

DETECÇÃO DE *Staphylococcus aureus* EM PLANTAS MEDICINAIS

F. A. G. Rocha¹, E. D. M. Pontes², J. A. B. Souza³, L. K. R. Bezerra⁴, J. R. Bezerra⁵, M. F. F. Araújo⁶
E-mail: angelo.gurgel@ifrn.edu.br¹; eduarda_dmpontes@hotmail.com²; joyce__azevedo@hotmail.com³;
leticiabezerra64@hotmail.com⁴; joão_rgb1@hotmail.com⁵; mag@cb.ufrn.br⁶

RESUMO

Devido a grande facilidade de acesso às plantas medicinais, o seu uso vem aumentando significativamente nos últimos anos, sendo alguns dos fatores responsáveis o baixo custo e a dificuldade de se obter medicamentos alopáticos. Em geral, essas plantas são encontradas em feiras livres, em condições higiênico-sanitárias precárias desde a coleta até a comercialização ao usuário final. Desse modo, a contaminação microbiana ocorre com frequência, trazendo riscos a saúde dos consumidores. O presente trabalho teve como finalidade, detectar e quantificar a presença de *Staphylococcus aureus* em amostras de pepaconda,

cumarú, ameixa, cajueiro e boldo, plantas medicinais de alta aceitação popular no município de Currais Novos região situada no Seridó do Rio Grande do Norte. Foram realizadas diluições decimais seriadas, de 10^{-1} a 10^{-6} , posteriormente semeadas em superfície em duplicatas (ágar Manitol Salgado, 35-37°C/24±2h). Colônias pequenas, circulares, convexas e de cor amarelo foram consideradas típicas e selecionadas para a confirmação bioquímica via teste da Termonuclease. Os resultados foram expressos em UFC/g. A presença dos microrganismos em questão foi confirmada em 100% das amostras.

PALAVRAS-CHAVE: contaminação, feira livre, Seridó, Currais Novos

DETECTION OF *Staphylococcus aureus* IN MEDICINAL PLANTS

ABSTRACT

Due to ease of access to medicinal plants, their use has increased significantly in recent years, and some of the factors responsible are the low cost and difficulty of obtaining allopathic medicines. In general, these plants are found in street fairs, in poor sanitary conditions from collection to marketing to the end user. Thus, microbial contamination occurs frequently, bringing risks to consumer health. This study aimed to detect and quantify the presence of *Staphylococcus aureus* in samples of pepaconda, Cumarú, ameixa, cashew and

boldo, medicinal plants with high popular acceptance in the city of Currais novos, situated in Rio Grande do Norte, Brazil. Serial decimal dilutions were made from 10^{-1} to 10^{-6} , then plated on surface duplicates (Mannitol Salt agar: 35-37°C/24±2h). Colonies small, circular, convex and yellow were considered typical and selected for biochemical confirmation via thermonuclease test. The results were expressed as CFU/g. The presence of microorganisms in question has been confirmed 100% of the samples.

KEYWORDS: contamination, street fairs, Seridó, Currais Novos.

1 INTRODUÇÃO

O uso de espécies vegetais com propriedades bioativas é um traço comum a todas as comunidades humanas, autóctones ou não. Reconhecendo a efetividade de seu uso, a Organização Mundial da Saúde recomenda a incorporação das plantas medicinais nos sistemas de Saúde Pública. Contudo, apesar do reconhecimento oficial, a população ainda tem nas feiras livres a principal fonte para a aquisição das espécies que utiliza.

De modo geral, a comercialização de plantas medicinais em feiras livres e mercados é caracterizada por condições estruturais e de higiene insatisfatórias, o que pode facilitar tanto a contaminação do material por microrganismos, quanto a posterior proliferação da microbiota, incluindo-se nestas espécies patogênicas para humanos.

