UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Curso de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

CONTAMINAÇÃO MICROBIANA EM MEDICAMENTOS
FITOTERÁPICOS SOB A FORMA SÓLIDA

DOMINIQUE CORINNE HERMINE FISCHER

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof. Dra. TAKAKO SAITO

São Paulo
1992

A Deus,

pela inspiração e concretização deste trabalho,

À Professora Doutora TAKAKO SAITO

*pelos ensinamentos e orientação, compartilhando
sua experiência e indicando sempre o caminho da
evolução em direção ao aprimoramento.*

À minha mãe ANDRÉE,

*a quem devo toda orientação de vida, apoio
e incentivo ao crescimento infindo.*

Ao meu pai GEORGES,

pelo exemplo de perseverança e incentivo.

À KATY,

minha segunda mãe.

Ao FLÁVIO, meu marido,

pelo auxílio e compreensão.

À Professora Doutora MARIA KUBOTA AKISUE,

pelo incentivo ao ingresso no Pós-Graduação.

AGRADECIMENTOS

À Coordenadoria do Curso de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos do Departamento de Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, pela oportunidade na efetivação do curso e obtenção do título.

À Professora Assistente Mitsuko Taba Ohara, do Departamento de Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, pela orientação e apoio.

A todos os professores e funcionários do Setor de Biofarmacognosia do Departamento de Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, pela compreensão, múltiplos auxílios e inestimável apoio.

À Sra. Horilde de Oliveira Castaldi pelo auxílio e trabalho imprescindíveis à execução da parte experimental deste trabalho.

Ao Laboratório de Controle Farmacêutico (CONFAR) do Departamento de Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP pela cessão de meios de cultura e permissão para utilização de instalações e equipamentos necessários à execução da parte experimental deste trabalho.

À Sra. Yara Maria Lima Mardegan, Secretária do Departamento de Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, pelo empenho e trabalho datilográfico.

À bibliotecária Moema Rodrigues dos Santos, pela norma
lização das referências bibliográficas.

À CAPES, pelo auxílio financeiro como bolsista.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram na exe
cução do presente trabalho.

DOMINIQUE CORINNE HERMINE FISCHER
CONTAMINAÇÃO MICROBIANA EM MEDICAMENTOS FITOTERÁPICOS
SOB A FORMA SÓLIDA

COMISSÃO JULGADORA
DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE

Takako Saito

Presidente e Orientador
- PROF. DR. TAKAKO SAITO -

FLAVIO ALTERTHUM

2º Examinador
- PROF. DR. FLAVIO ALTERTHUM -

Terezinha de Jesus Andreoli Pinto

3º Examinador
- PROF. DR. TEREZINHA DE JESUS ANDREOLI PINTO -

São Paulo, 02 de 04 de 1992.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVO	2
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	
3.1 Aspectos clínicos da contaminação microbiana em medicamentos	3
3.2 Contaminação microbiana	9
3.2.1 Contaminação microbiana em insumos farmacêuticos	9
3.2.1.1 Contaminação microbiana em drogas vegetais	11
3.2.2 Contaminação microbiana em medicamentos não estéreis	15
3.3 Padrão microbiano	22
3.3.1 Padrão microbiano de insumos farmacêuticos	22
3.3.2 Padrão microbiano de medicamentos não estéreis	27
3.4 Metodologia de avaliação	34
4. MATERIAL E MÉTODOS	
4.1 Material	38
4.2 Métodos	38
4.2.1 Apresentação comercial das amostras	38
4.2.1.1 Droga vegetal	38
4.2.1.2 Forma farmacêutica	38
4.2.1.3 Bula	39
4.2.1.4 Identificação do ciclo produtivo	39
4.2.1.5 Embalagens primária e secundária	39
4.2.1.6 Responsável técnico	39
4.2.1.7 Qualificação legal	39
4.2.1.8 Outras informações	40
4.2.2 Tratamento e tomada de ensaio das amostras	40
4.2.2.1 Comprimidos	40
4.2.2.2 Cápsulas	40
4.2.2.3 Pós	41
4.2.3 Determinação de contaminantes viáveis totais	41
4.2.3.1 Determinação de bactérias aeróbias mesófilas viáveis totais	41

4.2.3.1.1	Técnica de tubo múltiplo	41
4.2.3.1.2	Técnica de ágar fundido	42
4.2.3.2	Determinação de leveduras e bolores viáveis totais	42
4.2.3.2.1	Técnica de tubo múltiplo	42
4.2.3.2.2	Técnica de ágar fundido	43
4.2.3.3	Determinação de esporos de bactérias aeróbias mesó- filas	43
4.2.4	Pesquisa de coliformes	44
4.2.4.1	Prova presuntiva para coliformes totais	44
4.2.4.2	Prova confirmatória para coliformes totais	44
4.2.4.3	Prova confirmatória para coliformes fecais	44
4.2.4.4	Prova confirmatória para <u>Escherichia coli</u>	45
4.2.4.4.1	Isolamento seletivo	45
4.2.4.4.2	Identificação micromorfológica	45
4.2.4.4.3	Confirmação da fermentação de lactose	45
4.2.4.4.4	Prova do IMViC	45
4.2.4.4.4.1	Teste do indol	46
4.2.4.4.4.2	Teste de vermelho de metila	46
4.2.4.4.4.3	Prova de Voges-Proskauer	46
4.2.4.4.4.4	Prova de utilização do citrato	47
4.2.5	Pesquisa de <u>Salmonella</u> sp.	47
4.2.5.1	Enriquecimento não seletivo	47
4.2.5.2	Enriquecimento seletivo	47
4.2.5.3	Isolamento e identificação	47
4.2.6	Estimativa de <u>Escherichia coli</u>	48

5. RESULTADOS

5.1	Apresentação comercial das amostras	49
5.2	Determinação de contaminantes viáveis totais	49
5.3	Pesquisa de patógenos específicos	49
5.3.1	Pesquisa de coliformes e de <u>Salmonella</u> sp.	49
5.3.2	Isolamento e determinação de <u>Escherichia coli</u>	50

6. DISCUSSÃO	
6.1 Considerações gerais	71
6.2 Apresentação comercial das amostras	72
6.3 Métodos	80
6.3.1 Tratamento das amostras	80
6.3.2 Detecção de contaminantes viáveis	81
6.4 Resultados	95
7. CONCLUSÕES	129
8. RESUMO	131
9. SUMMARY	133
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	134

1. INTRODUÇÃO

Em vista do crescente interesse pela medicina a base de pro dutos terapêuticos de origem natural, principalmente de drogas vegetais, defronta-se com uma situação preocupante. De um lado, o consumidor leigo, pouco saberia distinguir a medicina folclórica da medicina científica; de outro lado, grande número de produtores e comerciantes oportunistas, até certo ponto, com respaldo legal pelo fato de a legislação pertinente ser insipiente.

Os fitoterápicos, pela sua origem, são potencialmente contaminados por agentes microbianos, quer sejam saprófitas ou patogênicos. Por isto, níveis de qualidade devem ser exigidos a fim de que estes medicamentos não sejam ^{os} responsáveis pela contaminação microbiana, comprometendo a integridade do paciente. Ao mesmo tempo, não devem deteriorar o produto, com isto diminuindo a eficácia terapêutica e aumentando o risco ao consumidor.

2. OBJETIVO

O presente trabalho tem como objetivo analisar alguns aspectos da contaminação microbiana em fitoterápicos mais amplamente comercializados pelas farmácias, drogarias, lojas de produtos naturais e supermercados da cidade de São Paulo, a fim de verificar a qualidade quanto à conformidade com os padrões internacionais de pureza microbiana para medicamentos não estéreis de uso oral.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Aspectos clínicos da contaminação microbiana em medicamentos

A veiculação de agentes infecciosos por medicamentos encontra-se devidamente documentada em inúmeros relatos e publicações, cujos problemas clínicos foram classificados por Dony (62). Um, das toxiinfecções, em decorrência da ingestão de medicamentos contaminados, e outro, das superinfecções, quando pela administração medicamentosa tópica sobre a pele e mucosas.

Diferentes formas farmacêuticas foram comprovadamente responsabilizadas pela infecção em pacientes (23,36,130,145,164,169,176,179), sempre que foi possível o isolamento e identificação de diferentes espécies microbianas. Descreveram-se casos de infecções oculares (10,89,93,217), pós-operatórias (10,15,89,104,121,154,155), do aparelho digestivo (48,64,93,97,102,120,181), do trato urinário (81,104,121,186), do sistema respiratório (154,174), da pele (15,42,132), até mesmo de meningite (22,67,157), com consequências graves e fatais.

Problemas dessa natureza foram tratados, com maior ênfase, na década de 60. Em 1965, houve casos de salmonelose em crianças tratadas com um xarope contaminado (20).

No início de 1968, Kallings e colaboradores (93) relataram 200 casos de salmonelose, na Suécia, em consequência da administração de comprimidos de tireóide contaminados por mais de 30 milhões de bactérias por grama (179), além de conter Salmonella muenchen, Salmonella bareilly e grande número de coliformes, inclusive Escherichia coli termodúrica, tendo sido o pó de tireóide, a fonte de infecção.

Anteriormente, no período de 1965 a 1967, ocorreram episódios de infecção por Salmonella cubana, nos Estados Unidos e Inglaterra (64).

Lang e colaboradores (102) descreveram 21 casos, entre abril de 1965 a julho de 1966, ocorridos no Hospital Geral de Massachussets, em Boston. As investigações mostraram que o surto de infecção foi em função da ingestão de cápsulas de vermelho carmim, empregado como agente marcador no diagnóstico de doenças digestivas. As cápsulas incriminadas apresentaram contagens de 10^5 Salmonella cubana por grama. Também se verificaram casos na Califórnia, no período de junho a julho do mesmo ano (97).

Outras infecções intestinais foram relatadas em função do uso de medicamento contendo Pseudomonas aeruginosa, como no Hospital St. Bartholomew's, em Londres (181), com carga do microorganismo variando de 15 a $1,4 \times 10^4$ / mL de água ^{de} menta.

No caso de infecções oculares, Pseudomonas sp. foi geralmente o microorganismo envolvido (169). Na Suécia, em 1964, 8 casos foram em decorrência do uso de unguento de hidrocortisona contendo neomicina e anfomicina e que estava contaminado com Pseudomonas aeruginosa em níveis superiores a até 2×10^3 / g (93). A mesma bactéria foi encontrada em solução salina empregada para o umedecimento de córnea, durante operações intraoculares, tendo infectado 15 de 25 pacientes submetidos a esse tipo de intervenção cirúrgica, em 1964, sendo que 6 apresentaram perda de visão em um dos olhos (10, 89).

No mesmo ano, um unguento oftálmico, contendo Pseudomonas pyocyanea causou infecções oculares graves (66). Estudos anteriores de Wyk e Granstone (217) demonstraram que diferentes tipos de unguentos, para o mesmo fim, não estavam estéreis numa proporção de 85,5% (com relação às 83 amostras analisadas), sendo que 19 apresentaram carga igual ou superior a 50 microorganismos por grama.

Vários autores relataram casos de infecção urinária em consequência do emprego de solução desinfetante ou líquido para lavagem de bexiga contaminados. Mitchell e Hayward, em 1966 (121), descreveram 7 casos pós-

operatórios pelo uso de solução antisséptica, contendo Pseudomonas sp., na desinfecção do reservatório do líquido de irrigação da bexiga. Casos semelhantes ocorreram com o uso de água supostamente estéril no enxágue dos instrumentos cirúrgicos e na lavagem da bexiga (104).

Em 1970, foi encontrada Pseudomonas multivorans (E0-1) em níveis variando de 10^3 a $3,3 \times 10^3$ / mL em solução antisséptica empregada na conservação e limpeza de sondas urinárias, tendo causado infecção em 12 pacientes, sendo a maioria assintomática (81).

No caso de infecções respiratórias foram geralmente incriminados os equipamentos médicos (145,154,169). Phillips, em 1966, relatou 4 casos de infecções pulmonares por Pseudomonas aeruginosa contaminante de gel de lidocaína empregado na lubrificação de sondas endotraqueais. Porém, a água e outros líquidos contaminados usados nos aparatos médicos também foram, reconhecidamente, fontes de infecção (154). Em 1967, registraram surtos de pneumonia devido à inalação de soluções contidas em frascos de aerossóis, contaminadas por Klebsiella sp. (154). Episódio parecido foi descrito por Sanders e colaboradores (174), em 1970, em consequência da inalação de solução contaminada por Serratia marcescens.

Com relação a casos de meningite, em 1945, Evans (67) descreveu tal ocorrência em 2 pacientes, com consequências fatais, após terem recebido anestesia intratecal de solução de nupercaina, tendo sido uma das fontes incriminadas de Pseudomonas pyocyanea. No mesmo ano, Botterell e Magner (22) fizeram relato sobre outros 2 pacientes que desenvolveram a mesma doença, em função de injeção intratecal de penicilina contendo a mesma bactéria. Posteriormente, em 1966, 2 recém-nascidos apresentaram meningite, tendo sofrido danos cerebrais permanentes, em decorrência do emprego de solução salina contaminada por Flavobacterium meningosepticum, na lavagem dos olhos (157).

Foram relatados surtos de infecção de feridas e infecções secundárias de lesões cutâneas pré-existentes, por vários tipos de Pseudomonas

presentes em cremes, loções e soluções desinfetantes (145,169). Basset e colaboradores (15), em 1970, verificaram 9 casos de infecção de feridas cirúrgicas por Pseudomonas multivorans, tendo-se incriminado a solução antisséptica de Savlon^R (uma mistura de clorhexidina e cetrimida) utilizada para limpeza da área a ser operada, nas cirurgias menores e no tratamento pós-operatório naquelas mais extensas. Noble e Savin (132) isolaram Pseudomonas aeruginosa de creme esteroideal, tendo sido responsável pela infecção de lesões cutâneas.

