

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Sarah de Miranda Faria

AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE FITOTERÁPICOS

Rio de Janeiro

2011

Sarah de Miranda Faria

AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE FITOTERÁPICOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito para obtenção do título de Mestre em Vigilância Sanitária.

Orientador: Victor Augustus Marin

Rio de Janeiro

2011

Catálogo na fonte
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
Biblioteca

Faria, Sarah de Miranda

Avaliação microbiológica de fitoterápicos/ Sarah de Miranda Faria. – Rio de Janeiro: INCQS / FIOCRUZ, 2011.

66 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária)– Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde. Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, 2011.

Orientador: Victor Augustus Marin

1. Medicamentos Fitoterápicos. 2. Contaminação de Medicamentos. 3. Controle de Qualidade. I. Título

Microbiological evaluation of phytoterapics

Sarah de Miranda Faria

AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE FITOTERÁPICOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito para obtenção do título de Mestre em Vigilância Sanitária.

Aprovado em

Fabio Coelho Amendoeira (Doutor)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Nancy dos Santos Barbi (Doutora)
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Rinaldini C. Philippo Tancredi (Doutor)
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro

Victor Augustus Marin (Doutor) - Orientador
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro

Aos meus pais Heraldo e Ondina
A minha prima Andressa e seu esposo Sergio

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus pela dádiva da minha existência.

Aos meus pais Heraldo Gomes de Faria e Ondina Valadares Miranda de Faria, me deram o exemplo de perseverança e me apoiaram em todas as etapas do caminho.

As amigas Hilda do Nascimento Nóbrega e Claudia Flores, pela compreensão e companheirismo.

Ao orientador Dr. Victor Augustus Marin, que me orientou em cada etapa desse trabalho.

A amiga Joana Angélica, por ter aberto as portas do Laboratório de Produtos Não-estereis para realização da pesquisa, pelos constantes ensinamentos durante a realização da pesquisa e pela inestimável amizade.

A prima Andressa e seu esposo Sergio pelo incentivo.

Ao Programa de Pós-Graduação do INCQS e seus professores, pela dedicação e melhoria do Programa.

Apoio financeiro: INCQS/FIOCRUZ

RESUMO

Os fitoterápicos têm sido utilizados desde a antiguidade para o tratamento de uma gama de enfermidades e a comercialização destes produtos encontra-se em expansão em todo o mundo. No Brasil tendo em vista a ampla diversidade de plantas existentes, o governo vem incentivando o aumento do mercado destes produtos. Como precaução deve-se avaliar sua segurança e eficácia sendo este procedimento de suma importância para a saúde pública. Assim, com o objetivo de avaliar microbiologicamente os medicamentos fitoterápicos derivados de dez espécies vegetais com maior número de registro na Agência Nacional de Vigilância Sanitária e com maior comercialização e relevância para o Sistema Único de Saúde - SUS, o presente estudo utilizou como parâmetros a contagem total de bactérias aeróbias, contagem de bolores e leveduras, contagem total de outras enterobactérias e a identificação dos micro-organismos. Os resultados das contagens revelaram que 80% do total das amostras avaliadas estavam insatisfatórias em relação aos limites estabelecidos pela Farmacopéia Brasileira. Foram identificadas dezenove espécies diferentes de micro-organismos que se dividiam em dezessete espécies de bactérias e duas de fungos. A comparação dos resultados com estudos anteriores permite a conclusão que a contaminação em fitoterápicos é um problema que vem persistindo ao longo do tempo. E que o monitoramento microbiológico fornece base para ações de Vigilância Sanitária tornando-se assim uma ferramenta útil para melhorar a qualidade e garantir a segurança e a eficácia destes produtos.

Descritores: Avaliação Microbiológica de fitoterápicos. Contaminação de fitoterápicos. Controle de qualidade. Contaminação microbiológica de medicamentos.

ABSTRACT

The phytoterapics have been used since antiquity to treat a range of illnesses and marketing of these products is growing worldwide. In Brazil, in view of the wide diversity of existing plants, the government is encouraging the growth of the market for these products. As a precaution, you should evaluate its safety and efficacy of this procedure is critical to public health. Thus, in order to assess microbiologically herbal medicines derived from ten plant species with the highest number of records in the National Agency for Sanitary Vigilance and greater marketing and relevance to the Health System-SUS, this study used as parameters to count total aerobic bacteria, yeast and mold count, total count of enterobacteria and other identification of micro-organisms. The results of the counts revealed that 80% of unsatisfactory samples were evaluated in relation to the limits established by the Brazilian Pharmacopoeia. Were identified twenty-one different species of micro-organisms were divided into nineteen species of bacteria and two of fungi. Comparisons of results with previous studies support the conclusion that the contamination in herbal medicines is a problem that has persisted over time. And that provides the basis for microbiological monitoring health surveillance thus becoming a useful tool to improve quality and ensure the safety and efficacy of these products.

Keywords: Microbiological evaluation of herbal medicines. Contamination of herbal medicines. Quality control. Microbial contamination of medications.

LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

SUS – Sistema Único de Saúde

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz

OMS – Organização Mundial da Saúde

INCQS – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

CEME – Central de Medicamentos

CIPLAN - Comissão Interministerial de Planejamento e Coordenação

COMAFITO - Comissão Técnica e Multidisciplinar de Elaboração e Atualização da Relação Nacional de Plantas Medicinal e Fitoterápico

OMS – Organização Mundial de Saúde

VISA – Vigilância Sanitária

UFC – unidade Formadora de colônia

TSI – Ágar triplo açúcar ferro

POP – Procedimento operacional padrão

RDC – Resolução de Diretoria Colegiada

RE – Resolução

IN – Instrução Normativa

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1:	Contagem de Bactérias Aeróbias Totais	36
Esquema 2:	Contagem Total de Bolores e Leveduras	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Espécies vegetais utilizadas neste trabalho com o seu nome popular.	29
Tabela 2:	Resultados das contagens de bactérias aeróbias, outras enterobactérias , bolores e leveduras.	39
Tabela 3:	Identificação bioquímica dos micro-Organismos isolados nas amostras de fitoterápicos.	42

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1 FITOTERAPIA E O SISTEMA ÚNICO DE SAÚDE (SUS)	17
1.2 BREVE HISTÓRICO DE QUALIDADE DOS FITOTERÁPICOS NO BRASIL	20
1.3 FITOTERÁPICOS NO ÂMBITO DA VIGILÂNCIA SANITÁRIA	23
1.4 ASPECTOS DA LEGISLAÇÃO	24
2. OBJETIVO	27
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
3. METODOLOGIA	28
3.1 DETERMINAÇÃO DAS AMOSTRAS	28
3.2 MANIPULAÇÃO DAS AMOSTRAS	30
3.5. VERIFICAÇÃO DA CAPACIDADE INIBITÓRIA	31
3.4. PREPARO DAS AMOSTRAS	32
3.5 EXECUÇÃO DO ENSAIO	32
3.5.1. CONTAGEM DAS COLÔNIAS	33
3.5.2. CONTROLE DO ENSAIO	33
3.6 IDENTIFICAÇÕES DOS MICRO-ORGANISMOS	34
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
4.1. CONTAGENS DAS BACTÉRIAS AERÓBIAS, OUTRAS ENTEROBÉCTERIAS, BOLORES E LEVEDURAS	38
4.2 IDENTIFICAÇÕES DOS MICRO-ORGANISMOS.	41
5. CONCLUSÕES	51
REFERÊNCIAS	53
ANEXOS	61

1. INTRODUÇÃO

Desde os tempos imemoriais o homem procura na natureza recursos para melhorar sua condição de vida, conseqüentemente aumentando suas chances de sobrevivência. O uso de plantas para alimentação humana sempre existiu e com o passar do tempo as civilizações primitivas perceberam sua outra finalidade, estas ao serem experimentadas no combate a doenças mostraram um potencial curativo, mesmo que empiricamente, demonstrando um maior ou menor grau de toxidez (FERREIRO, 2006).

Como resultado desse processo as plantas denominadas medicinais têm sido utilizadas desde a antiguidade para o tratamento de uma gama de enfermidades, logo, referências históricas descrevem o uso de plantas medicinais em praticamente todas as antigas civilizações, sendo considerada a primeira citação a obra chinesa Pen Ts'ao ("A Grande Fitoterapia"), de Shen Nung, que remonta a 2800 a.C.(TOMAZZONI, NEGRELLE, CENTA, 2006). No Brasil a utilização de plantas medicinais como forma terapêutica deu-se através da assimilação dos conhecimentos indígenas com a contribuição da cultura trazida por escravos e imigrantes, o que resultou no surgimento de uma medicina popular rica e original, no qual o emprego de plantas medicinais ocupa um lugar de destaque (GUERRA et al., 2007).

A maioria dos medicamentos comercializados atualmente origina-se de produtos naturais, em especial as plantas. Estima-se que cerca de 40% dos medicamentos disponíveis na terapêutica moderna foram desenvolvidos direta ou indiretamente a partir de fontes naturais, sendo 25% de espécies vegetais. Entre os anos de 1989 e 1994 cerca de 200 medicamentos aprovados pela agência reguladora americana de controle de medicamentos e alimentos (FDA) foram desenvolvidos através de produtos naturais (PAIXÃO et al., 2004).

Por definição, denominam-se plantas medicinais aquelas que são tradicionalmente utilizadas pela população para prevenir, aliviar ou curar enfermidades. Após passarem por processamento dão origem a um tipo especial de medicamento, os fitoterápicos (CARVALHO et al., 2007). De acordo com a legislação sanitária, fitoterápicos são medicamentos produzidos utilizando exclusivamente matérias-primas ativas vegetais,

(extrato, tintura, óleo, cera, exsudato, suco e outros), caracterizados pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso. Como todos os medicamentos, devem oferecer garantia de qualidade, ter efeitos terapêuticos comprovados, composição padronizada e segurança de uso para a população. Desta classe de medicamentos excluem-se os que em sua composição contenham substâncias ativas isoladas, de qualquer origem e as associações destas com extratos vegetais (BRASIL, 2010).

No Brasil, estima-se haver em torno de 120.000 espécies de plantas superiores e, devido a esta ampla diversidade de espécies vegetais e à riqueza étnica cultural brasileira, as plantas medicinais ocupam uma posição de destaque na medicina popular para o tratamento de diversas doenças. A comercialização de produtos fitoterápicos encontra-se em expansão em todo o mundo em razão de diferentes fatores como: o alto custo dos medicamentos sintéticos, insatisfação com os resultados obtidos em tratamentos com a medicina convencional, os efeitos indesejáveis e prejuízos causados pelo uso abusivo e/ou incorreto dos medicamentos sintéticos, a falta de acesso aos medicamentos e à medicina institucionalizada, modismo e a crença popular da ausência de efeitos adversos destas formas terapêuticas (HEINZMANN, BARROS, 2007; CALIXTO; 2003). Porém preparações derivadas de plantas, ao contrário do senso comum que atribuem à isenção de efeitos nocivos, podem conduzir a diversos tipos de danos a saúde como reações alérgicas, efeitos adversos e reações tóxicas. (ERNST, PITTLER, 2002; CALIXTO, 2000; DE SMET, 2004; PITTLER, SCHMIDT,ERNST; 2005; VARANDA, 2006; TURILLA, NASCIMENTO, 2006).

Anualmente, no mundo, o mercado consumidor de produtos fitoterápicos movimenta cerca de 22 bilhões de dólares (PINTO et al., 2002; YUNES, PEDROSA, CECHINEL FILHO, 2001). No Brasil, no período de novembro de 2003 a outubro de 2006, este faturou R\$ 1.840.228.655,00 com a venda de 122.696.549 unidades farmacêuticas Estes valores referem-se a fitoterápicos industrializados, não incluindo produtos provenientes de plantas medicinais, drogas vegetais, fitoterápicos manipulados ou produtos registrados como alimentos e cosméticos na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Estas cifras refletem o grande volume de vendas devido ao custo reduzido, ausência de patente e a preferência dos consumidores por tratamentos “naturais” (FREITAS, 2007).

Dados sobre consumo, obtidos na Organização Mundial da Saúde (OMS), indicam que 85% da população mundial utiliza as plantas medicinais para tratar da saúde. Em países em desenvolvimento, 85% das pessoas dependem da medicina complementar para atenderem suas necessidades básicas, neste tipo de medicina está incluída práticas de fitoterapia. (SOLER, 2000). A utilização de produtos fitoterápicos tem uma grande relevância socioeconômica nas populações de baixa renda dada a sua alta disponibilidade, baixo custo e/ou sem ônus se comparados aos medicamentos alopáticos (GUERRA et al.; 2007).

Quanto ao consumo nacional, dados indicam que na região oeste do Rio Grande do Norte em todos os municípios pesquisados (Campo Grande, Caraúbas, Martins e Umarizal) a população utiliza fitoterápicos e 65% dos entrevistados que usaram estes medicamentos pela primeira vez continuam usando-os (GUERRA et al.; 2007). Em estudo realizado com pacientes do programa de geriatria do ambulatório do Hospital Universitário de Brasília demonstrou consumo de plantas medicinais e fitoterápicos por 83,9% dos pacientes sendo citadas 106 espécies de plantas diferentes (PEREIRA, 2008).

Em virtude da expressividade deste comércio e do consumo, em junho de 2006 foi sancionada a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Esta tem por objetivo garantir à população brasileira o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos, promovendo o uso sustentável da biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional (BRASIL, 2006). Como consequência no ano de 2009, o Ministério da Saúde incluiu 71 plantas medicinais à lista de espécies que poderão ser utilizadas como medicamentos fitoterápicos pelo Sistema Único de Saúde, o SUS (BRASIL, 2009). Neste mesmo ano, oito fitoterápicos foram incluídos no Elenco de Referência Nacional de Medicamentos e Insumos Complementares para Assistência Farmacêutica na Atenção Básica (BRASIL, 2009).

