenas por permitirem a decomposição química de seus constituintes, mas, por se comportarem como agentes infectantes oportunistas ou produzirem metabólitos tóxicos (Adeleye *et al.*, 2005; Bugno, *et al.*, 2006; Okunlola *et al.*, 2007; Pinto *et al.*, 2010).

Os produtos fitoterápicos são obtidos de extratos provenientes de plantas coletadas, secas e armazenadas até o processamento de extração. As propriedades biológicas dos princípios-ativos e a umidade destes produtos podem favorecer a contaminação e o crescimento fúngico (Abu-Irmaileh; Afifi, 2003; Fennel *et al.*, 2004; Kneifel *et al.*, 2002). Quanto ao aspecto microbiológico, a literatura registra que a qualidade microbiológica de drogas vegetais e seus derivados apresentam índices de contaminação acima dos níveis aceitáveis (Alexander *et al.*, 1997; Bugno *et al.*, 2006; Fisher *et al.*, 1996).

Atentando ao fato que os medicamentos são produzidos em larga escala, a presença de determinados fungos pode ser considerada um problema de saúde pública, pois algumas espécies são capazes de produzir metabólitos tóxicos responsáveis por transtornos à saúde animal e do homem. A presença de fungos oportunistas como espécies de *Aspergillus* pode ser uma ameaça a pacientes imunocomprometidos, bem como a idosos e crianças (Kosalec *et al.*, 2009).

A Farmacopeia Brasileira 5ª edição determina requisitos para o limite de contaminação microbiana em produtos farmacêuticos, permitindo níveis mais elevados em produtos medicamentosos à base de plantas quando comparado com os alopáticos. No

entanto, este nível de contaminação permitido depende do método de processamento da droga. Níveis mais elevados de contaminação por fungo na ordem de 10^4 unidades formadoras de colônias (UFC/g), são permitidos se a preparação final envolver a adição de água fervente; se as drogas vegetais forem submetidas a processos extrativos a frio, este limite diminui para 10^3 UFC/g (Araújo; Ohara, 2000; Brasil, 2010c).

Diante do exposto, são objetivos com este trabalho comparar a eficiência de diferentes meios de cultura para enumeração de fungos em medicamentos fitoterápicos à base de castanha-da-índia e alcachofra e determinar qual a forma farmacêutica mais susceptível à contaminação por fungos.

MATERIAL E MÉTODOS

Para realização desta pesquisa foram analisados medicamentos fitoterápicos cujos princípios ativos foram: castanha-da-índia (*Aesculus hippocastanum* L.) e alcachofra (*Cynara scolymus* L.). Para cada princípio ativo foram analisadas três formas farmacêuticas: cápsula, comprimido e solução oral, e de cada forma farmacêutica foram selecionados três diferentes fabricantes. De cada fabricante foram utilizadas 10 amostras pertencentes ao mesmo lote, totalizando 30 amostras para cada forma farmacêutica e 90 para cada princípio ativo.

Todas as amostras destes medicamentos foram adquiridas em farmácias e drogarias comerciais do município de Recife – PE, Brasil, no período de setembro de 2010 a abril de 2011.

As amostras dos medicamentos fitoterápicos foram avaliadas quanto à contaminação fúngica, após validação do método, de acordo com os critérios estabelecidos pela Farmacopeia Brasileira, 5ª edição (Brasil, 2010c).

A análise micológica foi realizada pela enumeração de fungos viáveis totais, empregando-se o método de contagem em placa de Petri, utilizando a técnica de plaqueamento em profundidade conforme descrita em compêndios oficiais (Farmacopeia Brasileira, 1988; Brasil, 2010c; The United States Pharmacopeia, 2011) e três meios de cultura, ágar Dicloran Rosa de Bengala (DRBC) e ágar Dicloran Glicerol 18% (DG18) e ágar Sabouraud-dextrose (SDA), todos acrescidos de Cloranfenicol (50 mg/mL).

Para cápsulas e comprimidos, 10 g de cada amostra foram suspensos em 90 ml de solução tampão fosfato pH 7,2, adicionada de 0,5% de Tween 80 como agente dispersante. As amostras foram mantidas em repouso durante 15 minutos e diluições decimais

sucessivas foram realizadas até 10^{-3} . Posteriormente, 1 mL, de cada diluição, foram transferidas para placas de Petri e vertidas sobre estas, separadamente, os três meios de cultura. Para a solução oral, foram transferidos 10 mL de cada amostra e foi utilizado o meio de cultura Caldo Lethen como solução diluente e, em seguida realizado o mesmo procedimento de diluição e plaqueamento utilizados para as formas sólidas. Todas as placas de Petri, foram em seguida incubadas a 25° C por 7 dias.

Após esse período, as colônias de fungos foram enumeradas e determinada a média das UFC/g (cápsula ou comprimido) ou mL (solução oral) das 10 amostras de cada fabricante das formas farmacêuticas pesquisadas (Brasil, 2010c).

Análise estatística

A média das UFC/g ou mL de fungos foi calculada considerando os fatores relacionados ao medicamento pesquisado, a saber: fabricante, forma farmacêutica e meio de cultura. Foi aplicada a análise de variância com múltiplos fatores – ANOVA (3 fatores). A significância estatística adotada na avaliação das hipóteses foi de 5% ($p < 0,05$) e o *Software* utilizado foi o STATA versão 9.0.

RESULTADOS

Os valores médios das UFC/g ou mL encontrados nas amostras analisadas constam respectivamente nas Tabelas 1 e 2. Estes valores representam a média das UFC/g ou mL ($n=10$). Quando não foi observado crescimento de fungos, os resultados foram expressos como sendo menor que a menor diluição utilizada (<10).

Para as amostras dos produtos à base de castanha-da-índia (Tabela 1), na forma farmacêutica comprimido, para o Fabricante 4, foram observados níveis de contaminação elevados, sendo de $1,26 \times 10^3$ UFC/g; $1,39 \times 10^3$ UFC/g e $1,36 \times 10^3$ UFC/g nos meios de cultura DRBC, DG18 e SDA, respectivamente; e na forma cápsula, para o Fabricante 3, $8,4 \times 10^2$ UFC/g; $3,9 \times 10^2$ UFC/g e <10 UFC/g; nos meios de cultura DRBC, DG18 e SDA, respectivamente e o Fabricante 5, também apresentou índice elevado de $1,27 \times 10^3$ UFC/g; $2,44 \times 10^3$ UFC/g e $1,53 \times 10^3$ UFC/g nos meios de cultura DRBC, DG18 e SDA, respectivamente. Para a forma farmacêutica solução oral não foi observado crescimento de fungos em nenhum dos meios de cultura utilizados nas amostras de castanha-da-índia procedentes dos três fabricantes.

Tabela 1. Valores médios obtidos na enumeração de fungos presentes em medicamento fitoterápico à base de castanha-da-índia, nas formas farmacêuticas comprimido, cápsula e solução oral, de cada fabricante, nos três diferentes meios de cultura.

Forma farmacêutica	Código do fabricante	Unidades formadoras de colônias (UFC/g ou mL)		
		DRBC	DG18	SDA
Comprimido	4	$1,26 \times 10^3$	$1,39 \times 10^3$	$1,36 \times 10^3$
	9	<10	<10	<10
	12	<10	<10	<10
Cápsula	3	$8,40 \times 10^2$	$3,90 \times 10^2$	<10
	5	$1,27 \times 10^3$	$2,44 \times 10^3$	$1,53 \times 10^3$
	8	<10	<10	<10
Solução oral	15	<10	<10	<10
	16	<10	<10	<10
	18	<10	<10	<10

DRBC – Agar Dicloran-Rosa de Bengala-Cloranfenicol; DG18 – Agar Dicloran; SDA – Agar Sabouraud-Dextrose

Com relação ao medicamento fitoterápico à base de alcachofra (Tabela 2) na forma farmacêutica comprimido, apenas o Fabricante 1 apresentou contagem mais elevada, nos meios de cultura DRBC, DG18 e SDA de $2,9 \times 10^2$ UFC/g; $3,6 \times 10^2$ UFC/g e $3,3 \times 10^2$ UFC/g, respectivamente; e para a forma líquida, o Fabricante 17 apresentou uma contagem de $2,3 \times 10$ UFC/mL e $1,8 \times 10^2$ UFC/mL, para os meios de cultura DRBC e SDA, respectivamente. Para os Fabricantes 2, 11 e 6 houve crescimento somente no meio DG18, de $7,9 \times 10$ UFC/g; $9,1 \times 10$ UFC/g e $1,9 \times 10$ UFC/g, respectivamente.

Tabela 2. Valores médios obtidos na enumeração de fungos presentes em medicamento fitoterápico à base de alcachofra, nas formas farmacêuticas comprimido, cápsula e solução oral, de cada fabricante, nos três diferentes meios de cultura

Forma farmacêutica	Código do fabricante	Unidades formadoras de colônias (UFC/g ou mL)		
		DRBC	DG18	SDA
Comprimido	1	$2,90 \times 10^2$	$3,60 \times 10^2$	$3,30 \times 10^2$
	2	<10	$7,90 \times 10$	<10
	11	<10	$9,10 \times 10$	<10
Cápsula	6	<10	$1,90 \times 10$	<10
	7	$1,27 \times 10^3$	$2,44 \times 10^3$	$1,53 \times 10^3$
	13	<10	<10	<10
Solução oral	10	<10	<10	<10
	14	<10	<10	<10
	17	$2,30 \times 10$	<10	$1,80 \times 10^2$

DRBC – Agar Dicloran-Rosa de Bengala-Cloranfenicol; DG18 – Agar Dicloran; SAD – Agar Sabouraud-Dextrose.

Comparação da contagem de fungos entre os meios de cultura

Para comparar a eficácia dos três meios de cultura utilizados na enumeração da carga fúngica foi realizado a análise estatística dos resultados obtidos, para as amostras dos medicamentos fitoterápicos a base de castanha-da-índia e alcachofra.

Para os medicamentos à base de castanha-da-índia, tratando cada fator (fabricante, forma farmacêutica e meio de cultura) isoladamente (Tabela 4), observa-se que houve diferenças significativas entre os fabricantes no que se refere a contaminação destes por fungos ($p = 0,0276$). Efeito significativo também foi verificado quando comparados os meios de cultura ($p = 0,0252$). Os números de UFC de fungos entre as formas farmacêuticas não foram estatisticamente diferentes ($p = 0,7378$).

Comparando as interações entre os fatores no nível de contaminação por fungos, interação significativa foi evidenciada entre fabricante x forma farmacêutica ($p < 0,0001$) e entre fabricante x forma farmacêutica x meio de cultura ($p < 0,0010$). Não houve interação significativa entre fabricante x meios de cultura ($p = 0,3755$) ou meios de cultura x forma farmacêutica ($p = 0,3659$) (Tabela 3).

Tabela 3. Interações entre os efeitos relacionados ao fabricante, forma farmacêutica e meio de cultura, utilizando o medicamento à base de castanha-da-índia

Efeitos	p-valor
Efeitos principais	
Fabricante	0,0276 [†]
Forma farmacêutica	0,7378
Meio de cultura	0,0252 [†]
Efeitos de interação de dois fatores	
Fabricante x Forma farmacêutica	< 0,0001 [†]
Fabricante x Meio de cultura	0,3755
Meio de cultura x Forma farmacêutica	0,3659
Efeitos de interação de três fatores	
Fabricante x Forma farmacêutica x Meio de cultura	0,0010 [†]

[†]Interações estatisticamente significante ($p < 0,05$)

Para as amostras à base de alcachofra, tratando cada fator isoladamente, não houve diferenças significativas entre os fabricantes no que se refere à contaminação das amostras por fungos ($p = 0,0932$), assim como quando comparados à forma farmacêutica ($p = 0,8633$) e os meios de cultura ($p = 0,1178$). Porém quando comparadas às interações entre os fatores observa-se uma interação significativa entre fabricante x forma farmacêutica ($p = 0,0055$) (Tabela 4).

Tabela 4. Interações entre os efeitos relacionados ao fabricante, forma farmacêutica e meio de cultura, utilizando o medicamento à base de alcachofra.

Efeitos	p-valor
Efeitos principais	
Fabricante	0,0932
Forma farmacêutica	0,8633
Meio de cultura	0,1178
Efeitos de interação de dois fatores	
Fabricante x Forma farmacêutica	0,0055 [†]
Fabricante x Meio de cultura	0,7245
Meio de cultura x Forma farmacêutica	0,7755
Efeitos de interação de três fatores	
Fabricante x Forma farmacêutica x Meio de cultura	0,6451

[†]Interação estatisticamente significativa ($p < 0,05$)

Com relação ao número de UFC nos diferentes meios de cultura (Figura 1) foi observado que o meio DG18 propiciou maior número de UFC (7.209) tanto para os medicamentos à base de castanha da índia (4.220) quanto para alcachofra (2989) seguido pelo meio DRBC (5160) e SDA (4930).

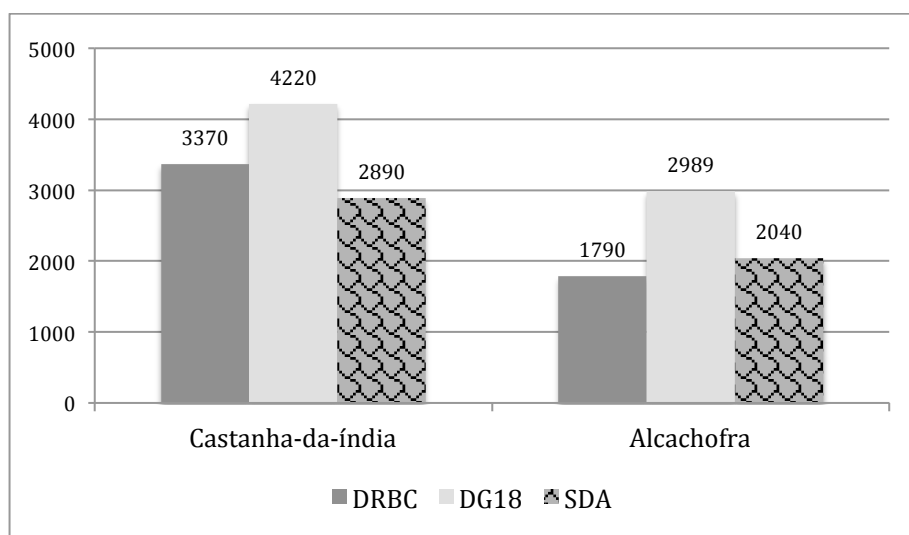


Figura 1. Número de UFC de fungos nos diferentes meios de cultura para cada droga vegetal.

DISCUSSÃO

Existem poucos relatos quanto à contaminação microbiana em medicamentos fitoterápicos industrializados. Na maioria dos relatos trata-se de drogas vegetais usadas como infuso, desidratadas ou em pó (Abbas *et al.*, 2004; Anyanwu, 2010; Bugno *et al.*, 2005; Furlaneto *et al.*, 2004) ou por contaminação bacteriana (Enayatifard *et al.*, 2010).