Na Nova Zelândia, em 1968, estudos de France (74) demonstraram a capacidade de sobrevivência de Candida albicans em cremes para as mãos, mesmo contendo hexaclorofeno, tendo sido recuperada em grande número a partir desses produtos, usados num hospital-maternidade e representando um sério risco para os recém-nascidos.

Em trabalho semelhante de 1969, Ayliffe e colaboradores (11), na Inglaterra, constataram a presença de bacilos Gram-negativos como Klebsiella sp., Pseudomonas aeruginosa e Escherichia coli em cremes para mãos e loções contendo o mesmo antibacteriano. Em loções de um hospital inglês, os mesmos autores encontraram contagens de Klebsiella aerogenes de até $2,3 \times 10^4$ / mL, apesar de conterem, também, o antisséptico. Esse tipo de contaminação representa uma fonte potencial de infecção de difícil suspeita, como ocorreu com o surto de septicemia em 6 pacientes com sondas intravenosas, como consequência de cremes para as mãos empregados pelos médicos e contaminados por Klebsiella pneumoniae (124).

Em 1970, em Londres, houve casos de infecção intestinal em recém-nascidos, nos quais foram aplicadas soluções antissépticas para a limpeza da pele, as quais foram posteriormente confirmadas como contaminadas (48).

Outros surtos ocorreram em função do emprego de soluções desinfetantes contaminadas por Pseudomonas sp., de 1966 a 1971 (42,81,121,155,186).

A administração de vacinas e soros contaminados provocou mortes (169,176). Isto ocorreu com injeção de soro anti-sarampo (intramuscular em 2 crianças) e de tuberculina (subcutânea, em 1 criança), tendo levado a óbito 3 crianças. A análise das amostras dos materiais injetados evidenciou a presença de Staphylococcus aureus com alto potencial toxigênico (141). Fato parecido deu-se, anteriormente, em 1928, na Austrália, em Bundaberg, após a aplicação subcutânea de vacina antidiftérica, tendo levado à morte 12 de 21 crianças imunizadas (72,141). Outros imunoterápicos contaminados como vacina meningocócica (169), vacina contra a peste e linfa usada para a imunização (176) trouxeram problemas.

Os injetáveis intravenosos foram responsáveis por 350 casos de septicemias, em hospitais dos Estados Unidos, em 1971, tendo sido isoladas Enterobacter cloacae e Erwinia sp. (209). Várias cepas de enterobactérias foram, também, detectadas em solução salina glicosada, tendo causado pequeno surto infeccioso, após a administração intravenosa, na Inglaterra, em 1965 (145).

Alguns casos clínicos ocorreram em função de contaminação por anaeróbios. Em 1949, Sevitt (180) descreveu 2 casos de tétano pós-cirúrgico, em consequência do uso de talco contaminado por cepas de Clostridium sp., incluindo Clostridium tetani toxigênica pela equipe médica antes da operação, para calçamento de luvas.

Anteriormente, em 1946, já haviam sido registradas 4 mortes de bebês, também atribuídas ao uso de talco, na Nova Zelândia e Austrália (36).

Outros pós foram fonte de infecção, tendo sido constatada contaminação em pó de sulfonamida, por Welch e colaboradores (212), em 1942, que detectaram a presença de Staphylococcus sp., Streptococcus sp., bactérias aeróbias e anaeróbias esporuladas. Mais tarde, em 1965, Dony e Gérard (120) mencionaram a contaminação de pancreatina por Salmonella sp. como fonte de problemas clínicos em um hospital.

O isolamento de Staphylococcus epidermidis em medicamentos foi considerado significativo. Este microorganismo causou infecções, o que alterou a sua classificação, passando de saprófita a patógeno oportunista (5,85). Sua presença foi confirmada em medicamentos sob a forma sólida (93) e líquida (56).

Outros patógenos oportunistas foram citados por Hitokoto e colaboradores (86), em 1978, incluindo Aspergillus niger e Candida albicans.

3.2 Contaminação microbiana

3.2.1 Contaminação microbiana em insumos farmacêuticos

No tocante aos insumos farmacêuticos, muitos autores averiguaram sua qualidade microbiológica (12,20,21,38,72,73,83,93,99,100,109,111,147,151,176,185,190,213,216).

As matérias-primas de origem sintética ou substâncias isoladas no estado puro apresentaram grau mínimo de contaminação (151,161), porém tendo sido consideradas exceção as substâncias orgânicas como vitaminas, lactose, esteróides entre outras além das minerais, como talco e fosfatos (72,151,185). Até mesmo algumas substâncias sintéticas apresentaram contaminação maciça, como sulfamida e corantes (83). Porém, de forma geral, as matérias-primas naturais se mostraram mais contaminadas (12,20,83,99,111,151,185,190) sendo os microorganismos encontrados reflexos da sua origem (12,62,110,161,187).

Henning (84), em 1970, classificou os insumos farmacêuticos em 3 categorias, segundo o grau de contaminação: aqueles contendo, geralmente, elevado conteúdo microbiano devido à contaminação primária ou secundária, outros apresentando grau mediano em função da contaminação secundária e o terceiro grupo de nível moderado em que a maior parte é atribuída à contaminação secundária. Pertenciam a essas categorias, respectivamente, matérias-primas de origem animal (extratos e órgãos pulverizados), vegetal (goma arábica e adraganta, amido, ágar, cacau e outros) e mineral.

Em 1965, em levantamento feito pelo Conselho Nacional de Saúde da Suécia (168), amostras de diferentes tipos de amido apresentaram contagens de até 2×10^4 / g, tendo sido detectada a presença de coliformes em 38 das 50 analisadas.

O estudo efetuado pela Food and Drug Administration (FDA) (109), em 1967, confirmou a detecção de salmonelas em pó de tireóide, proveniente

da Dinamarca, o que motivou a verificação da qualidade microbiológica de todas as importações americanas de insumos de origem animal. O mesmo órgão verificou a presença de vários sorotipos de Salmonella em insumos equivalentes, produzidos no próprio país, além dos produtos derivados desses, o que levou ao recolhimento desses últimos por parte das indústrias. A FDA constatou, ainda, a contaminação de levedura seca pela mesma bactéria.

Elevada carga microbiana foi encontrada em lactato de cálcio, carvão medicinal, folha de digitalis e tireóide por Fischer e colaboradores (73), em 1968.

No mesmo ano, Pedersen e Ulrich (147) analisaram 84 matérias-primas diferentes, tendo detectado contagens bacterianas até mesmo superiores a 10^4 /g em ágar, amido, cacau, caulim, folha de digitalis, alcaçuz. Uma amostra de digitalis superou o nível de 10^7 /g. Escherichia coli foi encontrada em níveis variando de 30 a 10^2 por grama em 9 lotes, correspondentes a 7 matérias-primas diferentes, entre elas: amido de batata, folha de digitalis, lactose, prednisolona, prednisona e talco. E, ainda, 1 lote de alcaçuz acusou Escherichia coli no nível de 10^4 /g.

Bühlmann e colaboradores (38) avaliaram a pureza microbiológica de adjuvantes farmacotécnicos de 4 indústrias farmacêuticas suecas, no período de 1970 a 1971, tendo observado, na maioria das vezes, cargas bacterianas e fúngicas inferiores, respectivamente a 10^3 e 10^2 / g (mL). Dentre 71 matérias-primas os autores encontraram microorganismos indesejáveis em amidos de trigo, milho e batata, ágar, alginato de sódio, cacau, celulose microcristalina, cacau em pó, gelatina, noz moscada pulverizada e talco.

Em 1972, Wózniak e colaboradores (216) constataram níveis de até 10^7 microorganismos por grama em opoterâpicos, tendo verificado as maiores cargas em tireóide, fator intrínseco e extrato ósseo, além de que, todos apresentaram fungos.

Em pesquisa realizada por Kruger (99), em 1973, com 114 matérias-primas correspondendo a 1032 lotes, foram verificados níveis de contaminação superiores a 10^3 bactérias e 10^2 fungos por grama, respectivamente em 12,2 e 14,9%.

Widmann e Croome (215), em 1975, isolaram enterobactérias de insumos como gelatina, goma arábica, cacau, amidos de arroz e de milho entre outros, sendo que Enterobacter cloacae foi o contaminante mais comum.

Na Índia, em 1976, Ferreira e Freitas (72) verificaram a condição microbiológica de talco 200 e 300, caulim, óxido de zinco e carbonato de magnésio, utilizados na formulação de talcos. Encontraram Staphylococcus aureus em 1 dos 8 pós analisados. A contagem de microorganismos viáveis foi inferior a 10^2 /g em 50% das amostras, sendo a maioria de bactérias aeróbias Gram-positivas esporuladas. Caulim e talco foram os mais contaminados, porém não acusaram a presença de patogênicos.

No mesmo país, em 1985, El Sovod (65) identificou até 66 tipos de contaminantes fúngicos em 18 pós de uso farmacêutico, inclusive, espécies potencialmente patogênicas.

3.2.1.1 Contaminação microbiana em drogas vegetais

Considerado insumo farmacêutico, as drogas vegetais quer para o isolamento de seus princípios ativos, quer sob a forma de infuso ou "in natura" tiveram seu consumo aumentado, sobretudo nos últimos anos em todo mundo (148). A Organização Mundial da Saúde (1) adotou programa de saúde básica (primária) fazendo uso das plantas medicinais, a partir da década de 70. Assim, procurou incentivar os países membros a identificar e explorar os aspectos da medicina tradicional, a fim de obter medicamentos eficazes.

Numerosos pesquisadores de diversos países dedicaram-se ao estudo das drogas vegetais, muitos deles, especificamente no que se relaciona

à qualidade microbiológica das mesmas (9,17,20,49,55,59,62,75,82,86,95,110,114,131,171,177,213).

Em função da origem natural, as drogas vegetais geralmente apresentam altas contagens microbianas (9,36,55,59,62,82,95,110,131,213), tendo alcançado níveis máximos de contaminação de 10^8 bactérias (9) e 10^7 fungos (95) por grama. Os microorganismos contaminantes mais frequentes foram bacilos Gram-positivos esporulados (53,55,213), bacilos Gram-negativos (213), aeróbios-anaeróbios facultativos ou oxidativos (55). As espécies mais frequentemente isoladas foram de enterobactérias (20,49,55,59,62,131,177), clostrídios sulfito-redutores como Clostridium perfringens (9,49,110,131), bem como, Staphylococcus aureus (131), Staphylococcus epidermidis (110), Pseudomonas sp., Pseudomonas aeruginosa (49,131) e estreptococos fecais (49,55,62,110). Entre as enterobactérias foram encontradas, comumente, coliformes (59,177), Escherichia coli (9,20,49,55,130), Proteus sp. (130), Proteus vulgaris (49), Enterobacter sp. (130), Enterobacter agglomerans (55), Enterobacter aerogenes (55), Enterobacter cloacae (49,110), Citrobacter sp. (49,110,130), Klebsiella sp. (130), Klebsiella pneumoniae (49,55,110) e Serratia sp. (130). Além dessas, bactérias da flora vegetal normal como Pseudomonas putida, Erwinia sp. (49) e Erwinia agglomerans (110) foram isoladas.

Entre os fungos, destacou-se a presença de bolores (213), tendo sido gêneros mais comuns Mucor (62,114), Aspergillus (62,86,114), Penicillium (62,86,114), Rhizopus (114) e Thamnidium (114).

Considerando que o vegetal pode ser analisado como um todo ou isoladamente através de partes integrantes, o resultado analítico pode acusar divergências entre pesquisadores. Cortez e colaboradores (49), em 1986, não consideraram significativas as diferenças de contaminação microbiológica entre os órgãos do vegetal (folha, caule, raiz e flor). Entretanto, Negretti (131), em 1983, havia verificado maior nível de contaminação por microorganismos indesejáveis ou patogênicos, em ordem decrescente de importância em raiz-rizoma, casca e folha, enquanto que o vegetal inteiro e o fruto

apresentaram baixa contaminação.

Os resultados de Kedzia e Holderna (95), em 1984, assemelham-se aos anteriores (131), com algumas diferenças. As porções vegetais que apresentaram menor nível de contaminação microbiana foram fruto, semente e casca, ao contrário de folha, flor e rizoma, sendo que o maior nível foi encontrado em raiz.

Na verificação da pureza microbiana de drogas vegetais brutas e de produtos extrativos (extratos fluido, seco, tinturas e essências), Negretti (131) comprovou cargas microbianas altas nas drogas brutas, sendo que, 50% das 350 amostras analisadas apresentaram contagem bacteriana superior a 10^3 /g, diferentemente das 200 amostras constituídas de seus derivados, cuja carga contaminante foi menor. A presença de microorganismos patogênicos, semelhantemente foi maior nas drogas brutas (23,14%) do que nos produtos extrativos (9,0%). Da mesma forma, a presença de bactérias foi maior nas drogas (11,71% das 350 amostras), seguidos de extrato seco (8,33% dos 60 analisados), extrato fluido (3,39% dos 60 analisados) e essências (5,0% das 40 analisadas).

Härtling (82), em 1983, analisou 20 amostras de chás correspondendo a 14 misturas de drogas, além de folhas e frutos de sene comercializadas na Alemanha. As contagens bacteriana e fúngica variaram, respectivamente, de 25 a $1,2 \times 10^6$ e de 0 a $2,6 \times 10^3$ por grama, tendo isolado enterobactérias de 11 das amostras, sendo que 7 destas apresentaram carga superior ou igual a 100/g.

