

Controle microbiológico de drogas vegetais comercializadas na região central do Rio Grande do Sul

GINDRI, A. L.^{1*}; LAPORTA, L. V.²; SANTOS, M. R.²

¹Universidade Federal de Santa Maria - UFSM, Departamento de Farmácia Industrial, Avenida Roraima, 1000, Cidade Universitária, Bairro Camobi, CEP: 97105-900-Santa Maria-Brasil *amandagindri@terra.com.br ²Centro Universitário Franciscano-UNIFRA, Laboratório de Controle de Qualidade e Equivalência Farmacêutica, Rua dos Andradas, 1614, Sala S011, Bairro Centro, CEP: 97010-032, Santa Maria-Brasil

RESUMO: O objetivo deste trabalho foi analisar a qualidade microbiológica de 40 amostras de matérias-primas de fitoterápicos coletadas de farmácias de manipulação da região central Rio Grande do Sul. Foram realizados os testes de contagem de microrganismos viáveis e pesquisa e identificação de patógenos, ambos de acordo com a Farmacopéia Brasileira. Os resultados obtidos mostraram que há presença de microrganismos nas amostras, entretanto, em nenhuma delas, o valor de UFC g⁻¹ ultrapassou o limite estabelecido para fitoterápicos na Farmacopéia Britânica, tanto para bactérias como para fungos. No teste de pesquisa e identificação de patógenos comprovou-se que não havia a presença de *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* sp, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, nas amostras analisadas. As amostras estão aptas a serem comercializadas, pois todas estavam dentro dos limites especificados, e foram aprovadas pelo teste de controle de qualidade microbiológico.

Palavras-chave: controle de qualidade microbiológico, farmácia de manipulação, plantas medicinais

ABSTRACT: Microbiological control of medicinal drugs commercialized in the central region of Rio Grande do Sul, Brazil. The aim of this study was to analyze the microbiological quality of 40 samples of raw material for herbal medicines collected from compounding pharmacies in the center of Rio Grande do Sul, Brazil. Count of viable microorganisms and search and identification of pathogens were performed, both according to the Brazilian Pharmacopoeia. Results showed that there were microorganisms in the samples; however, in none of them, the value of CFU g⁻¹ was above the limit established for herbal medicines by the British Pharmacopoeia, both for bacteria and fungi. The search and identification of pathogens indicated that there was no *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* sp, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* in the analyzed samples. The samples can be commercialized because all of them were within the allowed limits and were approved in the test for microbiological quality control.

Key words: microbiological quality control, compounding pharmacy, medicinal plants

INTRODUÇÃO

Atualmente, a sociedade tem buscado hábitos mais saudáveis de vida na natureza, o que, associado ao alto preço dos medicamentos, tem levado a aumento da utilização e produção de medicamentos fitoterápicos (Rocha et al., 2004). No ano de 2000, os produtos a base de plantas medicinais movimentaram cerca de 30 bilhões de dólares. A Organização Mundial da Saúde estima que 80% das pessoas dependem da medicina tradicional (Melo et al., 2007).

Apesar dos grandes avanços da indústria

farmacêutica, a utilização dessa terapia alternativa vem crescendo, o que aumenta a responsabilidade das agências regulatórias e dos fabricantes, pois devem assegurar a qualidade e eficácia terapêutica desses produtos (Satomi et al., 2005). Segundo a legislação atual, fitoterápico é um medicamento obtido empregando-se exclusivamente matérias-primas ativas vegetais. É caracterizado pelo conhecimento da eficácia e dos riscos do uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de qualidade. Não se considera medicamento

Recebido para publicação em 20/02/2011

Aceito para publicação em 03/04/2012

fitoterápico aquele que, na composição, inclua substâncias ativas isoladas, de qualquer origem, nem as associações destas com extratos vegetais (Anvisa, 2010).

As matérias-primas de origem natural são mais susceptíveis a apresentarem problemas de contaminação. Fatores como poluição na água de irrigação, atmosfera, solo, condições da coleta, manipulação, secagem e estocagem são importantes e devem ser considerados, por permitirem altos níveis de contaminação microbiana, por vezes patogênica (Bugno et al., 2005). Os microrganismos, de maneira geral, exigem condições favoráveis para o crescimento, o que torna algumas matérias-primas livres de contaminação ou, pelo contrário, muito susceptíveis. Estas últimas podem tornar-se substrato para o crescimento microbiano, uma vez que podem ser utilizadas como fonte de carboidratos, aminoácidos, proteínas, vitaminas, sais orgânicos, água, entre outros (Pinto et al., 2003).