Dentre os patógenos potencialmente presentes em plantas medicinais, destacamos *Staphylococcus aureus*, mundialmente implicado em surtos de doenças estafilocócicas, resultantes da ingestão de material contaminado por suas toxinas. No contexto do uso tradicional de plantas medicinais, a ingestão de chás formulados com base em matéria vegetal contaminada pelas toxinas estafilocócicas pode representar risco à saúde, uma vez que tais metabólitos secundários são termorresistentes e permanecem ativos no produto final, o chá.

Apesar de sua relevância para a saúde pública, tanto a OMS quanto a ANVISA não explicitam limites específicos para a presença de *S. aureus* em plantas medicinais, impossibilitando a ação fiscalizatória. Neste contexto, é necessário que sejam desenvolvidos estudos que dimensionem o risco à saúde do consumidor. Desse modo, podem ser fornecidas as bases para que os órgãos competentes possam ser pressionados no sentido de preencher o vácuo legal existente, com a criação de legislação específica voltada ao estabelecimento de parâmetros de qualidade microbiológica para o comércio de plantas medicinais e preparos tradicionais derivados.

Com o presente trabalho, objetivamos detectar em amostras de plantas medicinais de alta aceitação popular (ameixa, boldo, caju, cumarú e pepaconda), comercializadas na feira livre de Currais Novos/RN, as densidades de *S. aureus* presentes, permitindo avaliar a sua adequação ao consumo humano.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O uso de plantas medicinais iniciou-se na pré-história, quando as primeiras comunidades humanas caracteristicamente coletoras, recorriam à flora em busca de alimento. Por tentativa e erro, ao longo do tempo foram selecionando o que poderia ser consumido ou não. Como consequência, observaram que algumas das espécies vegetais apresentavam um ou mais efeitos terapêuticos sobre determinadas enfermidades. Esses conhecimentos empíricos foram sendo acumulados e passados de geração em geração, resultando no que é conhecido pela Organização Mundial da Saúde como Medicina Tradicional. Porém, diante do fácil acesso a produtos industrializados que a modernidade possibilitou, tais costumes foram ficando para trás, pois com o

avanço da tecnologia, a indústria farmacêutica viabilizou a produção e o consumo em larga escala de fármacos sintéticos, os medicamentos alopáticos. Apesar dos avanços na medicina moderna, o uso de plantas medicinais como forma de terapia aceita persiste, compondo os diversos sistemas de Medicina Tradicional existentes (JUNIOR *et. al.*, 2005).

O consumo mundial de plantas medicinais aumentou significativamente nos últimos anos, favorecido pelo fato de que cerca de 100 milhões de pessoas não têm acesso a medicamentos alopáticos (OLIVEIRA *et. al.*, 2006; NUNES *et. al.*, 2003). Adicionalmente, fatores como o crescente aumento dos preços das drogas convencionais, seus efeitos colaterais, novas formas de doenças passíveis de tratamento através de medicamentos ditos “naturais” e as dificuldades relacionadas ao acesso aos serviços de saúde pública, tem contribuído para este incremento no consumo do recurso terapêutico em questão (MARODIN; BAPTISTA, 2001).

Em geral, as plantas medicinais e seus derivados são comercializados em feiras livres, nas quais fiscalização sanitária é ineficiente, o que torna esses locais impróprios para comercialização de tais produtos, podendo torna-los insalubres ao consumo humano. Inadequações higiênico-sanitárias nas diversas etapas da sua cadeia produtiva - incluindo o armazenamento, transporte e a exposição - podem favorecer a contaminação das plantas medicinais por microrganismos indesejáveis e/ou a proliferação excessiva da microbiota associada (ROCHA *et. al.*, 2010).

