

Contaminação fúngica em chás de camomila, erva-doce e erva-mate

Fungi contamination in the chamomile, anis and mate teas

RIALA6/1194

Suzana CARVALHO¹, Rodrigo Makowiecky STUART¹, Ida Chapaval PIMENTEL¹, Patricia do Rocio DALZOTO¹, Juarez GABARDO², Maria Aparecida Cassilha ZAWADNEAK¹

Endereço para correspondência: Setor de Ciências Biológicas, Departamento de Patologia Básica, Universidade Federal do Paraná, Centro Politécnico, Jardim das Américas, Curitiba, PR, Brasil, Caixa Postal 19031, CEP 81531-990, e-mail:mazawa@ufpr.br

¹ Setor de Ciências Biológicas, Departamento de Patologia Básica, Centro Politécnico, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brasil.

² Departamento de Genética, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brasil.

Recebido: 07.05.2008 – Aceito para publicação: 07.01.2009

RESUMO

A avaliação da qualidade microbiológica de produtos armazenados, utilizados como plantas medicinais, é fundamental para garantir a segurança alimentar, em função do potencial micotoxigênico apresentado por algumas espécies de fungos. No presente trabalho foram realizados o isolamento, a quantificação e a identificação de fungos potencialmente produtores de micotoxinas em amostras de chás de camomila (*Chamomilla recutita* L.), erva-doce (*Pimpinella anisum* L.) e erva-mate (*Ilex paraguariensis* St.-Hil.), adquiridas em estabelecimentos comerciais da cidade de Curitiba, PR, Brasil. As amostras foram analisadas nas formas de infusão fria, de infusão tradicional e de cocção. Não houve diferenças significativas nos valores de UFC/g nas amostras de camomila, erva-mate e erva-doce analisadas na forma de infusão. Foram observadas diferenças significativas em amostras de camomila e erva-doce em forma de infusão fria em relação às demais formas de processamento de amostras, contudo essas não foram evidentes nas amostras de erva-mate. Os principais gêneros de fungos isolados das amostras analisadas foram *Aspergillus* sp (35,9%); *Penicillium* sp (9,4%); *Fusarium* sp (0,21%); *Rhizopus* sp (11,5%), *Ulocladium* sp (18,4%) e *Mycelia sterilia* (6,84%). Entre os fungos potencialmente toxigênicos, o *Aspergillus* sp foi o mais frequente nos três tipos de chás, seguido de *Penicillium* sp e *Fusarium* sp. Considerando que os fungos com potencial micotoxigênico persistem mesmo após a infusão ou cocção, recomenda-se que estratégias sejam desenvolvidas para garantir a qualidade e a segurança alimentar dos produtos consumidos pela população.

Palavras-chave. *Chamomilla recutita*, *Pimpinella anisum*, *Ilex paraguariensis*, fungos micotoxigênicos.

ABSTRACT

Microbiological evaluation on stored products such as medicinal plants has been a matter of great concern for Food Safety due to the potentiality in producing mycotoxins by some fungal species. In the present paper, the isolation, quantification and identification of potentially mycotoxigenic fungal genera in the chamomile (*Chamomilla recutita*), anise (*Pimpinella anisum*) and mate tea (*Ilex paraguariensis*) tea-leaf samples are reported. The analyzed tea-leaf samples were purchased from stores located in the city of Curitiba, Paraná, Brazil, and they were evaluated in the forms of cool infusion (pouring cool water on the leaves), regular infusion (pouring hot liquid on the leaves) and leaves boiling process. In chamomile, mate tea and anise tea-leaf samples analyzed in infusion form, no significant differences on CFU/g values were showed. The cool infusion forms of chamomile and anise teas presented some significant differences, but not in mate tea cool infusion. The fungal genera isolated from analyzed samples were *Aspergillus* sp (35.9%); *Penicillium* sp (9.4%); *Fusarium* sp (0.21%); *Rhizopus* sp (11.5%), *Ulocladium* sp (18.4%) and *Mycelia sterilia* (6.84%). The potentially mycotoxigenic fungus *Aspergillus* sp was the most frequent in all of analyzed tea samples, followed by *Penicillium* sp e *Fusarium* sp. Considering that the potentially mycotoxigenic fungi remain in tea samples even after being treated by infusion and boiling processes, some strategies should be implemented to guarantee the food quality and safety.

Key words. *Chamomilla recutita*, *Pimpinella anisum*, *Ilex paraguariensis*, mycotoxigenic fungi.