No que se refere a contaminação de medicamentos fitoterápicos por fungos, os resultados obtidos no presente estudo diferem dos obtidos por Fischer (1992), que detectou

maior nível de contaminação com predominância de fungos filamentosos ($4,6 \times 10^5$ UFC/g), ao analisar 84 amostras de medicamentos fitoterápicos, contendo 17 drogas vegetais, obtidas no comércio de São Paulo, na forma de cápsulas, comprimido e pó, contendo 17 drogas vegetais. Entretanto quando comparados cada princípio ativo estudado por esta autora, destacam-se dois lotes de cápsulas de castanha-da-índia (<10 e 10^3 UFC/g) e cinco lotes de cápsulas e um de comprimido de alcachofra, para ambas formas farmacêuticas, a contagem variou de <10 UFC/g a 10^3 UFC/g. Resultados estes, semelhantes aos obtidos no presente trabalho.

Comparando a contagem de UFC de fungos nas formas farmacêuticas estudadas no presente trabalho, foi constatada contaminação por fungos em cápsulas e comprimidos de castanha-da-índia e alcachofra e apenas em uma amostra de solução oral de alcachofra. Okunlola *et al.* (2007) analisaram 21 produtos fitoterápicos de diferentes formas farmacêuticas, dentre as quais, comprimidos, cápsulas e soluções líquidas comercializadas no sul da Nigéria, quanto à contaminação microbiana. Os autores verificaram contaminação por fungos em amostras de comprimidos ($4,0 \times 10^3$ UFC/g) e em soluções líquidas (<10 a $3,5 \times 10^3$ UFC/ml). Nenhuma cápsula estava contaminada por fungos. Estes resultados diferem dos obtidos presente trabalho no que se refere ao número de UFC e não ser observada contaminação das cápsulas pelos autores. Os resultados do presente trabalho também diferem dos observados por Kulkarni e colaboradores (2010) ao analisarem 10 preparações fitoterápicas líquidas no oeste da Índia para testes de limite microbiano. Todas as amostras demonstraram contagem de bactérias aeróbia e contagem de fungos dentro dos limites de 10^5 UFC/g e 10^3 UFC/g, respectivamente prescritos pela *World Health Organization*.

Em relação a eficácia dos meios de cultura para a enumeração de por Askun *et al.* (2007) ao utilizarem dois meios seletivos Rosa de Bengala Cloranfenicol (RBC) e DG18 na enumeração de fungos em 129 amostras de passas da Turquia. Não houve diferença estatística significativa na contagem ($p > 0,05$) entre os dois meios de isolamento. Também os resultados foram concordantes com os de Copetti *et al.* (2005) ao avaliarem a qualidade micológica de rações para cães e gatos utilizando três meios diferentes DG18, ágar Batata acidificado e ágar Dicloran Rosa de Bengala. Estes autores verificaram que não havia diferença estatística no número de UFC, entre os três meios. Os resultados, similares aos obtidos Lazaretti *et al.* (2000) que demonstraram que não havia diferença significativa quando compararam o número de UFC de fungos em três marcas de erva-mate utilizando

água Batata-dextrose, DRBC e o meio para bolores e leveduras - SIMPLATE. Entretanto, estes os autores demonstraram que quando a contagem de fungos era maior que 10^4 UFC/g, o meio água Batata-dextrose mostrava-se menos eficaz que os meios DRBC e meio para bolores e leveduras – SIMPLATE.

No presente estudo, quanto à comparação dos três meios DRBC, DG18 e SDA para enumeração de UFC dos produtos fitoterápicos, também não foi observada diferença estatística significativa quando o medicamento foi à base de alcachofra. No entanto, para o meio de cultura DG18 foi observado um maior número de UFC em relação aos outros dois meios estudados (DRBC e SDA), embora estes tenham sido eficazes no isolamento de fungos da solução oral de alcachofra. Não há relatos na literatura da utilização do meio de cultura DG18 para enumeração de fungos em medicamentos fitoterápicos.

Os níveis de contaminação por fungos, de forma geral, para as formas farmacêuticas comprimidos e cápsulas foram aceitáveis. No entanto, isto não foi observado para os medicamentos fitoterápicos à base de castanha-da-índia para os Fabricantes 4 (comprimido), 3 e 5 (cápsula); assim como para os medicamentos à base de alcachofra, para o Fabricante 1 (comprimido), os quais não atenderam aos critérios estabelecidos pela Farmacopeia Brasileira 5ª edição (Brasil, 2010c).

Para a forma farmacêutica solução oral, do medicamento fitoterápico à base de alcachofra apenas para o produto do Fabricante 17 foi obtido um resultado próximo do limite das especificações da Farmacopeia Brasileira 5ª ed. Não foi verificado nenhum crescimento de fungos em nenhum dos fabricantes para amostras de castanha-da-índia.

Com relação ao número de UFC de fungos obtidos para os diversos fabricantes e suas formas farmacêuticas, para os medicamentos à base de castanha-da-índia, observa-se que, isoladamente, os fatores fabricante e meio de cultura influenciam nos resultados. Porém, no estudo da interação entre os fatores, somente houve significância estatística entre fabricantes x formas farmacêuticas e entre fabricantes x formas farmacêuticas x meios de cultura. Para a alcachofra, entretanto, nenhum dos fatores isoladamente influenciou nos resultados, porém houve diferença significativa no estudo da interação dos fatores apenas entre fabricante x forma farmacêutica.

Diante do observado, a contaminação por fungos filamentosos nos medicamentos fitoterápicos estudados depende principalmente do fabricante, pois somente houve diferença significativa quando este fator estava associado à forma farmacêutica.

De acordo com os resultados obtidos, pode-se concluir que, para os medicamentos fitoterápicos estudados à base castanha-da-índia há diferença significativa entre os meios de cultura utilizados (DRBC, DG18 e SDA) em relação a enumeração de fungos, o que não foi observado para aqueles à base de alcachofra. O meio de cultura DG18 demonstrou ser mais indicado para isolamento de fungos filamentosos por apresentar maior número de UFC para ambos medicamentos fitoterápicos estudados. Este meio está sendo recomendado para avaliação quantitativa de medicamentos fitoterápicos na forma farmacêutica sólida por permitir a melhor recuperação dos fungos, incluindo os de crescimento lento.

As formas farmacêuticas mais susceptíveis a contaminação por fungos são cápsula e comprimido.

Agradecimentos: Agradecemos a Financiadora de Recursos e Projetos (FINEP), Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) e a Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) pelo apoio a esta pesquisa.

4. DIVERSIDADE E POTENCIAL TOXIGÊNICO DE FUNGOS ISOLADOS DE MEDICAMENTOS FITOTERÁPICOS

Artigo a ser submetido ao
Brazilian Journal of Microbiology

DIVERSIDADE E POTENCIAL TOXIGÊNICO DE FUNGOS ISOLADOS DE MEDICAMENTOS FITOTERÁPICOS²

RESUMO

A qualidade microbiológica de medicamentos fitoterápicos deve ser cuidadosamente investigada ou monitorada, pois podem apresentar elevada carga microbiana, quer seja sapróbia ou patogênica. Algumas destas espécies, em especial de fungos, podem produzir toxinas, que podem ser tóxicas e cancerígenas. Um total de 18 medicamentos fitoterápicos, nas formas farmacêuticas cápsulas, comprimidos e solução oral, à base de alcachofra e castanha-da-índia, foram analisados quanto à contaminação por fungos e quanto ao potencial toxigênicos dos gêneros *Penicillium*, *Aspergillus* e teleomorfos. De um total de 148 isolados, *Aspergillus* foi o de maior frequência, correspondendo a 45,27% dos isolados, seguido de *Eurotium* com 19,59% e *Penicillium* com 18,92%. Também foram isoladas espécies de *Alternaria* (1,34%), *Cladosporium* (6,75%), *Curvularia* (0,67%), *Emericella* (2,7%), *Neosartorya* (1,31%), *Tritirachium* (2,7%) e *Wallemia* (0,67%). Espécies de *Penicillium*, *Aspergillus* e teleomorfos (*Emericella*, *Eurotium* e *Neosartorya*) foram semeadas em ágar Coco para detecção de micotoxinas, dos quais 19 (67,85%) isolados de *Penicillium*, 30 (46,15%) de *Aspergillus*, 22 (70,97%) de *Eurotium* e quatro (100%) de *Emericella*, produziram micotoxinas neste meio. Os isolados de *Neosartorya* não produziram toxinas. Estes resultados demonstram a necessidade de exclusão destas espécies em produtos fitoterápicos devido a potencial capacidade de produzir micotoxinas.

Palavras-chave: Fungos toxigênicos. Medicamentos fitoterápicos. Contaminação fúngica.

INTRODUÇÃO

No Brasil, a fitoterapia é uma opção medicamentosa que atende às necessidades de atendimento primário à saúde (Brasil 2006; 2006a) e, é um dos fatores de expansão da fitoterapia que está associado à busca de produtos “naturais” e comprovações científicas das propriedades farmacológicas (Calixto, 2000; Carvalho *et al.*, 2008; Melo *et al.*, 2007).

Há evidências de que as plantas medicinais e seus derivados podem estar contaminados com fungos toxigênicos. Nos últimos anos tem sido enfatizada a ocorrência de aflatoxinas em plantas medicinais (Bugno, *et al.*, 2006; Kosalec *et al.*, 2009; Rizzo *et al.*, 2004; Singh *et al.*, 2008).

1 Artigo a ser submetido como Barros-Correia ACR, Fernandes MJS, Gomes BS, Souza-Motta CM. Diversidade e potencial toxigênico de fungos isolados em medicamentos fitoterápicos, *Brazilian Journal of Microbiology*.

O impacto da incidência de fungos em medicamentos fitoterápicos deve ser considerado um perigo para a saúde. A presença de fungos deve ser cuidadosamente investigada ou monitorada, pois algumas espécies produzem toxinas, especialmente aflatoxinas. Mesmo que o fungo tenha sido eliminado durante o processamento das drogas vegetais, as micotoxinas podem permanecer no produto final (Freire *et al.*, 2008).

Os fungos e suas respectivas micotoxinas se desenvolvem, principalmente, de acordo com o teor de umidade, assim a capacidade de produção de toxina pode ser limitada pela baixa atividade de água. No entanto, isolados ocratoxigênicos em geral estão adaptados a substratos com baixa atividade de água e podem colonizar facilmente produtos armazenados desidratados ou semi-secos (Pardo *et al.*, *apud* Askun *et al.*, 2007, p. 71).

As aflatoxinas são compostos altamente tóxicos e cancerígenos que têm sido envolvidos com possível hepatocarcinogenicidade humana (*International Agency for Research on Cancer*, 1993; 2002). Estas toxinas são produzidas principalmente por culturas de *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius*, porém outras espécies podem produzir em pequenas quantidades, como *A. pseudotamarii*, *A. arachidicola*, *A. minisclerotigenes*, *A. novoparasiticus*, *A. niger*, *A. ruber*, *A. ochraceus*, *A. fumigatus*, *Emericella venezuelensis*, e *E. astellata*. *A. parasiticus*, que predomina nos países tropicais, é considerado um dos produtores mais ativos, principalmente de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂, enquanto *A. flavus* produz B₁ e G₁ (Abarca *et al.*, 2000; Cary *et al.*, 2005; Frisvad *et al.*, 2004; 2004a; Ito *et al.*, 2001; Klick, 2007; Pildain *et al.*, 2008).

Ocratoxina A, outra micotoxina produzida por várias espécies de *Aspergillus* e *Penicillium*, possui efeitos nefrotóxicos e potencial atividade carcinogênica. Dentre as espécies de *Aspergillus*, *A. ochraceus* é o principal produtor de ocratoxina A, seguido por *A. carbonarius* e *A. niger* e, entre as espécies de *Penicillium*, *P. aurantiogriseum*, *P. brevicompactum*, *P. chrysogenum*, *P. glabrum* e *P. verrucosum* (Abarca *et al.*, 2000; Frisvad *et al.*, 2007; Paterson; Lima, 2010; Prado *et al.*, 2008; Tanikawi *et al.*, 2003).

No Brasil, a Resolução Nº 7 de 18 de fevereiro de 2011, dispõe sobre os limites máximos tolerados (LMT) de aflatoxina para alimento de consumo humano (20µg/kg) e ração animal (50µg/kg). No entanto, existe uma lacuna na área de medicamentos fitoterápicos (Brasil, 2002; 2011). A Farmacopeia Brasileira 5ª ed. (Brasil, 2010c) preconiza que ao avaliar os resultados dos testes microbiológicos em medicamentos devam ser considerados, no contexto do uso do produto, o número e os tipos de micro-organismos presentes. Esta edição, entretanto, não faz menção, às recomendações da edição anterior

que, para produtos de uso oral era indesejável a presença de, entre outros micro-organismos, *A. flavus* e *A. parasiticus* (Brasil, 2010c; Farmacopeia Brasileira, 1988).

As drogas vegetais, normalmente, apresentam elevada carga microbiana, quer seja sapróbia ou patogênica (Soriani, 2005). Os contaminantes, normalmente, são provenientes do solo, da água e do ar. Contaminação secundária pode ainda ocorrer devido ao armazenamento e ao processamento destas drogas (Satomi *et al.*, 2003).

Durante a fabricação de um medicamento fitoterápico, a matéria-prima vegetal é submetida a condições desfavoráveis à sobrevivência de micro-organismos, tais como radiação gama (^{60}Co), extração com solventes orgânicos e secagem a altas temperaturas (100-200°C). A presença destes fungos ou de seus metabólitos na matéria-prima vegetal pode então, permanecer e ser levada ao medicamento, pois estes tratamentos não garantem, teoricamente, a destruição da microbiota fúngica ou das toxinas ou redução da carga contaminante (Aquino, 2007; Furlaneto *et al.*, 2004; Prado *et al.*, 2008; Souza *et al.*, 2006)

Considerando a expansão da fitoterapia, é de suma importância a detecção de fungos produtores de micotoxinas em medicamentos fitoterápicos devido ao risco potencial, à saúde humana, decorrente da contaminação indireta destas substâncias. Os objetivos com esse trabalho foram identificar os fungos isolados de medicamentos fitoterápicos à base de castanha-da-índia e alcachofra; comparar a diversidade das espécies isoladas e detectar espécies toxigênicas.

MATERIAL E MÉTODOS

Medicamentos Fitoterápicos

Para realização desta pesquisa foram analisados medicamentos fitoterápicos cujos princípios ativo foram: castanha-da-índia (*Aesculus hippocastanum* L.) e alcachofra (*Cynara scolymus* L.). Para cada princípio ativo foram analisadas três formas farmacêuticas: cápsula, comprimido e solução oral, e de cada forma farmacêutica foram selecionados três diferentes fabricantes. De cada fabricante foram utilizadas 10 amostras pertencentes ao mesmo lote, totalizando 30 amostras para cada forma farmacêutica e 90 para cada princípio ativo.