Entretanto, o aumento da demanda, associado à falta de fiscalização no processo produtivo pode resultar em medicamentos sem condições adequadas de uso, sem garantia da qualidade, segurança e eficiência fundamentais para a recuperação ou preservação da saúde do consumidor (FARIAS, 1985; CALIXTO, 2000; DE SMET, 2004; ZARONI et al., 2004). A qualidade microbiológica constitui um dos atributos

essenciais para o seu desempenho adequado, principalmente em relação à segurança, eficácia e aceitabilidade destes produtos. Falha nas medidas preventivas e de controle do processo de fabricação pode resultar em produtos inadequados ao consumo. A contaminação microbiana pode levar ao comprometimento do desempenho do produto devido à quebra da estabilidade da formulação, alteração das características físicas e aparência e levar a inativação dos princípios ativos e excipientes da formulação e ainda, causar a perda de confiança na empresa. Além disso, a administração de produtos contaminados pode agravar quadros clínicos de pacientes já debilitados por doenças.(PINTO, KANENKO ,OHARA, 2003).

A segurança e eficácia dos produtos fitoterápicos sofrem influência de vários fatores que incluem a matéria-prima, controle do processamento, forma farmacêutica, bula, embalagem e propaganda. Sob a análise microbiológica, várias pesquisas constataram que os produtos analisados apresentaram níveis de contaminação elevados tornando seu consumo um problema de saúde pública (FICHER, 1992; BUGNO et al., 2005; ZARONI et al., 2005, ZARONI et al., 2004; MELO et al., 2007).

Neste contexto, a vigilância sanitária por ser o seguimento da saúde responsável por eliminar, diminuir ou prevenir os riscos à saúde e intervir nos problemas sanitários decorrentes do meio ambiente, da produção, circulação de bens e prestação de serviços de interesse da saúde, encontra-se dentro das suas competências o controle de qualidade de produtos com finalidades terapêuticas (BRASIL, 1990). A qualidade microbiológica de fitoterápicos é definida por padrões microbianos descritos em compêndios oficiais e normas regulamentadoras estabelecidas de ANVISA. Limites máximos de presença de microorganismos no produto e dentre estes, ausência de determinados patógenos estão estipulados (PINTO, KANENKO, OHARA, 2003).

Assim, este estudo destina-se a contribuir para ampliação do conhecimento sobre a qualidade dos fitoterápicos comercializados no Brasil de relevância para o Sistema Único de Saúde, uma vez que, existem poucos estudos sobre avaliação microbiológica de fitoterápicos na forma medicamentosa.

1.1 FITOTERAPIA E SISTEMA ÚNICO DE SAÚDE (SUS):

A inserção da fitoterapia ao sistema de saúde brasileiro tem seu marco inicial na portaria nº 212 de 11 de setembro de 1981, do ministério da saúde que determinou o estudo de plantas medicinais como prioridade na investigação em saúde (BRASIL, 1981).

Em 1982, a Central de Medicamentos (CEME), criou um programa de pesquisa de plantas medicinais, que possuía a finalidade de desenvolver uma terapêutica alternativa e completar, promovendo o embasamento científico dos medicamentos fitoterápicos através de estudos do valor farmacológico de formulações de uso popular (BRASIL, 1982).

Em continuidade a este processo a 8ª Conferência Nacional de Saúde recomendou a introdução de práticas alternativas à assistência a saúde no âmbito nos serviços de saúde possibilitando ao usuário a escolha da forma terapêutica preferida (CONFERÊNCIA NACIONAL DE SAÚDE, 1986).

A Comissão Interministerial de Planejamento e Coordenação – CIPLAN, em 1988, através da resolução CIPLAN nº 8 regulamentou a implantação da fitoterapia nos serviços de saúde e criou procedimentos e rotinas relativas a sua prática nas unidades assistenciais médicas (BRASIL, 1988).

A realização da 10ª Conferência Nacional de Saúde demonstrou através do seu relatório a necessidade de incorporação ao SUS de práticas de saúde, entre elas a Fitoterapia e que o Ministério da Saúde deveria fomentar incentivo à Fitoterapia na assistência farmacêutica pública e elaborar normas para sua utilização (CONFERÊNCIA NACIONAL DE SAÚDE, 1996).

A primeira proposta de uma Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos ocorreu no ano de 2001, que visava: tornar públicas e expressas as intenções do Governo; permitir o acesso da população em geral e dos formadores de opinião em particular à discussão das propostas de Governo; orientar no âmbito governamental o planejamento de programas, projetos e atividades; funcionar como

orientadora da ação do Governo, reduzindo os efeitos da descontinuidade administrativa e potencializando os recursos disponíveis (AMARAL, et al., 2006).

No ano seguinte, a OMS estabeleceu que fosse criado mecanismos normativos e legais necessários para promover a medicina complementar e manter as boas práticas, e que o acesso fosse equitativo e estivesse assegurada a qualidade, a segurança e a eficácia das terapias. E ainda a garantia dos recursos para a pesquisa, educação e formação (AMARAL, et al., 2006).

Em 2003, o relatório da 12ª Conferência Nacional de Saúde apontou a necessidade de investimento na pesquisa e desenvolvimento de tecnologia para produção de medicamentos a partir da flora brasileira. No mesmo ano ocorreu o Seminário Nacional de Plantas Medicinais, Fitoterápicos e Assistência Farmacêutica promovido pelo Ministério da Saúde que recomendou a inclusão da Fitoterapia no SUS (CONFERÊNCIA NACIONAL DE SAÚDE, 2003).

No ano seguinte o Conselho Nacional de Saúde aprovou a Resolução nº 338. Esta resolução estabelecia a Política Nacional de Assistência Farmacêutica que contempla, em seus eixos estratégicos, a “definição e pactuação de ações intersetoriais que visam à utilização das plantas medicinais e de medicamentos fitoterápicos no processo de atenção à saúde, com respeito aos conhecimentos tradicionais incorporados, embasamento científico, adoção de políticas de geração de emprego e renda, qualificação e fixação de produtores, envolvimento dos trabalhadores em saúde no processo de incorporação dessa opção terapêutica e baseada no incentivo à produção nacional, com a utilização da biodiversidade existente no País (BRASIL, 2004).

Ainda em 2004, a Política Nacional de Ciência, Tecnologia e Inovação em Saúde incluiu a Fitoterapia como área de interesse, na perspectiva de pesquisa e desenvolvimento de novos produtos para tratamento, prevenção e promoção da saúde. A realização da 1ª Conferência Nacional de Medicamentos e Assistência Farmacêutica, no ano de 2005 aprovou 48 recomendações, entre elas a implantação de programas para uso de medicamentos fitoterápicos nos serviços de saúde (AMARAL, et al., 2006).

Em 2006 ocorreram dois marcos importante para fitoterapia no âmbito do SUS, primeiro a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares para o SUS

(Portaria nº 971/GM/MS) propôs a implementação de ações e serviços relativos à Fitoterapia/Plantas Medicinais pelas Secretarias de Saúde dos Estados, do Distrito Federal e dos Municípios nos sistemas de atenção à saúde. O segundo foi a aprovação da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos através do Decreto nº 5.813. Esta política visava o desenvolvimento de toda a cadeia produtiva de plantas medicinais e fitoterápicos, para atender aos critérios de qualidade, eficácia, eficiência e segurança no uso (BRASIL, 2003; BRASIL, 2006).

No ano seguinte os fitoterápicos foram incluídos no Elenco de Referência de medicamentos e insumos complementares para a assistência farmacêutica na atenção básica em saúde, Portaria nº 3.237/GM/MS (BRASIL, 2007).

A aprovação do Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (Portaria Interministerial nº 2960) aconteceu ano de 2008. Este programa definiu ações, prazos, recursos, ministérios/órgãos gestores e envolvidos, para o desenvolvimento das diretrizes da política e criação do Comitê Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Neste mesmo ano foi publicada a Portaria nº 1.274/GM/MS que institui Grupo Executivo para o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (BRASIL, 2008; BRASIL, 2008).

No ano de 2009 o número de fitoterápicos no Elenco de Referência Nacional de Medicamentos e Insumos Complementares para a Assistência Farmacêutica na Atenção Básica foi ampliada através da aprovação da portaria Portaria nº 2.982/GM/MS (BRASIL, 2009).

Em 2010 foram publicadas pelo Ministério da Saúde duas normas envolvendo fitoterápicos. A Portaria nº 1.102/GM/MS, que constitui a Comissão Técnica e Multidisciplinar de Elaboração e Atualização da Relação Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (COMAFITO), e a Portaria nº 886/GM/MS, que institui a Farmácia Viva no âmbito do SUS (BRASIL, 2010).

1.2. BREVE HISTÓRICO DE QUALIDADE DOS FITOTERÁPICOS NO BRASIL:

O início dos questionamentos sobre a qualidade dos produtos fitoterápicos brasileiros datam das décadas de 30 e 40 (FARIAS et al., 1985). Porém a discussão sobre estes produtos se intensificou nos últimos vinte anos. Quanto à avaliação das plantas medicinais, que são matérias-primas para estes medicamentos, foi desenvolvida no estado de Minas Gerais a análise de vinte e sete amostras de camomila procedentes de farmácias, ervanárias e mercado, abrangendo os parâmetros de identidade, pureza e presença dos constituintes ativos. Foram detectados contaminantes em todas as amostras, havendo insetos presentes em 63%. Somente cerca de metade das amostras apresentou óleos essenciais, necessários à atividade anti-inflamatória da planta. Os constituintes fenólicos de ação espasmolítica estavam presentes em somente 20% das amostras comprometendo assim, sua eficácia (BRANDÃO, FREIRE, VIANA-SOARES, 1998).

Em Piracicaba, São Paulo, foram analisadas 50 amostras de 18 espécies vegetais diferentes: Alcachofra (*Cynara cardunculus* subsp. *Scolymus*), Boldo-do-chile (*Peumus boldus*), Calêndula (*Calendula officinalis*), Carquejô (*Baccharis trimera*), Cáscara sagrada (*Rhamnus purshiana*), Castanha-da-índia (*Aesculus hippocastanum*), Catuaba (*Anemopaegma arvense*), Cavalinha (*Equisetum* ssp.), Centella asiática (*Centella asiatica* L.), Cravo (*Caryophyllus aromaticus*), Canela (*Cinnamomum zeylanicum* Blume), Espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia*), Espirulina (*Spirulina maxima* Setchet Gardner), Fucus (*Fucus vesiculosus*), Ginkgo biloba (*Ginkgo biloba* L.), Guaraná (*Paullinia cupana* Kunth), Levedo-de-cerveja (*Saccharomyces cerevisiae*), Melissa (*Melissa officinalis*), Sene (*Cassia angustifolia*) e Valeriana (*Valeriana officinalis* L.) coletadas em cinco estabelecimentos comerciais. Destas 36% das amostras estavam contaminadas com bolores e leveduras, havendo variação de 10^1 a $4,2 \times 10^3$ UFC/g. A contaminação por bactérias mesófilas aeróbias foi de 58%, com variação de 10^1 a $3,4 \times 10^5$ UFC/g (PAIXÃO, OLIVEIRA, SILVA, 2004).

No Maranhão/MA foi realizada análise de doze espécies de drogas vegetais: entrecasca do caule aroeira (*Myracrodouon urundeuva* All), folhas de boldo (*Peumus boldus* Molina), frutos de cabacinha (*Luffa operculata* Cogn.), folhas de capim-santo (*Cymbopogon citratus* Stapf.), caules alados de carqueja (*Baccharis trimera* Less.), partes aéreas de enxuga (*Alternanthera tenella* Colla), favas de jucá (*Caesalpinia Férrea* Mart.), folhas de melão-de-são-caetano (*Momordica charantia* L.), entrecasca do caule de pau-d'arco-roxo (*Tabebuia avellanedae* Lor. ex Griseb), frutos de romã (*Punica granatum* L.), folhas de sene (*Senna alexandrina* Mill.) e sementes de sucupira (*Bowdichia virgilioides* Kunth). A inoculação das amostras em meios seletivos para bactéria (BHI, ágar sangue, ágar chocolate e bem) e seletivos para fungos (ágar batata e ágar Sauborad dextrose) indicou crescimento de colônias (AMARA et al., 2003).

Em 2004, 72 amostras de plantas medicinais de sete regiões do Estado do Paraná foram pesquisadas seguindo a metodologia preconizada pela OMS: contagem de microorganismos aeróbios viáveis, bolores, leveduras, pesquisa de enterobactérias, *Escherichia coli*, *Salmonella* sp., *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* resultando na contaminação de 79% das amostras (ZARONI et al., 2004). Neste mesmo ano, em Recife, foram examinados produtos à base de boldo, gingo e pata-de-vaca verificando-se a pureza, adequação das bulas e rótulos à legislação vigente. Todas as bulas e rótulos das amostras de boldo e pata de vaca e cinco de gingo continham erros e falta de informações. Quanto à impurezas todas de boldo, cinco de pata de vaca e uma de gingo foram reprovadas (MELO et al., 2004).

Com o objetivo de avaliar a qualidade de produtos à base de plantas medicinais, dez amostras de Castanha-da-índia (*Aesculus hippocastanum*), onze de capim-limão (*Cymbopogon citratus*) e seis de centella (*Centella Asiatica* L.) foram pesquisadas. As amostras eram provenientes de indústrias de várias partes do país, porém comercializadas em farmácias da cidade do Recife. Foram avaliadas as características organolépticas, autenticidade e a pureza dos produtos, além das informações técnico-científicas nos rótulos e/ou bulas, com reprovação de 59,02% das amostras quanto à pureza e 92,59% em relação a informações dos rótulos e bulas (MELO et al., 2007).