INTRODUÇÃO

Plantas com propriedades medicinais vêm sendo usadas desde a antiguidade no tratamento de diversas doenças no homem e, ainda hoje, uma grande parcela da população de países em desenvolvimento depende unicamente desta forma de tratamento¹. Com a recente busca por novos compostos com propriedades terapêuticas e a pressão social para consumo de produtos de origem natural, o consumo de plantas medicinais vem aumentando consideravelmente. As ervas, em geral, ao serem colhidas, passam por processos de secagem, normalmente em estufas a céu aberto, onde recebem toda a influência de fungos filamentosos².

A resolução RDC 12/01 da Anvisa, que regulamenta os padrões microbiológicos para alimentos, não contempla a pesquisa de fungos filamentosos em chás ou em alimentos consumidos após adição de líquido com emprego de calor³. Embora todas as plantas apresentem micro-organismos endofíticos, muitas vezes produzindo compostos com ação terapêutica, a contaminação superficial por algumas espécies de fungos é um fator preocupante⁴.

Fungos filamentosos como *Aspergillus* e *Penicillium*, encontrados em praticamente todos os nichos ambientais, apresentam várias espécies produtoras de metabólitos tóxicos durante seu crescimento e desenvolvimento⁴. A ingestão destas micotoxinas pode causar efeitos agudos ou crônicos no homem e outros animais⁵, especialmente no fígado, rins e cérebro, além do alojamento destas nos músculos esqueléticos⁶. Problemas imunológicos e ação carcinogênica também são descritos⁷. As micotoxinas mais importantes são as aflatoxinas (*Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*), fusariotoxinas (*Fusarium* spp) e ocratoxinas (*Aspergillus alutaceus*, e algumas espécies de *Penicillium*)^{8,9}.

Acredita-se que quase todos os fungos são potencialmente produtores de metabólitos tóxicos e que todos os alimentos são suscetíveis à contaminação⁵.

O presente trabalho teve por objetivo o isolamento, identificação e avaliação do número de fungos potencialmente produtores de micotoxinas em chás de camomila (*Chamomilla recutita* L. (Compositae)) erva-doce (*Pimpinella anisum* L. (Umbelliferae)) e erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil (Aquifoliaceae)), avaliados em diferentes modos de preparo (infusão fria, infusão, cocção).

MATERIAL E MÉTODOS

■ Obtenção de amostras

As plantas medicinais: camomila (*C. recutita* L.), erva-doce (*P. anisum* L.) e erva-mate (*I. paraguariensis* St.-Hill.) foram obtidas de sacarias plásticas de volume variável, expostas (setembro de 2005) em três diferentes estabelecimentos dentro do Mercado Municipal de Curitiba, onde tradicionalmente ocorre a venda de produtos a granel. O critério de escolha dos estabelecimentos levou em consideração a melhor estrutura e as condições higiênico-sanitárias dos locais. Em cada estabelecimento, foram coletadas aleatoriamente três amostras de 500 g de cada espécie vegetal, sendo estas acondicionadas em sacos de polietileno. Em laboratório, as amostras de cada vegetal foram misturadas para obtenção de uma amostra composta, da qual se retirou o equivalente a 1 kg para a realização das análises.

■ Preparo das amostras

A avaliação foi realizada no Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular (LabMicro), do Departamento de Patologia Básica, da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR. As amostras de chá foram preparadas pelos métodos: infusão fria, infusão e cocção, de acordo com a metodologia de Furlaneto, Marins e Endo¹⁰. Amostras de 25 g de cada chá foram homogeneizadas em 225 mL de água destilada esterilizada, com auxílio de bastão de vidro, por 3 minutos, constituindo o método de infusão fria. Para o método de infusão foi adicionada água destilada em ebulição. No método de cocção, os chás permaneceram em ebulição por 1 minuto. Foram realizadas diluições decimais seriadas (1/10, 1/100 e 1/1000).

■ Contagem e identificação de fungos filamentosos

Alíquotas de 0,1 mL de cada amostra de chá e seus respectivos métodos de preparo foram semeadas em 30 placas de Petri (9 cm Ø) de meio Ágar-Dextrose-Batata (BDA - Difco) acrescido de tetraciclina (100µg.mL⁻¹), pelo método de plaqueamento em superfície. As placas foram incubadas a 25 ± 1 °C por 7 dias e foi estimado o número de UFC/g¹¹. Os isolados fúngicos que apresentaram diferentes morfologias coloniais foram isolados em BDA, incubados a 25 ± 1 °C por 10 dias. Para a identificação dos isolados foram utilizados critérios macro e micromorfológicos^{12, 13, 14}.