Alguns autores demonstraram especial preocupação com relação aos contaminantes fúngicos, com vistas à averiguação da presença ou não de aflatoxinas (86,114,171).

Hitoko e colaboradores (86) avaliaram 49 amostras totalizando 13 espécies vegetais, entre elas canela, gengibre, alcaçuz e plantas nativas do Japão.

As espécies fúngicas mais frequentes foram Aspergillus e Penicillium, porém, não foram detectadas micotoxinas.

Lutomsky e Kedzia (114) constataram que, 60% das 246 amostras de drogas brutas, por eles analisadas, apresentaram contagem de contaminantes fúngicos variando de 10^2 a 10^4 /g e 30% com nível superior a 10^4 /g. As cepas toxigênicas foram raras, sendo que apenas 2 produziram aflatoxina B₁.

Na Índia, onde grande parte da população faz uso das plantas para tratamento de doenças, Roy e Chourasia (171), em 1989, fizeram levantamento da micoflora presente em 5 drogas vegetais nativas, sendo elas: Cyperus rotundus (túbera), Gmelina arborea (raiz), Hygrophila spinosa (semente), Mesua ferrea (semente) e Solanum nigrum (baga). Estas são usadas comumente por suas ações diurética, estomáquica, adstringente, carminativa, afrodisíaca e diaforética. Os autores verificaram a presença comum de espécies pertencentes aos gêneros Alternaria, Aspergillus, Curvularia, Fusarium, Penicillium, Rhizopus, Botrytis e Chaetomium. Porém, Aspergillus flavus foi predominante, na maioria das amostras, sendo que das 50 cepas isoladas 21 foram toxigênicas. O nível de aflatoxina B₁ na maior parte das amostras contaminadas ultrapassou o limite de tolerância de 20 µg/kg, fixado pela OMS. O maior nível de contaminação por aflatoxina foi registrado em Hygrophila spinosa e o menor, em Gmelina arborea, tendo sido, respectivamente, de $1,11 \times 10^3$ e $1,4 \times 10^2$ µg/kg. Mesua ferrea não apresentou tal tipo de contaminação.

As drogas vegetais quando fragmentadas ou pulverizadas apresentam, geralmente, nível de contaminação superior àsqueas inteiras. Este fato foi observado por Schiller e colaboradores (177), em 1968, em folhas de jaborandi e por Westwood (213), em 1971, em goma adraganta e ruibarbo. Da mesma forma, em análise efetuada por Devleeschouwer e Dony (55), em 1979, em chá de folha de boldo, uva ursi, sálvia, eucalipto, malva e hortelã, os autores encontraram, na maioria das vezes, contaminação bacteriana em nível superior nas drogas divididas. Esta diferença, em alguns casos como na amostra

de sálvia atingia 5 ciclos logarítmicos. Entretanto, no caso da contaminação fúngica, verificaram geralmente o contrário. Observaram, ainda, variação qualitativa quanto aos contaminantes encontrados nos 2 casos. Constataram, também, diferença em função da consistência das folhas, pois para casos de consistência dura o nível de contaminação bacteriana era inferior àqueles de folhas moles. O mesmo foi verificado quanto à contaminação fúngica, embora em nível inferior à contagem bacteriana.

Em outras constatações publicadas na década de 80 são relatados resultados semelhantes da carga contaminante (17,49,110). Em 50% das 12 amostras de Mentha piperita a presença de bactérias aeróbias mesófilas era superior a 10^6 /g, havendo sinais de contaminação fecal humana ou animal em 7 casos (110). Contaminação fúngica elevada, situada entre 10^5 e 10^7 /g, foi encontrada em 10% dos 79 lotes de drogas vegetais analisadas por Cortez e colaboradores (49). Com relação a contaminante bacteriano, esses autores detectaram cargas superiores a 5×10^5 /g em 25% das amostras.

3.2.2 Contaminação microbiana em medicamentos não estéreis

A qualidade microbiológica dos fitoterápicos, assim como de outros medicamentos não estéreis, depende de vários fatores. Entre eles, destaca-se a qualidade das matérias-primas (6,8,12,21,41,47,53,61,62,73,77,87,101,131,151,164,183,219) representada, principalmente, pelas drogas e excipientes de origem natural, originalmente contaminados (8,12,20,35,59,62,73,151,162,177,191,213,219). O que está relacionado às condições de cultivo (9,131), colheita (62,131,150,151) e armazenamento (12,62,98,101,131,151), além de que sua manipulação através de operações como a pulverização, tamisação, acondicionamento e embalagem (101) igualmente pode interferir.

O efeito do processo de fabricação sobre os microorganismos (21, 78,101,114,131,150,177) é aspecto importante. Assim, no caso de comprimidos,

o processo de granulação e secagem a 35-40°C favorece o desenvolvimento microbiano (62,101). Se a temperatura for de 80°C, os contaminantes mais resistentes são selecionados (158), havendo redução do número de microorganismos inicialmente presentes (177). Na encapsulação, contrariamente, pode haver contaminação em função da manipulação.

Outros pontos devem ser considerados durante o processo de fabricação, como a qualidade do ar (46,62,98), o local de produção (8,12,41,46,61,62,77,151,162), os materiais e equipamentos (12,23,41,62,101,108,151,162) e o acondicionamento (101).

O pessoal é o veículo mais importante de contaminação na fabricação (12,41,46,62,77,98,108,151,162,219) interferindo desde a manipulação de matérias-primas (101) até o acondicionamento, desempenhando papel fundamental na disseminação dos microorganismos através das mãos (8,77,108,219) e da pele (41,219), além das vias respiratórias (41,98,219) e digestiva (41), bem como dos cabelos (98) e vestimentas (41,46), havendo emissão de partículas (46,62,98), que pode ser acentuada de acordo com a atividade em questão.

A composição da fórmula pode favorecer ou não o desenvolvimento microbiano durante a produção e o uso (62).

Após a fabricação, o armazenamento é determinante, sendo que condições de alta temperatura e umidade são favoráveis ao desenvolvimento microbiano (21), assim como problemas decorrentes do acondicionamento (151,162,183).

O início dos estudos sobre a contaminação microbiana em medicamentos não estéreis deu-se em decorrência dos problemas clínicos ocorridos, na década de 60, que foram atribuídos, comprovadamente, a medicamentos de má qualidade.

Kallings e colaboradores (93), em 1966, na Suécia, foram os primeiros a avaliar a qualidade microbiológica de várias formas farmacêuticas. Analisando 600 lotes de diferentes produtos, incluindo ungüentos, cremes,

linimentos, pós e cremes infantis, isolaram várias espécies bacterianas e fúngicas, entre elas Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, Bacillus subtilis, Alcaligenes sp. e leveduras. Analisaram, também, 160 lotes de comprimidos, dos quais 63, altamente contaminados, tendo apresentado bactérias como Bacillus subtilis, Staphylococcus albus, Alcaligenes sp. e bolores, e 38 amostras contendo coliformes em níveis da ordem de milhões por grama, além de outras espécies. Em 32 lotes detectaram coliformes termoresistentes, sendo que, em 15 deles os níveis superaram 10^3 /g. Onze das 28 amostras de pós para uso infantil e para uso em feridas apresentaram cargas bacterianas superiores a 10^3 /g.

Os estudos de Kallings e colaboradores (93) chamaram a atenção para o problema da contaminação microbiana em medicamentos, tendo servido de ponto de partida e incentivo para trabalhos de outros pesquisadores, em todo o mundo (5,6,23,40,53,54,62,73,101,138,139,140,164,184). Constatou-se que medicamentos de uso oral estavam especialmente contaminados (164) em relação aos outros, e entre eles, os de forma sólida foram apontados, por alguns autores (53), como sendo os que continham maior carga microbiana, diferindo de outros pesquisadores (40,54,62) que verificaram tal fato em outras formas farmacêuticas.

Na Inglaterra, em 1971, foi demonstrado que produtos farmacêuticos de uso oral e tópico industrializados, apresentavam melhor qualidade microbiológica quando comparados àqueles preparados em farmácias hospitalares (164). Em contraste, Fischer e colaboradores (73) bem como Fuglsang-Smidt e Ulrich (184) haviam encontrado resultados de pureza microbiana semelhantes, tanto para comprimidos produzidos em farmácias quanto em indústrias da Dinamarca, tendo obtido contagens bacterianas inferiores a 10^3 /g na maioria dos casos.

Sabe-se que a qualidade microbiológica do produto final é influenciada, diretamente, entre outros fatores, anteriormente comentados,

pela qualidade das matérias-primas, em função de sua natureza e origem (21, 62, 73, 76, 84, 93, 101, 109, 111, 122, 140, 151, 164).

Muitos pesquisadores comprovaram, de um modo geral, a presença de altas contagens microbianas nos medicamentos contendo insumos farmacêuticos e/ou princípios ativos de origem natural, tendo sido superiores às aquelas encontradas nos produtos com apenas componentes de origem sintética (53, 62, 73, 101, 139, 140, 164).

Desvignes e colaboradores (53) detectaram níveis de contaminação bacteriana maiores que 10^4 /g em 4,5, 12,5 e 2,0% dos medicamentos constituídos, respectivamente, por insumos de naturezas vegetal, animal e sintética.

Entre várias matérias-primas, o amido de batata foi o responsável pela contaminação em comprimidos, pois Kallings e colaboradores (93) encontraram coliformes em níveis da ordem de até 120/g nos lotes apresentando carga bacteriana total de até 10^4 /g. Da mesma forma, o pó de tireóide, empregado na fabricação dos comprimidos correspondentes, foi o causador do surto de salmonelose ocorrido, na Suécia, no início de 1966 (93). A análise do mesmo demonstrou a presença de 30 milhões de bactérias por grama, sendo a maioria da flora fecal. Isolou-se, além disso, Salmonella muenchen e Salmonella bareilly. Resultados semelhantes aos de Kallings e colaboradores foram verificados por Fischer e colaboradores (73, 184) 2 anos mais tarde. Assim, 2 lotes de comprimidos de tireóide industrializados (184) apresentaram níveis bacterianos de até 10^4 /comprimido, e 1 lote de comprimidos de tireóide e 1 de carvão medicinal, produzidos em farmácias dinamarquesas (73) tiveram carga bacteriana alcançando nível de até 10^5 /unidade. Os autores também puderam comprovar que comprimidos contendo drogas de origem natural, como carvão medicinal, folha de digitalis e tireóide foram os que acusaram as contagens mais elevadas. No único lote de comprimidos de digitalis padrão, as contagens variaram entre 10^5 e 10^6 bactérias por comprimido.

Através de vários estudos foi constatado que há predominância de certas espécies contaminantes em determinados tipos de produtos. Os medicamentos administrados por via oral podem conter vários tipos de microorganismos, principalmente, Bacillus sp., cocos Gram-positivos e fungos, provocando sérias consequências do ponto de vista da saúde do consumidor bem como acarretando problemas de risco do produtor (6,62).

Em amplo estudo realizado por Dony (62), em 1977, medicamentos sob a forma sólida como comprimidos, pós, drágeas e granulados apresentaram carga bacteriana inferior a 10^2 /g, sendo geralmente de bacilos aeróbios esporulados. Além disso, a presença de enterobactérias, estreptococos fecais e fungos foi relacionada com a inclusão de insumos de origem natural.

No caso dos medicamentos com base aquosa como soluções, suspensões e cremes, verificou-se, mais comumente, a presença de enterobactérias e Pseudomonas sp. (62,140), sendo que soluções constituídas de princípios ativos naturais apresentaram bactérias esporuladas (139); as suspensões contendo os mesmos tipos de componentes acusaram carga total superior a 10^5 /mL.

Particularmente, com relação a formas farmacêuticas sólidas de uso oral, Lambin e colaboradores (101), em 1953, mesmo anteriormente à década de 60, considerando os comprimidos como a forma farmacêutica mais empregada na época, preocuparam-se com a possibilidade de veiculação de microorganismos através deles. Realizaram, assim, análise microbiológica em comprimidos de vários tipos, contendo princípios ativos variados, entre os quais isolados de vegetais ou sintéticos (adrenalina, digitalina, sulfato de morfina, sulfato de estriquina), de origem animal (extrato de medula, pó de ovário, pó de fígado, pó de testículo, pó de glândulas supra-renais, pó de tireóide) e fermentos lácticos. As contagens bacterianas variaram de 0 a $1,2 \times 10^4$ por comprimido naqueles contendo princípios ativos naturais.

Outros autores fizeram levantamento da pureza microbiológica de formas farmacêuticas sólidas (5,6,40,53,54,65,73,91,127,184).

Considerando-se as exigências microbianas com relação ao teor de água livre (atividade de água) (62) esperava-se que as formas sólidas não favorecessem o desenvolvimento microbiano. Porém, Desvignes e colaboradores (53), em 1973, verificaram que estavam entre as formas galênicas mais contaminadas, tendo sido detectados níveis bacterianos até mesmo superiores a 10^4 /g em comprimidos, drágeas, cápsulas e granulados, com frequência, respectivamente, de 7,5, 11,0, 4,5 e 7,0%. A mesma pesquisa acusou a presença de clostrídios sulfito-redutores em 2 das amostras de drágeas e, em 1 das 54 amostras de comprimidos, além de estafilococos patogênicos em 1 amostra de comprimido e estreptococos, em 2 das 28 de granulados.