Todas as amostras destes medicamentos foram adquiridas em farmácias e drogarias comerciais do município de Recife – PE, Brasil, no período de setembro de 2010 a abril de 2011.

Isolamento e Identificação de Fungos

A análise micológica foi realizada empregando-se o método de contagem em placa de Petri, utilizando a técnica de plaqueamento em profundidade conforme descrita em compêndios oficiais (Farmacopeia Brasileira, 1988; Brasil, 2010c; The United States Pharmacopeia, 2011) e três meios de cultura, ágar Dicloran Rosa de Bengala (DRBC) e ágar Dicloran Glicerol 18% (DG18) e ágar Sabouraud-dextrose (SDA), todos acrescidos de Cloranfenicol (50 mg/mL).

Para cápsulas e comprimidos, 10 g de cada amostra foram suspensos em 90 ml de solução tampão fosfato pH 7,2, adicionada de 0,5% de Tween 80 como agente dispersante. As amostras foram mantidas em repouso durante 15 minutos e diluições decimais sucessivas foram realizadas até 10^{-3} . Posteriormente, 1 ml, de cada diluição, foram transferidas para placas de Petri e vertidos sobre estas, separadamente, os três meios de cultura. Para a solução oral, foram transferidos 10 mL de cada amostra para o meio de cultura Caldo Lethen como solução diluente e, em seguida realizado o mesmo procedimento de diluição e plaqueamento utilizado para as formas sólidas. Todas as placas de Petri, foram em seguida incubadas a 25° C por 7 dias (Brasil, 2010c).

Após o período de incubação as colônias de fungos visivelmente diferentes foram transferidas, para tubos de ensaio contendo meio de cultura ágar Extrato Malte, e após confirmação da pureza, foram procedidas às técnicas de identificação, observando as características macromorfológicas e micromorfológicas, conforme esquemas taxonômicos utilizando os meios de cultura: Ágar Czapek Extrato de levedura (CYA), Ágar Glicerol 25% Nitrato (G25N), Ágar Malte Extrato (MEA), Ágar Czapek Extrato de levedura com 20% Sacarose (CY20S) (Carmichael, 1980; Domsch *et al.*, 2007; Ellis, 1971; Pitt, 1988; Pitt; Hocking, 2009; Samson *et al.*, 2007; Samson; Frisvad, 2004; Samson; Pitt, 2000; Raper; Fenell, 1977). Para observação das características micromorfológicas foram realizadas fotografias em microscópio eletrônico de varredura no Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE), Recife-PE, Brasil.

Deteção de micotoxinas

Espécies pertencentes aos gêneros *Aspergillus* e respectivos teleomorfos e *Penicillium* foram semeadas no centro de uma placa de Petri contendo o meio de cultura ágar Coco (marca Sococo®, Sococo S.A. Indústrias Alimentícias, Maceió-AL, Brasil) e incubadas durante 3 dias a 25°C, para evidenciar fluorescência (Lin; Dianese, 1976) e mudança de coloração da colônia (Saito; Machida, 1999). As cepas que apresentaram fluorescência sob

luz ultravioleta (360nm) ou mudança de coloração do meio de cultura após submissão a vapores de amônia foram consideradas potencialmente produtoras de micotoxinas.

RESULTADOS

Dos 18 medicamentos fitoterápicos à base de castanha-da-índia e alcachofra, foram obtidos 148 isolados de fungos pertencentes a 10 gêneros (*Alternaria*, *Aspergillus*, *Emericella*, *Eurotium*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Neosartorya*, *Penicillium*, *Tritirachium* e *Wallemia*). *Aspergillus* foi o gênero com maior frequência (45,27%), seguido de seu teleomorfo *Eurotium* (19,59%) e de *Penicillium* (18,92%). Quando considerado o gênero *Aspergillus* e seus teleomorfos (*Eurotium*, 19,59%; *Emericella*, 2,7% e *Neosartorya*, 1,31%) esta taxa se elevou para 68,87% de todos os isolados para todas as formas farmacêuticas analisadas. Também foram isoladas espécies de *Alternaria* (1,34%), *Cladosporium* (6,75%), *Curvularia* (0,67%), *Tritirachium* (2,7%) e *Wallemia* (0,67%) (Tabela 1).

Do total de fungos obtidos, o gênero *Aspergillus* apresentou o maior número de isolados (65) distribuídos em nove espécies; seguido de *Eurotium* com 31 isolados pertencendo a quatro espécies; *Penicillium*, com 28 isolados e 16 espécies e *Cladosporium*, com 10 isolados e duas espécies (Tabela 1).

Comparação da diversidade de isolados de fungos entre os meios de cultura

Do ponto de vista da diversidade de fungos entre os três meios utilizados no isolamento dos fungos, verifica-se que para todos os medicamentos à base de castanha-da-índia foram obtidos 90 isolados. O número de espécies obtido variou entre os meios de cultura utilizados; sendo nove, 17 e 12 espécies nos meios DRBC, DG18 e SDA, respectivamente (Tabela 1). Destas, três espécies foram isolados exclusivamente no meio DRBC; nove, no meio DG18 e quatro no meio SDA. Duas espécies foram comuns aos meios DG18 e SDA e seis espécies foram comuns aos três meios de cultura (Figura 1).

Para todos os medicamentos à base de alcachofra foram obtidos 58 isolados. O número de espécies obtidas entre os meios de cultura utilizados foram 13, 14 e 12 espécies nos meios DRBC, DG e SDA, respectivamente (Tabela 1). Destes isolados, foram obtidos exclusivamente sete, cinco e quatro espécies nos meios DRBC, DG18 e SDA, respectivamente. Uma espécie comum nos meios DRBC e DG18, como também para DRBC e SDA; quatro espécies foram comuns nos meios DG18 e SDA e três espécies foram comuns aos três meios de cultura (Figura 1).

Tabela 1 - Relação das espécies de fungos isoladas de medicamentos fitoterápicos à base de castanha-da-índia e alcachofra, nos meios de cultura ágar Dicloran Rosa de Bengala (DRBC), ágar Dicloran Glicerol 18% (DG18) e ágar Sabouraud Dextrose (SDA)

Espécies	Castanha-da-índia			Alcachofra			Total
	DRBC	DG18	SDA	DRBC	DG18	SDA	
<i>Alternaria alternata</i> (Fr.) Keis	0	1	0	0	1	0	2
<i>Aspergillus awamorii</i> Nakaz	5	4	1	0	0	0	10
<i>A. carbonarius</i> (Bainier) Thom	1	0	0	0	0	0	1
<i>A. flavus</i> Link	3	4	3	0	1	1	12
<i>A. fumigatus</i> Fresen.	0	1	0	0	0	0	1
<i>A. niger</i> Tiegh	5	4	2	1	0	0	12
<i>A. ochraceus</i> G.Wilh	0	2	1	0	1	1	5
<i>A. penicilloides</i> Speg.	0	0	1	0	0	0	1
<i>A. sydowii</i> (Bainier & Sartory) Yhom & Church	1	4	4	4	4	2	19
<i>A. tamarii</i> Kita	1	1	2	0	0	0	4
<i>Emericella variecolor</i> Berk & Broome	0	0	1	1	1	1	4
<i>Eurotium amstelodami</i> L. Mangi	0	2	0	0	1	0	3
<i>E. chevalieri</i> L. Mangi	0	3	0	0	0	3	6
<i>E. repens</i> Bary	3	7	4	0	0	0	14
<i>E. rubrum</i> W. Bremer	0	4	3	1	0	0	8
<i>Neosartorya fischeri</i> (Wehmer) Malloch & Cain 1973	0	2	0	0	0	0	2
<i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen) G.A. de Vries	0	2	0	0	4	1	7
<i>C. sphearospermum</i> Penz.	0	0	0	1	2	0	3
<i>Curvularia lunata</i> (Walker) Boedijn	0	0	0	0	0	1	1
<i>Penicillium aurantiogriseum</i> Dierckx	0	0	1	1	4	1	7
<i>P. brevicompactum</i> Dierckx	0	0	0	1	0	0	1
<i>P. canescens</i> Snopp	0	0	0	0	0	1	1
<i>P. chrysogenum</i> Fleroff	0	1	0	0	0	0	1
<i>P. citreonigrum</i> Dierckx	0	1	0	0	0	0	1
<i>P. citrinum</i> Thom	0	0	0	1	2	2	5
<i>P. corylophilum</i> Dierckx	0	0	0	1	0	0	1
<i>P. fellutanum</i> Biourge	0	0	0	1	0	0	1
<i>P. glabrum</i> (Wehmer)	0	0	0	0	1	0	1
<i>P. janthinellum</i> Biourge	0	1	0	0	0	0	1
<i>P. oxalicum</i> Currie & Thom	1	0	0	0	0	0	1
<i>P. solitum</i> Westling	0	0	0	0	1	0	1
<i>P. purpurogenum</i> Fleroff	0	0	0	1	0	0	1
<i>P. minioluteum</i> Dierckx	0	0	0	0	1	0	1
<i>P. waksmanii</i> K.M. Zalesky	0	0	1	1	0	1	3
<i>P. vinaceum</i> J.C. Gilman & E.V. Abbot	0	0	0	0	1	0	1
<i>Tritirachium oryzae</i> (Vincens) de Hoog	2	0	0	0	0	2	4
<i>Wallemia sebi</i> (Fr.) Arx	0	0	0	1	0	0	1
Total de isolados	22	44	24	16	25	17	148

0 = não isolado.

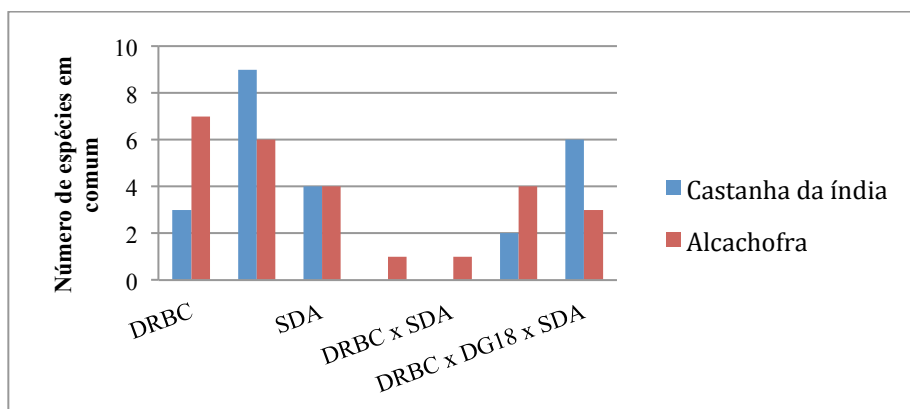


Figura 1. Relação numérica de espécies de fungos em comum entre os meios de cultura e aquelas que foram isoladas em apenas em um ou dois meios de cultura isolados de medicamentos fitoterápicos à base de castanha-da-índia e alcachofra.

A Figura 2 ilustra características macroscópicas e microscópicas de algumas espécies de *Aspergillus* e seus teleomorfos (*Emericella* e *Eurotium*) e *Penicillium* isoladas dos medicamentos fitoterápicos estudados.

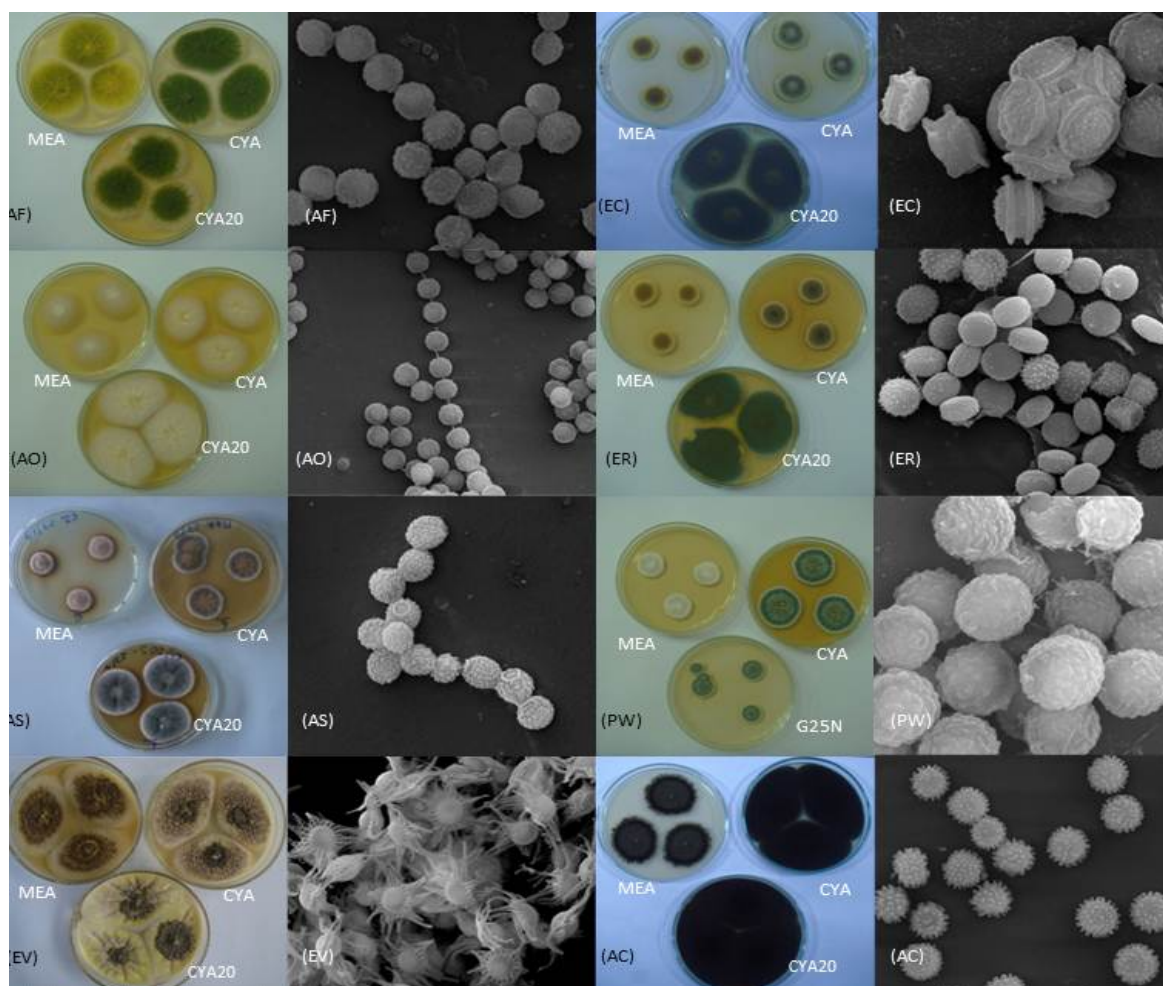


Figura 2- Características macroscópicas nos meios de cultura MEA (Ágar extrato de malte), CYA (Ágar Czapek extrato de levedura) e CY20S (Ágar Czapek extrato de levedura sacarose) e microscópicas das espécies *Aspergillus flavus* (AF) 10000x, *A. ochraceus* (AO) 10000x, *A. sydowii* (AS) 5000x, *Emericella varicolor* (EV) 6000x, *Eurotium chevalieri* (EC) 12000x, *E. repens* (ER) 7000x, *A. carbonarius* (AC) 5000x e MEA, CYA e G25N (Ágar Nitrato Glicerol 25%) para *Penicillium waksmanii* (PW) 20000x isoladas de medicamentos fitoterápicos.