Estudos sobre a qualidade das plantas medicinais são de extrema importância, uma vez que são matéria-prima para a fabricação de fitoterápicos e a sua contaminação

pode propagar-se para as fábricas e produtos finais. Sendo de eliminação muito difícil, estes micro-organismos podem originar doenças ou causar a deterioração dos medicamentos (KARANAM et al., 2008).

Na avaliação de drogas vegetais, foram coletadas dez amostras comercializadas livremente na cidade de Londrina/PR. Verificando-se a qualidade microbiológica antes e após o processo de infusão, constataram cargas de microorganismos aeróbios mesófilos variando entre 1×10^3 a 1×10^7 UFC/g, leveduras de 4×10^2 a 4×10^3 UFC/g e presença de enterobactérias em uma das amostras. Nos infusos a carga de microorganismos aeróbios mesófilos e bolores e leveduras foram menores e não houve presença de enterobactérias (FURNANETO, MARINS e ENDO, 2003)

Bugno e colaboradores (2005) avaliaram 91 amostras provenientes de 65 espécies vegetais distintas, 58,5% das amostras apresentaram índices contaminação por bactérias superiores aos recomendados na farmacopéia brasileira e 63,1% apresentaram contaminação por fungos. Os autores, mediante este resultado, sugeriram medidas regulatórias e educacionais que pudessem garantir a qualidade destes produtos.

No ano de 2007 foi desenvolvido um trabalho de controle de qualidade de drogas vegetais comercializadas em farmácias de manipulação de Maringá de acordo com os parâmetros de avaliação oficiais com a finalidade de averiguar o atendimento da legislação vigente. Dentre as amostras examinadas 28,3% foram reprovadas, em parâmetros relacionados à pureza, identidade e qualidade química, apontando para problemas específicos relacionados à qualidade da matéria-prima utilizada nas farmácias de manipulação (TOBIAS et al., 2007).

Em relação à avaliação da adequação técnica da indústria de medicamentos fitoterápicos, averiguou-se que 29,2% estavam classificadas como satisfatórias; 10,4% satisfatórias, porém com restrições; 6,2% insatisfatórias; 39,6% interditadas e 14,6% com recomendações para cancelamento de processo por não cumprirem a RDC nº 210/03, que estabelece todos os requisitos das Boas Práticas de Fabricação (ALVES et al., 2008).

No ano 2010 foi diagnosticado a qualidade microbiológica de amostras de pata-de-vaca (*Bauhinia forficata*), quixabeira (*Bumelia sertorum*) e umburana (*Amburana*

cearensis) no município de Currais Novos, RN. Foram quantificados: aeróbios mesófilos, coliformes totais, *Escherichia coli*, bolores e leveduras e *Staphylococcus aureus*. Todas as amostras analisadas apresentaram contagens de bactérias do grupo dos coliformes totais. *Escherichia coli* foi detectada em 34% das amostras. Níveis de bolores e leveduras e aeróbios mesófilos acima dos recomendados foram observados em 100% e 84% das amostras, respectivamente. *Staphylococcus aureus* foi detectado em 25% das amostras. Os níveis de contaminação registrados apontam o material analisado como potencialmente danoso à saúde humana (ROCHA, MEDEIROS e SILVA; 2010).

No estado atual do conhecimento sobre a qualidade dos produtos fitoterápicos no Brasil, constata-se a existência poucos estudos sobre fitoterápicos na forma de medicamentos, se somado a elevados índices de contaminação das plantas medicinais que são matérias-primas destes produtos e uma inadequação das indústrias no tocante ao atendimento das Boas Práticas de Fabricação.

1.3. FITOTERÁPICOS NO ÂMBITO DA VIGILÂNCIA SANITÁRIA:

Vigilância Sanitária pode ser compreendida como um conjunto integrado de ações legais, técnicas, de pesquisa e de fiscalização, que exerce o controle sanitário das atividades, da produção e consumo de produtos visando à proteção e a promoção da saúde da população. Este conceito de Vigilância Sanitária foi ampliado no decorrer do tempo, com a finalidade de abranger sua multiplicidade de ações (COSTA, 2001).

As ações de Vigilância Sanitária têm fundamento jurídico nas Leis 8.080 e 8.078, a primeira destaca a vigilância sanitária como parte integrante das ações de proteção à saúde da população e de competência comum das três esferas do governo: União, Estados e Municípios (BRASIL, 1990). O Código de Defesa do Consumidor, Lei 8.078, reconhecendo as condições de vulnerabilidade do consumidor no mercado de consumo determinou que os produtos e serviços colocados no mercado não poderão gerar risco à saúde ou à segurança dos consumidores (BRASIL, 1990).

Em consequência da promulgação das leis citadas anteriormente e com a finalidade de operacionalizar as ações de vigilância sanitária, em 1999, foi criada a Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Em sua lei criadora, considera medicamentos para uso humano produtos sujeitos a controle e fiscalização sanitária (BRASIL, 1999). Segundo a resolução RDC nº. 14, de 31 de março de 2010, que dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos, esta classe de produtos é considerada medicamento; assim, portanto o controle de qualidade destes produtos encontra-se dentro das suas competências (BRASIL, 2010).

Ao consultar a literatura referente a produtos fitoterápicos entre os anos de 1992-2008, constatou-se um alto índice de contaminação de plantas medicinais e a inadequação das indústrias de produção desse tipo de medicamento quanto aos requisitos da legislação sanitária vigente, causando questionamentos sobre o risco do consumo deste pela população. Neste contexto, este projeto destina-se a contribuir para a ampliação do conhecimento sobre a qualidade microbiológica dos medicamentos fitoterápicos comercializados no Brasil possibilitando futuras ações de Vigilância Sanitária.

1.4. ASPECTOS DA LEGISLAÇÃO:

A regulamentação dos medicamentos fitoterápicos é realizada pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), uma autarquia federal vinculada ao Ministério da Saúde. Assim, a ANVISA fixa que todo medicamento fitoterápico deve ser registrado antes da comercialização, a fim de que a população tenha acesso a medicamentos seguros, eficazes e de qualidade comprovada (CARVALHO et al., 2007).

O ato normativo RDCn° 14/10 dispõe sobre os registros destes medicamentos. Inicialmente, esta norma define o que são fitoterápicos e exclui da classe os que, em sua composição incluam substâncias ativas isoladas, de qualquer origem e as associações destas com extratos vegetais. Determina todos os requisitos necessários para a concessão do registro e dentre as exigências encontram-se a avaliação da matéria-prima,

dos derivados da droga vegetal e o produto final. Para a obtenção do registro, ainda, faz-se necessário certificado de Boas Práticas de Fabricação e relatório completo de produção. Para tal a indústria deve atender os critérios da RDC n° 17/10 (BRASIL, 2010; BRASIL, 2010).

A RDC n°14/10 preconiza que os fitoterápicos devem ter comprovação de eficácia e conhecimentos dos riscos de seu uso, reprodutibilidade e constância de sua qualidade. Sua eficácia e segurança podem ser comprovadas através de levantamentos etnofarmacológicos de utilização, documentações tecnocientíficas em publicações ou ensaios clínicos fase 3. Os levantamentos etnofarmacológicos são a demonstração da eficácia e segurança do produto por meio da comprovação do uso por um período igual ou superior a 20 anos. Nesse caso, é necessário considerar o período de uso proposto para o medicamento, que deve ser episódico ou curto e uma busca detalhada por substâncias químicas potencialmente tóxicas ao usuário (BRASIL, 2010).

A comprovação através de literatura tecnocientífica é obtida por meio de atribuição de pontuação contados a partir da apresentação de estudos farmacológicos e toxicológicos com base na literatura descrita na “Lista de Referências Bibliográficas para Avaliação de Segurança e Eficácia de Fitoterápicos”, publicada na Instrução Normativa n° 5 (BRASIL, 2008). A corroboração por meio da realização de testes pré-clínicos e clínicos até a fase 3, segue as orientações RE 90/04 para estudos de toxicidade aguda, crônica e sub-crônicos, os ensaios clínicos seguem as orientações do Conselho Nacional de Saúde (BRASIL, 2004).

Há uma Lista de Registro Simplificado de Fitoterápicos para os quais são dispensados a comprovação de eficácia e segurança, desde que o solicitante do registro siga os parâmetros especificados na lista citada como: parte da planta, forma de uso, quantidade de marcador, indicações, via de administração, dose diária e restrições de uso. A ANVISA ainda estabelece critérios para realização de alterações, inclusões, notificações e cancelamento pós-registro de fitoterápicos através RE n° 91/04 (BRASIL, 2004).A RDC n° 95/08 institui o texto padronizado para bula medicamentos fitoterápicos, (BRASIL, 2008)

Existem outras normas que dispõem sobre a produção, regulamentação e registro de medicamentos, incluindo os fitoterápicos: a RDC n°71 dispõe sobre regras para a

rotulagem de medicamentos, a RDC nº 138 estabelece o enquadramento nas categorias de venda, a RE nº 899, define o guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. ARDC nº 333 e a RDC nº 96, de 17/12/2008, dispõe sobre a propaganda, publicidade, informação e outras práticas cujo objetivo seja a divulgação ou promoção comercial de medicamentos (BRASIL, 2009, BRASIL, 2004; BRASIL, 2003, BRASIL, 2008, BRASIL, 2003).

No ano de 2006, o Presidente da República sancionou o Decreto 5.813 que aprova a Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos, visando fomentar a criação de opções terapêuticas aos usuários, construção dos marcos regulatórios para produção e distribuição, desenvolvimento de tecnologias e inovações nas diversas fases da cadeia produtiva. Essas ações têm como objetivo principal garantir à população brasileira o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos, promovendo o uso sustentável da biodiversidade e o desenvolvimento da cadeia produtiva (BRASIL, 2006).

A função da regulação é a proteção do consumidor impedindo que medicamentos ineficazes, de qualidade duvidosa e nocivos entrem no mercado causando malefícios à saúde, como: agravamento das doenças, fracassos terapêuticos ou morte do paciente. Neste contexto, o papel da ANVISA é primordial como agência reguladora, prevenindo riscos à saúde da população pela promulgação de legislações criteriosas. Com fitoterápicos seguros no mercado os profissionais da saúde estarão mais propensos à prescrição e a população a um uso racional desta modalidade terapêutica.

2. OBJETIVOS:

Avaliar microbiologicamente os aspectos higiênico-sanitários dos medicamentos fitoterápicos derivados de dez espécies vegetais com maior número de registro na Agência Nacional de Vigilância Sanitária e de maior comercialização com relevância para o SUS. Como consequência contribuir para a prevenção de danos a saúde pelo consumo de produtos contaminados.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Identificar dentre os fitoterápicos incluídos no Elenco de Referência de medicamentos e insumos complementares para a assistência farmacêutica na atenção básica em saúde, os que possuam uma maior comercialização no mercado brasileiro.
- Quantificar a presença fúngica e bacteriana nos medicamentos fitoterápicos analisados com a finalidade de determinar a qualidade dos mesmos.
- Identificar os fungos e bactérias presentes nos medicamentos fitoterápicos analisados

3. METODOLOGIA:

A metodologia foi utilizada em concordância com os POPs - Procedimentos Operacionais Padronizados: Verificação da capacidade inibitória de Produtos não Estéreis do Departamento de Microbiologia (POP número 65.3210.009), Contagem de Viáveis Totais em Produtos Farmacêuticos e Matérias-primas de Uso em sua Fabricação (POP número 65.3210.010) e Pesquisa de patógenos em produtos não-estéreis e matérias-primas de uso em sua fabricação (POP número 65.3210.008), todos foram elaborados por Joana Angélica Ferreira Barbosa (FIOCRUZ, 2009).

3.1. DETERMINAÇÃO DAS AMOSTRAS:

O presente trabalho foi realizado com fitoterápicos nas formas farmacêuticas de cápsulas, comprimidos, soluções. Para cada espécie vegetal foram analisadas três amostras. Uma representativa de cada forma farmacêutica, quanto esta estava disponível no mercado. A amostragem foi efetuada em farmácias e drogarias localizadas no estado do Rio de Janeiro. As trinta amostras de fitoterápicos foram selecionadas com base na Relação de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS).

As espécies vegetais foram escolhidas com base nos critérios de maior número de unidades farmacêuticas comercializadas no ano de 2006 (FREITAS, 2007) e número de registros na ANVISA no ano de 2008 (CARVALHO; et al., 2008). São elas: *Cynara scolymus*, *Glycine max*, *Mikania spp.*, *Passiflora spp.*, *Maytenus spp.*, *Rhamnus purshiana*, *Mentha spp.*, *Salix alba*, *Harpagophytum procumbens* e *Uncaria tomentosa* (tabela1).

Tabela 1: ESPÉCIES VEGETAIS UTILIZADAS NESTE TRABALHO COM O SEU NOME POPULAR

Espécie vegetal	Nome popular
<i>Cynara scolymus</i>	Alcachofra
<i>Glycine max</i>	Soja
<i>Mikania spp.</i>	Guaco
<i>Passiflora spp</i>	Maracujá
<i>Maytenus spp</i>	Espinheira-santa
<i>Rhamnus purshiana</i>	Cáscara-sagrada
<i>Mentha spp</i>	Hortelã
<i>Salix alba</i>	Salgueiro-branco
<i>Harpagophytum procumbens</i>	Garra-do-diabo
<i>Uncaria tomentosa</i>	Unha-de-gato

Fonte: Ministério da Saúde (2009)

3.2. MANIPULAÇÃO DAS AMOSTRAS:

O armazenamento das amostras ocorreu de acordo com as orientações dos fabricantes até o momento da análise. Antes de processá-las as embalagens foram inspecionadas cuidadosamente, anotando-se qualquer irregularidade em relação ao seu aspecto. Seguiu-se a desinfecção das embalagens com solução de álcool etílico 70 % (v/v).