As preparações de drogas vegetais, geralmente são oriundas de plantas coletadas, secas e empacotadas, sem muitos cuidados de higiene e controle sanitário. Os produtos destinados às farmácias de manipulação, por serem distribuídos em pequena quantidade, ainda passam pelo processo de fracionamento, podendo carrear partículas viáveis e não-viáveis, aumentando ainda mais a carga microbiana (Furlaneto et al., 2003; Bugno et al., 2005; Souza et al., 2006).

As farmácias de manipulação, também chamadas magistrais, têm se mostrado uma alternativa quando o paciente necessita de doses personalizadas de determinado medicamento, o que resultou num crescente aumento da procura por medicamentos manipulados. Outro fator que justifica esse crescimento é o custo desses medicamentos, que em geral, são mais baratos que os industrializados. Entretanto, o controle de qualidade das matérias-primas e dos produtos acabados é grande obstáculo a ser superado (Furlaneto et al., 2003; Bugno et al., 2005; Souza et al., 2005).

O número de estabelecimentos fornecedores destes serviços também vem aumentando. De acordo com dados fornecidos pelo Conselho Federal de Farmácia, em dezembro de 2003 existiam, no Brasil, 3.958 farmácias de manipulação (C.F.F., 2005), e em 2006 estas já eram mais de cinco mil farmácias magistrais (Anvisa, 2006).

A qualidade microbiológica das matérias-primas vegetais apresenta, geralmente, índices de contaminação microbiana acima de níveis internacionalmente aceitos para os medicamentos (Souza et al., 2006). Conforme Pinto et al. (2003), as drogas vegetais brutas normalmente têm contaminação fúngica de 10^4 g⁻¹ e bacteriana de 10^5 g⁻¹, considerando os contaminantes mais comuns o

Aspergillus e *Penicillium*, esporos do gênero *Bacillus* e algumas vezes *Micrococcus* e *Staphylococcus* spp.

Devido às exigências da Agência Nacional de Vigilância Sanitária frente aos laboratórios de manipulação para que estes realizassem o controle microbiológico das matérias-primas de origem vegetal, e ao fato de que a contaminação microbiana pode levar ao comprometimento do desempenho do produto e, conseqüentemente, a prejuízos a saúde do paciente, esse trabalho teve como objetivo avaliar a qualidade microbiológica das matérias-primas de drogas vegetais comercializados na região de Santa Maria.

MATERIAL E MÉTODO

Amostras

Foram avaliadas 40 amostras de matérias-primas vegetais (drogas *in natura*) comercializadas na região central do Rio Grande do Sul. As amostras, descritas a seguir, foram escolhidas pela disponibilidade comercial e popularidade de uso, Agar agar pó - *Gellidium cartilagineum* (Linné) Gaillon (Gelidiaceae), *Gracilaria confervoides* (Linné) Greville (Sphaerococcaceae) - 2 lotes; Alcachofra Extrato seco - *Cynara scolymus* (Asteraceae) - 4 lotes; Aloína pó - *Aloe vera* (Liliaceae) - 1 lote; Boldo extrato seco - *Peumus boldus* (Monimiaceae) - 1 lote; Carqueja extrato seco - *Baccharis trimera* (Less.) DC. (Asteraceae) - 1 lote; Cáscara Sagrada extrato seco - *Rhamnus purshiana* (Rhamnaceae) - 1 lote; Castanha da Índia extrato seco - *Aesculus hippocastanum* (Hippocastanaceae) - 3 lotes; Caraluma extrato seco - *Caraluma fimbriata* (Asclepiadaceae) - 1 lote; Catuaba pó - *Anemopaegma mirandum* (Bignoniaceae) - 1 lote; Cavalinha extrato seco - *Equisetum* sp (Equisetaceae) - 1 lote; Centella-asiática pó - *Hydrocotyle asiatica* L. (*Centella asiatica* Urban) (*H. hebecarpa* A.) (Umbiliferas) - 1 lote; Chá Branco Extrato seco - *Camellia sinensis* (Theaceae) - 1 lote; Espinheira-santa extrato seco - *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae) - 1 lote; Fucus-vesiculosos extrato seco - *Fucus vesiculosus* L. (Fucaceae) - 1 lote; Garcínia pó - *Garcinia cambogia* (Guttiferaceae ou Clusiaceae) - 1 lote; Ginkgo-biloba extrato seco - *Ginkgo biloba* L. (Ginkgoaceae) - 3 lotes; Ginseng-coreano extrato seco - *Panax ginseng* C.A. Mey (Araliaceae) - 1 lote; Guaraná pó - *Paullinia cupana* Kunth (Sapindaceae) - 1 lote; Hipérico extrato seco - *Hypericum perforatum* (Hipericaceae) - 2 lotes; Isoflavona pó - *Glycine max* (L.) Merr. (Fabaceae) - 2 lotes; Maracujá extrato seco - *Passiflora alata* Dryand (Passifloraceae) - 2 lotes; Panax-ginseng extrato seco - *Panax ginseng* C.A. Mey (Araliaceae) - 1 lote; Pata-de-vaca pó - *Bauhinia forficata* Link. (Fabaceae) - 1 lote; Quebra-pedra extrato seco - *Phyllanthus urinaria* L. (Euphorbiaceae) - 1 lote; Rutina pó - *Ruta*