Na Índia, Jain e Chauhan (91), em 1978, verificaram contagem total de $4,36 \times 10^3$ /g em 10 lotes de comprimidos de anti-ácidos, fabricados por diferentes indústrias. Dois deles acusaram apenas contaminação por bactérias, enquanto que os demais apresentaram fungos. As espécies microbianas mais frequentes foram Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Staphylococcus pyogenes, Pseudomonas aeruginosa, Bacillus mirabilis, Bacillus coagulans e Klebsiella pneumoniae. Entre os fungos destacaram-se espécies como Aspergillus niger, Mucor sp., Alternaria sp., cada uma delas presente em 30% dos produtos analisados.

Em 1979, Devleeschouwer e Dony (54) em análise microbiológica efetuada em 30 pílulas e 26 cápsulas constataram qualidade inferior àquela encontrada por Desvignes e colaboradores (53) pois 34,6% tiveram contagens bacterianas superiores a 10^4 /g. No caso de pílulas, 40% apresentou carga de bactérias aeróbias viáveis inferior a 10^4 /g. A contaminação fúngica foi relativamente baixa. Todas as cápsulas e 17 amostras de pílulas tiveram contagem superior a 10^2 /g. Os bacilos esporulados Gram-positivos foram predominantes (93% das amostras). Nove amostras de pílulas e 5 de cápsulas revelaram-se contaminadas por Staphylococcus sp. As pílulas acusaram, ainda, presença de bacilos Gram-negativos, espécies aeróbias e anaeróbias facultativas, entero-

bactérias, espécies aeróbias estritas, Xanthomonas sp., Acinetobacter sp., estreptococos, bacilos Gram-negativos aeróbios estritos.

Contrariamente, os dados revelados por estudos anteriores de Buogo e Ratti (40), em 1972, indicaram níveis baixos de contaminação em cápsulas gelatinosas, comprimidos e drágeas, não tendo sido isolada Escherichia coli.

Em 1983, na Espanha, Arribas e colaboradores (5) avaliaram um total de 237 amostras constituídas de 4 formas farmacêuticas sólidas de uso oral tendo isolado 48 cepas de cocos Gram-positivos cuja maior percentagem foi encontrada em comprimidos (52,08%), seguidos de drágeas (22,92%), pós (16,66%) e cápsulas (8,33%).

Os gêneros mais frequentes foram Staphylococcus, Micrococcus e Streptococcus. Este último foi encontrado apenas em comprimidos e cápsulas, mas a maior proporção desses microorganismos foi observada em comprimidos. Não isolaram Staphylococcus aureus, porém, a espécie mais comum foi Staphylococcus epidermidis, atualmente considerada patogênica oportunista e não mais saprófita (5,85).

No mesmo ano, Härtling (82) verificou a qualidade de comprimidos e granulados a base de drogas vegetais usados como laxantes, tendo obtido para o primeiro contagens bacteriana e fúngica variando, respectivamente, de $7,0 \times 10^3$ a $3,7 \times 10^4$ e de 0 a 2×10^2 por grama. Os granulados apresentaram, para os mesmos requisitos, níveis de $8,5 \times 10^2$ a $1,4 \times 10^5$ e de 0 a $2,5 \times 10^2$ /g, respectivamente. Das 7 amostras analisadas 4 apresentaram enterobactérias e, destas, 2 em nível superior a 100/g.

Na Índia, Nandapurkar e colaboradores (127), em 1985, detectaram espécies patogênicas em comprimidos de uma farmácia hospitalar.

Posteriormente, em 1986, Arribas e colaboradores (6) continuaram a análise de formas farmacêuticas sólidas com 240 amostras, tendo verificado qualidade satisfatória, visto que a maioria delas se mostrou isenta de

bactérias, sendo que 73 (30,4%) apresentaram bactérias aeróbias e apenas 16 (6,66%) em nível superior a 10^3 /g. Foram isoladas 18 espécies de Bacillus a partir de 70 amostras (29,16%), tendo sido mais frequentes Bacillus subtilis, Bacillus brevis e Bacillus licheniformis. Também foram encontrados Staphylococcus sp., Micrococcus sp. e fungos.

No Brasil, em 1990, o Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) iniciou o controle microbiológico de fitoterápicos, visando identificar as bactérias e fungos isolados das diferentes amostras (175).

3.3 Padrão Microbiano

3.3.1 Padrão microbiano de insumos farmacêuticos

Os padrões microbianos para insumos fitoterápicos foram oficialmente exigidos muitos anos após o enquadramento dos mesmos como insumos farmacêuticos com qualidade farmacopéica. Entre esses, a primeira planta superior que recebeu atributo de pureza microbiana foi digitalis, que consta da Farmacopéia Americana na sua 18ª edição (204), de 1970, enquanto que, na especificação de levedura de cerveja já havia o requisito para limite de contaminante aeróbio mesófilo a partir da 13ª edição (199). É bem verdade que, no início, havia orientação oficial com advertência sobre "ausência tanto quanto possível de bolores" (NF XII, 1965) (128), o que também se verificou na USP a partir da 13ª edição (199) até a 17ª (203), tendo anteriormente, apresentado semelhante recomendação: "ausência de emboloramento", na 11ª (197) e 12ª (198) edições, respectivamente, em 1936 e 1942.

Na edição seguinte do Formulário Nacional (NF XIII) (129) e a partir da 18ª edição da Farmacopéia Americana (204), a expressão foi modificada para "drogas vegetais e animais deverão estar, o máximo possível, isen

tas de microorganismos, sendo que os patogênicos não deverão estar presentes".

Convém lembrar que, o primeiro insumo farmacêutico com especificação relativa à qualidade microbiológica foi a gelatina, pois, em função de sua origem, o limite tolerado foi de 10^4 bactérias totais por grama (USP XII, de 1942) (198). Esta tolerância foi alterada diversas vezes, tendo passado por 5×10^3 /g, na 18ª edição; 10^4 /g, na edição seguinte (205) e, finalmente, 10^3 /g a partir da 20ª (206). Além dessa exigência quantitativa havia outro requisito, isto é, ausência de patogênicos específicos numa determinada tomada de ensaio, sendo que esse aspecto foi igual e gradativamente mais exigente, pois a tomada de ensaio de "10 mg ou menos" (USP XII) (198) passou para 10 mg (USP XVI) (202) e, finalmente, para 10 g (USP XVIII) (204).

Inicialmente se impôs ausência de Escherichia coli (USP XII e XIII) (198,199), que foi modificada para "ausência de coliformes" nas 4 edições seguintes (200,201,202,203), mas que passou a ser reconsiderada na USP XVIII (204). Além disso, iniciou-se a exigência adicional sobre a ausência de Salmonella sp., permanecendo inalterada até a USP XXII (205,206,207,208).

As monografias farmacopéicas incluem requisitos para um ou mais patogênicos específicos em função da origem da matéria-prima, visando evitar a transmissão de doenças para os pacientes através da terapia medicamentosa. Em alguns casos, deve-se efetuar a pesquisa de determinados grupos contaminantes (coliformes, enterobactérias) a fim de avaliar a qualidade sanitária envolvida na obtenção e /ou preparo desses insumos.

Neste particular, segundo Bruch (35), as matérias-primas a serem empregadas no preparo de medicamentos de uso oral não devem conter Escherichia coli e Salmonella sp.; aquelas para uso tópico devem estar isentas de Escherichia coli, Staphylococcus aureus e Pseudomonas aeruginosa.

Atenção especial foi dirigida às matérias-primas pela Farmacopéia Americana, com a introdução de capítulo sobre "Atributos microbiológicos de produtos farmacêuticos não estéreis", na 18ª edição (204), tendo sugerido monitoramento com maior ênfase "com relação a matérias-primas de origem animal ou botânica, especialmente aquelas que permitem o crescimento microbiano e que não se tornam estéreis durante o processamento subsequente". A ausência de microorganismos viáveis patogênicos como Salmonella sp., Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Pseudomonas sp. e Staphylococcus aureus foi considerada atributo desejável para produto de qualidade adequada.

Na USP XIX (205), o mesmo capítulo incluiu consideração sobre esta categoria de insumos (origem vegetal e animal) de que "podem carregar microorganismos patogênicos não destruídos pelos processamentos posteriores", tendo introduzido, adicionalmente a pesquisa de microorganismos específicos, a contagem de microorganismos viáveis aeróbios totais. Sugeriu-se, inclusive que, os produtos contendo tais matérias-primas deveriam ser rotineiramente testados quanto à presença de Salmonella sp.

Na Farmacopéia Britânica, a partir da edição de 1973 (32) configuram as monografias de digitalis (folha) e de goma adraganta com tolerâncias declaradas para a presença de patogênicos específicos.

Analisando a exigência desses 2 padrões oficiais ao longo do tempo observa-se desvinculação entre o grau de contaminação saprófita total e a presença de patogênicos pois, a maioria das monografias exige apenas a pesquisa de patogênicos específicos.

As especificações farmacopêicas de alguns insumos fitoterápicos e farmacotécnicos de origem vegetal, quando observadas sob ponto de vista evolutivo através das edições, pode-se dizer que em muitas não houve sequer referência sobre a qualidade microbiana. Verifica-se também, que houve redução do número de matérias-primas vegetais, em vista da substituição por princípios

ativos naturais e/ou sintéticos. Em alguns casos, há diferença marcante entre as duas farmacopéias, seja no aspecto quali ou quantitativo, assim como na época de oficialização destas exigências. Para digitalis, na forma bruta, por exemplo, constaram as exigências de ausência de Escherichia coli em 1g da tomada de ensaio e de Salmonella sp. em 10g, na BP 73 (32) enquanto que a Americana, apesar de incluí-la como monografia, não apresentou padrão microbiano. No caso de pó, a BP 80 (33) exigiu apenas a ausência de Escherichia coli em 1g, tendo complementado o requisito com a recomendação para ausência de Salmonella sp., na última edição (34). Ao lado disto, a Farmacopéia Americana exigiu apenas a segunda parte deste requisito, a partir da 18ª edição (204), com exceção da 19ª (205) que não constou da monografia.

No caso de ágar, a exigência de ausência de Salmonella sp. em 10g surgiu na USP XVII (204), enquanto que na Farmacopéia Britânica, somente em 1988, constou a recomendação referente a ausência de Escherichia coli em tomada de 1g (34).

Tanto a Farmacopéia Americana, desde a 20ª edição (206), quanto a Britânica, desde 1932 (30) apresentaram especificações para ipecacuanha na forma de droga bruta e/ou de pó, porém sem requisito para a qualidade microbiológica.

No caso da rauwolfia, a Farmacopéia Britânica não a incluiu entre suas monografias, enquanto que a Americana fez exigências para ausência de Salmonella sp. em 10g, na sua edição de 1980 (USP XXI) (207), sendo que para o pó da droga, fez a mesma recomendação a partir da 20ª edição (206).

Para carvão ativo não há qualquer requisito constando da Farmacopéia Britânica, porém, a ausência de Salmonella sp. e de Escherichia coli em tomada de ensaio de 10g já configurou na USP XVIII (204).

Quanto aos adjuvantes farmacotécnicos de origem vegetal como o amido, o padrão microbiano da Farmacopéia Americana surgiu em 1970 (204) tendo sido mantido até hoje na USP XXII (208), referindo-se à ausência de Salmonella sp. e Escherichia coli em 10 g do pó, ao passo que apenas a última edição da Farmacopéia Britânica (34) tratou desse aspecto, apesar de sua importância, tendo recomendado a ausência de Escherichia coli em 1 g.

Para goma arábica, os requisitos de pureza microbiana, igualmente aos insumos ativos ou não foram semi-quantitativos e introduzidos a partir da USP XVIII (204), não permitindo a presença de Salmonella sp. em 10 g, ao passo que a BP 88 (34), de Escherichia coli em 1 g de pó.

Para goma adraganta, a Farmacopéia Britânica fez várias modificações no limite de pureza microbiana, desde 1973 (32), quando então exigiu ausência de Salmonella sp. em 10g, tendo passado a "ausência de Escherichia coli em 1g", na edição seguinte (33) e, finalmente, à somatória dos requisitos anteriores, na edição de 1988 (34). Na Farmacopéia Americana, os requisitos para este insumo foram introduzidos em 1980, na 20ª edição (206) com recomendação de ausência de Escherichia coli e Salmonella sp. em 10g.

Tanto a USP VIII (195) de 1905, UXP X (196) de 1920 até a USP XXII (208) quanto a BP 32 (30) até a BP 88 (34) não apresentam limite microbiano para as seguintes drogas vegetais, embora constem de monografias. Trata-se de cáscara sagrada, aloe, beladona, alcaçuz, ópio, bálsamo de Tolu entre outras. Além disso, verifica-se que são raras as monografias farmacopêicas a apresentarem limite microbiano referente a contaminantes fúngicos (71,199,200,201,205).

Com relação à regulamentação brasileira para insumos farmacêuticos de origem vegetal, observa-se a inclusão de padrões microbianos a partir da 2ª edição (71) sendo que para levedura seca configuram limites quantitativos para bactérias e fungos sendo de $7,5 \times 10^3$ bactérias e 50 fungos por grama à semelhança de recomendações da Farmacopéia Americana nas suas 13ª (199), 14ª (200) e 15ª (201) edições.

Na Farmacopéia Brasileira III (69), não constam os limites para a mesma matéria-prima. A última edição (70), de 1988, por ser apenas parte referente a métodos gerais não inclui monografias.