■ Análise estatística

Os valores de UFC/g foram transformados em $\log(x+2)$, submetidos à análise de variância seguindo um modelo fatorial (3x3) e as médias comparadas por meio de teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, utilizando o software ASSISTAT 7.5 2008¹⁵.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Considerando o número de UFC/g nos diferentes chás, observou-se que em camomila ($2,63 \times 10^4$ UFC/g) os valores não diferem dos observados em erva-mate ($1,73 \times 10^4$ UFC/g) e em erva-doce ($1,03 \times 10^4$ UFC/g), no método de infusão. Erva-mate e erva-doce são estatisticamente diferentes, sendo os valores de erva-doce menores ($p \leq 0,01$). No método de infusão os três tipos de chás apresentaram valores com diferenças não significativas, sendo encontrado em camomila $1,5 \times 10^4$ UFC/g, em erva-mate $1,73 \times 10^4$ UFC/g e em erva-doce $0,63 \times 10^4$ UFC/g. No método infusão fria, camomila e erva doce não diferiram significativamente ($5,6 \times 10^4$ UFC/g e $2,7 \times 10^4$ UFC/g respectivamente), entretanto, ambos apresentaram diferenças em relação à erva-mate (10^4 UFC/g). Todos os valores observados foram superiores ao limite máximo sugerido pela Organização Mundial da Saúde para fitoterápicos¹¹, que é de 10^4 UFC/g (Tabela 1).

Em relação aos métodos de preparo, o método de infusão é estatisticamente comparável à cocção, diferindo

do método infusão fria, em camomila, o qual apresenta maior número de UFC/g. em camomila, o método infuso apresentou diferença significativa em relação ao método infusão fria. Em erva-mate, os três métodos de preparo são similares e em erva-doce, os métodos infusão e cocção não apresentaram diferença significativa no número de UFC/g, sendo ambos diferentes do método de cocção (Tabela 1).

Observou-se uma tendência de diminuição no número de UFC/g quando os chás foram submetidos ao aquecimento para camomila e erva-doce, sendo este tratamento recomendado como uma das formas de controle de fungos nestas ervas. Entretanto, apesar da redução no número de isolados, os fungos filamentosos, por apresentarem estruturas de resistência, podem permanecer no produto até que existam condições ambientais para o seu desenvolvimento¹⁶.

Entretanto, em erva-mate os valores observados nos três métodos não foram estatisticamente significativos. Seria desejável uma redução nos níveis de contaminação nos infusos, já que em virtude das tradições regionais, a erva-mate é preparada com água fria e em infusão com água quente, constituindo bebidas típicas popularmente conhecidas como tererê e chimarrão¹⁶.

As condições de armazenamento e o tempo, bem como os tipos de embalagens podem propiciar o desenvolvimento de micro-organismos nos chás. Os

Tabela 1. Média das contagens formadoras de colônia (UFC/g) de fungos isolados de chás de camomila, erva-mate e erva-doce, nos métodos de preparo infusão fria, infusão e cocção

Espécies vegetais	Método de preparo	Contagem (UFCx10 ⁴ /g*)	Médias**
Camomila (<i>Chamomilla recutita</i> L. (Compositae))	Infusão fria	5,6000	0.6122 ^{aA}
	Infusão	2,6300	0.4535 ^{abB}
	Cocção	1,5000	0.4207 ^{aB}
Erva-mate (<i>Ilex paraguariensis</i> St. Hil (Aquifoliaceae))	Infusão fria	1,0000	0.4771 ^{bA}
	Infusão	1,7300	0.4855 ^{aA}
	Cocção	1,7300	0.5166 ^{aA}
Erva-doce (<i>Pimpinella anisum</i> L. (Umbelliferae))	Infusão fria	2,7000	0.6239 ^{aA}
	Infusão	1,0300	0.3839 ^{bB}
	Cocção	0,6300	0.4597 ^{aB}

*Médias de 30 repetições. **Médias transformadas para $\log(x+2)$. DMS = 0.1016 CV=33,92%.

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si (Tukey ao nível de 5% de probabilidade).

chás de camomila e erva-doce analisados são produtos importados, ficando armazenados durante a entressafra e comercialização, propiciando condições favoráveis ao crescimento de fungos. A erva-mate, por sua vez, fica armazenada por períodos de tempo menores, pois após a colheita é processada, comercializada e consumida em curto espaço de tempo, o que possivelmente leva à diminuição no número de fungos contaminantes.