Avaliação da Capacidade Micotoxigênica

Dentre as 101 culturas de *Aspergillus* e seus teleomorfos isolados nos medicamentos estudados, 52 apresentaram capacidade de produzir micotoxinas, o que corresponde a 51,48% e com relação aos 28 isolados de *Penicillium* 67,85% (19) produziram fluorescência no ágar Coco (Figuras 3 e 4).

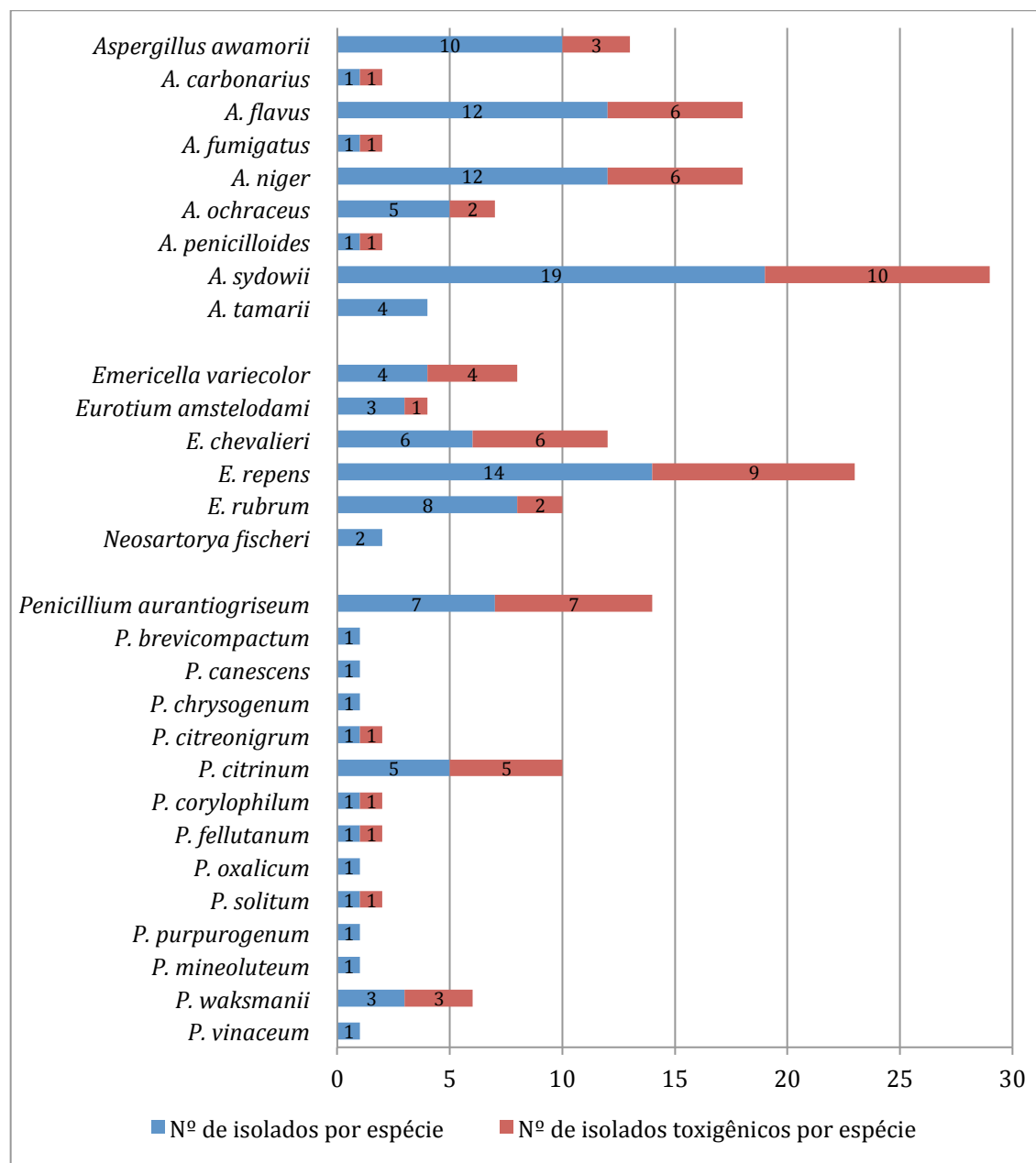


Figura 3. Número de isolados por espécie e de isolados toxigênicos dos medicamentos fitoterápicos constituídos pelas formas farmacêuticas cápsula, comprimido e solução oral, à base castanha-da-índia e de alcachofra.

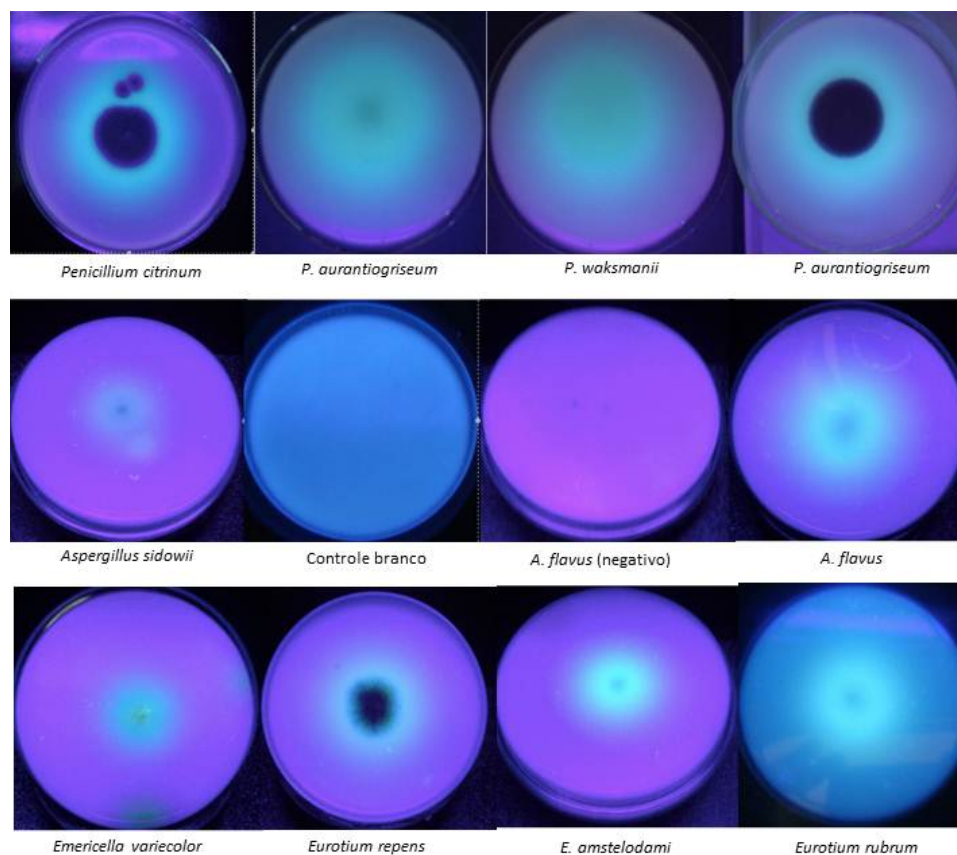


Figura 4 - Características macroscópicas do meio Ágar Coco, cultivo 25°C/72h, após exposição à luz UV (360 nm) de espécies isoladas dos medicamentos fitoterápicos à base de castanha-da-índia e alcachofra.

Relacionando os medicamentos fitoterápicos de onde foram isoladas às espécies toxigênicas verifica-se que a cápsula de castanha-da-índia (Fabricante 5) apresentou o maior número de isolados (31) com potencial capacidade produtora de micotoxina (52,54%). Ao considerar todas as formas farmacêuticas para o medicamento fitoterápico à base de castanha-da-índia, observa-se que dos 84 isolados, 39 (46,18%) produziram toxina enquanto que do medicamento à base de alcachofra, dos 46 isolados, 32 (69,56%) foram produtores de toxina (Tabela 2).

Tabela 2. Número de fungos isolados de medicamentos fitoterápicos à base de castanha-da-índia e alcachofra, nas formas farmacêuticas comprimido, cápsula e solução oral com resultados positivos quanto à capacidade de produzir micotoxinas em ágar coco.

Código Fabricante	Forma farmacêutica /droga veg.	Teleomorfos					
		<i>Aspergillus</i>		<i>(Emericella, Eurotium, Neosartorya)</i>		<i>Penicillium</i>	
		Total		Total		Total	
		Isolado	Positivo	Isolado	Positivo	Isolado	Positivo
1	Comp./alc.	5	5	0	0	5	4
2	Comp./alc.	1	1	0	0	4	3
3	Cap./cast.	1	1	2	2	1	1
4	Comp./cast.	0	0	0	0	3	2
5	Cap./cast.	33	17	24	13	2	1
6	Cap./alc.	2	2	6	3	3	2
7	Cap./alc.	2	0	0	0	2	2
8	Cap./cast.	12	0	0	0	1	0
10	Sol. oral/alc.	1	1	0	0	1	0
11	Comp./alc	4	1	0	0	2	2
12	Comp./cast.	3	1	1	1	1	0
13	Cap./alc.	0	0	3	3	0	0
14	Sol.oral/alc.	1	1	1	0	3	2
Total		65	30	37	22	28	19

droga veg. = droga vegetal; Comp. = comprimido; Cap. = cápsula; Sol. Oral = solução oral; alc. = alcachofra; cast. = castanha da índia; 0 = nenhum achado.

Para os medicamentos estudados foram encontradas espécies toxigênicas em produtos com umidade entre 4,23 e 12,36% (Tabela 3). Apesar da umidade alta (11,22%) para cápsula de alcachofra (Fabricante 6), a quantidade de fungos toxigênicos presentes nesta amostra foi menor que a do comprimido de alcachofra (Fabricante 1).

Tabela 3. Relação entre o percentual de umidade, número de isolados e o número de fungos toxigênicos procedentes dos medicamentos fitoterápicos à base de castanha-da-índia e alcachofra, nas formas farmacêuticas comprimido e cápsula

Código Fabricante	Forma farmacêutica /droga vegetal	Umidade (%)	Nº de isolados	Nº de fungos toxigênicos
1	Comp./alcachofra	5,26	10	09
2	Comp./ alcachofra	8,01	05	04
3	Cap./cast. índia	NR	04	04
4	Comp./cast. índia	4,98	03	02
5	Cap./cast. índia	12,36	59	31
6	Cap./ alcachofra	11,22	11	07
7	Cap./ alcachofra	9,32	04	02
8	Cap./cast. índia	6,62	13	00
9	Comp./cast. índia	4,23	00	00
11	Comp./ alcachofra	5,56	06	03
12	Comp./cast. índia	5,18	05	02
13	Cap./alcachofra	8,35	03	03

Comp. = comprimido; Cap. = cápsula; cast. índia = Castanha-da-índia; (0) = não detectado. NR = não realizado. Teor de umidade determinado pelo Método Gravimétrico segundo Brasil, 2010c.

DISCUSSÃO

Embora existam poucos trabalhos na literatura, envolvendo a análise microbiológica de produtos fitoterápicos nas formas comprimido, cápsula ou solução oral, na interpretação dos resultados dos ensaios microbiológicos deve ser considerada a duração do tempo de uso do produto, a idade e o comprometimento do sistema imunológico do usuário, bem como o número e tipos de micro-organismos presentes.

Na pesquisa, pode-se verificar a predominância do gênero *Aspergillus* e seus teleomorfos e uma maior diversidade em relação ao gênero *Penicillium* nas amostras de comprimidos e cápsulas. Estes resultados se assemelham com os obtidos por outros autores que ressaltaram o predomínio dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, em amostras de drogas vegetais e especiarias (Bugno *et al.*, 2006; Martins *et al.*, 2001; Rizzo *et al.*, 2004).

Foi observado no meio DG18 uma maior diversidade, 17 isolados, para os medicamentos à base de castanha-da-índia. Quando comparado esta diversidade com os dois outros meios, verifica-se que, apesar dos meios DRBC e SDA apresentarem nove e 12 espécies diferentes, respectivamente, estas pertenciam a quatro gêneros, enquanto que para o meio DG18 foram seis gêneros. O meio DG18 também apresentou um número maior de espécies identificadas exclusivamente neste meio (9) enquanto para DRBC e SDA foram

três e quatro, respectivamente. Comportamento semelhante foi observado quando analisado o medicamento cuja droga vegetal foi a alcachofra. No meio DG18 foram isolados 14 espécies com cinco espécies isoladas unicamente neste meio e para os meios DRBC e SDA foram isolados 12 espécies para cada meio com sete e quatro espécies isoladas unicamente em cada meio, respectivamente. Resultados semelhantes foram obtidos por Askun *et al.* (2007) ao analisarem passas quanto a enumeração de fungos utilizando os meios de cultura DG18 e Rosa de Bengala Cloranfenicol (RBC), verificaram que 53 espécies pertencentes a seis gêneros foram isolados do meio DG18, enquanto que 74 espécies pertencentes a 12 gêneros foram isolados de meio de cultura Rosa Bengala Cloranfenicol. Trinta e nove espécies foram identificadas somente em DG18 e 35 isoladas de RBC, demonstrando que a diferença, quanto a diversidade, favorece também ao meio DG18.

Quando confrontado os três meios de cultura utilizados para o isolamento dos fungos, estes achados também foram demonstrados por Hocking e Pitt (1980) ao compararem os meios DG18, DRBC e MSA (ágar Malte Sal segundo Christensen) para isolamento de fungos que crescem em meio com baixa atividade de água (xerotolerantes). No presente estudo, *Wallemia sebi*, entretanto, foi isolada do meio DRBC e não do meio DG18, mais adequado para fungos xerofílicos.