Em 1980, Lenoble e colaboradores (110) sugeriram normas para as espécies vegetais destinadas ao consumo sob a forma de chá. Para as bactérias aeróbias mesófilas, o limite era de 5×10^5 /g, enquanto que para fungos, de 5×10^2 /g e para enterobactérias, de 5×10^4 /g. Adicionalmente, a

pesquisa de Escherichia coli e Salmonella sp. deveria atender ao requisito de ausência de Ig em tomada de ensaio, sendo que a presença simultânea de estreptococos fecais e Clostridium perfringens não seria tolerada, e nem mesmo desse último isoladamente.

Em 1979, o grupo de especialistas da Farmacopéia Belga elaborou mesmo tipo de estudo, a fim de que as drogas vegetais e suas misturas constassem da 5ª edição sob a denominação de chás (55). Na mesma época, o grupo de estudos da Farmacopéia Européia propôs normas menos rígidas para esta categoria de insumos, com tolerância de até 5×10^4 microorganismos por grama, sem exigências para a pesquisa de microorganismos como Pseudomonas aeruginosa e Staphylococcus aureus (55).

Em 1983, foi publicada a Nota Técnica Pro Farmacopéia nº 190 (134) referente ao controle microbiológico de plantas medicinais, com as devidas adaptações em relação à Nota Técnica Pro Farmacopéia nº 189 (133) relativa ao "Controle da contaminação microbiana em produtos não estéreis", tendo constado os limites, respectivamente, para bactérias aeróbias totais e fungos, de 5×10^5 e 5×10^4 /g. Além de recomendação para a ausência de Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa e Staphylococcus aureus em 1 g.

3.3.2 Padrão microbiano de medicamentos não estéreis

Entre as propostas iniciais, a de 1954, da Farmacopéia da Tchecoslováquia (45,61), apresentou limites de contagem total bacteriana para comprimidos e produtos análogos (61). Posteriormente, na Suécia, após os estudos de Kallings e colaboradores (93) surgiu a proposta de limite de até 10^2 bactérias por grama ou mililitro de produto farmacêutico. Esse valor foi adotado em 1967 pela Junta Médica Real da Suécia em Memorando sobre higiene e produção e controle bacteriológico, na fabricação de medicamentos (188). Com isso, esse país passou a ser considerado o de origem das especificações para controle microbiano de medicamentos não estéreis, dos princípios ativos e adjuvantes farmacotécnicos (99).

A segunda edição da Farmacopéia Internacional (90), em 1967, recomendava que a contaminação microbiana de medicamentos não estéreis fos-

se inferior àquela permitida para os alimentos, pela legislação vigente em cada país. Semelhantemente, o critério sugerido pelo Laboratório de Serviço Nacional de Saúde da Dinamarca (130), em 1968, foi baseado no fato de que os medicamentos de uso oral não devem causar infecções no trato gastro-intestinal, à semelhança de alimentos. Assim, a preocupação esteve voltada para a comprovação da ausência de salmonelas e shigelas.

De forma geral, verifica-se que o estabelecimento inicial de normas microbiológicas para medicamentos de uso oral foi inspirado naquelas existentes para alimentos (120,166). Dony e Gérard (61), já em 1968, dividiram os medicamentos em categorias diferentes, tendo equiparado os produtos farmacêuticos de uso oral aos alimentos semi-conservados, razão pela qual os autores enfatizaram, igualmente, o aspecto sanitário recomendando a ausência de microorganismos indicadores de contaminação fecal, de patogênicos (especialmente salmonelas e shigelas), bem como daqueles responsáveis por toxi-infecções. Recomendaram carga bacteriana total inferior a 10^4 /g (mL), baseando-se em padrões para leite pasteurizado (3×10^4 /g), leite medicamentoso ($1,5 \times 10^4$ /g) e alimentos semi-conservados (10^4 /g).

Em 1969, Penso (149) propôs padrões mais rígidos do que os de Dony e Gérard (61), tendo limitado a carga viável total para 50/g (ml) no caso de xaropes e elixires; 10^2 /g (mL) para formas farmacêuticas sólidas, porém mantendo o mesmo limite do padrão anterior para cápsulas gelatinosas.

Segundo Westwood (213), em 1971, os padrões para contagem total de bactérias viáveis em certos alimentos, aceitos em muitos países, são de no máximo 10^5 /g apesar da vigência de níveis 5 a 10 vezes mais tolerantes que o limite anterior. Em função disto acredita ser razoável o de 10^4 /g, indicando, assim, o padrão de qualidade sanitária, uma vez que as matérias-primas de uso farmacêutico seriam, provavelmente, menos contaminadas que aquelas alimentícias.

No Brasil, o último padrão microbiológico vigente para alimentos foi estabelecido pela Divisão Nacional de Vigilância Sanitária de Ali-

mentos (28), em 1987, tendo sofrido algumas correções (29) e dá ênfase à de terminação de microorganismos patogênicos, além de requerer para "leite e produtos de laticínios", por exemplo, contagem padrão em placa de até 3×10^5 /mL (leite pasteurizado tipo C), sendo interessante notar que a to lerância máxima para bolores e leveduras é de 5×10^3 /g para produtos de infusão, sementes cruas ou torradas, especiarias em pó, sendo, nesse caso, a determinação desses microorganismos preferencial à contagem bacteriana. Com relação ao padrão brasileiro, a última edição da farmacopéia (70) in cluiu o método geral de análise para "produtos que não necessitam cumprir com o teste de esterilidade". Como não houve atualização simultânea das mo nografias e dos métodos gerais, o Brasil carece de limites de tolerância para contagem total de viáveis em medicamentos, embora existam para insumos.

Na Inglaterra, através de sua farmacopéia, edição de 1973 (32), pode-se observar conduta similar a outros países anteriormente mencionados, visto referir-se à pesquisas de patogênicos específicos como Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa e Salmonella sp., porém, salientando a não obrigatoriedade desses testes.

Em 1971, em Simpósio realizado em Londres (35) sobre o contro- le microbiológico de medicamentos e cosméticos, muitos especialistas ha- viam renovado a importância da necessidade de pesquisa de algumas espécies especificamente consideradas como indesejáveis nesses produtos. Chegou ao extremo exagero, segundo Evans (68), para a exigência de ausência de endo- toxinas.

Em 1972, a Federação Farmacêutica Internacional (FIP) apresen- tou relatório sobre os problemas gerais inerentes à pureza microbiana em medicamentos não estéreis (47). Este documento, incluindo os métodos de a- nálise, foi publicado em vários idiomas (39,165,214). Em 1976, no seu se- gundo relatório, foram apresentados os níveis de tolerância da contamina- ção microbiana, em função da categoria de medicamentos. Esta classificação

teve como base a proposta sugerida por Dony (62), que levou em consideração o risco da presença de diferentes espécies microbianas em função da ^{forma de} administração. A categoria 1, subdividida em grupos 1a e 1b, referia-se, respectivamente, aos produtos estéreis e àqueles de uso tópico. Neste segundo grupo (medicamentos de uso oftálmico e aqueles destinados à aplicação em cavidades normalmente livres de microorganismos, bem como queimaduras e ulcerações graves) o requisito era de que não houvesse contaminante viável em 1 g (mL) do produto. Na categoria 2 foram enquadrados aqueles de uso tópico, sobre pele e lesões, nas mucosas do nariz, garganta e ouvido, tendo sido recomendado o limite máximo de 10^2 /g (mL) de bactérias aeróbias, além da ausência de enterobactérias, Pseudomonas aeruginosa e Staphylococcus aureus em 1 g (mL) do produto. As outras especialidades farmacêuticas, pertencendo à categoria 3, onde se encontram os medicamentos de uso oral e outros, deveriam apresentar carga bacteriana inferior a 10^3 a 10^4 /g (mL) e fúngica, 10^2 /g (mL), além da obediência à ausência de Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa e Staphylococcus aureus em 1 g (mL) e conter, no máximo, 10^2 /g de outras enterobactérias. O limite bacteriano máximo fundamentou-se em caso de presença de componentes constituindo fonte inevitável de contaminação e cujo número não fosse reduzido durante o processo, subentendendo, portanto, a presença de matéria-prima de fonte natural.

No mesmo ano, Smart e Spooner (183) questionaram o padrão sueco em vigor que estabelecia a tolerância de até 10^2 microorganismos por grama, fazendo ressalva quanto ao "fator tempo", isto é, o momento no qual o produto deveria estar em conformidade ao requisito, se imediatamente após o término da manipulação ou meses ou anos após este instante. Além disto, outro aspecto diretamente relacionado ao tempo dizia respeito ao tipo de produto, se capaz de manter a viabilidade dos contaminantes iniciais ou, ainda, promover o crescimento dos mesmos.

A preocupação considerada por Buogo e Ratti (40), quando do

estabelecimento de limite para contaminante total como sendo $2 \times 10^2/\text{g}$ (mL), relacionava-se com o controle dos microorganismos patogênicos, devendo basear-se em critério probabilístico afeto a momentos específicos da produção, como por exemplo, no caso de manipuladores apresentarem alguma doença infecciosa.

Ao lado dos inúmeros padrões nacionais, também, a Comissão da Farmacopéia Européia, encarregada de estudos sobre a contaminação microbiana em medicamentos, propôs o seu muito semelhante ao da FIP, em 1973 (191). Mais tarde, em 1985, essa mesma farmacopéia incluía a metodologia para controle microbiológico de medicamentos, porém, sem haver definição dos limites de tolerância para os produtos acabados (8).

Em 1975, foi publicada a proposta de qualidade microbiana da Sociedade Italiana de Ciências Farmacêuticas (SISF) (60), com conteúdo semelhante ao da FIP, com diferenças no nível de exigência. Nesta, os produtos de aplicação tópica tiveram o limite de carga viável total bacteriana ou fúngica limitada em $10^2/\text{g}$ (mL) e ausência de Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa e Escherichia coli, sem a exigência para enterobactérias. Para os produtos de uso oral, o limite para carga bacteriana foi de $10^3/\text{g}$ (mL), enquanto que para fungos foi igual ao da FIP.

Em 1977, o Laboratório Nacional de Saúde da França (151) propôs normas de pureza microbiológica de acordo com as formas farmacêuticas, diferindo da FIP em alguns aspectos. Acrescentou a exigência para ausência de estreptococos fecais e clostrídios sulfito-redutores nos produtos correspondentes à categoria 2, além dos mencionados pela FIP (Staphylococcus aureus e Pseudomonas aeruginosa). Com relação à categoria 3, no tocante à pesquisa de patogênicos específicos exigiu-se a ausência de enterobactérias, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, estreptococos fecais e clostrídios sulfito-redutores.

Outra proposta foi apresentada por Tagliapietra (191), em 1978. Este vincula, no caso da categoria 2 da FIP (47), a pesquisa de patógenos específicos com a carga contaminante total, pois, se for baixa (menor que 10/g (mL)), tanto para bactérias aeróbias mesófilas ou fungos, basta efetuar a pesquisa de Escherichia coli em 1 g (mL) do produto. Porém, ultrapassado este limite, estando entre 10 e 10²/g (mL), a pesquisa de patógenos específicos inclui também Staphylococcus aureus e Pseudomonas aeruginosa.

Com relação aos produtos de uso oral e outros medicamentos, o limite para carga bacteriana e fúngica é de 10²/g (mL), ainda devendo estar livre de Escherichia coli em 1 g (mL).

Caso a contagem bacteriana recaia entre 10² e 10⁴/g (mL) e a fúngica até 10²/g (mL), a exigência complementar é de que esteja livre de Salmonella sp. e Escherichia coli em 1 g (mL), além de tolerância de enterobactérias até 10²/g (mL).

Mais recentemente, em 1982, Ringertz e Ringertz (169) recomendaram para produtos de uso tópico o mesmo limite da FIP para contagem total e número grande de espécies indesejáveis além das exigidas pela FIP, a saber: Serratia marcescens, Klebsiella sp., Pseudomonas putida, Pseudomonas multivorans (cepacia), Clostridium perfringens, Clostridium tetani, Clostridium novyi, Aspergillus sp. e Candida albicans. Para produtos de uso oral recomendam a ausência dos germes responsáveis por infecções alimentares como salmonelas, shigelas e Staphylococcus aureus enterotoxigênica, bem como fungos produtores de toxinas. Consideraram que, a exclusão de vírus pode ser deduzida quando da ausência de Escherichia coli como indicador de contaminação fecal.

Quando o produto contivesse corticosteróides o mesmo deveria ser aprovado pelo teste de esterilidade, considerando o aumento de susceptibilidade a infecções por parte dos pacientes (169).

Os padrões farmacopêicos americanos e britânicos para fitoterápicos constituindo forma farmacêutica foram semi-quantitativos, assim como para as respectivas drogas vegetais, embora haja padrões quantitativos para alguns medicamentos de uso oral.

Tanto para cápsulas e comprimidos de digitalis, a Farmacopéia Americana constou de limite microbiano a partir da 20ª edição (206), recomendando ausência de salmonelas em 10 g de produto. Enquanto que a BP apresentou monografias para os comprimidos, nas edições de 1953 (31) e de 1973 (32) em diante, porém, sem qualquer menção a padrão microbiológico.

A monografia de rauwolfia sequer foi incluída nesta mesma farmacopéia, diferentemente da Americana cuja exigência para os comprimidos constituídos desta mesma droga foi a ausência de salmonelas em 10 g de produto, a partir da 20ª edição (206).

Para ipecacuanha, na forma de xarope, a partir da USP XX (206) foi recomendada ausência de Escherichia coli para tomada de ensaio de 10 mL. Em contrapartida, não houve qualquer referência a forma farmacêutica contendo esta droga, na Farmacopéia Britânica.

Mesmo na década de 80, ainda não se contou com padrão único de pureza microbiana para produtos farmacêuticos não estéreis, o que levou muitas empresas a elaborarem as suas próprias especificações, baseando-se no histórico de cada produto (12, 166).