Para análise microbiológica foram utilizadas alíquotas representativas do conteúdo das amostras. Para produtos comercializados em quantidades superiores a 10 gramas, foi coletada uma amostra de 10 gramas para cada um dos ensaios, obtendo 10 alíquotas de 1 grama; em amostras com peso inferior a 10 gramas foram empregados todo os seus conteúdos nos ensaios. Durante o processamento foram aplicadas técnicas assépticas e ocorreram em cabine de proteção biológica. Após as preparações das diluições estas foram utilizadas até 20 minutos após o preparo. Todas as amostras foram avaliadas quanto sua capacidade inibitória de crescimento microbiano, segundo a metodologia descrita no POP INCQS número 65.3210.009, “Verificação da capacidade inibitória de Produtos não Estéreis do Departamento de Microbiologia”(FIOCRUZ, 2009).

Após a manipulação, as amostras foram submetidas ao método de contagem em placa (semeadura em profundidade), pois este método pode ser utilizado em quase todos os tipos de amostras, sendo indicado quando se espera um elevado número de contaminantes.

3.3. VERIFICAÇÃO DA CAPACIDADE INIBITÓRIA:

A verificação da capacidade inibitória seguiu a metodologia descrita no POP INCQS número 65.3210.009, “Verificação da capacidade inibitória de produtos não estéreis do departamento de microbiologia”(FIOCRUZ, 2009).

Utilizando crescimentos em ágar de caseína-soja, sucedeu-se a preparação de subcultivos em caldo de caseína-soja de cada micro-organismo de referência (*Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella Typhimurim* e *Staphylococcus aureus*), servindo-se de uma alça de cromo níquel de 3mm. Todos os micro-organismos foram incubados a 30 – 35° C por 18 a 24 horas, com exceção de *Candida albicans* que foi incubada a 20 - 25° C por 44 a 52 horas.

Em seguida, foram preparados os inóculos, através de diluições decimais de cada uma das culturas usando o tampão de cloreto de sódio-peptona para a obtenção de uma suspensão que continha 100 células viáveis por mL, aproximadamente. Prosseguindo a inoculação de 1 mL de suspensão de cada micro-organismo no meio de cultura contendo da amostras. Como controle positivo inoculou-se 1 mL da diluição preparada em outro tubo contendo meio, porém, sem a amostra para servir de controle positivo. Novamente incubou-se as amostras a 30 – 35° C por 24 horas, com exceção de *Candida albicans* que foi incubada a 20 - 25° C por 44 a 52 horas.

A presença de crescimento de micro-organismos frente à amostra indicou a ausência de substâncias inibidoras, então deu-se prosseguimento às análises microbiológicas das amostras. A ausência de crescimento indica a existência de substâncias inibitórias, estas foram eliminadas antes das análises microbiológicas. Foram utilizados os seguintes métodos: método de diluição, método de inativação, associações entre ambos e método de filtração por membrana.

3.4. PREPARO DAS AMOSTRAS:

O tratamento das amostras adequou-se às suas características físicas, com o intuito de obter uma solução uniforme.

No caso de sólidos parcialmente solúveis, drágeas e comprimidos, as amostras foram trituradas até a obtenção de um pó fino seguido de pesagem de 10 g da amostra. A este pó fino adicionou-se 90 ml de caldo de caseína-soja seguida da homogeneização

vigorosa e de repouso por 30 minutos (diluição 1:10). Então foram preparadas diluições sucessivas até 1:100.000 usando o sobrenadante da diluição 1:10.

Para sólidos solúveis (cápsulas) foram mensuradas 10g da amostra, após isso foram adicionados 90 ml de caldo caseína-soja e agitados vigorosamente por 15 a 20 minutos para a obtenção de uma suspensão uniforme. Na sequência preparou-se diluições sucessivas até 1: 100.000.

Para sólidos solúveis, fluidos, soluções, suspensões aquosas, suspensões hidroalcoólicas (menos de 30%) mensurou-se 10mL da amostra, onde foram adicionados 90mL de caldo de caseína-soja e homogeneizados completamente por agitação (diluição 1:10), seguindo com diluições decimais até 1:100.000 utilizando o mesmo meio de cultura.

3.5. EXECUÇÃO DO ENSAIO:

Contagem bacteriana:alíquotas de 1 ml de cada diluição da amostra foram transferidas para duas placas de Petri e adicionados 15-20 ml de ágar de caseína-soja a 45-50°C. Procedeu-se à homogeneização por movimentos rotatórios e a solidificação, invertendo-se posteriormente as placas e incubando-as a 30-35°C por 48 horas. Caso não ocorresse o crescimento prolongou-se a incubação por mais 48 horas. Como o demonstrado na esquema 1.

Contagem de fungos: transferiu-se, em duplicata, alíquotas de 1 ml de cada diluição para placas de Petri e adicionou-se 15-20 ml de Agar de Sabouraud–dextrose ou ágar batata-dextrose acidificado a 45-50°C. O meio foi homogeneizado através de movimentos rotatórios. Deixou-se solidificar o meio, depois as placas foram invertidas e incubou-as à temperatura de 20- 25°C de 5 a 7 dias. A exemplificação encontra-se na esquema 2.

3.5.1. CONTAGEM DE COLÔNIAS:

A contagem do número de colônias nas placas de ágar de caseína-soja, que apresentou até 300 colônias de bactérias e nas placas de Sabouraud-dextrose ou ágar batata-dextrose acidificado com até 100 colônias de fungos, foi efetuada utilizando um contador de colônias, com a seguinte fórmula:

$$N = \frac{P1 + P2}{2} D$$

Onde:

- N = número de UFC/1 g ou 1 mL
- D = Fator da diluição utilizada
- P1 = Número de colônias observadas na placa 1
- P2 = Número de colônias observadas na placa 2

O resultado foi expresso em unidades formadoras de colônias (UFC por grama ou mililitro da amostra) para fungos e bactérias e ausência ou presença em 1 grama para pesquisa de anaeróbios.

3.5.2 CONTROLE DO ENSAIO:

Para a garantia dos resultados, em paralelo ao ensaio, envasou-se uma placa com o mesmo meio de cultura, porém sem a adição da amostra, sendo este controle submetido às mesmas condições da análise das amostras.

3.6 IDENTIFICAÇÃO DOS MICRO-ORGANISMOS:

Na identificação foram inoculados 10 mL ou 10 g da amostra em caldo caseína-soja e caldo lactosado, encubando-se este material a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ durante um período de 24 a 48 horas. A partir do caldo lactosado realizou-se plaqueamento em ágar MacConkey para a pesquisa de *E. coli* e outras enterobactérias. Foram transferidos 1 mL para caldo selenito cistina e 1 mL para caldo Tetrionato, sendo este adicionado 0,1 mL de verde brilhante e 0,2 mL de iodeto de potássio. O acréscimo destes reagentes facilita o crescimento de *Salmonella* sp. através da inibição do crescimento de outros micro-organismos. Estes caldos foram incubados $35 \pm 2^\circ\text{C}$ durante um período de 24 a 48 horas. No caso de crescimento as colônias foram isoladas em placas de xilose-lisina desoxicolato (XLD), verde brilhante-vermelho de fenol lactose-sacarose (BPLS) e bismuto-sulfito (ASB). O caldo lactosado também foi utilizado para pesquisa de outras enterobactérias através da transferência de 1 mL de caldo lactosado para tubo contendo caldo mossel em seguida foram feitas diluições até 1: 1000. Estas diluições foram incubadas por $35 \pm 2^\circ\text{C}$ durante um período de 24 a 48 horas. Findado este período foi feito o plaqueamento por esgotamento em placas de Agar cristal vermelho violeta neutro bile glicose (VRBG). Havendo crescimento nas diluições 1:10 e 1:100 as amostras eram reprovadas, pois indicava que possuía uma contagem de outras enterobactérias > que 100, superior ao limite estabelecido (100UFC por 1 grama de produto).

Através do crescimento em caldo caseína-soja fez-se o plaqueamento em ágar cetrimida (específico para *P. aeruginosa*), ágar Vogel-Johnson (específico para *S. aureus*) e ágar caseína-soja (para pesquisa de outros micro-organismos). Estas placas foram incubadas $35 \pm 2^\circ\text{C}$ durante um período de 24 horas.

Os testes bioquímicos realizados seguiram a metodologia do POP (Procedimento Operacional Padronizado) números 65.3210.008 e segundo o “Manual of Clinical Microbiology” (MURRAY, 2007):

- Bastonetes Gram negativos (fermentadores): Primeiro foi realizada a triagem através da fermentação da glicose, verificação da mobilidade e oxidase. Seguiu-se as provas de utilização do citrato; descarboxilação da arginina, ornitina e lisina; produção de acetoína (prova de VP-Voges Proskauer);

produção de H₂S; gás na glicose com tubo de Durhan; oxidação da xilose, manitol, arabinose, trealose, sacarose, inositol, raminose, sorbitol, salicina; redução do nitrato; indol e hidrólise da uréia.

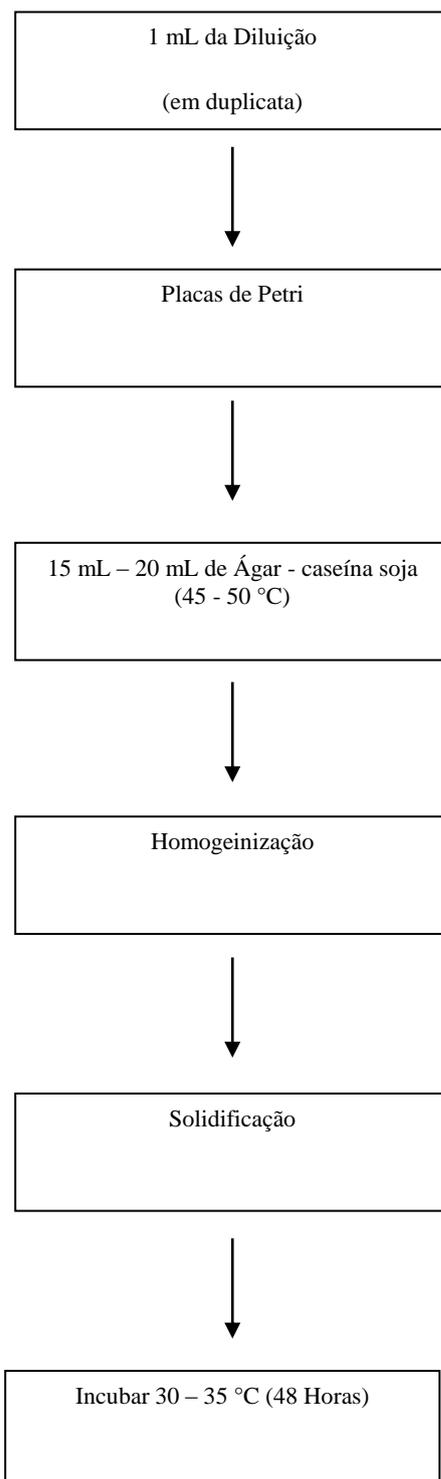
- Bastonetes Gram negativos (não-fermentadores): A triagem foi realizada através da não fermentação da glicose e produção da enzima oxidase. Provas bioquímicas realizadas: utilização do citrato; liquefação da gelatina; não fermentação dos açúcares (glicose, sacarose, manitol, frutose, rhamnose, trehalose, xilose, galactose, manose e lactose); hidrólise da uréia; hidrólise da esculina, crescimento em 6% e 6,5% de NaCl; descarboxilação da arginina, ornitina e lisina e redução do nitrato.
- Cocos Gram positivos: A triagem foi feita por meio da glicose e catalase. Provas: fermentação da frutose, manitol, rafinose, manose, sacarose, xilose, teralose, maltose; hidrólise da uréia, descarboxilação da arginina; produção de acetína,(VP) e VM (vermelho de metila), produção da enzima coagulase e redução do nitrato a nitrito.
- Bastonetes Gram positivos: A triagem foi efetuada através da catalase. Provas: utilização do citrato; utilização do D- manitol, D- xilose, D- glicose, D- arabinose; produção de acetoína em pH menor que 6 e pH maior que 7 (prova de VP-Voges Proskauer); observação da fermentação da glicose com produção de gás através do tubo de Durhan, crescimento em caldo nutriente com 2%, 5%,7% e 10% de NaCl; crescimento na presença de lisozima, lecitianase (egg-yolk); tirosina; decomposição da caseína (milk-agar); hidrólise do amido, mobilidade; redução do nitrato; indol, desaminação da fenilalanina e liquefação da gelatina

A pesquisa de *Candida albicans* abrangeu a verificação das características morfológicas das culturas, pela observação microscópica em corante azul de algodão lactofenol, e seguindo-se com identificação das culturas que apresentarem células redondas, ovaladas e com brotamento, através de provas bioquímicas complementares.