graveolens L. (Rutaceae) - 2 lotes; Sene extrato seco - *Cássia senna* e *Cássia angustifolia* (Leguminosae) - 1 lote; Unha-de-gato extrato seco - *Uncaria tomentosa* (Wild) DC. (Rublacaeae) - 1 lote; Valeriana extrato seco - *Valeriana officinalis* L. (Valerianaceae) - 1 lote.

Contagem total de microrganismos viáveis

Os testes de contagem total de microrganismos viáveis foram realizados conforme a Farmacopéia Brasileira, parte I (1988). Para estes testes porções de 10 g de amostra foram transferidas para balões volumétricos de 100 mL e diluídas com tampão fosfato pH 7,2 (1/10). Transferiu-se 10 mL da solução 1/10 para balão volumétrico de 100 mL e completou-se o volume com o mesmo diluente (1/100). Diluiu-se 10 mL da solução 1/100 para balão volumétrico de 100 mL e completou-se o volume com o tampão fosfato pH 7,2 (1/1.000).

Para a execução do método de contagem em placas para bactérias adicionou-se 1 mL da amostra e 15 mL do *Meio I (Ágar caseína-soja)* liquefeito a 45°C, em placas de Petri (100 x 20 mm). A amostra foi diluída de maneira que não ultrapassasse 300 colônias por placa. Foram preparadas duas placas de Petri para cada diluição (1/10, 1/100, 1/1000) e estas foram incubadas a 30-35°C, por 4 dias.

Para a execução do método de contagem em placas para fungos adicionou-se 1 mL da amostra e 15 mL do *Meio II (Ágar sabourand dextrose)* liquefeito a 45°C, em placas de Petri (100 x 20 mm). A amostra foi diluída de maneira que não ultrapassasse 100 colônias por placa. Foram preparadas duas placas de Petri para cada diluição (1/10, 1/100, 1/1000) e estas foram incubadas a 20-25°C, por 7 dias.

Após a incubação foi efetuada a média aritmética do número de colônias por placa e a partir dos valores, obteve-se o número de microrganismos

por grama, multiplicando-se pela diluição usada. Os resultados foram expressos em unidades formadoras de colônias (UFC).

Pesquisa e identificação de patógenos

O método de pesquisa e identificação de patógenos foi realizado conforme descrito na Farmacopéia Brasileira, parte I (1988).

Em primeiro lugar foi realizado o enriquecimento não seletivo nas amostras que obtiveram crescimento no meio I. Neste teste transferiu-se 3,33 g da amostra para frasco contendo 100 mL de caldo de enriquecimento e incubou-se, a 30-35°C, durante 48 horas.

Após este primeiro procedimento foram realizadas as etapas da fase seletiva, onde quando resultado foi positivo nos meios seletivos, se prosseguia os testes confirmatórios respectivos. A seguir estão descritos os testes seletivos e confirmatórios para cada microrganismo.