Em 1985, a Farmacopéia Italiana adotou critérios em dois níveis, isto é, caso o limite pré-fixado fosse superado, no tocante à contagem total, a avaliação deveria ser ampliada. Para pomadas e outros de uso tópico o limite pré-fixado para bactérias aeróbias mesófilas foi de 10/g (mL) sem exigência para pesquisa de espécies específicas. Não havendo obediência para com este limite, o segundo critério seria ampliado para 10^2 /g (mL) no caso de carga bacteriana e para fungos, de no máximo 10/g (mL),

além da pesquisa de Pseudomonas aeruginosa e Staphylococcus aureus com a ausência dos mesmos em 1 g (mL). Para medicamentos de uso oral como cápsulas, comprimidos, elixires, xaropes, etc. o limite bacteriano seria de 10/g (mL), sem necessidade para outras pesquisas. Entretanto, não havendo cumprimento deste requisito, a exigência subsequente seria não ultrapassar os seguintes limites: 10^3 a 10^4 /g (mL) de bactérias aeróbias mesófilas, 10^2 /g (mL) de fungos, 10^2 /g (mL) de enterobactérias, ausência de Escherichia coli em 1 g (mL) e de salmonelas em 10 g (mL) (8).

Até 1986, não havia critérios oficializados para chás, na França. Cortez e colaboradores (49) sugeriram considerá-los como forma final de consumo, razão pela qual o nível de qualidade deveria equivaler ao de medicamento de uso oral. Porém, na ausência de publicação oficial, vários padrões microbiológicos foram propostos e adotados pelas indústrias farmacêuticas.

Diante desta diversidade de padrões, apesar de não configurar limite numérico único, fica bem evidente a preocupação quanto à não transmissão de doenças aos pacientes como decorrência do tratamento medicamentoso, bem como da manutenção da estabilidade do próprio produto, evitando-se a sua deterioração durante o prazo de validade e consequentemente oferecendo segurança aos seus usuários. Desta forma, conforme já mencionado por Baird (12), em 1986, os fabricantes devem estabelecer os critérios de qualidade para seus produtos em função das matérias-primas integrantes da fórmula, e o seu potencial de carga microbiana contaminante, compatibilizando com o processo de manipulação, a fim de que a eficácia terapêutica e inocuidade sejam garantidas aos pacientes.

3.4 Metodologia de avaliação

Considerando a qualidade dos medicamentos não estéreis quanto

à sua pureza microbiológica, tornou-se necessária a padronização e adequação das técnicas bacteriológicas clássicas, de forma que esses métodos analíticos fossem confiáveis e reproduzíveis.

Tendo em vista o padrão de pureza microbiana desejável para gêneros alimentícios e a semelhança desses com medicamentos de uso oral (51), a metodologia de avaliação da qualidade microbiológica dos primeiros (3) serviu de modelo para o estabelecimento daquela relativa aos produtos farmacêuticos e afins (120,170).

Os métodos empregados visam detectar o número total de saprófitas viáveis e identificar alguns patogênicos específicos, com a finalidade de avaliar a qualidade microbiana. O isolamento das espécies indesejáveis representadas principalmente por aquelas indicadoras de contaminação fecal e/ou virtualmente patogênicas indica as condições sanitárias impróprias. Com isto, a verificação da pureza microbiana de medicamentos não estéreis e insumos farmacêuticos fundamenta-se basicamente em 2 aspectos (23,47,53,54,61,73,93,101,113,120,133,139,140,146,151,164,184,210). Um, da avaliação das condições gerais, através da quantificação de microorganismos viáveis e outro, da pesquisa de microorganismos específicos, conforme mencionado anteriormente, com a sua quantificação ou não. Portanto, a metodologia baseia-se em técnicas bacteriológicas rotineiras, com algumas adaptações, quando necessárias (9,49,55,73,82,95,110,131,177,213).

Os compêndios oficiais e/ou farmacopéias dirigiram a atenção, inicialmente, à contaminação microbiana de insumos farmacêuticos.

A primeira edição da Farmacopéia Americana a apresentar métodos de análise microbiológica foi a 12ª (198), em 1942, para gelatina, tendo descrito a técnica para contagem bacteriana total e a pesquisa de Escherichia coli. Na edição de 1947 (199), foi introduzida a metodologia específica, na monografia de levedura seca, abrangendo contagem fúngica, fato que se repete até a 15ª edição (201). Porém, somente em 1970, na 18ª edição

(204), constou o capítulo "Teste de limite microbiano", descrevendo as técnicas microbiológicas para a contagem total de microorganismos aeróbios viáveis e para a pesquisa de espécies microbianas específicas, como Escherichia coli, Salmonella sp., Staphylococcus aureus e Pseudomonas aeruginosa, cujos limites configuravam em algumas monografias.

Na Inglaterra, a metodologia de análise para medicamentos não estéreis foi introduzida, somente na edição de 1973 (32) da Farmacopéia Britânica sob a denominação "Teste para a contaminação microbiana", não havendo obrigatoriedade de seu uso em específico, porém com a ressalva: "quando métodos alternativos são empregados nas provas de controle deve ser usado número e tipo de microorganismo especificado", isto é, Escherichia coli, Salmonella sp. e Pseudomonas sp.

A Farmacopéia Britânica apresentou tendência para a análise semi-quantitativa e apenas sua última edição de 1988 (34) incluiu a contagem de microorganismos aeróbios viáveis totais.

Particularmente, com relação a insumos ou medicamentos fitoterápicos e adjuvantes farmacotécnicos de origem vegetal, ambas as farmacopéias apresentam especificações, cujo cumprimento ou não deve ser mediante a análise conforme a metodologia geral descrita para medicamentos não estéreis.

Apesar da subdivisão dos produtos farmacêuticos em três categorias, a Federação Farmacêutica Internacional (FIP) (47) apresentou metodologia semelhante àquela da Farmacopéia Americana. Constou, também, a contagem de fungos e a pesquisa de enterobactérias, além de Escherichia coli. A mesma foi recapitulada por Devleeschouwer e Dony (54), em 1979, tendo sido empregada na análise de fitoterápicos (55,82).

Com relação ao controle microbiológico de fungos, a Farmacopéia Americana apresentou item "Contagem total combinada de bolores e leveduras"

a partir da 21ª edição (206), em 1980, enquanto que somente a BP 88 (34) descreveu procedimento semelhante.

Em contraste, ao estudarem a qualidade de fitoterápicos, muitos autores pesquisaram a contaminação fúngica (9,49,55,82,95,110,114,131, 140,171,213), empregando métodos similares entre si.

A Farmacopéia Brasileira, na sua 2ª edição (71), introduziu a metodologia para "exame bacteriológico da gelatina" incluindo contagem total e pesquisa de coliformes, além da contagem bacteriana e fúngica, na especificação de levedura seca. Porém, somente, na 4ª edição (70), em 1988, foi apresentado o procedimento analítico para controle microbiológico de medicamentos não estéreis, através dos capítulos "Contagem de microorganismos viáveis em produtos que não necessitam cumprir com o teste de esterilidade", tratando da quantificação de bactérias e fungos e "Método geral para pesquisa e identificação de patógenos", sendo estes os mesmos indicados pela USP (204).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

O presente estudo foi realizado com fitoterápicos constituindo especialidades farmacêuticas sob a forma sólida, abrangendo comprimido, cápsula e pó. A amostragem das mesmas foi efetuada em farmácias, drogarias, lojas de produtos naturais e supermercados da cidade de São Paulo, no período de setembro de 1987 a julho de 1989, totalizando 84 lotes, produzidos por 20 fabricantes estabelecidos em 6 estados brasileiros: São Paulo, Santa Catarina, Mato Grosso, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul e Pará. Assim a amostragem abrangeu 21 comprimidos, 48 cápsulas e 15 pós, em que constam 17 espécies vegetais.

4.2 Métodos

4.2.1 Apresentação comercial das amostras

4.2.1.1 Droga vegetal

A classificação e a frequência de ocorrência da espécie vegetal integrante da fórmula foram baseadas em informações contidas na bula, no rótulo e/ou no cartucho do produto.

4.2.1.2 Forma farmacêutica

Os produtos amostrados foram subdivididos em comprimido, cápsula e pó, verificando-se a presença ou não de denominação correspondente no material impresso da embalagem.

4.2.1.3 Bula

Observou-se o acompanhamento ou não da bula como folha impressa contendo as informações pertinentes ao produto, conforme a legislação em vigor (24,25), dentro da embalagem secundária ou como recurso alternativo através de informações impressas tanto no rótulo da embalagem primária como na própria embalagem secundária.

4.2.1.4 Identificação do ciclo produtivo

Foi verificada, em cada apresentação farmacêutica comercial, o cumprimento às exigências legais (24,25) no tocante à identificação do ciclo produtivo, através da informação traduzida por data de fabricação, prazo de validade e número de lote.

4.2.1.5 Embalagens primária e secundária

A embalagem primária foi classificada quanto ao tipo e natureza, enquanto que a secundária, quando presente, quanto à sua natureza.

4.2.1.6 Responsável técnico

Verificou-se, conforme a legislação sanitária vigente (24,25), a inscrição do nome do responsável técnico, no material impresso.

4.2.1.7 Qualificação legal

O cumprimento às exigências legais quanto ao registro do produto em órgão de vigilância sanitária foi verificado no material impresso de cada apresentação farmacêutica.

4.2.1.8 Outras informações

Verificou-se a presença de dizeres como "alimento dietético", "complemento nutritivo", "produto natural" e de afirmações quanto à ausência de toxicidade, além da inclusão do nome científico da droga, discriminação do conteúdo em droga por unidade de forma farmacêutica.

4.2.2 Tratamento e tomada de ensaio das amostras

Foi efetuada a limpeza e desinfecção externa da embalagem primária, antes da sua abertura, com algodão embebido em etanol a 70% (v/v) (46). Todo o procedimento analítico obedeceu às condições assépticas, com uso de utensílios, vidrarias e meios de cultura previamente esterilizados. As amostras foram preparadas conforme a forma farmacêutica (6,40,146) e as características físicas (37,47,133,208).

4.2.2.1 Comprimidos

Foi determinado o peso médio de 10 unidades. Trituraram-se várias delas em gral esterilizado e a tomada de exatamente 5g do produto foi efetuada em erlenmeyer de 100 mL. Após a adição de 45 mL do diluente (solução fisiológica contendo 0,5% (p/v) de polissorbato 80) e agitação manual obteve-se a suspensão do pó, correspondente à diluição 10^{-1} .

4.2.2.2 Cápsulas

Determinou-se o peso médio das cápsulas cheias. A tomada de ensaio em número de cápsulas foi baseada neste dado, de modo a aproximar de 5,0 g. O volume do diluente foi ajustado para obter a diluição correspondente a 10^{-1} , como no caso dos comprimidos. A dissolução da gelatina foi

acelerada mediante aquecimento da mistura em banho de água, a 40-45°C, durante 10 minutos, seguido de agitação manual.

4.2.2.3 Pós

A preparação da diluição 10^{-1} foi segundo a técnica descrita para comprimidos (item 4.2.2.1).

4.2.3 Determinação de contaminantes viáveis totais

4.2.3.1 Determinação de bactérias aeróbias mesófilas viáveis totais

4.2.3.1.1 Técnica de tubo múltiplo (34,47,70,133,208)

A partir da amostra diluída a 10^{-1} , segundo o item 4.2.2, efetuaram-se diluições seriadas decimais até 10^{-6} , com auxílio de 9 mL de solução fisiológica estéril. A partir de cada uma das diluições foram transferidas alíquotas de 1 mL para réplica de 3 tubos contendo 9 mL de caldo de caseína-soja (Difco).

Os tubos foram incubados em estufa à temperatura de $36 \pm 1^{\circ} \text{C}$, por 72 horas, com observação macroscópica dos mesmos a cada 24 horas, anotando-se os dados positivos para o aparecimento de turvação como resultado do desenvolvimento bacteriano. Após 72 horas de incubação todos os tubos foram agitados manualmente e sempre que houve dúvidas na diferenciação do crescimento bacteriano e turvação inerente à amostra em suspensão, procedeu-se à confirmação. Para isto, alíquota de 0,1 mL foi inoculada para 4 mL de caldo caseína-soja, seguida de incubação nas mesmas condições, durante 24 horas.

Quando a triplicata de tubos correspondente à diluição 10^{-6}

acusava crescimento em todos, o reteste foi efetuado com diluições decimais maiores até que resultassem tubos positivos e negativos dentro da réplica.

Os dados obtidos, com ou sem subcultura, serviram para a determinação da estimativa de contaminação por grama de produto, através da Tabela do Número Mais Provável (NMP).

4.2.3.1.2 Técnica de ágar fundido (34,47,70,133,170,208)

As suspensões diluídas das amostras, preparadas conforme o item anterior, serviram para este ensaio. Aliquotas de 1,5 e 1,0 mL foram transferidas para duplicata de placas de Petri e homogeneizadas com cerca de 20 mL de ágar caseína-soja (Difco). As condições de incubação foram idênticas às do procedimento anterior, efetuando-se contagem diária de colônias, até 72 horas.

Para efeito de cálculo foram selecionadas as placas cujo número de colônias variou de 30 a 300, em que o valor médio foi multiplicado pela recíproca da diluição correspondente. Apenas 3 amostras escolhidas ao acaso, foram analisadas através desta técnica.