Os principais fungos produtores de toxinas são capazes de crescer em substrato com 13% a 18% de umidade, temperatura ótima entre 29°C e 35°C e atividade de água mínima de $A_w = 0,80$. Esta atividade de água, quando observada em grãos de milho, corresponde a 16% de umidade (Moss, 1991 *apud* Baptista *et al.*, 2004, p. 3; Pereira *et al.*, 2002). Relacionando a capacidade de produção de micotoxina com a umidade do substrato, neste estudo, foram encontradas espécies produtoras de micotoxinas onde a umidade dos medicamentos se encontravam na faixa de quatro e 12%, diferindo dos dados da literatura citada anteriormente.

A incapacidade de produzir toxina de algumas culturas tem sido relacionada a fatores genéticos, bem como a natureza do substrato utilizado para detecção da micotoxina (Abarca *et al.*, 1988; Lin; Dianese, 1976; Mogensen *et al.*, 2009; Romo; Fernandez, 1986). Foi observado, neste estudo que para os medicamentos à base de castanha-da-índia foram detectados 39 (46,42%) isolados toxigênicos entre os 84 isolados pertencentes a espécies consideradas toxigênicas pela literatura (Miller; Trenholm, 1994; Samson; Frisvad, 2004); enquanto que para os medicamentos à base de alcachofra foram detectados 32 (69,56%)

isolados toxigênicos entre os 46 isolados de espécies consideradas toxigênicas pela literatura. Embora o número de fungos filamentosos obtido dos medicamentos à base de castanha-da-índia tenha sido maior que o dos medicamentos à base de alcachofra, este último apresentou maior percentual de espécies toxigênicas, confirmando ser um substrato favorável à presença de fungos toxigênicos, como também demonstrado por Bugno (2006).

Espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* predominaram como contaminantes nas amostras de medicamentos fitoterápicos estudados, as quais são relatadas como dominantes em plantas medicinais armazenadas. A maioria das espécies fúngicas identificadas como *Aspergillus* e *Penicillium* são referidas como produtoras de micotoxinas como aflatoxinas, ocratoxinas e citrininas (Aziz *et al.*, 1998; Bugno *et al.*, 2006, Hitokoto *et al.*, 1978). Dentro do gênero *Aspergillus*, a principal classe de micotoxina, são as aflatoxinas. As culturas mais afetadas são milho, algodão, amendoim e certas nozes (Abou-Arab *et al.*, 1999; Abou-Donia, 2008; Aziz *et al.*, 1998; Bugno, 2006; Hitokoto *et al.*, 1978; Sánchez *et al.*, 2006; Singh *et al.*, 2008). As ocratoxinas constituem metabólitos secundários produzidos por *Aspergillus* e *Penicillium*, capazes de contaminar uma ampla variedade de drogas vegetais. *Aspergillus ochraceus* e *P. verrucosum* constituem as principais espécies toxigênicas (Batista *et al.*, 2003).

Em cápsulas de castanha-da-índia (Fabricante 3), foram encontradas espécies produtoras de micotoxinas como *A. carbonarius* principal fonte de ocratoxina A em grãos, devido a secagem inadequada dos mesmos (Abarca *et al.*, 2000; Taniwaki *et al.*, 2003). Como também *Neosartorya fischeri*, apesar dos isolados não terem sido produtores, é citada como uma espécie produtora de fumitremorgens A e C e verruculogen (Nielsen *et al.*, 1988). Embora estes compostos sejam altamente tóxicos, é improvável que tenha significado prático, visto que raramente foi reportado como contaminante apesar dos seus ascósporos serem termorresistentes.

Aspergillus niger geralmente é considerado como um fungo benigno, apesar de produzir micotoxinas. Alguns isolados do *A. niger* podem produzir fumonisinas B₂ (Frisvad *et al.*, 2007a) e ocratoxina A. Esta espécie quando presente, supõe-se um risco inesperado para a saúde humana, devido a provável carcinogenicidade destas toxinas, segundo *International Agency for Research on Cancer – IARC*. (Abarca *et al.*, 1994; IARC, 1993; 2002; Frisvad *et al.*, 2007a; Kosalec *et al.*, 2009). Houve predomínio desta espécie, em cápsulas à base de castanha-da-índia para o Fabricante 5, com 12 isolados dos quais, seis (50%) foram micotoxigênicos.

Aspergillus fumigatus, é o principal agente de aspergilose invasiva e alérgica em indivíduos imunocomprometidos (Souza, 2006) como também em pacientes imunocompetentes (Pianetti Filho *et al.*, 2005). Esta espécie produz gliotoxina, responsável pela invasão nos pulmões (Kamei; Watanabe, 2005), foi encontrado apenas um isolado micotoxigênico em cápsulas a base de castanha da índia para Fabricante 5. Portanto, a ingestão de medicamento fitoterápico contendo esta espécie é um risco potencial para a saúde humana.

A presença de *A. flavus* nas amostras analisadas também deve ser ponderada, uma vez que este fungo inicialmente coloniza o substrato e o predispõe a produção de aflatoxinas B₁ e B₂ (Magan *et al.*, 2004; Paterson; Lima, 2010). As aflatoxinas são metabólitos altamente tóxicos, mutagênicos, cancerígenos e teratogênicos produzidos principalmente por *A. flavus* e têm sido envolvidos como agentes de carcinomas hepáticos e extra-hepático humanos (Shephard, 2008). Alguns relatos demonstram a presença de contaminação por aflatoxina em plantas medicinais (Abdullah *et al.*, 2009; Bugno *et al.*, 2006; Roy; Chourasia, 1989; 1990; Chourasia, 1995), contaminação com micotoxinas de algumas drogas vegetais utilizados em pacientes renais (Kumar; Roy, 1994) e demonstrado como um dos achados mais frequentes em drogas medicinais (Rizzo *et al.*, 2004). Neste estudo foram encontradas 50% de cepas toxigênicas, principalmente em cápsulas de castanha-da-índia, Fabricante 5 com três isolados; e em comprimidos (Fabricantes 11 e 12), e uma solução oral (Fabricante 10) todos com um isolado.

O isolamento de espécies potencialmente toxigênicas de *Penicillium citrinum* também é motivo de grande preocupação, devido aos efeitos micotóxicos de seus metabólitos secundários. Esta espécie é hemofílica conhecida por produzir citrinina, uma toxina renal relatada por causar efeitos teratogênicos em ratos (Singh *et al.*, 2008).

Outras espécies encontradas neste estudo podem causar doenças em hospedeiro imunocompetentes como *Wallemia sebi*, (Guarro *et al.*, 2008). De Hoog *et al.*, (2000) citam como espécies oportunistas: *Aspergillus sydowii*, *A. niger*, *A. ochraceus*, *A. tamarii*, *Emericella* spp., *Eurotium amstelodami*, *E. chevalieri*, *E. repens* e *P. aurantiogriseum*, *P. brevicompactum*, *P. citrinum* e *P. janthinellum*.

Cerca de 90% dos fungos isolados dos medicamentos fitoterápicos analisados corresponderam a gêneros de importância micotoxicológica (*Aspergillus* e *Penicillium*).

Espécies de *Aspergillus*, *Emericella*, *Eurotium* e *Penicillium* comprovaram a capacidade em produzir micotoxinas evidenciando a necessidade de monitoramento mais adequado na verificação da qualidade microbiológica destes medicamentos.

Considerando a crescente demanda por produtos naturais, bem como a importância da garantia da segurança do uso destes medicamentos, sugere-se alterações nas especificações da Farmacopeia Brasileira. Diante dos resultados obtidos na presente pesquisa, é sugerida a inclusão no item “Limite Microbiano de produtos não estéreis – Pesquisa de patógenos”, a ausência nos produtos de origem vegetal e nas suas preparações de uso oral, das espécies toxigênicas: *Aspergillus awamorii*, *A. carbonarius*, *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. ochraceus*, *A. penicilloides*, *A. sydowii*, *Emericella variecolor*, *Eurotium amstelodami*, *E. chevalieri*, *E. repens*, *E. rubrum*, *Penicillium aurantiogriseum*, *P. citreonigrum*, *P. citrinum*, *P. corylophilum*, *P. fellutanum*, *P. solitum*, *P. waksmanii*, devido a potencial capacidade de produzirem micotoxinas.

Agradecimentos: agradecemos a Financiadora de Recursos e Projetos (FINEP), a Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) e a Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) pelo apoio a esta pesquisa.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os medicamentos fitoterápicos industrializados analisados estão disponíveis em farmácias e drogarias no mercado nacional apesar de 22% não atenderem as especificações da Farmacopeia Brasileira quanto a contaminação por fungos.

Dentre as formas farmacêuticas sólidas as cápsulas se mostraram mais contaminadas com carga fúngica, independente da droga vegetal.

Os dados analíticos dos medicamentos amostrados, sob o ponto de vista sanitário, indicam que não há controle de qualidade para determinados fabricantes, o que pode sugerir um problema pontual.

O meio ágar Sabouraud Dextrose recomendado pela Farmacopeia Brasileira 5 ed. mostrou-se menos eficaz no isolamento de fungos para forma farmacêutica sólida. Conforme este estudo, este meio demonstrou ser inadequado para o crescimento de fungos xerofílicos os quais frequentes nas formas sólidas.

Considerando que, o meio de cultura ágar Dicloran Glicerol 18% propiciou maior número de UFC, este meio pode ser recomendado para a avaliação quantitativa e isolamento de fungos filamentosos em medicamentos na forma sólida (cápsulas e comprimidos).

Em medicamentos fitoterápicos à base de castanha-da-índia e alcachofra estão presentes fungos pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Eurotium*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Emericella*, *Neosartorya*, *Tritirachium* e *Wallemia*; sendo espécies de *Penicillium*, *Aspergillus*, *Eurotium* e *Emericella*, potencialmente capazes de produzir micotoxinas. A ocorrência desses fungos não implica, necessariamente, que estejam contaminados com micotoxinas. Mas, o armazenamento prolongado desses medicamentos a temperatura acima de 28°C, característica da região onde o estudo foi realizado, principalmente para forma farmacêutica (comprimido e cápsula), medicamentos com baixa atividade de água, favoreceram a presença de espécies xerofílicas e micotoxigênicas, como demonstrado neste estudo.

Para ensaios de controle de qualidade microbiológico de medicamentos fitoterápicos, a presença de fluorescência no meio ágar Coco é um indicio de cepas produtoras de micotoxinas. Este meio pode ser usado como prova positiva para aflatoxina, se *Aspergillus flavus* ou *A. parasiticus* ou presuntiva para outros gêneros, para os quais devem ser comprovadas com provas adicionais.

Diante disto, os resultados das análises micológicas indicam que os limites para fungos, ora sugeridos pela Farmacopeia Brasileira, podem ser alterados para menos, uma vez que em cerca de 80% dos produtos analisados apresentaram biocarga de fungos $\leq 2 \times 10^1$ UFC/g ou mL. Por outro lado, observa-se a necessidade de inclusão de teste para detectar fungos produtores de micotoxinas bem como, teste de presença e ausência de micotoxina em medicamentos fitoterápicos.

REFERENCIAS

- Abarca, M.L., Bragulat, M.R., Cabañes, F.J. 1988. Comparasion of some screening methods for aflatoxigenic moulds. *Mycophatologia* 104: 75-79.
- Abarca, M.L., Bragulat, G., Cabanes, F.J. 1994. Ochratoxin A production by strains of *Aspergillus flavus* var. *niger*. *Applied and Environmental Microbiology* 60: 2650–2652.
- Abarca, M.L., Bragulat, M.R., Castellá, G., Accensi, F., Cabañes, F.J. 2000. Hongos productores de micotoxinas emergentes. *Revista Iberoamericana de Micologia* 17: S63-S68.
- Abbas, H.K, Shier, W.T., Horn, B.W., Weaver, M.A. 2004. Cultural methods for aflatoxin detection. *Journal of Toxicology* 23(2-3): 295-315. Disponível em: <<http://www.ars.usda.gov/SP2UserFiles/Place/64022000/Publications/Weaver/Abbasetal04JT23295-315.pdf>> - 2008-11-13>. Acesso em: 25 June 2011.
- Abdullah, S.K., Al-Myryane, M.S., Al-Saadoon, A.H. 2009. Mycobiota and incidence of aflatoxigenic *Aspergillus* section *Flavi* in three medicinal plants in Iraq. *Journal Duhok University* 12(1): 262-267. (Special Issue).
- Abou-Arab, A.A., Soliman, K.M., El-Tantawy, M.E., Ismail, B.R., Naguib, K. 1999. Quantity estimation of some contaminants in commonly used medicinal plants in Egyptian Market. *Food Chemistry* 67: 357-36.
- Abou-Donia, M.A. 2008. Microbiological quality and aflatoxigeniss of Egptian spices and medicinal plants. *Global Veterinaria* 2: 175-181.
- Abu-Irmaileh, B.E., Afifi, F.U. 2003. Herbal medicine in Jordan with special emphasis on commonly used herbs. *Journal Ethnopharmacology* 89: 193-197.
- Adeleye, I.A., Okogi, G., Ojo, E.O. 2005. Microbial Contamination of herbal preparations in Lagos, Nigeria. *Journal Health Population and Nutrition* 23(3): 296-297.
- Alexander, R.G., Wilson, D.A. Davidson, A.G., 1997. Medicines control agency investigation of the microbial quality of herbal products. *The Pharmaceutical Journal* 259: 259-262.
- Alexandre, R.F., Garcia, F.N., Simões, C.M.O. 2005. Fitoterapia baseada em evidências. Parte 2. Medicamentos elaborados com Alcachofra, Castanha-da-Índia, Ginseng e Maracujá. *Acta Farmacêutica Bonarerense* 24(2): 310-314.
- Almança, C. C. J., Carvalho, J. C. T. 2003. *Formulário de prescrição fitoterápica*. São Paulo, Atheneu.
- Ansel, H.C., Popovich, N.G., Allen Jr, L.V. 2000. *Formas Farmacêuticas e Sistema de Liberação de fármacos*. São Paulo, Editorial Premier.
- Anyanwu, C.U. 2010. Fungal contaminants of powdered herbal drugs sold in parts of Enugu States, Southeast, Nigeria. *Plant Product Research Journal* 14: 46-50. Disponível em: <<http://www.ajol.info/index.php/pprj/article/view/70031>>. Acesso em: 10 Dez. 2011.
- Aquino, Simone. **Avaliação da microbiota fúngica e da presença de micotoxinas em amostras de plantas medicinais irradiadas adquiridas no comércio varejista e atacadista**, 2007. 98f. Tese (Doutorado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear – Aplicação) – Instituto de Pesquisa Energética e Nucleares, São Paulo. 2007.