Pseudomonas aeruginosa

Transferiu-se, com auxílio de alça de platina, o material enriquecido no meio não seletivo, para placa de Petri contendo ágar cetrímida, usando o método de estrias em superfície. A placa foi incubada a 36°C, durante 48 horas. Quando houve crescimento de colônias neste meio, procedeu-se aos seguintes testes confirmatórios apresentados na Tabela 1.

Staphylococcus aureus

Transferiu-se, com auxílio de alça de platina, o material enriquecido no meio não seletivo, para placa de Petri contendo ágar sal manitol-vermelho de fenol, usando o método de estrias em superfície. A placa foi incubada a 36°C, durante 48 horas. Quando houve crescimento de colônias neste meio, procedeu-se aos seguintes testes confirmatórios apresentados na Tabela 2.

TABELA 1. Testes confirmatórios para *Pseudomonas aeruginosa*.

Teste confirmatório	Análise	Temperatura / Tempo de incubação	Resultado
Citocromo oxidase	Adicionou-se uma gota de solução aquosa a 1% (p/V) de cloridrato de <i>n,n</i> -dimetil- <i>p</i> -fenilenodiamina na colônia suspeita.	Temperatura ambiente - sem incubação	Analisou-se se houve a coloração da colônia.
Produção de fluoresceína	Incubou-se colônia em tubo contendo ágar inclinado para detecção de fluoresceína.	30-37°C - 24 horas	Analisou-se se houve a produção de fluoresceína na luz ultravioleta de 328 a
Crescimento à 41°C	Incubou-se colônia em tubo contendo ágar inclinado de infusão cérebro e coração.	41°C - 48 horas	210 nm Analisou-se se houve crescimento microbiano

TABELA 2. Testes confirmatórios para *Staphylococcus aureus*.

Teste confirmatório	Análise	Temperatura / Tempo de incubação	Resultado
Coloração de Gram	Transferiu-se a colônia suspeita do meio seletivo para lâmina de microscopia e procedeu-se aos testes de coloração de Gram.	Temperatura ambiente- sem incubação	Analisou-se os grupamentos no microscópio, para identificar se eram Gram-positivos.
Coagulase +	Inocularam-se as colônias suspeitas em liofilizado de plasma de coelho reconstituído.	Banho-maria a 30-37°C-2, 4 e 24 horas	Observou-se se houve ou não a formação de gel.
Desoxirribonuclease	Inoculou-se a colônia suspeita em tubo contendo agar para teste de desoxirribonuclease com verde de metila inclinado.	30-37°C - 18 horas	Analisou-se se houve crescimento microbiano. Comparou-se com um controle positivo.

Salmonella sp.

Transferiu-se, com auxílio de alça de platina, o material enriquecido no meio não seletivo, para placa de Petri contendo ágar verde brilhante de fenol, usando o método de estrias em superfície. A placa foi incubada a 36°C, durante 48 horas. Inoculou-se uma colônia suspeita em 100 mL de caldo digesto pancreático de caseína e incubou-se a 30-37°C de 24 a 48 horas, adicionando-se após a incubação 0,5 mL do Reagente de Kovak. Reação negativa é típica de *Salmonella* sp. Quando houve crescimento de colônias no meio ágar verde brilhante de fenol, procedeu-se aos seguintes testes confirmatórios apresentados na Tabela 3.

Escherichia coli

Transferiu-se, com auxílio de alça de platina, o material enriquecido no meio não seletivo, para placa de Petri contendo ágar Mac Conkey, usando o método de estrias em superfície. A placa foi incubada de 30-37°C, durante 48 horas. Quando houve

crescimento de colônias neste meio, as mesmas foram transferidas para tubo de ensaio contendo ágar peptona-ferro, perfurando-se a base não inclinada com fio reto, passando-se pela superfície inclinada e a placa foi incubada na temperatura entre 30-37°C, durante 24 horas. Outra colônia foi transferida para placa de Petri contendo ágar de eosina-cloreto de metilitionínio (EMB) e incubada por 24 horas, a 30-37°C. Quando o resultado foi positivo nos ensaios anteriores, procedeu-se aos seguintes testes confirmatórios apresentados na Tabela 4.