4.2.3.2 Determinação de leveduras e bolores viáveis totais

4.2.3.2.1 Técnica de tubo múltiplo (34,47,70,208)

O procedimento analítico foi o mesmo aplicado para as bactérias. O meio de cultura utilizado foi caldo Sabouraud-dextrose (Difco), acrescido de tetraciclina (0,01%) após a autoclavação sob a forma de solução aquosa (0,2%) esterilizada por filtração em membrana de 0,22 μ m. Os tubos foram incubados em estufa a 20-25°C, por 7 dias. Tanto a turvação como a presença de hifas foi considerada resposta positiva para fungos. No primeiro

caso, foi efetuada a confirmação da natureza da turvação pela observação micromorfológica do material corado pelo Gram.

A estimativa da carga viável foi segundo a Tabela do Número Mais Provável.

Nos casos em que a subcultura foi necessária empregou-se a mesma técnica do item 4.2.3.1.1, utilizando o caldo Sabouraud-dextrose acrescido de tetraciclina.

4.2.3.2.2 Técnica de ágar fundido (34,47,70,133,208)

O procedimento analítico foi idêntico ao aplicado para a contagem de contaminantes bacterianos, diferindo no tocante ao meio de cultura, pois, alíquotas de 1 mL das diluições correspondentes a 10^{-1} a 10^{-3} foram homogeneizadas com ágar seletivo para fungos (Biobrás). Este meio de cultura contém 400 mg/L de cicloheximida e 50 mg/L de cloranfenicol. A incubação foi conforme o item 4.2.3.2.1. A confirmação das colônias duvidosas, com vistas à diferenciação com o crescimento bacteriano, foi feita através de esfregão do material e coloração de Gram. Selecionaram-se as placas contendo até cerca de 100 colônias para efetuar o cálculo do número total de viáveis por grama de amostra.

4.2.3.3 Determinação de esporos de bactérias aeróbias mesófilas (146,194)

Alíquota de 10 mL da diluição 10^{-1} das amostras, contida em tubo de ensaio, foi aquecida em banho de água, a $80 \pm 1^{\circ}\text{C}$, por 10 minutos. Após resfriamento rápido da mistura, em água fria, até atingir a temperatura ambiente, foi sucessivamente diluída e submetida à análise, pela técnica do tubo múltiplo, conforme o item 4.2.3.1.1.

4.2.4 Pesquisa de coliformes (2,52,88,126)

4.2.4.1 Prova presuntiva para coliformes totais

Semeou-se uma alíquota de 10 mL da suspensão inicial da amostra, correspondente à diluição 10^{-1} , em tubo de ensaio contendo 20 mL de caldo lactose (Merck) de dupla concentração, com tubo de Duhran. Os tubos foram incubados em estufa a $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$, com observação a 24 e 48 horas. Aqueles que apresentaram crescimento e produção de gás foram considerados positivos para a prova presuntiva.

4.2.4.2 Prova confirmatória para coliformes totais

A partir dos tubos positivos da prova presuntiva inoculou-se uma alçada para tubos contendo 9 mL de caldo lactose-bile-verde brilhante (Difco), com tubo de Duhran. Após incubação dos tubos, em condições idênticas às prova presuntiva, foram considerados positivos aqueles que apresentaram crescimento e produção de gás neste meio de enriquecimento seletivo.

4.2.4.3 Prova confirmatória para coliformes fecais

A partir dos tubos positivos da prova confirmatória para coliformes totais foi inoculada uma alçada para tubo contendo 9 mL de caldo EC (Difco), com tubo de Duhran. A incubação foi em banho de água, a $45,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, por 24 horas, considerando-se resposta positiva quando havia turvação e formação de gás.

4.2.4.4 Prova confirmatória para Escherichia coli

4.2.4.4.1 Isolamento seletivo

A partir dos tubos positivos da prova confirmatória para coliformes fecais foi feito repique em estria, na superfície do ágar eosina-azul de metileno (Biobrás). Após a incubação das placas por 24 horas a $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$, as colônias suspeitas foram confrontadas com a descrição da literatura, bem como com a cepa padrão de Escherichia coli UC 677, repicada e incubada em condições idênticas.

4.2.4.4.2 Identificação micromorfológica

As colônias foram repicadas em ágar caseína-soja inclinado e incubadas em condições idênticas às do isolamento seletivo. O crescimento resultante, após esfregaço e coloração de Gram, foi observado microscópicamente, considerando-se positivo quando se tratava de bacilos Gram-negativos, não esporulados.

4.2.4.4.3 Confirmação da fermentação de lactose

As colônias suspeitas foram repicadas para caldo lactose contendo tubo de Durham. A liberação de gás e crescimento após a incubação dos tubos a $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24 a 48 horas foi considerada prova positiva.

4.2.4.4.4 Prova do IMViC

As colônias suspeitas, isoladas seletivamente e confirmadas como típicas em função dos 2 testes anteriores foram submetidas às provas bioquímicas, comparativamente à cepa padrão.

4.2.4.4.4.1 Teste do indol

Foi feito o repique do crescimento resultante em ágar caseína-soja inclinado para tubo contendo 5 mL de água peptonada. Após a incubação do mesmo durante 24 horas a $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$, a metade do líquido foi agitado com 1 mL de clorofórmio. Uma vez separada a fase clorotórmica foi adicionado, com cuidado e pela parede o tubo, 0,5 mL de reativo de Erlich. A prova foi considerada positiva quando a camada clorotórmica apresentou coloração vermelha. Caso contrário, o teste foi repetido após a incubação de mais 24 horas.

4.2.4.4.4.2 Teste de vermelho de metila

O crescimento resultante em ágar caseína-soja inclinado foi inoculado em 5 mL de caldo de Clark e Lubs, seguido de incubação a $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 72 horas. Pela adição de 5 gotas do indicador vermelho de metila a prova foi considerada positiva quando houve o desenvolvimento imediato de coloração avermelhada estável. A prova foi repetida com culturas incubadas durante 4 a 5 dias quando a coloração foi alaranjada, indicando resposta fracamente positiva.

4.2.4.4.4.3 Prova de Voges-Proskauer

O caldo de Clark e Lubs, inoculado como no teste anterior, porém incubado por 24 a 48 horas, a $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$, serviu para esta prova. Cerca de 1 mL da cultura foi transferido para um tubo, seguida de adição de 0,6 mL de solução de alfa-naftol a 5% e 0,2 mL de solução de hidróxido de potásio a 40%, com agitação após cada adição. O não desenvolvimento de coloração avermelhada foi considerado prova positiva para a presença de Escheri
chia coli.

4.2.4.4.4 Prova de utilização do citrato

O crescimento resultante em ágar caseína-soja foi repicado para ágar citrato de Simmons (Difco) inclinado, em picada e estria. A incubação do tubo foi em condições idênticas à prova anterior (ítem 4.2.4.4.3). O não desenvolvimento de coloração azul intensa e/ou crescimento no trajeto da picada e na superfície foram sinais considerados prova positiva para Escherichia coli.

4.2.5 Pesquisa de Salmonella sp. (7,34,160,208)

4.2.5.1 Enriquecimento não seletivo

Uma tomada de ensaio de 5 g de amostra foi homogeneizada com 45 mL de caldo lactose (Merck), seguida de incubação em estufa, a $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$, durante 24 a 48 horas.

4.2.5.2 Enriquecimento seletivo

Aliquotas de 1 mL de suspensão resultante do enriquecimento não seletivo foram inoculadas em 10 mL dos caldos tetrationato (Difco) e selenito-cistina (Difco) e incubados em estufa, durante 24 horas, a $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$.

4.2.5.3 Isolamento de identificação

A partir do crescimento obtido em enriquecimento seletivo fizeram-se repiques em estria, na superfície do ágar sulfito de bismuto (Difco) e do ágar verde brilhante (Difco). As condições de incubação foram iguais às do enriquecimento seletivo e as colônias suspeitas foram repicadas, em picada e estria para ágar-ferro-tríplice açúcar (Difco) inclinado e ágar ferro-lisina (Difco) inclinado. Os

tubos foram incubados em estufa a $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 e 48 horas, respectivamente.

As reações bioquímicas, bem como as etapas anteriores de isolamento seletivo foram confrontadas com a descrição da literatura, além do acompanhamento pela cepa padrão de Salmonella thyphosa ATCC 6539.

Procedeu-se à observação microscópica, após coloração de Gram do crescimento cuja resposta bioquímica indicou reação positiva, a fim de confirmar a presença de bacilos Gram-negativos.

4.2.6 Estimativa de Escherichia coli

As amostras cujas provas do item 4.2.4.4 indicaram resposta positiva para Escherichia coli foram submetidas à análise quantitativa pela técnica do tubo múltiplo.

Prepararam-se diluições seriadas decimais até 10^{-4} tendo-se prosseguido com a técnica analítica do item 4.2.3.1.1 empregando-se o caldo lactose (Merck) e a incubação a $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 48 horas.

Repicou-se 1 mL do crescimento com resposta positiva para 5 mL de caldo EC (Difco) com tubo de Duhran, tendo-se incubado a $45,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, em banho de água, durante 24 horas. Os tubos com resposta positiva, em função da diluição correspondente, serviram para a determinação do Número Mais Provável de Escherichia coli por grama de amostra.

5. RESULTADOS

5.1 Apresentação das amostras

Todas as informações relativas às características inerentes à comercialização, qualificação legal e demais inscrições presentes na forma de apresentação das especialidades fitoterápicas amostradas encontram-se relacionadas, respectivamente, nas Tabelas I, II III (pg. 51,52,53).

5.2 Determinação de contaminantes viáveis totais

Os valores do Número Mais Provável (NMP/g) encontrados nos 84 lotes para bactérias aeróbias mesófilas, esporos bacterianos e fungos, em função da espécie vegetal e da forma farmacêutica, constam, respectivamente, das Tabelas IV, V, VI e VIII, IX, X (pg.54,55,56 e 58,59).

A Tabela XII (pg. 61) refere-se à incidência de bolores, leveduras e de ambos, de acordo com a forma farmacêutica.

A carga de microorganismos viáveis totais (NMP/g) dos lotes correspondentes aos produtores com amostragem mais abrangente encontram-se nas Tabelas XVII (produtor A) (pg. 66), XVIII (produtor B) (pg. 67), XIX (produtor L) (pg. 68) e XX (produtor G) (pg. 69). Os dados equivalentes, porém, correspondentes a produtores com menor amostragem acham-se na Tabela XXI (pg. 70).

5.3 Pesquisa de patógenos específicos

5.3.1 Pesquisa de coliformes e de Salmonella sp.

Do total de 84 amostras, 61 acusaram crescimento em caldo lactose e, destas, 40 produziram gás e turvação em caldo lactose-bile-verde brilhante.

Das 40 amostras repicadas para caldo EC, 13 acusaram crescimento e produção de gás. Destas, 5 apresentaram reações bioquímicas preliminares positivas, tendo-se observado colônias suspeitas para Salmonella sp. em ágar ferro-tríplice açúcar, diferentemente do ágar ferro-lisina em que as reações foram atípicas.

As Tabelas VII e XI (pg. 57 e 60) relacionaram a incidência dos microorganismos patogênicos específicos pesquisados, respectivamente, com a espécie vegetal e forma farmacêutica das 84 amostras.

Ainda, a verificação da presença de coliformes totais, coliformes fecais e de Salmonella sp., em função da carga de bactérias aeróbias mesófilas, esporos bacterianos e fungos, consta, respectivamente, das Tabelas XIII, XIV e XV (pg. 62,63 e 64).

5.3.2 Isolamento e determinação de Escherichia coli

Do total de 13 amostras que acusaram a presença de coliformes fecais, 5 apresentaram reação confirmatória positiva para o microorganismo, tendo-se verificado colônias típicas em meio de isolamento seletivo (ágar eosina-azul de metileno), que foram positivas para a fermentação de lactose e prova do IMViC. A Tabela XVI (pg. 65) relaciona os dados de contagem de microorganismos viáveis para as 13 amostras contendo coliformes fecais, fornecendo, para aquelas positivas para Escherichia coli o resultado da sua determinação quantitativa.