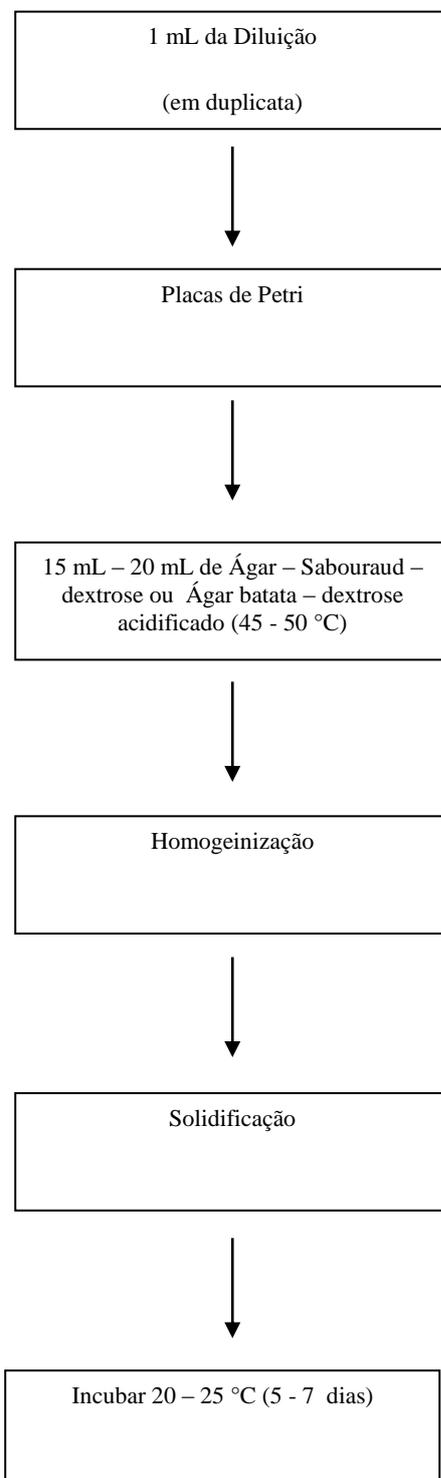
A identificação de *Aspergillus parasiticus* ocorreu a partir da observação nas placas de ágar Sabouraud-dextrose ou ágar batata dextrose, utilizadas na contagem de fungos, o desenvolvimento de colônias grandes com crescimento radial, micélio aéreo de coloração inicialmente branca, tornando verde oliva e submetê-las a observações

macro e micromorfológicas que identificam os fungos filamentosos(MURRAY et al., 2007).

Esquema 1: Contagem de bactérias aeróbias totais



Esquema 2: Contagem de bolores e leveduras.



4. RESULTADOS E DISCUSSÃO :

4.1 CONTAGENS DE BACTÉRIAS AERÓBIAS, OUTRAS ENTEROBACTÉRIAS, BOLORES E LEVEDURAS:

Neste estudo foram analisadas 30 amostras de fitoterápicos nas formas farmacêuticas de cápsulas, comprimidos, soluções e suspensões. A amostragem foi efetuada em farmácias e drogarias localizadas no estado do Rio de Janeiro.

Todas as amostras se mostraram aptas aos ensaios após a verificação da capacidade inibitória POP 65.3210.009 (FIOCRUZ, 2010). Após o processamento das amostras, os resultados dos crescimentos em placa de Bactérias Aeróbias, Outras Enterobactérias, Bolores e Leveduras foram expressos através das médias das contagens. Os resultados foram expressos em Unidades Formadoras de Colônias (UFC) em 1 grama ou mililitro das amostras, dependendo da natureza destas. Estes resultados estão descritos na Tabela 2: Resultados das Contagens de Bactérias Aeróbias, Contagem de Outras Enterobactérias, Bolores e Leveduras.

Tabela 2: Resultados das contagens de bactérias aeróbias, outras enterobactérias, bolores e leveduras.

Amostras	Fitoterápico	Bactérias Aeróbias Totais(UFC/mL)	Fungos e Leveduras(UFC/mL)	Outras Enterobactérias (UFC/ mL)
1	<i>Cynara scolymus</i>	$1,0 \times 10^4$	$3,5 \times 10^3$	<10
2	<i>Cynara scolymus</i>	$4,1 \times 10^6$	<10	> 10^3
3	<i>Cynara scolymus</i>	<10	<10	<10
4	<i>Harpagophytum procumbens</i>	<10	<10	<10
5	<i>Harpagophytum procumbens</i>	<10	<10	<10
6	<i>Harpagophytum procumbens</i>	$3,0 \times 10^9$	<10	> 10^3
7	<i>Glycine max</i>	<10	<10	<10
8	<i>Glycine max</i>	$2,5 \times 10^9$	$2,3 \times 10^2$	> 10^3
9	<i>Glycine max</i>	$6,0 \times 10^8$	$1,5 \times 10^2$	> 10^3
10	<i>Maytenus spp.</i>	$3,8 \times 10^9$	<10	> 10^3
11	<i>Maytenus spp.</i>	$4,3 \times 10^6$	<10	> 10^3
12	<i>Maytenus spp.</i>	<10	$2,0 \times 10^3$	<10
13	<i>Mentha spp.</i>	$1,2 \times 10^7$	$2,0 \times 10^2$	> 10^3
14	<i>Mentha spp.</i>	$2,5 \times 10^4$	$3,0 \times 10^2$	> 10^3
15	<i>Mentha spp.</i>	$1,45 \times 10$	$4,0 \times 10^2$	> 10^3
16	<i>Mikania spp.</i>	<10	<10	<10
17	<i>Mikania spp.</i>	$2,0 \times 10^8$	<10	> 10^3
18	<i>Mikania spp.</i>	<10	<10	<10
19	<i>Passiflora spp.</i>	$4,0 \times 10^8$	<10	> 10^3
20	<i>Passiflora spp.</i>	$9,8 \times 10^9$	<10	<10
21	<i>Passiflora spp.</i>	$9,6 \times 10^8$	<10	<10
22	<i>Uncaria tomentosa</i>	$1,4 \times 10^6$	$1,3 \times 10^3$	> 10^3

Tabela 2: Continuação

Amostras	Fitoterápico	Bactérias Aeróbias Totais(UFC/mL)	Fungos e Leveduras(UFC/mL)	Outras Enterobactérias (UFC/ mL)
23	<i>Uncaria tomentosa</i>	$2,9 \times 10^7$	$1,5 \times 10^3$	$>10^3$
24	<i>Uncaria tomentosa</i>	$3,0 \times 10^8$	$3,2 \times 10^2$	$>10^3$
25	<i>Rhamnus purshiana</i>	$2,0 \times 10^7$	<10	$>10^3$
26	<i>Rhamnus purshiana</i>	$8,0 \times 10^8$	<10	$>10^3$
27	<i>Rhamnus purshiana</i>	<10	<10	<10
28	<i>Salix alba</i>	$2,3 \times 10^8$	<10	$>10^3$
29	<i>Salix alba</i>	$3,4 \times 10^8$	<10	$>10^3$
30	<i>Salix alba</i>	$5,4 \times 10^7$	<10	$>10^3$

‘Das trinta amostras analisadas vinte e duas possuíam contaminação por bactérias aeróbias totais, com valores que variavam entre 10^4 a 10^9 . Enquanto nove amostras encontravam-se acima dos padrões preconizados para fungos e leveduras, com contaminação variando entre 10^2 a 10^3 . Em relação à contagem total de outras enterobactérias dezenove das trinta amostras entravam-se com contaminação acima de 10^3 .

Os percentuais de contaminação foram muito semelhantes aos encontrados por Dominique Fischer em 1992, que detectou uma contaminação bacteriana de 70% dos produtos e fúngica de 34% (FISCHER, 1992). A comparação como os resultados encontrados em estudo realizado em 2004, na cidade de Piracicaba, no estado de São Paulo, tem-se uma contaminação por bactérias um pouco menor, 58%, enquanto a contaminação por fungos e leveduras foi novamente em valores percentuais próximos, 34%. Em relação aos valores das contagens temos resultados semelhantes no tocante a fungos e leveduras. O estudo referenciado encontrou uma variação de 10^1 a $4,2 \times 10^3$ UFC/g, enquanto o presente estudo tem uma variação entre $1,5 \times 10^2$ e $3,5 \times 10^3$ UFC/g. Porém as contagens de Bactérias Aeróbias Totais foram significativamente maiores no presente estudo variando entre $2,5 \times 10^4$ e $9,8 \times 10^9$ enquanto os produtos pesquisados

em 2004 tiveram a contagem variando entre 10^1 a $3,4 \times 10^5$ UFC/g (PAIXÃO, OLIVEIRA, SILVA; 2004).

Através da comparação entre estes três estudos brasileiros verifica-se um percentual alto de contaminação dos medicamentos fitoterápicos, com uma contaminação fúngica média de trinta por cento das amostras. Os valores de bactéria aeróbios totais tiveram uma maior variação, porém em todos os estudos a contaminação das amostras avaliadas foi superior a 50%, demonstrando uma tendência temporal de elevados índices de contaminação nesta classe de medicamentos.

Quando comparamos os resultados das contagens com os limites estabelecidos na Farmacopeia Brasileira constata-se que a maioria das amostras encontra-se fora dos padrões estabelecidos que são 10000 UFC/ g ou mL para contagens de Bactérias Aeróbias Totais, 100 UFC/ g ou mL para fungos e leveduras e maior 100 UFC/ g ou mL para a contagem de Outras Enterobactérias .

Os limites estabelecidos por outras farmacopéias como a Americana, a Européia e a Britânica possuem os mesmos limites que a Farmacopéia Brasileira, logo, utilizando tais parâmetros, estes produtos possuiriam o mesmo percentual de insatisfatoriedade ao determinado pela presente análise (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2002; EUROPEAN PHARMACOPEIA, 2008; BRITISH PHARMACOPEIA, 2011; THE UNITED STATE PHARMACOPEIA, 2010).

4.2 IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA DAS BACTÉRIAS, BOLORES E LEVEDURAS ISOLADAS NAS AMOSTRAS DE FITOTERÁPICOS:

Na Tabela 3 estão identificados os micro-organismos isolados de cada amostra analisada.

Tabela 3: Identificação bioquímica dos micro-organismos isolados nas amostras de fitoterápicos:

Amostras	Fitoterápico	Micro-organismos
1	<i>Cynara scolymus</i>	<i>Candida albicans, Bacillus coagulans</i>
2	<i>Cynara scolymus</i>	<i>Escherichia coli, Enterobacter cloacae</i>
3	<i>Cynara scolymus</i>	Ausência
4	<i>Harpagophytum procumbens</i>	Ausência
5	<i>Harpagophytum procumbens</i>	Ausência
6	<i>Harpagophytum procumbens</i>	<i>Escherichia coli, Bacillus cereus, Bacillus subtilis, Enterobacter aerogenes, Raoultella planticola</i>
7	<i>Glycine max</i>	Ausência
8	<i>Glycine max</i>	<i>Escherichia coli, Serratia marcescens, Cedecea davisae</i>
9	<i>Glycine max</i>	<i>Escherichia coli, Cedecea davisae, Enterobacter gergoviae, Bacillus cereus, Bacillus subtilis, Candida albicans</i>
10	<i>Maytenus spp.</i>	<i>Citrobacter freundii, Cronobacter sacazakii, Enterobacter cloacae, Escherichia coli, Bacillus circulans, Bacillus sutibtilis</i>
11	<i>Maytenus spp.</i>	<i>Citrobacter freundii, Enterobacter cloacae, Escherichia coli, Bacillus coagulans</i>
12	<i>Maytenus spp.</i>	<i>Aspergillus parasiticus</i>
13	<i>Mentha spp.</i>	<i>Aspergillus parasiticus, Enterobacter cloacae, Bacillus circulans</i>
14	<i>Mentha spp.</i>	<i>Aspergillus parasiticus, Enterobacter cloacae, Cronobacter sacazakii, Bacillus circulans</i>
15	<i>Mentha spp.</i>	<i>Aspergillus parasiticus, Cronobacter sacazakii</i>

Tabela 3: Continuação

Amostras	Fitoterápico	Micro-organismos
16	<i>Mikania spp.</i>	Ausência
17	<i>Mikania spp.</i>	<i>Escherichia coli</i>
18	<i>Mikania spp.</i>	Ausência
19	<i>Passiflora spp.</i>	<i>Escherichia coli</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus subtilis</i>
20	<i>Passiflora spp.</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Bacillus cereus</i>
21	<i>Passiflora spp.</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus subtilis</i>
22	<i>Uncaria tomentosa</i>	<i>Escherichia coli</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Candida albicans</i>
23	<i>Uncaria tomentosa</i>	<i>Escherichia coli</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Candida albicans</i>
24	<i>Uncaria tomentosa</i>	<i>Escherichia coli</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Candida albicans</i>
25	<i>Rhamnus purshiana</i>	<i>Escherichia coli</i> , <i>Cronobacter sakazakii</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus subtilis</i>
26	<i>Rhamnus purshiana</i>	<i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella oxytoca</i> , <i>Hafnia alvei</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus subtilis</i>
27	<i>Rhamnus purshiana</i>	Ausência
28	<i>Salix alba</i>	<i>Citrobacter freundii</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Escherichia coli</i>
29	<i>Salix alba</i>	<i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Bacillus coagulans</i>
30	<i>Salix alba</i>	<i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Cedecea davisae</i> , <i>Enterobacter aerogenes</i>

A identificação bioquímica de bactérias aeróbias, fungos e leveduras detectaram um total de 19 espécies diferentes de micro-organismos, das quais 17 eram bactérias e 2 fungos e leveduras. Nas espécies da família das *Enterobacteriaceae* encontrou-se: *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Raoultella planticola*, *Cedecea davisae*, *Enterobacter gergoviae*, *Serratia marcescens*, *Cronobacter sakazakii*,

Klebsiella oxytoca, *Hafnia alvei*, *Citrobacter freundii*. Esta família de bactérias Gram-negativas, inclui uma grande variedade de bactérias patogênicas. Estes micro-organismos encontram-se distribuídos entre plantas, solo, intestinos de humanos e animais podendo ocasionar uma série de infecções em humanos como abscessos, pneumonia, meningites e septicemia. (KONEMAN, 2001).