RESULTADO E DISCUSSÃO**Contagem total de microrganismos viáveis**

A contagem total de microrganismos viáveis é um método capaz de determinar o número de bactérias e fungos presentes em produtos e matérias-primas não-estéreis. O método consiste na contagem da população de microrganismos que apresentem

TABELA 3. Testes confirmatórios para *Salmonella* sp.

Teste confirmatório	Análise	Temperatura / Tempo de incubação	Resultado
Ágar tríplice açúcar-ferro	Incubou-se uma colônia suspeita em tubo contendo ágar tríplice açúcar-ferro.	30-37°C - 24 horas	Analisou-se se houve alteração de cor no meio.
Lisina-descarboxilase	Incubou-se uma colônia suspeita para um tubo com ágar de lisina-ferro inclinado.	30-37°C - 24 horas	Analisou-se se houve alteração de cor no meio.
Crescimento a partir de citrato como única fonte de carbono	Incubou-se uma colônia suspeita para tubo com ágar citrato de Simmons inclinado.	30-37°C - 4 dias	Analisou-se se houve alteração de cor no meio.
Urease	Incubou-se uma colônia suspeita em tubo com ágar uréia inclinado.	30-37°C - 4 dias	Analisou-se a presença de urease.
Fermentação da Lactose	Incubou-se uma colônia suspeita em tubo com caldo de lactose.	30-37°C - 24 horas	Analisou-se se houve alteração no meio.

TABELA 4. Testes confirmatórios para *Escherichia coli*.

Teste confirmatório	Análise	Temperatura / Tempo de incubação	Resultado
Ágar Tríplice Açúcar-Ferro	Incubou-se uma colônia suspeita do meio EMB em tubo com ágar tríplice açúcar-ferro inclinado.	30-37°C - 24 horas	Analisou-se o crescimento microbiano e a formação de gás.
Teste de Indol	Incubou-se uma colônia suspeita do meio EMB em tubo de ensaio contendo caldo digesto pancreático.	30-37°C - 48 horas	Adicionou-se o 0,5 mL de reagente de Kovac, agitando o tubo suavemente. Verificou-se a coloração formada.
Teste de Vermelho de Metila	Incubou-se uma colônia do meio EMB em tubo com caldo vermelho de metila Voges-Proskauer.	30-37°C - 18 a 48 horas	Adicionou-se 15 gotas do indicador vermelho de metila. Verificou-se a coloração formada.
Teste de Voges-Proskauer	Incubou-se uma colônia do meio EMB em tubo com caldo vermelho de metila Voges-Proskauer.	30-37°C - 24 horas	Adicionou-se 4 mL do reagente de Voges-Proskauer, incubando novamente, de 35 a 37°C/1 hora. Verificou-se a coloração formada.
Crescimento a partir de Citrato como única fonte de Carbono	Incubou-se uma colônia do meio EMB em tubo com ágar citrato Simmons inclinado.	30-37°C - 4 dias	Analisou-se o crescimento microbiano.

crescimento visível em 4 dias, em ágar caseína soja (*Meio I*) a 30-35°C e em ágar sabouraud-dextrose (*Meio II*) a 20-25°C, em 7 dias (Farmacopéia Brasileira, 1988).

Foi evidenciado crescimento bacteriano nas seguintes amostras: Agar-agar - lote 1 (650 UFC g⁻¹); Alcachofra - lote 2 (10 UFC g⁻¹); Alcachofra - lote 3 (30 UFC g⁻¹); Aloína (70 UFC g⁻¹); Castanha-da-Índia - Lote 1 (140 UFC g⁻¹); Castanha-da-Índia - lote 3 (40UFC g⁻¹); Catuaba (55 UFC g⁻¹); Caraluma (567 UFC g⁻¹); Garcínia (30 UFC g⁻¹); Isoflavona - lote 1 (10 UFC g⁻¹); Maracujá - lote 1 (1833 UFC g⁻¹); Maracujá - lote 2 (407 UFC g⁻¹) e Unha-de-gato (487 UFC g⁻¹). As outras amostras obtiveram resultados < 10 UFC g⁻¹.