Dentre os microrganismos que podem estar presentes em plantas medicinais destacamos o *Staphylococcus aureus*. Gram positivo e anaeróbio facultativo, o microrganismo ocorre de forma isolada, aos pares e em aglomerados. O *S. aureus* é capaz multiplicar-se em 10% a 20% de NaCl, sendo a principal espécie patogênica para humanos do Gênero *Staphylococcus*. Contaminante de alimentos, o microrganismo é produtor de enterotoxinas, sendo apontado frequentemente como responsável por casos de intoxicação alimentar. Componente normal da microbiota associada às vias aéreas de humanos e presente em lesões da pele, pode ser facilmente transferido para alimentos, utensílios e superfícies de trabalho. Naturalmente, o *S. aureus* não faz parte da microbiota associada às plantas medicinais, sendo considerado contaminante (FRANCO; LANDGRAF, 2008; SILVA *et al.*, 2007). Dado o seu potencial de risco à saúde pública, a legislação brasileira e internacional estabelece limites claros para a sua presença em diversos grupos de alimentos. Contudo, não existe nenhum limite estabelecido ou recomendado para a sua detecção em plantas medicinais (BRASIL, 2003; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2007).

No município de Currais Novos, a feira livre como outras ao longo do território nacional, não se pauta pela presença de condições de higiene, fiscalização ou regulamentação sanitária ideais. Dentre outros produtos de natureza variada, as plantas são expostas na maioria das vezes em calçadas ou barracas de madeira, onde ficam sujeitas à variações das condições climáticas ao longo do dia. Armazenadas e expostas em sacos plásticos abertos, reutilizados, permanecem bem próximos a uma diversidade de produtos que são comercializados e que podem servir como fontes de contaminação. Caracteristicamente, as embalagens – quando presentes - são confeccionadas de forma artesanal, utilizando-se jornais, sacolas ou outros materiais, em geral reutilizados (ROCHA *et al.*, 2010).

Considerando-se a ampla aceitação das plantas medicinais enquanto recurso terapêutico tradicional, bem como os riscos existentes no consumo de espécies vegetais contaminadas pelo *S. aureus*, objetivamos quantificar sua presença em amostras de pepaçonha (*Cephaelis ipecacuanha* (Brot.) Tussac), cumarú (*Amburana cearenses* (Fr. All.)), ameixa (*Ximenia americana* L.), cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) e boldo (*Peumus boldus* Molina), plantas medicinais de alta aceitação popular disponíveis ao consumidor na feira-livre de Currais Novos, RN.

3 METODOLOGIA

3.1 Caracterização da área estudada

As amostras foram coletadas na feira popular do município de Currais Novos (figura 1).

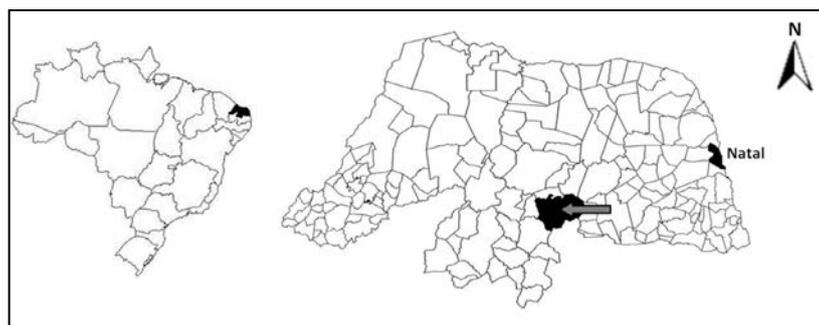


Figura 1. Localização do estado do Rio Grande do Norte e do município de Currais Novos, indicado pela seta.

O município situa-se na mesorregião Central Potiguar e na microrregião Seridó Oriental, sob as coordenadas 6°15'39,6" Sul, 36°30'54" Oeste, Estado do Rio Grande do Norte (BRASIL, 2005).

3.2 Espécies Estudadas e Coleta das Amostras

As plantas a serem estudadas foram selecionadas tendo como base a indicação de comerciantes, que apontaram as cinco plantas mais procuradas pela população. Foram coletadas vinte e cinco amostras, sendo: cinco de raízes de pepaçonha - *Cephaelis ipecacuanha* (Brot.) Tussac, cinco de cascas de cumarú - *Amburana cearenses* (Fr. All.), cinco de cascas de ameixa - *Ximenia americana* L., cinco de cascas de cajueiro - *Anacardium occidentale* L. e cinco de folhas de boldo - *Peumus boldus* Molina. As amostras eram constituídas por órgãos (ou partes destes) em diferentes graus de dessecação, com pesos variados e superiores a 100g. Para reproduzir fielmente as condições da comercialização popular, as amostras foram embaladas pelo próprio comerciante. Posteriormente, o material foi acondicionado em recipientes estéreis e em seguida, encaminhado ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos/Biologia Molecular (MICROBIO) do IFRN/Câmpus Currais Novos onde foi analisado.