A *Escherichia coli* tem a forma de um bacilo, possui flagelos e pode ser aeróbia ou anaeróbia facultativa. Esta espécie de bactéria produz um amplo espectro de exotoxinas. O seu habitat natural é o lúmen intestinal dos seres humanos e de outros animais de sangue quente. Em seres humanos pode ocasionar uma série de transtornos à saúde como infecção do trato urinário, colecistite, peritonite, meningite, infecções de feridas e gastroenterites (MURRAY et al.; 2006; ALWAKEEL, 2008). Foi identificada em 15 amostras estudadas (2, 6, 7, 10, 11, 17, 19, 22, 23, 24, 25, 26, 28, 29 e 30). Segundo a Farmacopéia Brasileira, Farmacopeia Americana, Europeia e Britânica a presença deste micro-organismo é indesejável em preparações orais contendo matéria-prima de origem natural. *Escherichia coli*. (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2002; EUROPEAN PHARMACOPEIA, 2008; BRITISH PHARMACOPEIA, 2011; THE UNITED STATE PHARMACOPEIA, 2010). Dentre as espécies da família *Enterobacteriaceae* identificadas, esta é a bactéria mais relacionada a doenças em seres humanos.

Enterobacter aerogenes foi encontrada em duas das amostras do estudo, amostras 6 e 3. Caracteriza por responder aos testes bioquímicos como oxidase negativa, catalase positiva, citrato positivo, indol negativo. É uma bactéria patogênica causadora de infecções oportunistas, incluindo bacteremia, infecções respiratórias, de pele e tecidos moles, infecções do trato urinário, endocardite, infecções intra-abdominais, artrite séptica, osteomielite e infecções oculares. Algumas cepas podem se tornar muito resistentes a tratamento como resultado da sua presença em ambientes hospitalares (KONEMAN, 2001).

A *Raoultella planticola* foi isolada também em uma amostra de fitoterápico, é uma espécie isolada principalmente em ambientes naturais como solo, animais e água. Esta espécie está relacionada a infecções e causa sepsis. Estava presente na amostra 6.

Outra bactéria que também foi isolada em apenas uma amostra foi a *Cedecea davisae* e esta relacionada com casos de septicemia em humanos (MURRAY et al.; 2006).

A *Enterobacter cloacae* é facultativamente anaeróbica e sua morfologia em forma de bastonete. Encontra-se amplamente distribuída em água, esgotos, solo, carne, ambientes hospitalares; na pele e trato intestinal do homem e outros animais comporta-se como comensal. Está associada às infecções do trato urinário, infecções do trato respiratório, sepse e bacteremia (KONEMAN, 2001). Esta espécie de bactéria gram-negativa foi identificada em 9 amostras dos fitoterápicos, ou seja, nas amostras 2, 10, 11, 13, 14, 19, 28, 29 e 30.

Enterobacter gergoviae foi encontrada em um dos produtos analisados, esta enterobactéria possui respiração aeróbica e é um micro-organismo móvel, geralmente isolada em hospitais e associadas a infecções do trato urinário. No Brasil esta bactéria foi pesquisada e isolada em baratas provenientes de hospitais comprovou-se sua associação a surtos hospitalares (PRADO; et al., 2002). Outra espécie identificada foi a bactéria *Cronobacter sazakii*. Como as demais enterobactérias está presente em plantas, solo e intestinos de animais e humanos. Sua morbidade está relacionada a doenças do trato respiratório, fluido cérebro espinhal (MURRAY et al., 2006). Esta enterobactéria foi isolada em três amostras estudadas: amostras 10, 14, e 15.

Serratia marcescens foi identificada apenas na amostra 7. É uma espécie de bactéria gram-negativa, em forma de bastonete, encontrada na água, no solo, alimentos e insetos. Raramente está associada à causas primárias de infecções, sendo considerado assim um patógeno oportunista. Atacando principalmente trato urinário, causadora de pneumonias e em hospedeiros mais frágeis causando bacteremia. Sua transmissão geralmente é pessoa a pessoa, mas raramente está relacionado a aparatos médicos e fluidos intravenosos (KONEMAN, 2001; PRADO et al., 2002).

A *Klebsiella oxytoca* e *Hafnia alvei*, foram isoladas cada uma em amostras distintas, a primeira está enquadrada dentro da classe dos micro-organismos oportunistas, encontra-se disseminado pelo meio ambiente e nas mucosas dos mamíferos. Sua patogenia está relacionada com pneumonia, infecções do trato urinário e infecções hospitalares. *Hafnia alvei* é um bacilo gram negativo, relacionado com

diarréia em humanos, porém seu mecanismo de virulência não se encontra bem definido(MURRAY et al., 2006; MURRAY et al., 2007).

A última bactéria representante da família *Enterobacteriaceae* é a bactéria *Citrobacter freundii*, podendo estar presente em solos, águas, alimentos e esgotos. Esta bactéria pode ser isolada de análises clínicas como agente patogênico - causadores de doença, podendo ser encontradas nas fezes dos humanos e animais (KONEMAN, 2001; PRADO et al., 2002).

Comparando as enterobactérias identificadas com estudos anteriores, verificamos que em estudo realizado no Arábia Saudita em 2008 identificou-se *Enterobacter spp.*, *Shigella spp.*, *Enterobacter agglomerans*, *Klebsiella rhinoscleomati*, e, em comum com os identificados no presente estudo encontravam-se *Enterobacter cloacae* e *Escherichia coli*. Em estudo realizado no Iran foi identificado somente a *Salmonella spp.*, micro-organismo que não esteve presente na atual identificação(ALWAKEEL, 2008; ENAYATIFARD; ASGARIRAD; KAZEMI-SANI, 2009).

No estudo realizado por Fisher foram identificadas *Salmonella spp* e *Escherichia coli*. Porém é necessário ressaltar que a proposta daquele estudo atendia a padrões internacionais da época, que se restringia somente a pesquisa destes micro-organismos (FISHER, 1992). Posteriormente em análise realizada com fitoterápicos provenientes da cidade de Piracicaba, foram pesquisadas a presença de *Salmonella spp* e *Escherichia coli*, *Shigella spp.* e Clostrídios Sulfito Redutores, identificando a presença somente de *Escherichia coli* (PAIXÃO; OLIVEIRA; SILVA, 2004). A presença de *Escherichia coli*, nos três estudos, denota a relevância deste micro-organismo, uma vez que, é um patógeno amplamente estudado e demonstra que os medicamentos estudados tiveram contaminação de origem fecal. Em estudo realizado na Nigéria em 2007, como no presente estudo, foi identificado a presença de contaminação das amostras por *Escherichia coli* e *Staphylococcus*. Porém o que divergiu dos resultados encontrados foi a presença de *Salmonella spp.*(OKUNLOLA, ADEWOYIN, ODEKU; 2007)

Outro gênero de bactéria identificado foi o *Staphylococcus* que apresenta-se comococcus gram positivos e dividem-se em catalase positiva e catalase negativa. Junto com *Stomatococcus* e *Planococcus* encontram-se na família *Micrococcaeae* (MURRAY

et al., 2006; MURRAY et al., 2007). As espécies identificadas foram o *Staphylococcus aureus*, e *Staphylococcus epidermidis* estavam presentes em duas amostras.

Staphylococcus aureus é um importante patógeno devido à sua virulência, resistência aos antimicrobianos e associação à várias doenças, que vão desde uma infecção simples, como espinhas e furúnculos, até as mais graves, como pneumonia, meningite, endocardite, síndrome do choque tóxico e septicemia. Esta bactéria habita com frequência a nasofaringe do ser humano, a partir da qual pode facilmente contaminar as mãos do homem, sendo assim amplamente disseminada (MURRAY et al., 2007).

Staphylococcus epidermidis é uma bactéria comumente presente na pele humana, que às vezes causa doenças humanas. A infecção causada por *Staphylococcus epidermidis* está geralmente associada com dispositivos médicos, como cateteres permanentes; é um dos mais importantes agentes de infecções hospitalares, especialmente em indivíduos com sistema imunológico debilitado, os recém-nascidos e pessoas com dispositivos médicos implantados (MURRAY et al., 2007; WESTPHAL, 2010). *Staphylococcus epidermidis* além de estar presente no fitoterápico número 20 também esteve presente na identificação do estudo realizada na Arábia Saudita, porém não esteve em estudos anteriores (ALWAKEEL, 2008; ENAYATIFARD; ASGARIRAD; KAZEMI-SANI, 2009).

Outro gênero também presente nas amostras estudadas foi o gênero *Bacillus*. Entre eles estavam o *Bacillus circulans*, comumente isolado em casos de meningites, infecções de córnea, bacteremia e feridas de pacientes que sofrem de câncer. Seu habitat natural é o solo. Outra espécie encontrada foi o *Bacillus coagulans*, comumente relacionado à contaminação de alimentos em conserva, caracterizados pela produção de um sabor ácido nestes alimentos (MURRAY et al., 2007).

O *Bacillus cereus* apresenta morfologia em forma de um bastonete espiralado e seu esporo é termo-resistente. Na coloração de gram encontra-se positivo, sua respiração é anaeróbia facultativa. Esta espécie é formadora de esporos e produtora de dois tipos de toxina - diarréica (termo-lábil) e emética (termo-estável). Este bacilo é ubiqüitário, presente em todos os ambientes, mas principalmente no solo. Está comumente associado à contaminação de cereais e outros alimentos. Sua patogênese

está associada a duas formas de intoxicação alimentar: Vômitos, forma emética e doença diarreica (forma diarreica). Está relacionado também com infecções oculares, infecções de cateter venoso, do sistema nervoso central, endocardites, pneumonias, bacteremia e meningites em pacientes imunossuprimidos (MURRAY et al., 2006; MURRAY et al., 2007).

Em estudo realizado na Arábia Saudita a contaminação por *Bacillus cereus* foi extremamente significativa atingindo um percentual de 45% das amostras (ALWAKEEL, 2008). O *Bacillus cereus* estava presente em oito das amostras pesquisadas neste estudo. E em estudo avaliando a utilização de suplemento nutricional a base de ervas, contaminado por *Bacillus subtilis* estabeleceu-se uma relação com consumo e toxicidade em células hepáticas HepG2 (STICKEL et al.; 2009).

Quanto ao *Bacillus subtilis* é uma bactéria que tem sido associada a casos de pneumonia, bacteremias, sepse em pacientes com câncer, bacteremias em pacientes traumatizados, meningites em pacientes com injúria na cabeça e colangite em pacientes com doenças de fígado e rim (MURRAY et al.; 2006). Quanto ao *Bacillus subtilis* se fez presente em 10 das amostras analisadas neste estudo.

A *Candida albicans* é um fungo leveduriforme, possuindo um ciclo sexual de ascomiceto, colonizadora de homem e outros animais de sangue quente. Este micro-organismo comensal torna-se patogênico caso ocorram alterações nos mecanismos de defesa do hospedeiro ou o comprometimento de barreiras anatômicas, como em intervenções cirúrgicas e queimaduras. As manifestações clínicas da candidíase são extremamente variadas, que vão desde aguda, subaguda, crônica e episódica. A infecção pode estar localizado na boca, garganta, pele, couro cabeludo, vagina, dedos, unhas, brônquios, pulmão ou trato gastrointestinal. Também pode ser sistêmica como na septicemia, endocardite e meningite (MURRAY et al., 2006; MURRAY et al., 2007; COLOMBO, GUIMARÃES, 2003).

O *Aspergillus parasiticus* é um fungo pertencente ao filo Ascomycota. Os representantes deste filo são saprófitos universais na natureza, são encontrados no solo, em plantas, em vegetação em decomposição e em áreas em construção. Podem causar doenças em humanos através da colonização das vias aéreas com subseqüentes reações alérgicas, pela colonização da cavidade por invasão tecidual (MURRAY et al., 2006;

MURRAY et al., 2007). Este micro-organismo produz aflotoxina, que está entre os mais potentes agentes cancerígenos conhecidos e também exibem hepatotoxicidade aguda e imunossupressão (HORN, RAMIREZ-PRADO, CARBONE; 2009; PEREIRA, CARVALHO, PRADO; 2002).

A identificação de fungos revelou a presença de duas espécies: *Candida albicans* presente nos fitoterápicos 9, 22, 23 e 24. O *Aspergillus parasiticus*, nas amostras 12, 13, 14 e 15. A revisão da literatura permitiu verificar a presença de aflatoxinas em fitoterápicos em estudos realizados na Malásia e Tailândia. A aflotoxina pode ser produzida por *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* e sua presença no organismo humano pode ter efeito carcinogênico, teratogênico e mutagênico (ALI et al. 2005, TASSANEYAKU et al.; 2004).