Para o meio II, foram evidenciados crescimentos nas placas contendo as amostras de: Agar-agar - lote 1 (900 UFC g⁻¹); Agar-agar - lote 2 (10 UFC g⁻¹); Alcachofra - lote 1 (10 UFC g⁻¹); Alcachofra - lote 4 (10 UFC g⁻¹); Boldo (55 UFC g⁻¹); Castanha-da-índia - lote 1 (413 UFC g⁻¹); Castanha-da-índia - lote 2 (10 UFC g⁻¹); Catuaba (55 UFC g⁻¹); Cavalinha (100 UFC g⁻¹); Centella-asiática (40 UFC g⁻¹); Caraluma (20 UFC g⁻¹); Espinheira-santa (505 UFC g⁻¹); Fuccus-vesiculosos (500 UFC g⁻¹); Castanha-da-índia - lote 1 (550 UFC g⁻¹); Hipérico - lote 1 (10 UFC g⁻¹); Isoflavona - lote 1 (10 UFC g⁻¹); Isoflavona - lote 2 (55 UFC g⁻¹); Maracujá - lote 1 (460 UFC g⁻¹); Maracujá - lote 2 (55 UFC g⁻¹); Pata-de-vaca (10 UFC g⁻¹); Quebra-pedra (550 UFC g⁻¹); Rutina - lote 1 (20 UFC g⁻¹); Rutina - lote 2 (100 UFC g⁻¹) e Unha-de-gato (50 UFC g⁻¹). As outras amostras obtiveram o resultado <10 UFC g⁻¹

para este teste.

Segundo a British Pharmacopoeia (2005), os limites permitidos para bactérias são de 10⁵ UFC g⁻¹ e para fungos 10⁴ UFC g⁻¹. Nenhuma das amostras ultrapassou o limite máximo permitindo, estando todas aprovadas.

É importante ressaltar que, devido a carga microbiana já existente nas plantas pela flora saprófita e patogênica, além daqueles provenientes do solo, da água e do ar, algumas empresas distribuidoras de matérias primas utilizam procedimentos de descontaminação dos produtos (Satomi et al., 2005).

O procedimento de irradiação, utilizado por algumas distribuidoras, pode ter levado a aprovação de algumas amostras neste trabalho. No entanto, ao verificar os laudos das matérias primas foi observado que este processo para diminuição dos microrganismos foi realizado em somente 11 das 40 amostras, o que indica que este procedimento pode sim auxiliar na diminuição dos microrganismos viáveis nas drogas, no entanto não foi largamente utilizado pelas distribuidoras nestas matérias primas.

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária regulamentou o registro de fitoterápicos na RDC nº 48, de 16 de março de 2004, onde ressalta que os procedimentos de descontaminação requerem estudos relacionados à estabilidade dos princípios ativos dos produtos após a exposição a tais procedimentos.

Conforme Satomi e colaboradores (2005), o método de irradiação é eficaz na redução da carga

microbiana para as drogas vegetais além de não causarem alterações no teor dos marcadores adotados. Podendo então ser considerado seguro para a redução de microrganismos sem afetar os metabólitos das plantas.

Pesquisa e identificação de patógenos

O teste de pesquisa e identificação de patógenos é um método que permite a detecção da presença de células viáveis de *Salmonella* sp., *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, que devem estar ausentes em produtos farmacêuticos não estéreis.

As seguintes amostras analisadas apresentaram crescimento no meio I (não-seletivo): Ágar Ágar (lote 1); Alcachofra (lote 2); Alcachofra (lote 3); Aloína; Castanha-da-índia (lote 1); Castanha-da-índia (lote 3); Catuaba; Caraluma; Garcínia; Isofavona (lote 1); Maracujá (lote 1); Maracujá (lote 2) e Unha-de-gato (lote 1).

As amostras que apresentaram crescimento no enriquecimento não seletivo, foram semeadas nos meios ágar cetrimida, ágar verde brilhante, ágar sal manitol vermelho de fenol e ágar Mac Conkey que são seletivos para *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* sp., *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, respectivamente. Das 13 amostras testadas, duas apresentaram crescimento no meio ágar cetrimida, três no ágar verde brilhante, sete no ágar manitol vermelho de fenol e uma no ágar Mac Conkey, sendo necessária a realização das fases confirmatórias, conforme demonstrado na Tabela 5.