3.3 Preparo das Amostras e Diluições Seriais

Parcelas de 25g de cada amostra foram individualmente pesadas e adicionadas a 225 mL de Solução Salina Peptonada estéril, sendo homogeneizadas por agitação durante dois minutos, utilizando-se agitador vórtex. A partir desta diluição inicial (10^{-1}), foram realizadas diluições decimais seriadas, também homogeneizadas, até 10^{-3} . Quando necessário, tendo em vista o possível elevado nível de contaminação da amostra, foram realizadas diluições até 10^{-6} (SILVA, 2007).

3.4 Quantificação das populações de *Staphylococcus* coagulase positivos

As diluições foram semeadas em duplicata pelo método *spread plate* em placas de petri contendo 15 mL do ágar seletivo e diferencial Manitol Salgado (ABBA et al., 2009; WANNIPA et al., 2007). As placas foram incubadas na posição invertida a $35-37^{\circ}\text{C}/24\pm 2\text{h}$. Cumprido o período de incubação, as colônias foram selecionadas com base em sua morfologia, sendo consideradas típicas as que apresentaram as seguintes características: tamanho pequeno, circulares, convexas e de cor amarelo brilhante. Cinco colônias típicas de cada placa foram selecionadas e transferidas para tubos de ensaio contendo 15 mL de caldo BHI (*Brain Heart Infusion*), sendo incubadas a $35-37^{\circ}\text{C}/24\pm 2\text{h}$. Após a incubação, os tubos foram submetidos à fervura em banho maria por 15 minutos. Após o resfriamento, alíquotas de 0,1µL foram individualmente transferidos para poços previamente perfurados em placas de petri, contendo aproximadamente 15 mL de ágar DNase com verde de metila. As placas foram incubadas a 50°C por duas horas. O desenvolvimento de áreas de clarificação ao redor dos poços foi considerado resultado positivo para a presença dos microrganismos alvo, tendo em vista a existência de correlação precisa entre as atividades coagulase + e DNase +. O teste da termonuclease é recomendado como prova adicional e confirmatória, realizada posteriormente ao teste coagulase, para confirmação da presença *S. aureus* (BRASIL, 2003; SILVA et al., 2007).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Baseando-se nas análises realizadas a presença do *S. aureus* foi observada em 100% das amostras, conforme expresso na tabela 1.

Tabela 1: Populações de *S. aureus* detectadas nas amostras de plantas medicinais analisadas.

Planta medicinal analisada	Amostras analisadas	Densidades médias observadas (UFC/g)
Pepaconha (<i>Cephaelis ipecacuanha</i>)	5	$6,0 \times 10^5$
Cumarú (<i>Amburana cearensis</i>)	5	$1,7 \times 10^5$
Ameixa (<i>Ximenia americana</i>)	5	$2,8 \times 10^4$
Cajueiro (<i>Anacardium occidentale</i>)	5	$1,0 \times 10^4$
Boldo (<i>Peumus boldus</i>)	5	$4,8 \times 10^2$

Apesar da inexistência de limites estabelecidos pela OMS (Organização Mundial da Saúde) para a presença em plantas medicinais do *S. aureus* ou outros estafilococos coagulase positivos, a detecção de populações significativas da espécie/grupo neste tipo de material não deve ser desprezada, existindo relatos de sua detecção e do risco que representam aos consumidores (ABBA et al., 2009; FRANCO; LANDGRAF, 2008; ROCHA et al, 2010; WANNIPA et al., 2007).