- Araújo, A., Ohara, M.T. 2000. Qualidade microbiológica de drogas vegetais comercializadas em feira de São Paulo e de infusos derivados. *Revista Brasileira Ciências Farmacêuticas* 36: 129-137.
- Askun, T., Eltem, R., Taskin, E. 2007. Comparison of Rose-Bengal Chloramphenicol agar and Dichloran Glycerol agar (DG18) for enumeration and isolation of moulds from Raisins. *Journal of Applied Biological Sciences* 1(2): 71-75.
- Atanda, O.O., Akpan, I., Rati, E.R., Ozoje, M. 2005. Palm Kernel: a potential substrate for rapid detection of aflatoxigenic fungi. *Food Science and Technology International* 11(1): 67-74. Disponível em: < <http://fst.sagepub.com>>. Acesso em: 4 maio 2010.
- Aziz, N.H., Youssef, A. Y., El-Fouly, M.Z., Moussa, L.A. 1997. Contamination of some common medicinal plant samples and spices by fungi and their mycotoxins. *Botanical Bulletin Academia Sinica*. 39: 279-285.
- Bandaranayake, W.M. 2006. Quality Control, Screening, Toxicity, and Regulation of Herbal Drugs. In: Ahmad, F. A., Owais, M. (eds.) *Modern Phytomedicine. Turning Medicinal Plants into Drugs*. pp. 22-57. Disponível em: < <http://faculty.ksu.edu.sa/23494/Documents/...>> Acesso em: 10 Apr. 2011.
- Baptista, A.S., Horii, J., Baptista, A.S. Fatores físico-químicos e biológicos ligados à produção de micotoxinas. 2004. *Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos* 22(1): 1-14.
- Bara, M.T.F., Ribeiro, P.A.M., Arantes, M.C.B., Amorim, L.L.S.S., Paula, J.R. 2006. Determinação do teor de princípios ativos em matérias-primas vegetais. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 16(2): 211-215.
- Batista, L.R., Chalfoun, S.M., Prado, G., Schwan, R., Wheals, A.E. 2003. Toxigenic fungi associated with processed (green) coffee beans (*Coffea arabica* L.). *International Journal of Food Microbiology* 85(3): 293-300. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com>>. Acesso em: 01 Nov. 2011.
- Bennett, J.W., Klich, M. 2003. Mycotoxins. *Clinical Microbiology Review* 16(3):497-516. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC164220/>>. Acesso em: 10 Fev. 2009.
- Bent, S., Ko, R. 2004. Commonly used herbal medicines in the United States: a review. *American Journal of Medicine* 116: 478-485.
- Brasil. 1967. Serviço de Fiscalização da Medicina e Farmácia. Portaria 22 de 30 de outubro de 1967. Estabelece as normas para o emprego de preparações fitoterápicas. *Diário Oficial [da] União*, Brasília, DF. Brasília, 16 nov. 1967.
- _____. 1995. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria 06 de 31 de janeiro de 1995. Institui e normatiza o regulamento de produtos fitoterápicos junto à Secretaria de Vigilância Sanitária. *Diário Oficial [da] União*, Brasília, DF. Brasília, 01 fev. 1995.
- _____. 2000. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC 17 de 24 de fevereiro de 2000. Aprova o regulamento técnico de medicamentos fitoterápicos junto ao Sistema de Vigilância Sanitária. *Diário Oficial [da] União*, Brasília, DF. Brasília, 25 fev. 2000.
- _____. **2002. Resolução RDC nº 274, de 15 de outubro de 2002.** Art. 1º “Aprova o Regulamento Técnico Sobre Limites Máximos de Aflatoxinas Admissíveis no Leite, no

Amendoim, no Milho”, constante do Anexo desta Resolução. *Diário Oficial [da] União*. Brasília, DF, 16 out. 2002. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2002/274_02rdc.htm>. Acesso em: 07 mar. 2010.

_____. 2002a. Ministério da Saúde. Portaria Nº 254, de 31 janeiro de 2002. Aprova a política nacional de atenção à saúde dos povos indígenas. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 06 fev.2000. Seção 1. p. 46-49. Disponível em:<bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/politica_saude_indigena.pdf>. Acesso em: 25 mar. 2010.

_____. 2004. Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 48, de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*. Brasília, DF, 18 mar. 2004. Seção 1. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2004/48rdc.htm>>. Acesso em: 04 abr. 2010.

_____. 2004a. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução -RE Nº 88 de 16 de março de 2004, determina a publicação da “Lista de referências bibliográficas para avaliação de segurança e eficácia de fitoterápicos”. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/registro/legis.htm>>. Acesso em: 28 jul. 2010.

_____. 2004b. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RE Nº 89 de 16 de março de 2004, determina a publicação de “Lista de registro simplificado de fitoterápicos”. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/registro/legis.htm>>. Acesso em: 28 jul. 2010.

_____. 2004c. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RE Nº 90 de 16 de março de 2004, determina a publicação do “Guia para realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos”. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/registro/legis.htm>>. Acesso em: 28 jul. 2010.

_____. 2004d. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução -RE Nº 91 de 16 de março de 2004, determina a publicação do “Guia para realização se alterações, inclusões, notificações e cancelamento pós registro de fitoterápicos”. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/registro/legis.htm>>. Acesso em: 28 jul. 2010.

_____. 2006. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria Nº 971, de 3 de maio de 2006, aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde. *Diário Oficial [da] União*, Brasília, Nº 48, 4 de maio de 2006.

_____. 2006a. Decreto no 5.813, de 22 de junho de 2006. Presidência da República Casa Civil Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá outras providências. *Diário Oficial [da] União*, Brasília, DF, 23 jun. 2006. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2004-2006/2006/decreto/D5813.htm>. Acesso em: 25 mar. 2011.

_____. 2006b. Ministério da Saúde. Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Brasília, DF, <bvsms.saude.gov.br/bvs/.../politica_nacional_fitoterapicos.pdf>. Acesso em: 07 mar. 2010.

_____. 2006c. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. A fitoterapia no SUS e o Programa de Pesquisa de Plantas Medicinais da Central de Medicamentos / Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de

- Assistência Farmacêutica. – Brasília: Ministério da Saúde, 2006.
- _____. 2007. Anvisa. *Regulamento Técnico sobre Boas Práticas de Manipulação de Preparações Magistrais e Oficiais para Uso Humano em Farmácias e seus Anexos*. Resolução de Diretoria Colegiada nº 67, de 8 de outubro de 2007. Disponível em: <www.anvisa.gov.br/legis/resol/2007/rdc/67_rdc_anexo_pdf> Acesso em: 25 abril 2011.
- _____. 2010. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2010. Res. nº 14, de 31 de março de 2010. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. *Diário Oficial [da] União*, Brasília, DF, 05 abr. 2010. Seção 1, p. 85-87.
- _____. 2010a. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução Normativa Nº 5, de 31 de março de 2010. Estabelece a “Lista de Referências Bibliográficas para avaliação de segurança e eficácia de medicamentos fitoterápicos”. *Diário Oficial [da] União*, Brasília, DF, Nº 63, 5 de abril de 2010.
- _____. 2010b. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Res. 17, de 16 de abril de 2010. Dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos. *Diário Oficial [da] União*, Brasília, DF, 07 jan. 2010. Seção 1, p. 94-110
- _____. 2010c. Farmacopeia Brasileira, 5ª ed., volume 1 / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2010. 524 p., 1v/il. DOU Nº 224, 24 de novembro de 2010. (CD-ROM)
- _____. 2011. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Res. Nº 7, de 18 de fev. de 2011. *Dispõe sobre os limites máximos tolerados (LTM) de micotoxinas em alimentos*. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/saudelegis/anvisa/2011/res0007_18.../>. Acesso em: 09 maio 2011.
- Bragulat, M.R., Abarca, M.L., Cabañes, F.T. 2001. An easy screening methods for fungi producing ochratoxin A in pure culture. *International Journal of Food Microbiology* 71: 139-144.
- Bugno, A., Almadovar, A.A.B., Pereira, T.C., Pinto, T.J.A., Sabino, M. 2006. Occurrence of toxigenic fungi in herbal drugs. *Brazilian Journal of Microbiology* 37: 47-51.
- Bugno, A., Buzzo, A.A., Nakamura, C.T. Matos, T.C.P.D., Pinto, T.J.A. 2005. Avaliação da contaminação microbiana em drogas vegetais. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas* 41(4): 491-497.
- Calixto, J. B. 2000. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 33: 179-189.
- Calvo, A.M., Wilson, R.A., Bok, J.W., Keller, N.P. 2002. Relationship between secondary metabolism and fungal development. *Microbiology Molecular Biology Reviews* 66(3): 447-459.
- Campeato, Viviane Ribeiro. **Uso de Plantas Medicinais Durante a Gravidez e Risco para Malformações Congênitas**. 2005. 138f. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Biociências Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/10183/7354>>. Acesso em: 10 maio 2011.
- Carmichael, J.W. 1980. *Genera of Hyphomycetes*. Alberta, University of Alberta Press.

- Carvalho, Ana Cecília Bezerra. 2011. **Plantas medicinais e Fitoterápicos: regulamentação sanitária e proposta de modelo de monografia para espécies vegetais oficializadas no Brasil**. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) - Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília. Brasília, DF, 2011. Disponível em: <repositorio.bce.unb.br/.../1/2011_AnaCecíliaBezerraCarvalho.pdf>. Acesso em 26 dez. 2011.
- Carvalho, A.C.B., Balbino, E.E., Maciel, A., Perfeito, J.P.S. 2008. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 18(2): 314-319.
- Carvalho, A.C.B., Perfeito, J.P.S., Silva, L.V.C., Ramalho, L.S., Marques, R.F.O., Silveira, D. 2010. New Brazilian rules for herbal medicines. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 9(3): 238-241. Disponível em: <<http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp/?iCve=85615232013>>. Acesso em: 27 Mar. 2011.
- Carvalho, C.M.G., Prudente, L.R. Pereira, A.C., Paula, J.R., Bara, M.T.T.M. 2006. Avaliação da qualidade de extratos vegetais. *Revista Eletrônica de Farmácia* 3(20): 53-62. Disponível em: <www.revistas.ufg.br/index.php/REF/article/ViewFile/2076/2018>. Acesso em: 12 jan. 2011.
- Cary, J.W., Klich, M.A., Beltz, S.B. 2005. Characterization of aflatoxin-producing fungi outside of *Aspergillus* section *Flavi*. *Mycologia* 97(2): 425-432. Disponível em: <<http://mycologia.org/...>>. Acesso em: 05 May 2011.
- Chan, K. 2003. Some aspects of toxic contaminants in herbal medicines. *Chemosphere* 52: 1361-1371. Disponível em: <<http://wlv.openrepository.com>>. Acesso em: 07 Jan. 2011.
- Chourasia, H.K. 1995. Mycobiota and mycotoxins in herbal drugs of Indian pharmaceutical industries. *Mycological Research* 99(6): 697-703.
- Chourasia, H.K., Roy, 1991. A. Effect of temperature relative humidity and light on aflatoxin B1 in Neen and Datura seed. *International Journal Pharmacognosy* 29: 197-202.
- Copetti, Marina Venturini. **Avaliação micológica de rações comerciais para cães e gatos e potencial micotoxinogênico de espécies selecionadas**. 2005. 68f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS.
- Cutuli, M.T., Cuellar, A., Camara, J.M., Mateos, A., Suarez, G. 1991. Different media and methodologies for the detection of aflatoxin production by *Aspergillus flavus* strain isolated from trout feed. *Mycopathologia* 113:121-125.
- Czech, E., Kneifel, W., Kopp, B. 2001. Microbiological status of commercially available medicinal herbal drug – screening study. *Planta Medica* 67: 263-269.
- Davis, N.D., Iyer, S.K., Diener, U.L. 1987. Improved Method of screening for aflatoxin with a coconut agar medium. *Applied and Environmental Microbiology* 53(7): 1593-1595.
- De Hoog, G.S., Guarro, J., Gené, J., Figueras, M.J. 2000. *Atlas of Clinical Fungi*. 2nd edition. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht.

- De Smet, P.A.G.M., Keller, K. H., Chandler, R.F. 1992. *Adverse Effects of Herbal Drugs*, Vol. 1. Springer-Verlag, Heidelberg.
- Domsch, K.H., Gams, W., Anderson, T.H. 2007. *Compendium of soil fungi*. v.1. San Francisco: Academic Press.
- Eizendeher, Leonir Bittencourt. 2005. **Comparação de métodos cromatográficos por camada delgada e líquida com kits imunológicos para detecção de aflatoxinas em amendoim in natura e doce de amendoim**. 88f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR. 2005.
- Ellis, M.B. 1971. *Dematiaceus Hyphomycetes*. Kew: Commonwealth Mycology Institute.
- European Medicines Agency Science Medicine Health. 2010. *Evaluation of Medicines for Human Use*. Assessment report on *Cynara scolymus* L., folium. 25 November 2010 EMA/HMPC/150209/2009 Committee on Herbal Medicinal Products. Disponível em: <www.ema.europa.eu/ema/pages/includes/document/open_document.jsp?webContentId=WC500100935>. Acesso em: 23 Nov. 2011.
- _____. 2009. Assessment report on *Aesculus hippocastanum* L. semen. Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC). London, 16 July 2009 Doc. Ref.: EMEA/HMPC/225304/2008. Disponível em: <http://www.ema.europa.eu/.../open_document.jsp?web...>. Acesso em: 23 Nov. 2011
- Enayatifard, R., Asgarirad, H., Kazemi-sani, B. 2010. Microbial quality of some herbal solid dosage forms. *African Journal of Biotechnology* 9(11): 1701-1705. Disponível em: < <http://www.academicjournals.org/AJB>>. Acesso em: 07 Jan. 2011.
- Farmacopeia Brasileira. 1988. Parte I. 4 ed. São Paulo, Atheneu,
- Farmacopéia Brasileira. 1977. 3ª edição. São Paulo, Organização Andrei.
- Farmacopéia dos Estados Unidos do Brasil. 1959. 2ª ed. São Paulo, Siqueira.
- Fente, C.A., Ordaz, J.J., Vázquez, B.I., Franco, C.M., Cepeda, A. 2001. New additive for culture media for rapid identification of aflatoxin-producing *Aspergillus* strains. *Applied and Environmental Microbiology* 67(10): 4858-4862.
- Fennel, C.W., Lihht, M.E., Sparg, S.G, Stafford G.I, van Staden, J. 2004. Assessing African medicinal plants for efficacy and safety: agricultural and storage practices. *Journal Ethnopharmacology* 95(2-3): 113-121.
- Ferreira, L.A., Leite, J.P.V. 2009. Desenvolvimento de Formulações Fitoterápicas. In: Leite, J.P.V. (Ed.). *Fitoterapia: bases científicas e tecnológicas*. São Paulo, Editora Atheneu, p. 205-251
- Feltrow, C.W., Avila, J.R. 2000. *Manual de Medicina Alternativa*. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan.
- Filtborg, O., Frisvad, J.C., Svendsen, J. 1983. Simple screening method for molds producing intracellular mycotoxins in pure cultures. *Applied and Environmental Microbiology* 45(2): 581-585.
- Filtborg, O., Frisvad, J.C., Thrane, U., Lund, F. 1996. Screening methods for secondary metabolites produced by fungi in pure culture. Cap 6. In: Samson, R.A., Hoekstra, E.S.,