Os valores encontrados no presente trabalho foram superiores aos obtidos por ROCHA et al.¹⁷. Estes autores analisaram folhas inteiras de sene (*Cassia acutifolia*) e boldo-do-chile (*Peumus boldus*) vendidas em farmácias de manipulação em Campinas, São Paulo e concluíram que apresentavam um nível de contaminação por fungos de até $7,37 \times 10^3$ UFC/g e $1,9 \times 10^3$ UFC/g, respectivamente. Entretanto, os valores obtidos foram inferiores aos obtidos por Araújo e Ohara¹⁸, que analisaram 45 amostras de drogas vegetais vendidas em feira livre, no Estado de São Paulo e que revelaram níveis de contaminação por bolores e leveduras de até 10^6 UFC/g. Também foram inferiores aos resultados encontrados por Martins et al.¹⁹, que encontraram fungos em 93,5% das amostras de plantas medicinais comercializadas em mercados públicos em Lisboa, Portugal, com níveis médios de 10^5 UFC/g.

Os principais gêneros fúngicos isolados no presente trabalho, das amostras de camomila, erva-mate e erva-doce foram *Aspergillus* sp (35,9%); *Penicillium* sp (9,4%); *Fusarium* sp (0,21%); *Rhizopus* sp (11,5%), *Ulocladium* sp (18,4%) e *Mycelia sterilia* (6,84%). Dentre estes, *Aspergillus* sp, *Penicillium* sp e *Fusarium* sp são descritos como potencialmente micotoxigênicos. Segundo Furlaneto et al.¹⁰, estes fungos são produtores de metabólitos secundários, podendo causar diversas patologias prejudiciais ao homem. Resultados semelhantes

aos obtidos no presente trabalho, com relação aos gêneros fúngicos, foram encontrados em erva-mate (*I. paraguariensis*), espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia*), sene (*Cassia acutifolia*) e boldo-do-chile (*Peumus boldus*) (Bernardi¹⁸; Aquino²; Rocha¹⁷), com grande concentração de *Aspergillus* sp e *Penicillium* sp, entre outros. Bugno et al.⁴, compararam 64 diferentes espécies de plantas medicinais comercializadas em São Paulo e avaliaram o número de isolados fúngicos, destes, 9% correspondiam a *Aspergillus* e *Penicillium*.

Em relação à avaliação qualitativa, não foi observada diferença estatisticamente significativa quanto ao número de *Aspergillus* sp nas ervas analisadas, o mesmo sendo observado para *Fusarium* sp. Em relação ao gênero *Penicillium* sp, em camomila, a sua frequência foi estatisticamente diferente dos demais ($p \leq 0,01$) (Tabela 2).

Em relação à frequência dos gêneros potencialmente micotoxigênicos *Aspergillus* sp, *Penicillium* sp e *Fusarium* sp, em camomila, foi observada diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,01$). Já em erva-mate e em erva-doce, o gênero *Aspergillus* sp diferiu significativamente de *Fusarium* sp e *Penicillium* sp, os quais não diferiram entre si ($p \leq 0,01$) (Tabela 2).

Os gêneros *Ulocladium* sp, *Rhizopus* sp e *Mycelia sterilia* também foram observados no presente trabalho. Segundo Borges⁵, embora não se conheçam evidências de toxicidade para estes gêneros, não se descarta a possibilidade de que seus metabólitos apresentem algum tipo de reação toxigênica no organismo humano ou animal.

Os dados obtidos sugerem que condições inadequadas de qualidade da matéria prima, processamento, distribuição, armazenamento e comercialização dos chás avaliados contribuíram para a contaminação dos

Tabela 2. Média de gêneros de fungos potencialmente toxigênicos isolados de chás de camomila, erva-mate e erva-doce

Chás	FUNGOS		
	<i>Aspergillus</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Fusarium</i>
Camomila	0.5103 ^{aA}	0.5137 ^{aA}	0.5059 ^{aA}
Erva-mate	0.4341 ^{bA}	0.3304 ^{bB}	0.3128 ^{bB}
Erva doce	0.3069 ^{cA}	0.3010 ^{bA}	0.3010 ^{bA}

Médias de 30 repetições. Dados transformados para $\log(x+2)$. DMS=0.0525. CV=22,12%.

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

produtos por fungos. Estudos mais aprofundados devem ser conduzidos, envolvendo o levantamento quantitativo e qualitativo dos isolados fúngicos. A identificação de fungos contaminantes de chás é uma importante ferramenta para a segurança alimentar dos consumidores destes produtos, uma vez que a presença de micro-organismos produtores de micotoxinas pode acarretar efeitos prejudiciais à saúde do consumidor, dependendo da forma de preparação ao qual são submetidos. Tendo em vista que, mesmo com a infusão ou cocção do produto, os fungos com potencial micotoxigênico ainda persistem, estratégias para garantir a qualidade e a segurança alimentar devem ser desenvolvidas.