Fase confirmatória

Pseudomonas aeruginosa

Para que o teste citocromo oxidase possa ser considerado positivo, as colônias suspeitas devem

desenvolver coloração rósea, que passam a marrom, vermelho escuro e negro entre 10 e 30 minutos. Nenhuma das amostras analisadas obteve resultado positivo para esse teste. A fluoresceína pode ser detectada pela presença de fluorescência no ágar, quando observado à luz ultravioleta, no comprimento de onda entre 328 e 210 nm. O crescimento a 41°C pode ser considerado positivo quando após o tempo de incubação, pode-se visualizar a presença de cepas. Ambas as amostras apresentaram resultado positivo para a presença de fluoresceína e crescimento a 41°C.

Conforme demonstrado na Tabela 6, nenhuma das amostras apresentou resultado positivo para os três testes confirmatórios a que foram submetidos, motivo pelo qual podemos sugerir que não há presença de *Pseudomonas aeruginosa*, nos produtos analisados (Farmacopéia Brasileira, 1988).

Staphylococcus aureus

As sete amostras analisadas apresentaram resultado negativo para os testes confirmatórios de coloração de Gram e coagulase. No teste de coloração de Gram, identificam-se a presença de microrganismos Gram positivos, quando se visualiza, no microscópio, agrupamentos semelhantes a cachos de uva. O teste de coagulase pode ser considerado positivo quando se observa a formação de gel no liofilizado de plasma de coelho. As amostras de alcachofra (lote 3), aloína, catuaba, garcínia e maracujá (lote 1) apresentaram a formação de uma zona incolor ao redor do crescimento das colônias, sendo o teste considerado positivo para esses cinco produtos.

Conforme demonstrado na Tabela 7, nenhuma das amostras apresentou resultado positivo para os três testes confirmatórios a que foram submetidos, não havendo a presença de *Staphylococcus aureus*, nos produtos (Farmacopéia Brasileira, 1988).

TABELA 5. Resultados obtidos na fase seletiva para a pesquisa e identificação de patógenos.

	Amostras	Ágar cetrimida	Ágar verde brilhante	Ágar sal manitol vermelho de fenol	Ágar Mac Conkey
Agar Agar - lote 1	x			x	
Alcachofra - lote 2			x		
Alcachofra - lote 3			x		
Aloína			x		
Caraluma			x		
Castanha-da-índia - lote 1		x			
Castanha-da-índia - lote 3					
Catuaba			x		
Garcínia			x		
Isoflavona - lote 1					
Maracujá - lote 1		x	x		
Maracujá - lote 2					
Unha-de-gato	x	x			

TABELA 6. Resultados obtidos na fase confirmatória para *Pseudomonas aeruginosa*.

Amostra	Citocromo oxidase	Fluoresceína	Crescimento a 41°C
Agar-agar - lote 1	negativo	positivo	positivo
Unha-de-gato - lote1	negativo	positivo	positivo

TABELA 7. Resultados obtidos na fase confirmatória para *Staphylococcus aureus*.

Amostras	Coloração de Gram	Coagulase	Desoxirribonuclease
Alcachofra - lote 2	negativo	negativo	negativo
Alcachofra - lote 3	negativo	negativo	positivo
Aloína	negativo	negativo	positivo
Caraluma	negativo	negativo	negativo
Catuaba	negativo	negativo	positivo
Garcínia	negativo	negativo	positivo
Maracujá - lote 1	negativo	negativo	positivo

Salmonella sp.

As amostras de castanha-da-índia (lote 1) e maracujá (lote 1) apresentaram reação alcalina, cor vermelha na parte superior e inclinada, e ácida, cor amarelada na base, sendo considerado positivo para o teste confirmatório de ágar tríplice açúcar-ferro. O teste de ágar de lisina-ferro é positivo quando a cor do meio se altera para púrpura (reação alcalina). Essa reação aconteceu em todos os produtos analisados.

Nenhuma das amostras foi positiva para o teste de citrato como única fonte de carbono, pois não houve a formação de colônias e a cor do meio, na parte inclinada, não mudou para azul. As amostras

de castanha da índia (lote 1) e maracujá (lote 1), produziram urease e a de maracujá (lote 1) e unha-de-gato fermentaram a lactose, o que não é característico para a maioria das cepas de *Salmonella sp.*

Conforme demonstrado na Tabela 8, nenhuma das amostras apresentou resultados positivos para os cinco testes confirmatórios, o que indica a ausência de *Salmonella sp.*, nos produtos analisados.