- Frisvad, J.C., Filtenborg, O. (Eds.) *Introduction to food-borne fungi*. Baarn/Delft, CBS, p. 270-274.
- Fischer, Dominique Corinne Hermine. **Contaminação microbiana em medicamentos fitoterápicos sob a forma sólida**. Universidade de São Paulo. 1992. 161f. Dissertação (Mestrado em Produção e Controle Farmacêutico) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, SP, 1992. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9139/tde-1-72008-152345/>>. Acesso em: 15 dez. 2008.
- Fischer, D.C.H., Ohara, M.T., Saito, T. 1996. Padrão microbiano em medicamentos não estéreis de uso oral: enquadramento de produtos fitoterápicos. *Revista Brasileira Farmacognosia* 5(1): 29-55.
- Foglio, M.A., Queiroga, C.L, Sousa, I.M.O., Rodrigues R.A.F. 2006. Plantas Medicinais como Fonte de Recursos Terapêuticos: um modelo multidisciplinar. *Construindo a História dos Produtos Naturais*. Disponível em: <http://www.multiciencia.unicamp.br/art_04_7.htm> . Acesso em: 18 Sept. 2010.
- Freire, F.C.O., Vieira, I.G.P., Guedes, M.I.F., Mendes, F.N.P. 2008. Micotoxinas: importância na alimentação e na saúde humana e animal. *Empraba Agroindústria Tropical*. Disponível em: <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc/427374>> Acesso em: 23 maio 2010.
- Frisvad, J.C., Larsen, T.O., de Vries, R., Meijer, M., Houbraken, J., Cabañes, F.J., Ehrlich, K., Samson, R.A. 2007. Secondary metabolite profiling, growth profiles and other tools for species recognition and importante *Aspergillus* mycotoxins. *Studies in Mycology* 59: 31-37. Disponível em: < www.studiesinmycology.org>. Acesso em: 14 July 2009.
- Frisvad, J.C., Smedsgaard, J., Samson, R.A., Larsen, T.O., Thrane, U. 2007a. Fumonisin B₂ production by *Aspergillus niger*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 9727-9732.
- Frisvad, J.C., Samson, R.A., Smedsgaard, J. 2004. *Emericella astellata*, a new producer of aflatoxin B₁, B₂ and sterigmatocystin. *Letters in Applied Microbiology* 38: 440-445.
- Frisvad, J.C., Samson, R.A. 2004a. *Emericella venezuelensis*, a new species with stellate ascospores producing sterigmatocystin and aflatoxin B₁. *Systematic and Applied Microbiology* 27: 672-680. Disponível em: < <http://www.elsevier.de/syapm>>. Acesso em: 05 Nov. 2011.
- Furlaneto, L., Marins, V.D., Endo, Rosane. 2004. Qualidade microbiológica de drogas vegetais comercializadas nas ruas da cidade de Londrina/PR e de seus infusos. *Saúde Revista* 5(10): 49-52. Disponível em: <www.unimep.br/phpg/.../saude10art07.pdf>. Acesso em: 10 abr. 2011.
- Guarro, J., Gugnani, H.C., Sood, N., Batra, R., Mayayo, E., Gené, J., Kakkar, S. 2008. Subcutaneous phaeohyphomycosis caused by *Wallemia sebi* in an immunocompetent host. *Journal of Clinical Microbiology* 46(3): 1129-1131.
- Halt, M. 1998. Moulds and mycotoxins in herb tea and medicinal plants. *European Journal of Epidemiology* 14: 269-274.
- Hitokoto, H., Morozumi, S., Wauke, T., Sakai, S., Kurata, H. 1978. Fungal contamination and mycotoxin detection of powdered herbal drugs. *Applied and Environmental Microbiology* 36(2): 252-256.

- Hocking, A.D., Pitt, J.I. 1980. Dichloran-glycerol medium for enumeration of xerophilic fungi from low-moisture foods. *Applied Environmental Microbiology* 39(3): 959-964.
- Índice terapêutico fitoterápico: ITF- 2008. Rio de Janeiro. Ed. Petrópolis, RJ: EPUB
- International Agency for Research on Cancer. 2002. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*. v. 82 (2002) Some Traditional Herbal Medicines, Some Mycotoxins, Naphthalene and Styrene. Disponível em: <<http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol82/index.php>>. Acesso em: 01 Aug. 2011
- _____. 1993. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*. v. 56. Some Naturally Occurring Substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins. Disponível em: <<http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol56/index.php>>. Acesso em: 01 Aug. 2011.
- Ito, Y., Peterson, S.W., Wicklow, D., Goto, D. 2001. *Aspergillus pseudotamarii*, a new aflatoxin producing species in *Aspergillus* section *Flavi*. *Mycology Research* 105(2): 233-239. Disponível em: < <http://www.aspergillus.org.uk>>. Acesso em: 05 de maio 2011.
- Kamei, K., Watanabe, A. 2005. *Aspergillus* mycotoxins and their effect on the host. *Medical Mycology Supplement* 43(Suppl 1): S05-S99.
- Khan, S.N., Riaz, T., Hannan, A., Mukhtar, I. 2006. Fungal contamination of medicinal herbs during commercial storage in Punjab. *Mycopathologia* 4(10): 21-25.
- King, A.D., Hocking, A.D., Pitt, J.I. 1979. Dichloran rose Bengal medium for enumeration and isolation of molds from foods. *Applied Environmental Microbiology* 37: 488-492.
- Klich, M. A. 2007. Environmental and developmental factors influencing aflatoxin production by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Mycoscience* 48: 71-80.
- Kneifel, W., Czech, E., Kopp, B. 2002. Microbial contamination of medicinal plants: a review. *Planta Medica* 68(1): 5-15.
- Korokolvas, A. 1996. A riqueza potencial de nossa flora. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 5(1): 1-7. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbfar/...>>. Acesso em: 23 maio 2011.
- Kosalec, I., Cvek, J., Tomic, S. 2009. Contaminants of medicinal herbs and herbal products. *Arh Hig Rada Toksikol* 60: 485-501. Disponível em: <<http://hrck.srce.hr>>. Acesso em: 07 Jan. 2011.
- Kumar, S., Roy, A.K. 1994. Mycotoxin contamination of some kidney curative herbal drugs. *Journal Indian Botanical Society* 73: 341-342.
- Kulkarni, C., Deshpande, A., More, S. 2010. Assessment of microbial contamination in commercial herbal oral medicinal liquids. *International Journal of Pharma Research and Development* - online. Disponível em: <<http://www.ijprd.com>>. Acesso em: 19 Jan. 2011.
- Lazaretti, K.E.S., Beux, M.R., Pimentel, I.C., Talamini, A., Gabardo, J. 2000. Comparação entre os meios de cultura para contagem de fungos no controle microbiológico de erva-mate. *Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos* 18(2): 163-170.

- Leite, J.P.V. Desenvolvimento da Fitoterapia. In: _____, (Ed.). *Fitoterapia: bases científicas e tecnológicas*. São Paulo: Editora Atheneu, 2009. p. 3-20.
- Leite, J.P.V. (ed). *Fitoterapia: Bases científicas e tecnológicas*. São Paulo: Editora Atheneu, 2009.
- Lin, M.T., Dianese, J.C. 1976. A coconut-agar medium for rapid detection of aflatoxin production by *Aspergillus* spp. *Phytopathology* 66(12): 1466-1469.
- Lutovsky J., Kedzia, B. 1980. Mycoflora of crude drugs. *Planta Medica* 40(2): 212-217.
- Magan, N., Hope, R., Cairn, V., Aldred, D. 2004. Post-harvest fungal ecology: impact of fungal growth and mycotoxin accumulation in stored grain. *European Journal of Plant Pathology* 109:723-730.
- Martins, E.L.P., Brandão, M.G.L. 2006. Qualidade de amostras comerciais preparadas com *Aesculus hippocastanum* L. (castanha-da-Índia). *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 16(2): 224-229.
- Martins, E.R., Figueiredo, L.S. 2009. Cultivo de Plantas Medicinais. In: Leite, J.P.V. (ed). *Fitoterapia: Bases científicas e tecnológicas*. São Paulo: Editora Atheneu, pp. 144-167.
- Martins, H.M., Martins M.L., Dias, M.I., Bernado, F. 2001. Evaluation of microbiological quality of medicinal plants used in natural infusions. *International Journal of Food Microbiology* 68: 149-53. Disponível em: <<http://www.elsevier.com/locate/ijfoodmicro>>. Acesso em: 23 Nov. 2011.
- Melo, J.G., Martins, J.D.G.R., Amorim, E.L.C., Albuquerque, U.P. 2007. Qualidade de produtos a base de plantas medicinais comercializadas no Brasil: castanha-da-índia (*Aesculus hippocastanum* L), capim-limão (*Cymbopogon citratus* (DC) Stapf) e centela (*Centella asiatica* (L.) Urban). *Acta Botanica Brasilica*. 21(1): 27-36. Online. Disponível em: <_. Acesso em: 16 jul. 2010.
- Moraes, L.F., Navarini, P.A., Benedetti, P.V. 2007. Análise microbiológica de xaropadas fitoterápicas produzidas no município de Francisco Beltrão PR. Disponível em: <http://cacphp.unioste.br/eventos/OLD_mesmo_antigos/semanadabio2007/resumos/M_B_02.pdf>. Acesso em: 28 jul. 2011
- Mogensen, J., Nielsen, K.F., Samson, R.A., Frisvad, J.C., Thrane, U. 2009. Effect of temperature and water activity on the production of fumonisins by *Aspergillus niger* and different *Fusarium* species. *BMC Microbiology* 9: 280. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/471-2180/9/281>>. Acesso em: 08 Mar. 2010.
- Morreira Filho, H. 1972. *Plantas medicinais I*. Curitiba. Imprensa da Universidade Federal do Paraná.
- Miller, J.D., Trenholm, H.L. 1994. *Mycotoxins in Grain*. St. Paul, USA, Eagan Press.
- Netto, E.M., Shuqair, N.S.S.A.Q., Balbino, E.E., Carvalho, A.C.B. 2006. Comentários sobre o registro de fitoterápicos. *Revista Fitos* 1(3): março. Disponível em: <https://www.anvisa.gov.br/.../fitoterapicos/registro_fitoterapicos.pdf>. Acesso em 24 nov. 2011.
- Nielsen, P.V., Beuchat, L.R., Frisvad, J.C. 1988. Growth of and fumitremorgin production by *Neosartorya fischeri* as affected by temperature, light, and water activity. *Applied and Environmental Microbiology* 54(6): 1504-1510. Disponível em: <<http://aem.asm.org>>. Acesso em: 28 Nov. 2010.

- Noldin, V.F., Cechinel Filho, V., Monache, J.C., Benassi, J.C., Christmann, I.L., Pedrosa, R.C., Yunes, R.A. 2003. Composição química e atividades biológicas das folhas de *Cynara scolymus* L. (alcachofra) cultivada no Brasil. *Química Nova* 26(3): 331-334.
- Obuekwe, I.F., Eichie, F. 2006. The presence of microorganisms in some common excipients used in tablets formulation. *Acta Poloniae Pharmaceutica-Drug Research* 63(2): 121-125.
- Ocokoljić, M., Nikić, Z., Medarević, M., Čavlović, D. 2011. Effect of horse chestnut tree genotype on production of fatty oil and fatty acids in seed cotyledons. *African Journal of Biotechnology* 10(10): 1932-1935. Disponível em: <<http://www.academicjournal.org>>. Acesso em: 06 Dec. 2011.
- Okunlola, A., Adewoyin, B.A., Odeku, O.A. 2007. Evaluation of Pharmaceutical and Microbial Qualities of some herbal medicinal products in South Western Nigeria. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 6(1): 661-670.
- Oliveira, Jeniffer Rodrigues. 2011. **Espécies medicinais utilizadas por gestantes atendidas nas unidades de saúde da família da cidade do Recife/PE: uma abordagem etnofarmacológica**. 64f. Dissertação de mestrado. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco.
- Ordaz, J.J., Fente, C.A., Vázquez, B.I., Franco, C.M., Cepeda, A. 2003. Development of a method for direct visual determination of aflatoxin production by colonies of the *Aspergillus flavus* group. *International Journal of Food Microbiology* 83: 219-225. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com>>. Acesso em: 06 Dec. 2011.
- Paterson, R.R.M., Lima, N. 2010. Toxicology of mycotoxins. In: Luch, Andreas (ed.) *Clinical Toxicology. Molecular, Clinical and Environmental Toxicology* Vol. 2. Basel: Birkhäuser Verlag, cop. pp. 31-63 Disponível em: <<https://repositorium.sdum.uminho.pt/handle/1822/10550>>. Acesso em: 10 Apr. 2011.
- Pereira, M.M.G., Tavares, L.S., Carvalho, E.P., Prado, G., 2002. Crescimento e produção de aflatoxinas por *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. *Bolletim do CEPPA* 20(1): 141-146. Disponível em: <<http://ojs.c3sl.ufpr.br/ojs2/>>. Acesso em: 30 jun. 2011.
- Pianetti Filho, G., Pedroso, E.R.P., Gianetti, A.V., Darwich, R. 2005. Aspergilose cerebral em paciente imunocompetente. *Arquivo NeuroPsiquiatria* 63(4): 1094-1098.
- Pildain, M.B., Frisvad, J.C., Vaamond, G., Cabral, D., Varga, J., Samson, R.A. 2008. Two novel aflatoxin-producing *Aspergillus* species from Argentinean peanuts. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58: 725-735.
- Pinto, T.J., A, Kaneko, T.M., Pinto, A.F. 2010. *Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos*. 3ª ed. São Paulo, Atheneu Editora,.
- Pires, A. M., Araujo, P.S. 2011. Percepção de Risco e Conceitos sobre planta medicinais, fitoterápicos e medicamentos alopáticos entre gestantes. *Revista Baiana de Saúde Pública* 35(2): 320-333.
- Pitt, J.I. 1988. *A laboratory guide to commons Penicillium species*. North Ryde: Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization.
- Pitt, J.I., Hocking, A.D. 2009. *Fungi and Food Spoilage*. 3rd edition. London, Springer.