Bioindicador de baixas condições de higiene na manipulação, o *S. aureus* denuncia as condições indesejáveis de higiene e qualidade presentes na cadeia produtiva das plantas analisadas. A detecção do microrganismo é concordante com a estrutura física precária dos pontos de venda, bem como com as práticas de comercialização indesejáveis do ponto de vista higiênico, empregadas pelos comerciantes de plantas medicinais presentes na área estudada. É importante ressaltar que a detecção do *S. aureus* em material que será consumido na forma de chás representa risco à saúde, dada a sua contaminação potencial por enterotoxinas produzidas pelo microrganismo, as enterotoxinas A, B, C₁, C₂, C₃, D e E. Proteínas simples, de baixo peso molecular, são higroscópicas e facilmente solúveis em água. Por serem termorresistentes, tais toxinas permanecem ativas após a fervura das plantas para o preparo de chás, provocando no consumidor náuseas, vômitos, câimbras abdominais, diarreia e sudorese. Embora seja raro, em concordância com as condições orgânicas do indivíduo e a quantidade de toxina ingerida, a intoxicação pode resultar em óbito (FRANCO; LANDGRAF, 2008; ROCHA et al., 2010).

5 CONCLUSÃO

Embora não sejam estabelecidos limites legais para a sua presença em plantas medicinais, consideramos que a detecção do *S. aureus* no material analisado o torna inapropriado para o consumo humano. Tal fato indica a necessidade de melhorias higiênico-sanitárias, fiscalização eficaz, regulamentação, formação dos manipuladores, e atenção voltada a toda cadeia produtiva das plantas medicinais, dada a sua grande aceitação como recurso terapêutico na área estudada.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBA, D.; INABOO, H. I.; YAKUBU, SBO E.; OLONITOLA O. S. Contamination of herbal medicinal products marketed in Kaduna metropolis with selected pathogenic bacteria. **The African Journal of Traditional, complementary and Alternative Medicines**. v.6, n.1, 2009.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Instrução Normativa 62, de 26 de agosto de 2003. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 18 ago. 2003. Seção 1, p. 14.

BRASIL. MINISTÉRIO DAS MINAS E ENERGIA. **Projeto de fontes de abastecimento por água subterrânea no Estado do Rio Grande do Norte**: Diagnóstico do Município de Currais Novos. Recife, 2005.

FRANCO, Bernadette D. G. de; LANDGRAFF, Mariza. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2008.

JUNIOR, V. F. V.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura?. **Química Nova**, Vol. 28, No. 3, 519-528, 2005.

MARODIN, S. M.; BAPTISTA, L. R. de M.. O uso de plantas com fins medicinais no município de Dom Pedro de Alcântara, Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, Botucatu**, v.4, n.1, p. 57-68, 2001.

NUNES, G. P.; SILVA, M. F. da; RESENDE, U. M.; SIQUEIRA, J. M. de. Plantas Mediciniais comercializadas por raizeiros no Centro de Campo Grande, Mato Grosso do Sul. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.13, n.2, p. 83-92, 2003.

OLIVEIRA, M. J. R.; SIMÕES, M. J. S.; SASSI, C. R. R.. Fitoterapia no Sistema de Saúde Pública (SUS) no Estado de São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, Botucatu**, v.8, n.2, p. 39-41, 2006.

ROCHA, F. A. G. da; MEDEIROS, F. G. M. de; SILVA, Jonas Luiz Almada da. Diagnóstico da qualidade sanitária de plantas medicinais comercializadas no município de Currais Novos, RN. **HOLOS**, ano 26, v. 2. 2010.

SILVA, N. da; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M. H.; SANTOS, R. F. S.; GOMES, R. A. R.. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. 3. ed. São Paulo: Varela, 2007.

WANNIPA P.; RENGPIPAT, S.; CHERDSHEWASART, W. *Gamma irradiation versus microbial contamination of Thai medicinal herbs*. **Songklanakarín Journal of Science and technology**. v.29, n.1, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. **WHO guidelines for assessing quality of herbal medicines with reference to contaminants and residues**. GENEVA: WHO PRESS, 2007. 118 P.