De acordo com a Farmacopéia Brasileira 4 ed, em produtos farmacêuticos não estéreis e em matérias primas de uso para sua fabricação, devem ser ausentes os seguintes micro-organismos: *Salmonella sp*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2002). A análise qualitativa de micro-organismos identificou que duas espécies que não deveriam estar presentes nas amostras: *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

A Farmacopéia Brasileira 4 ed também determina que, segundo a via de administração do produto é indesejável, a presença de determinados micro-organismos - Via oral (sólidos e líquidos): *Bacillus cereus*, *Enterobacter sp*, *Candida albicans*, *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. Via tópica: *Serratia marcescens*, *Klebsiella sp*, *Burkholderia cepacea*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Pseudomonas stutzeri* e *Streptococcus sp*, grupo B. Via nasal ou respiratória: *Enterobacter sp*, *Serratia marcescens*, *Klebsiella sp*, *Candida albicans*, *Proteus sp*, *Acinetobacter sp*, *Burkholderia cepacea*, *Stenotrophomonas maltophilia* e *Pseudomonas stutzeri*. Via intra-mamária: *Staphylococcus sp*, *Streptococcus sp*, grupo B, *Bacillus cereus*, *Serratia marcescens*, *Corynebacterium pyogenes*, *Klebsiella sp*, *Mycoplasma sp*, *Enterobacter sp*, *Pseudomonas sp*, *Citrobacter sp*, *Nocardia sp*, *Proteus sp*, *Cryptococcus neoformans* e *Candida sp*. Todos os medicamentos estudados pertenciam à via oral e micro-organismos que deveriam estar ausentes segundo a via também foram identificados, sendo estes: *Bacillus cereus*, *Enterobacter sp*, *Candida albicans*, e

Aspergillus parasiticus. Porém é necessário ressaltar que a Farmacopeia Brasileira 5 ed aboliu a exigência de ausência de micro-organismos segundo a via de administração do medicamento (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2002; FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

A contaminação de medicamentos é extremamente indesejável porque pode promover a deterioração do produto, visto que reside nestes uma versatilidade de caminhos bioquímicos possibilitando aos micro-organismos a síntese de enzimas degradativas, dentre os micro-organismos identificados os *Bacillus spp.* são capazes de produzir alfa-amilase, que degrada açúcares; os *Aspergillus* são fontes comuns de proteinases e peptidases que degradam compostos como gelatinas e a produção de lipase são comuns entre os fungos (PINTO; KANEKO; OHARA, 2003).

Deve-se considerar que a eficácia e a segurança do medicamento estão relacionadas com o controle de qualidade (SAHOO; MANCHILKANTI; DAY, 2010). Além disso, o consumo de produtos contaminados pode ter um impacto negativo à saúde humana. A experiência tem mostrado que produtos contaminados podem não ter alterações perceptíveis aos seres humanos. Assim, o consumo destes pode acarretar em infecção a pacientes com sistema imunológico comprometido, idosos e crianças (PINTO; KANEKO; OHARA, 2003). No caso dos micro-organismos identificados na atual pesquisa, esta questão deve ser considerada, pois, a maioria destes são como micro-organismos oportunistas.

A maioria dos estudos que abordam o controle de qualidade de fitoterápicos sugere necessidade de uma regulação mais rígida e específica desta espécie de produto. A adoção de Boas Práticas no manejo agrícola, monitoramento das Boas Práticas na indústria e controle microbiológico rotineiro pelos órgão de vigilância (SAHOO; MANCHILKANTI; DAY, 2010; ALWAKEEL, 2008; KOSALEC; CVEK; TOMIC, 2009; ENAYATIFARD; ASGARIRAD; KAZEMI-SANI, 2009).

5. CONCLUSÕES :

- Foram identificadas vinte e uma espécies diferentes de micro-organismos que se dividiam em dezenove espécies de bactérias e duas de fungos.
- 80% do total das amostras avaliadas estão insatisfatórias em relação aos limites estabelecidos pela Farmacopeia Brasileira.
- Todas as espécies vegetais analisadas apresentaram contaminação em pelo menos uma amostra.
- Quanto à identificação dos micro-organismos, com bases nos dados averigua-se que a maioria das bactérias e fungos identificadas são patógenos oportunistas podendo representar risco a saúde dos consumidores que possuam sistema imunológico suprimido, como idosos, crianças e gestantes. As espécies identificadas foram *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter planticola*, *Cedecea davisae*, *Enterobacter gergoviae*, *Serratia marcescens*, *Cronobacter sazakii*, *Klebsiella oxytoca*, *Hafnia alvei*, *Citrobacter freundii*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus circulans*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus coagulans*, *Candida albicans* e *Aspergillus Parasiticus*.
- Dentre as espécies identificadas havia micro-organismos que deveriam estar ausentes das amostras segundo o critério de avaliação pela via de administração do medicamento, critério estabelecido pela Farmacopeia Brasileira 4ª edição, sendo eles o *Bacillus cereus*, *Enterobacter sp*, *Candida albicans* e *Aspergillus parasiticus*, porém este critério foi extinto na nova edição da Farmacopeia Brasileira, que passará a vigorar a partir de 24 de fevereiro de 2011 na sua 5ª edição.
- Em relação à comparação aos dados encontrados com outros estudos, havia uma escassez dos que abrangiam as Contagens Totais de Bactérias Aeróbias, Contagens de Bolores e Leveduras e Contagens Totais de outras enterobactérias e poucos estudos que identificam micro-organismos em medicamentos fitoterápicos.

- Um programa de monitoramento microbiológico serviria de base para ações de Vigilância Sanitária sendo uma ferramenta útil para a melhora da qualidade e garantia da segurança destes produtos.

REFERÊNCIAS

ALI, N.; et al. Evaluation of a method to determine the natural occurrence of aflatoxins in commercial traditional herbal medicines from Malaysia and Indonesia. **Food and Chemical Toxicology**, Estados Unidos da América. v. 43, p. 1763–1772, 2005.

ALVES, N. D. C.; et al. Avaliação da adequação técnica de indústrias de medicamentos fitoterápicos e oficinas do estado do Rio de Janeiro. **Ciência & Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, p 745 – 753, 2008. Suplemento 13.

ALWAKEEL, S. S. Microbial and heavy metals contamination of herbal medicines. **Research Journal of Microbiology**, Estados Unidos da América, p. 683 – 691, 2008.

AMARAL, A. C. F; et al. **A Fitoterapia no SUS e o Programa de Pesquisa de Plantas Medicinais da Central de Medicamentos**. 1ed. Brasília: Serie B Textos Básicos. p. 149, 2006.

AMARAL, F. M. M.do; et al. Avaliação da qualidade de drogas vegetais comercializadas em São Luís/Maranhão. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 13, p. 27-30, 2003. Suplemento.

BRANDÃO, G. L.; FREIRE, N. ; VIANNA-SOARES C. D. Vigilância de fitoterápicos em Minas Gerais. Verificação da qualidade de diferentes amostras comerciais de camomila. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 3, n 14, p. 613-616, 1998.

BRASIL. Ministério da Saúde. 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, DF, 05 de abril de 2010.

BRASIL. Lei Federal 8080, de 19 de setembro de 1990. Dispõe sobre as condições para a promoção, proteção e recuperação da saúde, a organização e o funcionamento dos serviços correspondentes e dá outras providências. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 19 de setembro de 1990.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução (RDC) nº 17, de 16 de abril de 2010. Dispõe sobre as Boas Práticas para a Fabricação de Medicamentos. Resolução. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 19 de abril de 2010.

BRASIL. Lei Federal 9.782, de 26 de janeiro de 1999. Define o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, cria a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF. 26 de janeiro de 1999.

BRASIL. Decreto nº 5.813, de 22 de junho de 2006. Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá outras providências. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 23 de junho de 2006.

BRASIL. Lei Federal 8078, de 11 de setembro de 1990. Dispõe sobre a Proteção do consumidor e dá outras providências **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 11 de setembro de 1990.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução (RE) 88 de 16 de março de 2004. Determina a publicação da "Lista de referências bibliográficas para avaliação de segurança e eficácia". **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 18 março 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução Normativa (IN) nº 5 de 11 de dezembro de 2008. Dispõe sobre a Lista de registro simplificado de fitoterápicos. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 12 de dezembro de 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria Nº 2.982/GM, de 26 de novembro de 2009. Aprova as normas de execução e de financiamento da Assistência Farmacêutica na Atenção Básica. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 01 de dezembro de 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução (RE) 90 de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o Guia para os estudos de toxicidade de medicamentos fitoterápicos. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 18 de março de 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução (RE) 91 de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o Guia para realização de alterações, inclusões, notificações e cancelamento pós-registro de fitoterápicos. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 18 março 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução (RE) nº 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos"; fica revogada a Resolução RE nº 475, de 19 de março de 2002. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 02 de junho de 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução (RDC) nº 95, de 11 de dezembro de 2008. Regulamenta o texto de bula de medicamentos fitoterápicos. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 12 de dezembro de 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução (RDC) nº 71, de 22 de dezembro de 2009. Estabelece regras para a rotulagem de medicamentos. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 22 de dezembro de 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução (RDC) nº 138, de 09 de maio de 2003. Dispõe sobre o enquadramento na categoria de venda de medicamentos. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 06 de janeiro de 2004

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução (RDC) nº 333, de 19 de novembro de 2003. Dispõe sobre rotulagem de medicamentos e outras providências. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 21 de novembro de 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução (RDC) nº 96, 17 de dezembro de 2008. Dispõe sobre a propaganda, publicidade, informação e outras práticas cujo objetivo seja a divulgação ou promoção comercial de medicamentos. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF. 18 de dezembro de 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria 212 de 11 de setembro de 1981. Define o estudo de plantas medicinais como uma das prioridades de investigação em saúde. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF. 11 de setembro de 1981.

BRASIL. Ministério da Previdência e Assistência Social. Central de Medicamentos. Portaria 93 de 07 de dezembro de 1982. Estabelece a Definição e Competências da Comissão de Plantas medicinais. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF. 07 de dezembro de 1982.

BRASIL. Comissão Interministerial de Planejamento e Coordenação. Resolução Ciplan nº 8, de 8 de março de 1988. Implanta a Prática de Fitoterapia nos Serviços de Saúde. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF. 11 de março de 1988.

BRASIL. Conselho Nacional de Saúde. Resolução nº 338, de 06 de maio de 2004. Estabelece a Política Nacional de Assistência Farmacêutica. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF. 04 de maio de 2006.

BRASIL. Portaria Interministerial nº 971, de 02 de maio de 2003. Estabelece a Política de práticas Integrativas e Complementares ao SUS **Diário Oficial da União**. Brasília, DF. 03 de maio de 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria 3.237 de 24 de dezembro de 2007. Aprova normas de financiamento e execução da assistência farmacêutica na atenção básica. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF. 24 de dezembro de 2007.

BRASIL. Comissão Interministerial nº 2.960 de 09 de dezembro de 2008. Aprova o Programa Nacional de Plantas Medicinal e Fitoterápico e cria o Comitê Nacional de Plantas Medicinal e Fitoterápico. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF. 10 de dezembro de 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 1274 de 25 de junho de 2008. Institui Grupo Executivo para o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF. 26 de junho de 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 2982 de 26 de novembro de 2009. Ampliação do nº de fitoterápicos no Elenco de Referência Nacional de Medicamentos e Insumos Complementares para a Assistência Farmacêutica na Atenção Básica. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF. 01 de dezembro de 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 1.102 de 12 de maio de 2010. Constitui Comissão Técnica e Multidisciplinar de Elaboração e Atualização da Relação Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos - COMAFITO. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF. 13 de maio de 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 886 de 20 de abril de 2010. Institui a Farmácia Viva no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS). **Diário Oficial da União**. Brasília, DF . 22 de abril de 2010.

BRITISH PHARMACOPEIA, 2011ed, London: The Stationery Office, 2011

BUGNO, A; et al. Avaliação da contaminação microbiana em drogas vegetais. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. São Paulo, v. 41, n. 4, p. 491-497, 2005.

COLOMBO, A. L.; GUIMARAES, T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** Uberaba, v.36, n.5, p. 599-607, 2003.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological**, São Paulo, v. 33, n 2, p. 179-189, 2000.

CALIXTO, J. B. . Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Ciência e Cultura**. São Paulo, v. 55,n. 3, 2003.

CONFERÊNCIA NACIONAL DE SAÚDE, 8ª, 1986, Brasília, **Relatório Final**, Brasília, p.29,1986.

CONFERÊNCIA NACIONAL DE SAÚDE, 10ª, 1996, Brasília, **Relatório Final**, Brasília, p. 95, 1996.

CONFERÊNCIA NACIONAL DE SAÚDE, 12ª, 2003, Brasília, **Relatório Final**, Brasília, p. 236, 2003.

CARVALHO, A C. B.; et al. Aspectos da legislação no controle dos medicamentos fitoterápicos. **T & C Amazônia**, n. 1, p. 26-32, 2007

COSTA, E. A. **Políticas de Vigilância Sanitária: Balanços e Perspectivas**. Texto elaborado como subsídio aos debates da I Conferência de Vigilância Sanitária, Brasília, 26 a 30 de novembro de 2001, Disponível em:< [http: www.anvisa.gov.br/institucional/snvs/coprh/cad.../cad_saude4.pdf](http://www.anvisa.gov.br/institucional/snvs/coprh/cad.../cad_saude4.pdf)> acesso em 11 de novembro de 2010.

DE SMET, P. A. G. M. Health risks of herbal remedies: an update. **Clin. Pharmacol. Ther.**, St. Louis, v. 76, p. 1-17, 2004.

ENAYATIFARD, R.; ASGARIRAD, H.; KEZEMI-SANI, B. Microbial quality of some herbal solid dosage forms. **African Journal of Biotechnology**, Africa, v.9, p. 1701-1705, 2008.

ERNST, E.; PITTLER, M. H. Risks associated with herbal medicinal products. **Wiener Medizinische Wochenschrift**. Estados Unidos da América, v. 152, n. 7-8,p 183–189, 2002

FIOCRUZ. Contagem de viáveis totais em produtos farmacêuticos, matérias-primas e água para diálise. **Manual de Controle de Qualidade**. Rio de Janeiro, n. 65.3210.101, 2009.

FIOCRUZ. Verificação da capacidade inibitória de Produtos não Estéreis do Departamento de Microbiologia. **Manual de Controle de Qualidade**. Rio de Janeiro, n. 65.3210.009, 2009.

FIOCRUZ. Pesquisa de patógenos em produtos não-estéreis e matérias-primas de uso em sua fabricação. **Manual de Controle de Qualidade**. Rio de Janeiro, n. 65.3210.008, 2009

FARIAS, M. R;et al. O problema da qualidade dos fitoterápicos. **Caderno de farmácia**, Rio Grande do Sul. v. 1, n. 2, p. 73-82, 1985.