REFERÊNCIAS

1. Calixto JB. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). *Braz J Med Biol Res*. 2000; 33(2): 179-89.
2. Aquino S, Gonzalez E, Rossi MH, Dártora MMPA, Silva PV, Corrêa B, Villavicencio ALC. Efeitos da radiação gama na contaminação fúngica de espinheira santa (*Maytenus ilicifolia*). *Reunião Anual do Instituto Biológico* 2005; 72(2); 71.
3. Brasil. Ministério da Saúde. ANVISA. Resolução RDC nº 12, de 2 jan. 2001. Estabelece padrões microbiológicos sanitários para alimentos. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, 10 jan. 2001. p. 45.4.
4. Bugno A, Buzzo AA, Nakamura CT, Pereira TC, Matos D, Pinto TJA. Avaliação da contaminação microbiana em drogas vegetais. *Rev Bras Cienc Farm*. 2005; 41 (4): 491-7.
5. Borges LR, Pimentel IC, Beux MR, Talamini A. Contagem de fungos no controle de qualidade da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St.-Hill) e isolamento de gêneros potencialmente micotoxigênicos. *Bol CPPA* 2002;20(1): 103-10.
6. Camargo R. *Tecnologia dos Produtos Agropecuários*. São Paulo: Nobel, 1984. 298p.
7. Hsieh DPH, Atkinson DN. Bifuranoid mycotoxins: their genotoxicity and carcinogenicity. *Adv Exp Med Biol* 1991; 283: 525-32.
8. Agência Nacional de Vigilância Sanitária [ANVISA]. Resolução nº. 274 de 15 de out. 2002: Regulamento técnico Mercosul, sobre limites máximos de aflatoxinas admissíveis no leite, no amendoim, no milho. Brasília (DF); *Diário Oficial União*; 16 out. 2002.
9. Food and Agriculture Organization of United Nations [FAO]. Micotoxinas em grãos. [online]. Folheto técnico nº. 3. [cited 2008 05 mai]; Available from <http://www.fao.org/WAIRDOCS/X5012O/X5012O00.HTM>.
10. Furlaneto L, Marins VD, Endo R. Qualidade microbiológica de drogas vegetais comercializadas nas ruas da cidade de Londrina/PR e de seus infusos. *Saúde em Revista*, 2003; 5(10): 49-52.
11. World Health Organization (WHO). *Quality control methods for medicinal plant materials*. Geneva, 1998, 115 p.
12. Barnett HC, Hunter BB. *Illustrated genera of imperfect fungi*. 3a. ed. Minneapolis: Burgess publications, 1986. 241p.
13. Kern ME, Blevins KS. *Micologia médica*. 2ª. edição, São Paulo: Premier; 1999. 256p.
14. Hoog GS, Guarro J. *Atlas of Clinical Fungi*. Centraalbureau voor Schimmelcultures/Universitat roviria i Virgili, ed. 2004. 1126p.
15. Silva FAS. The ASSISTAT Software: statistical assistance. In: *International Conference on Computers in Agriculture*. American Society of Agricultural Engineers 1996; 6: 294-8.
16. Rupollo G, Gutkoski LC, Marini LJ, Elias MC. Sistemas de armazenamento hermético e convencional na conservabilidade de grãos de aveia. *Cienc Rural* 2004; 34(6):1715-22.
17. Rocha LO, Soares MMSR, Corrêa CL. Análise da contaminação fúngica em amostras de *Cassia acutifolia* (sene) e *Peumus boldus* (Molina) Lyons (boldo-do-chile) comercializados na cidade de Campinas, Brasil. *Rev Bras Cienc Farmac* 2004; 40(4): 521-7.
18. Bernardi E, Caldeira MF, Nascimento JS. Identificação de fungos filamentosos em erva-mate (*Ilex paraguariensis* st. Hil.). *Arq Inst Biol*. 2005; 72(4): 489-93.
19. Araújo ALD, Ohara MT. Qualidade microbiológica de drogas vegetais comercializadas em feira de São Paulo e de infusos derivados. *Rev Bras Cienc Farmac* 2000; 36: 129-37.
20. Martins HM, Martins ML, Dias MI, Bernardo F. Evaluation of microbiological quality of medicinal plants used in natural infusions. *Int J Food Microb* 2001; 68: 149-51.