Escherichia coli

O teste de inoculação de colônia suspeita em ágar peptona-ferro visa verificar se a bactéria produz ou não de gás sulfídrico (H₂S) e no ágar eosina-cloreto

TABELA 8. Resultados obtidos na fase confirmatória para *Salmonella sp.*

	Ágar TSI	Lisina descarboxilase	Citrato	Urease	Lactose
Castanha da Índia - lote 1	positivo	positivo	negativo	positivo	negativo
Maracujá - lote 1	negativo	positivo	negativo	positivo	positivo
Unha de gato	positivo	positivo	negativo	negativo	positivo

de metilitionínio, se há o crescimento de colônias pretas, esverdeadas e brilhantes. A amostra de Agar-agar (lote 1), produziu gás e não foi evidenciado o crescimento de colônias pretas, esverdeadas e brilhantes, excluindo-se a possibilidade da presença de *Escherichia coli*, não sendo necessário a realização dos testes confirmatórios.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos mostraram que há presença microrganismos nas amostras, entretanto,

em nenhuma delas, o valor de UFC g⁻¹ ultrapassou o limite estabelecido para fitoterápicos na Farmacopéia Britânica (2005), tanto para bactérias como para fungos.

O procedimento de irradiação pode levar a diminuição na carga microbiológica nas amostras, o que auxilia no controle microbiológico das mesmas, no entanto não foi amplamente utilizado pelas empresas que manufaturaram as drogas vegetais analisadas neste trabalho.

O teste de pesquisa e identificação de patógenos mostrou que não havia a presença de

Pseudomonas aeruginosa, *Salmonella* sp., *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, nas amostras analisadas.

REFERENCIA

- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 67, de 08 de outubro de 2007. Boas práticas de manipulação de medicamentos para uso humano em farmácias. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2006.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 14, de 31 de março de 2010. Dispõe sobre o registro de Medicamentos Fitoterápicos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2010.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária. Diretoria Colegiada. Resolução n. 48 de 16 de março de 2004. **Diário Oficial**, Brasília, DF, 18 de março de 2004. Seção 1, v.53, p.39-41.
- BRITISH PHARMACOPOEIA. London: Her Majesty's Stationery Office, 2005. 1 CD-ROM.
- BUGNO, A. et al. Avaliação da contaminação microbiana em drogas vegetais. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.41, n.4, p.491-7, 2005.
- CFF - CONSELHO FEDERAL DE FARMÁCIA. Estabilidade dos medicamentos após abertura. **Pharmacia Brasileira**, n.3, p.49-50, 2005.
- FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4.ed. São Paulo: Atheneu, 1988.
- FURLANETO, L.; MARINS, V.D.; ENDO, R. Qualidade microbiológica de drogas vegetais comercializadas nas ruas da cidade de Londrina/PR e seus infusos. **Saúde em Revista**, v.5, n.10, p.49-52, 2003.
- MELO, J.G. et al. Qualidade de produtos a base de plantas medicinais comercializados no Brasil: castanha-da-índia (*Aesculus hippocastanum* L.), capim-limão (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf.) e centela (*Centella asiatica* (L.) Urban). **Acta Botânica Basílica**, v.21, n.1, p.27-36, 2007.
- PINTO, T.J.A.; KANEKO, T.M.; OHARA, M.T. **Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos**. 2.ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2003. 325p.
- ROCHA, L.O.; SOARES, M.M.S.R.; CORRÊA, C.L. 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 de Ciências Farmacêuticas**, v.40, n.4, p.521-7, 2004.
- SATOMI, L.C.; SORIANI, R.R.; PINTO, T.J.A. Descontaminação de drogas vegetais empregando irradiação gama e óxido de etileno: aspectos microbianos e químicos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.41, n.4, p.445-50, 2005.
- SOUSA, A.L. et al. Determinação do teor de omeprazol por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em matérias-primas e produtos acabados. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.2, n.2, supl., p.206-9, 2005.
- SOUZA, T.P.; LIONZO, M.I.Z.; PETROVICK P.R. Avaliação da redução da carga microbiana de droga vegetal através do processamento tecnológico: decocção e secagem por aspersão. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, n.1, p.94-8, 2006.