EUROPEAN Pharmacopoeia. 6. ed., v. 6.1. Strasbourg: Council of Europe 2008. CD ROM.

FERRO, Degmar. **Fitoterapia: conceitos clínicos**. 1 ed. São Paulo. Ateneu, 2006.

FREITAS, A. Estrutura de mercado do seguimento de fitoterápicos no contexto atual da indústria farmacêutica brasileira. **Ministério da Saúde**. Brasília, 15 p, 2007

MICROBIAL Limit Tests. In: **THE UNITED STATES PHARMACOPEIA**. 33 ed. Rockville, 2010.

Métodos Biológicos. In **Farmacopéia Brasileira**. 4 ed.São Paulo: Ateneu, 2002.pt II. Fac 3.

Métodos Biológicos. In **Farmacopéia Brasileira**. 5 ed. Brasília, Anvisa, 2011.

FISCHER,D.C. H.**Contaminação microbiana em medicamentos fitoterápicos sob a forma sólida**. São Paulo: USP, 1992, p.161 Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Professor Takako Saito. São Paulo.

FURNANETO, L.; MARINS, V. D. . ; ENDO, R . Qualidade Microbiológica de Drogas Vegetais Comercializadas nas Ruas da Cidade de Londrina/PR e de seus Infusos. **Saúde em Revista**, Piracicaba, v. 5, n. 10, p.49-52, 2003.

GUERRA, A. M. N. de M.; et al. Medicamentos provenientes de farmácias fitoterapêuticas usados em municípios da região oeste do estado do Rio Grande do Norte. **Revista verde**.Mossoró, v. 2, n. 2, p. 150-157, 2007.

HORN, B. W.; RAMIREZ-PRADO, J. H.;CARBONE, I.. Sexual reproduction and recombination in the aflatoxin-producing fungus *Aspergillus parasiticus*. **Fungal Genetics and Biology**, EUA, v. 46, p. 169-175, 2009.

HEINZMANN, B. M.; BARROS, F. M. C.. Potencial Das Plantas Nativas Brasileiras Para O Desenvolvimento De Fitomedicamentos Tendo Como Exemplo *Lippia Alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae). **Saúde**. Santa Maria, v. 33, n. 1, p43-48, 2007

KARANAM, V. R. et al. Detection of indicator pathogens from pharmaceutical finished products and raw materials using multiplex PCR and comparison with conventional microbiological methods. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology Official Journal of the Society for Industrial Microbiology**. India, p 1007 – 1018, 2008.

KONEMAN, E.W. **Diagnóstico Microbiológico**. Texto e Atlas colorido, 5ed.Rio de Janeiro. Medsi, 2001

KOSOLEC, I.; CVEK, J; T, Sinisa Contamination of medicinal herbs and herbal products. **Archives of Industrial Hygiene and Toxicology**, Poland, v. 60, p. 485 – 501, 2009.

MELO, J. G. de.; 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 bot. bras.**São Paulo, v. 21 n. 1 p. 27-36, 2007.

MELO, J. G. ; et al Avaliação da qualidade de amostras comerciais de boldo (*Peumus boldus* Molina), pata-de-vaca (*Bauhinia spp.*) e ginko (*Ginkgo biloba* L.) **Revista Brasileira de Farmacognosia**. João Pessoa, v. 14, n.2, p.111-120, 2004.

MINISTÉRIO DA SAUDE, RENISUS- Relação Nacional de Plantas Mediciniais de Interesse ao SUS. Disponível em <<http://saude.gov.br>> acesso em 20 de maio de 2009.

MURRAY, PATRICK R.et al., **Manual of Clinical Microbiology**, 9. ed. Washington D.C.: American Society for Microbiology,p. 1773, 2007.

MURRAY, PATRICK R.et al., **Microbiologia Médica**, 5. ed. Washington D.C.: American Society for Microbiology, p. 979. 2006.

OKUNLOLA, A.; ADEWOYIN, B. A. ; ODEKU,O. A.Evaluation of Pharmaceutical and Microbial Qualities of Some Herbal Medicinal Products in South Western Nigeria,**Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, Nigéria, v.1, n.6, p. 661-670, 2007

PAIXÃO, F. G.; OLIVEIRA, D. P. de; SILVA, P. B. .Controle microbiológico de produtos fitoterápicos. **Higiene Alimentar. São Paulo**v.18, p. 55-57, 2004.

PEREIRA, I. G. P.**Prevalência do uso de fitoterapia em Pacientes do programa de geriatria do Hospital Universitário de Brasília- HUB**.Brasília: UB, 2008, p.143 Dissertação (Mestrado) Universidade de Brasília, Faculdade de Ciências da Saúde. Professor Dâmaris Silveira. Brasília.

PEREIRA, M. M. G. ; CARVALHO, E. P. de; PRADO Guilherme. Crescimento e Produção de Aflatoxinas por *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. **Boletim CEPPA**, Curitiba, v. 20, n. 1, p.141-156, 2002.

PINTO, T de J. A.; KANENKO, T. M.; OHARA, M. T. **Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos correlatos e cosméticos**. São Paulo, 2ed, p. 325, 2003.

PINTO, A. C.; et al. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, , p.45-61, 2002. Suplemento 1.

PITTLER, M. H.; SCHMID, K.; ERNST, E. Adverse events of herbal food supplements for body weight reduction: systematic review. **Obesity Reviews**, v. 6, n. 2, p. 93-111, 2005

PRADO, M. A. et al . Enterobactérias isoladas de baratas (*Periplaneta americana*) capturadas em um hospital brasileiro. **Rev Panam Salud Publica**, Washington, v. 11, n. 2, 2002.

REZENDE-LAGO, N. C. M. et al. Ocorrência de *Bacillus cereus* em leite integral e capacidade enterotoxigênica das cepas isoladas. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, Belo Horizonte, v.59, n. 6, 2007.

ROCHA, F. A. G. da; MEDEIROS, F. G. M. de; SILVA, J. L. A da. Diagnóstico da qualidade sanitária de plantas medicinais comercializadas no município de currais novos, RN. **HOLOS**, Ribeirão Preto. v. 12, ano 26, p. 71-79, 2010.

SAHOO, N.; MANCHIKANTI, P.; DEY, S. Herbal drugs: Standards and regulation. **Fitoterapia**, Estados Unidos da América, v. 81, p. 462-471, 2010.

SOLER, Orenzio. **Biodiversidade, bioeconomia & fitoterapia**. Belém: Faculdade de Economia, Universidade Federal p.32 2000. Tese (Doutorado em Ciências Sócio-Ambientais no Programa de Desenvolvimento do Trópico Úmido – PDTU. Núcleo de Altos Estudos da Amazônia – NAEA) Belém.

STICKEL, Felix. Severe hepatotoxicity following ingestion of Herbalife_ nutritional supplements contaminated with *Bacillus subtilis*. **Journal of Hepatology**, Switzerland, v. 50, p. 111-117, 2009.

TASSANEYAKUL, W.; RAZZAZI-FAZELI, E. ; SUPATRA P. J. Contamination of aflatoxins in herbal medicinal products in Thailand. **Mycopathologia**. Tailândia, n. 158, p. 239–244, 2004.

TOMAZZONI, M. I.; NEGRELLE, R. R. B.; CENTA, M. de L. Fitoterapia popular: a busca instrumental enquanto prática terapêutica. **Texto contexto – enfermagem** . Florianópolis, v. 15, n. 1, p.115-121, 2006.

TOBIAS, M. L.; et. al. Controle de Qualidade Microbiológica de Drogas Vegetais de Farmácias de Manipulação de Maringá. (Paraná – Brasil) **Revista Eletrônica de Farmácia**. v. IV, n. 1, p. 95-103, 2007.

TURILLA, M. S. R. ; Nascimento, E. de S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Revista de Ciências Farmacêuticas : Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 42, n. 2, p. 189 – 306, 2006.

VARANDA, E. A. Atividade mutagênica de plantas. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**. São Paulo, v. 27, n.1, p.1-7, 2006.

YUNES, R. A.; PEDROSA, R. C. ; CURICECHINEL FILHO, V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Química Nova**, vol. 24, p. 147-152, 2001.

ZARONI, M.; et al. Qualidade microbiológica das plantas medicinais produzidas no Estado do Paraná **Revista Brasileira. Farmacognosia**. João Pessoa, v. 14, n. 1, p.29-39, 2004.

ZARONI, M.; et al. Avaliação da contaminação microbiana em drogas vegetais. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Science**. São Paulo, v. 41, n. 4, p. 491-496, 2005.

WESTPHAL, F. L. et al. Tratamento cirúrgico de crianças com pneumonia necrosante. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**. Brasília, 6 ed., v.36 p. 716 -723, 2010.

ANEXOS

Materiais e equipamentos:

Pipetas graduadas de 1,2, 5 e 10 ml

Erlenmeyer de 250ml

Placas de Petri

Tubos de ensaio 16 x 150 mm ou similar

Tubos de ensaio 18 x 180 mm ou similar

Alça de inoculação

Espátulas e pinças

Homogeneizador

Jarra de anaerobiose

Gral e pistilo

Banho termostático regulado a 45°- 50°C

Estufas bacteriológicas reguladas a 20-25°C e a 30 – 35°C

Cabine de proteção biológica

Contador de colônias

Pipetador automático

Balanças com capacidade de 300 g e sensibilidade de 0,001g

pHmetro

microscópio

MEIOS DE CULTURA PARA A REALIZAÇÃO DAS CONTAGENS:

Ágar de caseína soja:

- Digesto pancreático de caseína ----- 15,0 g
- Digesto pancreático de farinha de soja -----5,0 g
- Cloreto de sódio----- 5,0 g
- Ágar----- 15,0 g
- Água purificada-----1000 mL

Suspende-se a mistura em 1 litro de água purificada. Esteriliza-se a 121°C durante 15 minutos. O pH final é de $7,3 \pm 0,2$ a 25°C. Para o preparo em meio desidratados irá ser seguido às orientações do fabricante.

Ágar de Sabouraud – dextrose – 4%

- Dextrose ----- 40 g
- Mistura de partes iguais de caseína tratada por suco pancreático e digesto péptico de tecido animal ----- 10,0 g
- Ágar----- 15,0 g
- Água purificada-----1000 mL

Suspende-se a mistura em 1 litro de água purificada. Esteriliza-se a 121°C durante 15 minutos. O pH final será de $5,6 \pm 0,2$ a 25°C. Para o preparo em meio desidratados irá ser seguido as orientações do fabricante.

Ágar para fermentação de anaeróbios

- Extrato de levedura-----5,0 g
- Digesto péptico de tecido animal----- 5,0 g

- Digesto papaínico de farinha de soja-----10,0 g
- Dextrose -----10,0 g
- Cloreto de sódio----- 5,0 g
- Tioglicolato de sódio ----- 2,0 g
- Ágar----- 20 ,0 g
- Água purificada-----1000 mL

A mistura será suspendida em 1 litro de água purificada, e esterilizada a 121°C por 15 minutos. O pH final será de $7,2 \pm 0,2$ a 25 ° C. No caso de prepara a partir de meio desidratado, este obedecerá as recomendações dos fabricantes.

Caldo de caseína soja

- Caseína tratado por suco pancreático----- 17,0 g
- Farinha de soja tratada por digestão papaínica ----- 3,0 g
- Cloreto de sódio----- 5,0 g
- Fosfato de potássio dibasico ----- 2,5 g
- Dextrose -----2,5 g
- Água purificada-----1000 mL

Suspende-se a mistura em 1 litro de água purificada. Esteriliza-se a 121°C durante 15 minutos. O pH final será de $7,3 \pm 0,2$ a 25°C. Para o preparo em meio desidratados irá ser seguida a orientação do fabricante.

Ágar de batata-dextrose:

- Infusão de batata ----- 4,0 g
- Glicose ----- 20,0 g
- Ágar----- 15 ,0 g

- Água purificada-----1000 mL

Suspende-se a mistura em 1 litro de água purificada. Esteriliza-se a 121°C durante 15 minutos. O pH final será de $5,6 \pm 0,2$ a 25°C. Antes da utilização o pH do meio será ajustado para 3,5 com a adição de aproximadamente 14 mL de solução de ácido tartárico a 10 %, para um volume de meio de 100 mL, estado a temperatura do meio entre 45-50 °C. Para o preparo do meio desidratado será respeitado as recomendações do fabricantes.

Caldo de caseína-soja adicionado 0,4% de polissorbato 80 e 0,5% de lecitina de soja

- Peptona de caseína por digestão pancreática ----- 17,0 g
- Peptona de soja por digestão papaínica ----- 3,0 g
- Cloreto de sódio----- 5,0 g
- Fosfato de potássio dibásico ----- 2,5 g
- D(+) Glicose -----2,5 g
- Polissorbato 80 ----- 4,0 g
- Lecitina de soja ----- 5,0 g
- Água purificada-----1000 mL

Suspende-se a mistura em dos componentes por agitação e aquecimento . Esteriliza-se a 121°C durante 15 minutos. O pH final será de $7,3 \pm 0,2$ a 25°C. Para o preparo em meio desidratados irá ser seguida a orientação do fabricante.

Soluções:

Tween 80 a 0,1 % estéril:

- Polissorbato 80 (tween 80)----- 1 mL
- Água purificada -----100 mL

Será solubilizado 1 mL de polissorbato em 80 a 100 mL de água purificada. Esteriliza-se a 121°C durante 15 minutos.

Solução estéril de ácido tartárico a 10 %

- Ácido tartárico -----10,0 g
- Água purificada -----100 mL

Será solubilizado 10 g de ácido tartárico em 100 mL de água purificada. Esteriliza-se a 121°C durante 15 minutos.