- Pitt, J.I. 2000. Toxigenic fungi and mycotoxins. *British Medical Bolletin* 56(1): 184-192. Disponível em: <<http://bmb.oxfordjournal.org>>. Acesso em: 30 Dec. 2011.
- Prado, G., Andrade, M.C., Oliveira, M.S.O., Leal, A.S., Oliveira, B.R., Batista, L.R. 2009. Efeito da irradiação na microbiota fúngica de plantas medicinais. *Ciências e Agrotecnologia* 33: 1372-1378.
- Prado, G., Leal, A.S., Oliveira, M.S., Moraes, V.A.D., Madeira, J.E.G.C., Vieira, I.F.R., Lima, A.S., Moreira, A.P.A., Andrade, M.C. 2008. Influência da radiação gama (^{60}Co) na ocratoxina A e na microbiota fúngica de café (*Coffea Arabica* L.). *Revista Brasileira de Armazenamento* (10): 42-48.
- Prista, L.V.N., Correia, A.A., Morgado, R.M. 1996. *Tecnologia Farmacêutica*. 4 ed. Lisboa, Fundação Caloust Gulbenkian.
- Raper, K.B., Fenell, D.I. 1977. *The genus Aspergillus*. Malabar: Robert and Krieger.
- Rates, S.M.K. 2001. Promoção do uso racional de fitoterápicos: uma abordagem no ensino de farmacognosia. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 11(2): 57-69.
- Reif, K., Metzger, W. 1995. Determination of aflatoxins in medical herbs and plant extracts. *Journal of Cromatography A* 692: 131-136. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com>>. Acesso em: 04 May 2011.
- Remili, H., Boussard, P., Devleeschouwer, M. 1994. Microbiological quality of spray-dried pharmaceutical plant extracts. *European Journal Pharmaceutical Science* 1: 265-268.
- Ritter, Ana Carolina. **Potencial toxigênico de *Aspergillus flavus* testado em diferentes meios e condições**. Abril, 2007. 67 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/10183/14308>>. Acesso em: 03 maio 2010.
- Rizzo, I., Vedoya, G. Maurutto, S., Haidukowski, M., Varsavsky, E. 2004. Assessment of toxigenic fungi on Argentinian medicinal herbs. *Microbiological Research* 159: 113-120. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com>>. Acesso em: 05 May 2010.
- Rocha, L.O., Soares, M.M.S. R., Corrêa, C. L. 2004. 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. *Revista Brasileira Ciências Farmacêuticas* 40(4): 521-527. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/...>>. Acesso em: 07 mar. 2010.
- Rocha, L.M. 2009. Controle de Qualidade de Drogas Vegetais e Fitoterápicos. In: Leite, J.P.V. (ed). *Fitoterapia: bases científicas e tecnológicas*. São Paulo, Editora Atheneu, p. 253-276.
- Romo, M.A.M., Fernández, G.S. 1986. Aflatoxin-producing potential of *Aspergillus flavus* strains isolated from Spanish poultry feeds. *Mycopathologia* 95: 129-132.
- Roy, A.K.; Chourasia, H.K. 1989. Aflatoxin problems in some medicinal plants under storage. *International Journal of Crude Drug Research* 27: 156-160.
- Roy, A.K.; Chourasia, H.K. 1990. Mycoflora mycotoxin productibility and mycotoxin in traditional herbal drugs from India. *The Journal of General and Applied Microbiology* 36: 129-302.

- Saad, B., Azaizeh, H., Abu-Hijleh, G., Said, O. 2006. Safety of traditional Arab herbal medicine. *eCAM Advance Access* 1-7. Disponível em: <<http://wcam.oxfordjournals.org/cgi/reprint/.../>>. Acesso em: 16 Jan. 2011.
- Saito, M., Machida, S. 1999. A rapid identification method for aflatoxin-producing strains of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* by ammonia vapor. *Mycoscience* 40: 205-208.
- Samson, R.A., Noonim, P., Meijer, M., Houbraken, J., Frisvad, J.C., Varga, J. 2007. Diagnostic tools to identify black aspergilli. *Studies in Mycology* 59: 129-145. Disponível em: <www.studiesinmycology.org>. Acesso em: 26 Jul. 2011.
- Samson, R.A., Frisvad, J.C. 2004. *Penicillium* subgenus *Penicillium*: new taxonomic schemes and mycotoxins and other extrolites. In: Samson, R. A. et al. Eds. *Studies in Mycology* 49. The Netherlands: CBS, 2004.
- Samson, R.A., Houbraken, J.A.M.P., Kuijpers, A.F.A., Frank, J.M., Frisvad, J.C. 2004a. New ochratoxin A or sclerotium producing species in *Aspergillus* section Nigri. *Studies in Mycology* 50:45-61. Disponível em: <<http://www.studiesinmycology.org>>. Acesso em: 26 Jul. 2011.
- Samson, R.A., Pitt, J.I. 2000. *Integration of modern taxonomic methods for Penicillium and Aspergillus classification*. The Netherland, Harwood Academic Publisher.
- Samson, R.A., Hoekstra, E.S., Frisvad, J.C., Filtenborg, O. 1996. Methods for the detection and isolation of food-borne fungi. In: _____. (Eds.) *Introduction to food-borne fungi*. Baarn/Delft, CBS. p. 235-242.
- Sánchez, V., González, A.M., Lurá, M.C. 2006. Análisis microbiológico de hierbas medicinales y su contaminación por especies de *Aspergillus* toxigénicos. *Acta Farmacéutica Bonaerense* 25(1): 89-94.
- Santos, P.R.V., Oliveira, A.C.X., Tomassini, T.C.B. 1995. Controle microbiológico de produtos fitoterápicos. *Revista Farmacêutica de Universidade de São Paulo* 31(1): 35-38.
- Santos, T.M., Pereira, L.F., Elifisio-Esposito, S.L. 2007. Investigação do efeito hipolipemiante do extrato aquoso de folhas de Alcachofra (*Cynara scolymus* L) em associação à atividade física intensa. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* 9(3): 76-81. Disponível em: <<http://www2.ibb.unesp.br/.../>> Acesso em 12 jan. 2011.
- Satomi, L.C., Soriani, R.R., Pinto, T.J.A. 2003. Descontaminação de drogas vegetais empregando irradiação gama e óxido de etileno: aspectos microbianos e químicos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas* 41(4): 445-450.
- Shephard, G.S. 2008. Impact of mycotoxins on human health in developing countries. *Food Additives and Contaminants* 25: 146-151.
- Schütz, M.V., Velazquez, C.C. Abegg, M.A. 2008. Avaliação da qualidade microbiológica das drogas vegetais mais comercializadas em farmácias de manipulação de Toledo – PR. *Arquivos de Ciências da Saúde da Unipar* 12 (3): 181-186. Disponível em:<<http://revistas.unipar.br/saude/article/view/2533>>. Acesso 05 jun. 2011.
- Silveira, P.F., Bandeira, M.A.M., Arrais, P.S.D. 2008. Farmacovigilância e reações adversas às plantas *medicinais* e fitoterápicas: uma realidade. *Brazilian Journal Pharmacognosy* 18 (4): 618-626.

- Simões, C., Schenkel, E.P., Gosmann, G.; Mello, J.C.P.; Mentz, L.A. Petrovick, P.R. (Orgs). 2004. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5 ed. rev. Porto Alegre/Florianópolis, Editora da UFRGS/Editora da UFSC.
- Singh, P., Srivastava, B., Kumar, A., Dubey, N.K. 2008. Fungal contamination of raw materials of some herbal drugs and recommendation of *Cinnamomum camphora* oil as herbal fungitoxicant. *Microbial Ecology* 56: 555-560.
- Smedsgaard, J. 1997. Micro-scale extraction procedure for standardized screening of fungal metabolite production in cultures. *Journal of Chromatography A* 760: 264-270.
- Sonaglio, D., Ortega, G.G., Petrovick, P.R., Bassani, V.L. 2004. Desenvolvimento tecnológico e produção de fitoterápicos. In: Simões, C., Schenkel, E.P., Gossmann, G., Mello, J.C.P., Mentz, L.A., Petrovick, P.R. (Orgs). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5 ed. rev. ampl., primeira reimpressão. Porto Alegre/Florianópolis, Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2004
- Soriani, R.R., Satomi, L.C., Pinto, T.J.A. 2005. Effects of ionizing in ginkgo and guaraná. *Radiation Physics and Chemistry* 73(4): 239-242.
- Souza, Carolina Althoff. 2006. **Aspergilose e candidíase pulmonar em pacientes imunocomprometidos – estudos comparativo dos achados de tomografia computadorizada de alta resolução**. 110f. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Área de Concentração: Radiologia. Linha de Pesquisa: Disponível em: <<http://www.medicina.ufrj.br/download/teses/.../pdf>> Acesso em: 28 nov.2011.
- Souza, T.P., Lionzo, M.I.Z., Petrovick, P.R. 2006. Avaliação da redução da carga microbiana de droga vegetal através do processamento tecnológico: decocção e secagem por aspersão. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 16(1): 94-98.
- Souza-Moreira, T.M., Salgado, H.R N., Pietro, R.C.L.R. 2010. O Brasil no contexto de controle de qualidade de plantas medicinais. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 20(3): 435-440.
- Springfield, E.P., Eagles, P.K.F., Scott, G. 2005. Quality assessment of South African herbal medicines by means of HPLC fingerprinting. *Journal of Ethnopharmacology* 101: 75-83.
- Stoloff, L. The threes eras of fungal toxin research. 1979. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 56(9): 784-788.
- Taniwaki, M. H., Pitt, J. I., Teixeira, A. A., Iamanaka, B. T. 2003. The source of ochratoxin A in Brazilian coffee and its formation in relation to processing methods. *International Journal of Food Microbiology* 82: 173-179.
- The Pharmacopeia of The United States of America. 11rd edition. Easton: Mack Printing Company, 1936.
- The Pharmacopeia of The United States of America. 12rd edition. Easton: Mack Printing Company, 1942.
- The Pharmacopeia of The United States of America. 13rd edition. Easton: Mack Printing Company, 1947.
- The United States Pharmacopeia. 2008. 31rd edition. Baltimore: United States Pharmacopeial Convention. p 192, 232-235, 973-974.

- The United States Pharmacopeia. 2011. 34rd edition. Baltimore: United States Pharmacopeial Convention.
- Turolla, M.S.R., Nascimento, E.S. 2006. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas* 42(2): 289-306.
- Veiga Junior, V. F. 2008. Estudo do consumo de plantas medicinais na Região Centro-Norte do Estado do Rio de Janeiro: aceitação pelos profissionais de saúde e modo de uso pela população. *Revista Brasileira Farmacognosia* 18(2): 308-313.
- Veiga Jr, V.F., Mello, J.C.P. 2008. As monografias sobre plantas medicinais. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 18(3): 464-471.
- Veiga Junior, V.F., Pinto, A. C., Maciel, M.A.M. 2005. Plantas medicinais: cura segura? *Química Nova* 28(3): 519-528.
- Virgilio, L.J., Marques, L.C. 2004. Avaliação dos efeitos da Resolução RDC 17 sobre fitoterápicos de registros antigos. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 14 (supl.01): 03-06.
- World Health Organization. 2011. *Quality control methods for medicinal plant materials. Updated edition of Quality control methods for medicinal plant materials, 1998.* World Health Organization. ISBN 978 92 4 150073 9 © World Health Organization 2011. Disponível em: <<http://whqlibdoc.who.int/publications/.../9241545100>>. Acesso em: 14 Sept. 2010.
- Yazdani, D., Zainai Abdin, M.A., Tan, Y.H., Kamaruzaman, S. 2010. Evaluation of detection techniques of toxigenic *Aspergillus* isolates. *African Journal of Biotechnology* 9(45): 7654-7659. Disponível em: <<http://www.academicjournals.org/AJB>>. Acesso em: 01 Nov. 2011.
- Zaroni, M., Pontarolo, R., Abrahão, W.S.M., Fávero, M.L.D., Correa Júnior, C., Stremel, D.P. 2004. Qualidade microbiológica das plantas medicinais no Estado do Paraná. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 14(1): 29-39.
- Zheng, M. Z., Richard, J.L., Binder, J. 2006. A review of rapid methods for the analysis of mycotoxins. *Mycopathologia* 161(5): 261-273.

APÊNDICE

APÊNDICE – Relação das espécies depositadas na Micoteca URM

Espécie	Número de registro
<i>Aspergillus awamori</i> Nakaz. 1907	URM 6450
<i>Aspergillus carbonarius</i> (Bainier) Thom 1916	URM 6436
<i>Aspergillus flavus</i> Link 1809	URM 6434; URM 6480; URM 6481; URM 6482
<i>Aspergillus fumigatus</i> Fresen. 1863	URM 6483
<i>Aspergillus niger</i> Tiegh. 1867	URM 6474; URM 6479
<i>Aspergillus ochraceus</i> G. Wilh. 1877	URM 6475; URM 6476; URM 6477
<i>Aspergillus penicilloides</i> Speg. 1896	URM 6447
<i>Aspergillus sydowii</i> (Bainier & Sartory) Thom & Church 1926	URM 6443; URM 6484; URM 6486; URM 6487
<i>Aspergillus tamarii</i> Kita 1913	URM 6435
<i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen) G.A. de Vries 1952	URM 6511; URM 6512; URM 6513
<i>Cladosporium sphaerospermum</i> Penz. 1882	URM 6514; URM 6515; URM 6516
<i>Curvularia lunata</i> (Wakker) Boedijin 1933	URM 6485
<i>Emericella variegata</i> Berk & Broome 1857	URM 6424; URM 6468; URM 6469; URM 6470
<i>Eurotium amstelodami</i> L. Mangin 1908	URM 6426
<i>Eurotium chevalieri</i> L. Mangi 1910	URM 6444; URM 6454
<i>Eurotium repens</i> Bary 1870	URM 6425
<i>Eurotium rubrum</i> W. Bremer 1901	URM 6428; URM 6489
<i>Neosartorya fischeri</i> (Wehmer) Malloch & Cain 1973	URM 6427
<i>Penicillium aurantiogriseum</i> Dierckx 1901	URM 6497; URM 6498; URM 6499; URM 6500
<i>Penicillium brevicompactum</i> Dierckx 1901	URM 6445
<i>Penicillium canescens</i> Sopp 1912	URM 6490
<i>Penicillium chrysogenum</i> Fleroff 1906	URM 6451
<i>Penicillium citreonigrum</i> Dierckx 1901	URM 6441
<i>Penicillium citrinum</i> Thom 1910	URM 6446; URM 6471; URM 6493
<i>Penicillium corylophilum</i> Dierckx 1901	URM 6491
<i>Penicillium fellutanum</i> Biourge 1923	URM 6472
<i>Penicillium glabrum</i> (Wehmer) Westling 1911	URM 6415
<i>Penicillium janthinellum</i> Biourge 1923	URM 6473
<i>Penicillium minioluteum</i> Dierckx 1901	URM 6453
<i>Penicillium oxalicum</i> Currie & Thom 1915	URM 6448
<i>Penicillium solitum</i> Westling 1911	URM 6492
<i>Penicillium vinaceum</i> J.C. Gilman & E.V. Abbot 1927	URM 6488
<i>Penicillium waksmanii</i> K. M. Zalessky 1927	URM 6494; URM 6495; URM 6496
<i>Tritirachium oryzae</i> (Vincens) de Hoog 1972	URM 6517; URM 6518; URM 6519
<i>Wallemia sebi</i> (Fr.) Arx 1970	URM 6438