TABELA I - Relação entre amostragem de fitoterápicos e características inerentes à comercialização

DROGA VEGETAL	AMOSTRAGEM	PRODUTOR **	EMBALAGEM		BULA	IDENTIFICAÇÃO		PRAZO DE VALIDADE (anos)	TÉCNICO RESPONSÁVEL (omissão)
			Primária	Secundária		Nº lote	Data de fabricação		
ALCACHOFA	05 cápsula	B,B,L,L,N	p,p,p,p,p	-,-,c,c,-	-,-,rc,rc,-	B,B,L,-,-,	B,B,-,-,-	3,3,-,-,-	
	01 comprimido	K	v	-	r	K	K	3	
BOLDO	02 comprimido	L,L	p,p	c,c	rc,rc	-,-	-,-	-,-	
	01 pó	C	s	fl	r*	C	C	2	
CARVÃO MEDICINAL	01 comprimido	I	s	c	a	-	-	-	
CASTANHA DA ÍNDIA	02 cápsula	B,B	p,p	-,-	-,-	B,B	B,-	3,3	
CATUABA	03 cápsula	B,B,M	p,p,b	-,-,c	-,-,a	B,B,M	B,B,M	3,5,2	
CENTELHA ASIÁTICA	03 cápsula	B,B,L	p,p,p	-,-,c	-,-,rc	B,B,-	B,B,-	3,3,-	L
CONFREI	01 cápsula	B	p	-	-	B	B	3	
ESPINHEIRA SANTA	01 cápsula	B	p	-	-	B	B	3	
ESPIRULINA	03 cápsula	B,B,L	p,p,p	-,-,c	-,-,rc	B,B,-	B,B,-	3,3,-	L
FUCUS	05 cápsula	B,B,L,L,N	p,p,p,p,p	-,-,c,c,-	-,-,rc,rc-	B,B,-,-,-	B,B,-,-,-	1,3,-,-,-	
GINSENG BRASILEIRO	02 cápsula	B,B,	p,p,	-,-	-,-	B,B	B,B	3,3	
	01 comprimido	L	p	c	-	-	-	-	L
GINSENG COREANO	03 cápsula	A,A,E	p,p,p,	-,-,c	r,r,a	A,A,-	A,A,E	3,3,-	
GUARANÁ	06 cápsula	A,A,A,B,L,L	p,p,p,p,p,p	-,-,-,-,c,c	r,r,r,-,rc,rc	A,A,A,B,-,L	A,A,A,B,-,-	3,3,3,5,-,-	
	08 comprimido	C,C,G,G,H,K,K,N	v,v,s,p,p,v,v,p	c,c,-,-,-,-,-	-,-,-,-,-,r,r,-	C,C,-,G,-,-,K,N	-,-,-,-,-,K,N	5,5,-,-,-,-,3,-	
	13 pó	B,B,C,C,D,H,H,J,J,P,R,S,I	p,p,s,s,p,p,p,e,fl,fl,p,v,v	-,-,fl,fl,-,-,-,c	-,-,r*,r*,r,-,-,a	B,B,C,C,-,-,-,-	B,B,C,-,-,-,-,-	3,3,2,2,-,-,-,-	D,J J,R,S,I
LECITINA DE SOJA	05 cápsula	A,B,B,L,Q	p,p,p,p,b	-,-,-,c,c	r,-,-,rc,c	A,B,B,L,-	-,-,-,-,-	3,3,3,-,-	
LEVEDURA DE CERVEJA	02 cápsula	B,L	p,p	-,c	-,rc	B,-	-,-	3,-	
	08 comprimido	A,B,G,G,G,G,H,H	p,p,p,s,p,p,p,p	-,-,-,-,-,-,-,-	r,-,-,-,-,-,-,-	A,B,-,-,G,G,-,-	-,-,-,-,-,-,-,-	3,3,-,-,-,-,-	
	01 pó	B	p	-	-	B	-	5	
ÓLEO DE GERME DE TRIGO	06 cápsula	A,A,B,B,O,Q	p,p,p,p,p,b	-,-,-,-,-,c	r,r,-,-,-,r,c	A,A,B,B,O,-	-,-,-,-,-,-	3,3,3,5,2,-	Q
ZEDOÁRIA	01 cápsula	F	p	-	a	-	-	1	

**Para o mesmo produtor com mais de um lote amostrado, manteve-se a correlação sequencial entre estes e os dados discriminados na tabela.

- - ausência de informação
a - bula como impresso avulso
b - "blister"
c - cartucho
e - envelope de papel plastificado
fl- fibra-lata

p - frasco plástico
r - rótulo da embalagem primária
r* - rótulo da embalagem secundária
s - saco plástico
v - frasco de vidro

TABELA II - Aspecto legal dos produtos amostrados (nº de lotes) quanto ao seu registro

DROGA VEGETAL	AMOSTRAGEM	PRODUTOR*	MINISTÉRIO DA SAÚDE				MINISTÉRIO DA AGRICULTURA	SEM REGISTRO	PRODUTO OFICINAL	
			Sem especificação	DIMED	DINAL	Isento			Alopático	Homeopático
ALCACHOFA	05 cápsula 01 comprimido	B,B,L,I,N K				K		L ^e ,L ^e ,N		B ^d ,B ^d
BOLDO	02 comprimido 01 pó	L,L C						L ^e ,L ^e	C ^a	
CARVÃO MEDICINAL	01 comprimido	I				I			I ^a	
CASIANHA DA INDIA	02 cápsula	B,B								B ^d ,B ^d
CATUABA	03 cápsula	B,B,H		H						B ^d ,B ^d
CENTELHA ASIÁTICA	03 cápsula	B,B,I						L ^e		B ^d ,B ^d
CONFREI	01 cápsula	B								B ^d
ESPINHEIRA SANTA	01 cápsula	B								B ^d
ESPIRULINA	03 cápsula	B,B,L						L ^e		B ^d ,B ^d
FUCUS	05 cápsula	B,B,L,L,N						L ^e ,L ^e ,N		B ^d ,B ^d B ^d ,B ^d
GINSENG BRASILEIRO	02 cápsula 01 comprimido	B,B L	L					L ^e		
GINSENG COREANO	03 cápsula	A,A,E	A,A,E							
GUARANÁ	06 cápsula	A,A,A,B,L,L	A,A,A					L ^e ,L ^e		B ^d
	08 comprimido	C,C,G,G,H,K,K,N	C,C	K,K				G,G,N	K,K	C ^d ,C ^d ,H ^d
	13 pó	B,B,C,C,D,H,H,J,J, P,R,S,I	J ² R,S			B	J ¹	D	C ^a ,C ^a pc	B ^d ,B ^d ,H ^d ,H ^d
LECITINA DE SOJA	05 cápsula	A,B,B,L,Q	A,B,B	Q				L ^e		
LEVEDURA DE CERVEJA	02 cápsula	B,L						L ^e		B ^d
	08 comprimido	A,B,G,G,G,H,H	A					G,G,G,G,H ^e ,H ^e	H,H	B ^d
	01 pó	B								B ^d
ÓLEO DE GERME DE TRIGO	06 cápsula	A,A,B,B,O,O	A,A,O		Q			B ^e ,B ^e		
ZEDOÁRIA	01 cápsula	F				F			rb	

* Para o mesmo produtor com mais de um lote amostrado, manteve-se a correlação sequencial entre estes e os dados discriminados na tabela.

a - Farm. Bras.
b - Farm. Bras. I
c - Farm. Bras. III

d - Farmacopéia Homeopática Brasileira
e - Produto homeopático

TABELA III - Algumas informações relevantes inscritas no material gráfico dos produtos amostrados

DROGA VEGETAL	AMOSTRAGEM	PRODUTOR**	ESTADO DA FEDERAÇÃO	IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA		PRODUTO NATURAL	AFIRMAÇÃO DE INOCUIDADE	ALIMENTO/ PRODUTO DIETÉTICO	COMPLEMENTO NUTRITIVO	MILIGRAMAS DA DROGA POR UNIDADE	POSOLOGIA
				Presença	Nome científico						
ALCACHOFA	05 cápsula 01 comprimido	B,B,L,L,N K	SP(B,L,N) RJ	L,L	Cynara scolymus					L,L K	L,L
BOLDO	02 comprimido 01 comprimido	L,L C	SP(L) SP	L C	Peumus boldus PFUMUS BOLDUS	C	C				L,L C
CARVÃO MEDICINAL	01 comprimido	I	SP			I	I			I	I
CASTANHA DA INDIA	02 cápsula	B,B	SP(B)								
CATUABA	03 cápsula	B,B,M	SP(B,M)			M					M
CENTELHA ASIÁTICA	03 cápsula	B,B,L	SP(B,L)	B,B	CENTELLA AS.			L			L
CONFREI	01 cápsula	B	SP								
ESPINHEIRA SANTA	01 capsula	B	SP								
ESPIRULINA	03 cápsula	B,B,L	SP (BL)					L		L	L
FUCUS	05 cápsula	B,B,L,L,N	SP(B,L,N)	B,B,L,L,N	1*(B,B),2*(L,L),3*(N)					L,L	L,L
GINSENG BRASILEIRO	02 cápsula 01 comprimido	B,B L	SP(B) SP	L	Pfaffia paniculata						
GINSENG COREANO	03 cápsula	A,A,E	SP(A),RS(E)			E	E			B,B,L	A,A,E
GUARANÁ	06 cápsula	A,A,A,B,L,L	SP(A,B,L)	L ¹	Paulinia sorbilis(l ¹)	A,A,A	A,A,A			A,A,A	A,A,A,L,L
	08 comprimido	C,C,G,G,H,K,K,N	SP(C,G,H,N),RJ(K)	C,C	PAULINIA CUPANA(C,C)					N,G,G	K,K
	13 pó	B,B,C,C,D,H,H,J,	SP(B,C,H),PA(D),MI(J),	C,C	PAULINEA CUPANA(C,C)	C,C,D,H,H,J,	C,C				C,C,D,J
		J,P,R,S,I	MI(J),SP(P,R,S,I)	J,I	4*(J,T)	J,P,R,I	P				J,P,R,S,T
LECITINA DE SOJA	05 cápsula	A,B,B,L,Q	SP(A,B,L,Q)			A,Q	A	A,L,Q	A	A,B,B,L,Q	A,L,Q
LEVEDURA DE CERVEJA	02 cápsula	B,L	SP(B,L)			L					L
	08 comprimido	A,B,G,G,G,G,H,H	SP(A,B,G,H)			A	A			A,G,G,G,G	A
	01 pó	B	SP								
ÓLEO DE GERME DE TRIGO	06 cápsula	A,A,B,B,O,Q	SP(A,B,O),SC(O)			A,A,O,Q	A,A,O	A,A,Q	A,A	A,A,B,B,O,Q	A,A,O,Q
ZEDOÁRIA	01 cápsula	F	SP	F	Curcuma zedoaria					F	F

** Para o mesmo produtor com mais de um lote amostrado, manteve-se a correlação sequencial entre estes e os dados discriminados na tabela.

1* - FUCUS VES.
2* - Fucus vesiculosus
3* - FUCUS VESICULOSUS
4* - Paulinia Cupana

TABELA IV - Frequência de distribuição da carga bacteriana aeróbia mesófila (NMP/g) nos produtos amostrados segundo a espécie vegetal

DROGA VEGETAL	Nº AMOSTRA	BACTÉRIAS / g									
		<10	10-10 ²	10 ² -10 ³	10 ³ -10 ⁴	10 ⁴ -10 ⁵	10 ⁵ -10 ⁶	10 ⁶ -10 ⁷	10 ⁷ -10 ⁸	10 ⁸ -10 ⁹	10 ⁹ -10 ¹⁰
ALCACHOFA	6	-	-	-	3	2	1	-	-	-	-
BOLDO	3	-	-	-	-	2	1	-	-	-	-
CARVÃO MEDICINAL	1	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-
CASTANHA DA INDIA	2	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-
CAIUABA	3	-	-	-	2	1	-	-	-	-	-
CENTELHA ASIÁTICA	3	-	-	-	-	-	2	-	-	-	1
CONFREI	1	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-
ESPINHEIRA SANTA	1	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-
ESPIRULINA	3	-	-	-	-	1	-	1	-	1	-
FUCUS	5	-	-	1	1	1	2	-	-	-	-
GINSENG BRASILEIRO	3	-	-	-	-	-	1	1	1	-	-
GINSENG COREANO	3	-	1	1	-	1	-	-	-	-	-
GUARANÁ	27	1	-	1	2	9	8	5	1	-	-
LECITINA DE SOJA	5	-	-	4	1	-	-	-	-	-	-
LEVEDURA DE CERVEJA	11	1	4	2	3	1	-	-	-	-	-
ÓLEO DE GERME DE TRIGO	6	4	1	1	-	-	-	-	-	-	-
ZEDOÁRIA	1	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-
T O T A L	84	6	6	13	14	18	15	8	2	1	1

TABELA V - Frequência de distribuição da carga de esporos de bactérias aeróbias mesófilas (NMP/g) nos produtos amostrados segundo a espécie vegetal

DROGA VEGETAL	Nº AMOSTRA	ESPOROS BACTERIANOS/g							
		<10	10 -10 ²	10 ² -10 ³	10 ³ -10 ⁴	10 ⁴ -10 ⁵	10 ⁵ -10 ⁶	10 ⁶ -10 ⁷	10 ⁷ -10 ⁸
ALCACHOFA	6	-	1	2	-	2	1	-	-
BOLDO	3	-	-	1	1	1	-	-	-
CARVÃO MEDICINAL	1	-	-	1	-	-	-	-	-
CASTANHA DA INDIA	2	-	-	1	1	-	-	-	-
CATUABA	3	-	-	1	1	1	-	-	-
CENTELHA ASIÁTICA	3	-	-	-	1	1	-	-	1
CONFREI	1	-	1	-	-	-	-	-	-
ESPINHEIRA SANTA	1	-	-	-	-	-	1	-	-
ESPIRULINA	3	-	-	-	1	1	1	-	-
FUCUS	5	-	-	1	2	2	-	-	-
GINSENG BRASILEIRO	3	-	-	-	1	-	1	1	-
GINSENG COREANO	3	-	1	1	-	1	-	-	-
GUARANÁ	27	1	-	2	2	6	11	5	-
LECITINA DE SOJA	5	-	-	3	1	-	1	-	-
LEVEDURA DE CERVEJA	11	2	4	4	1	-	-	-	-
ÓLEO DE GERME DE TRIGO	6	2	3	-	1	-	-	-	-
ZEDOÁRIA	1	1	-	-	-	-	-	-	-
T O T A L	84	6	10	17	13	15	16	6	1

TABELA VI - Frequência de distribuição da carga fúngica (NMP/g) nos produtos amostrados segundo a espécie vegetal

DROGA VEGETAL	Nº AMOSTRA	FUNGOS/g					
		<10	10 -10 ²	10 ² -10 ³	10 ³ -10 ⁴	10 ⁴ -10 ⁵	10 ⁵ -10 ⁶
ALCACHOFA	6	4	-	2	-	-	-
BOLDO	3	2	1	-	-	-	-
CARVÃO MEDICINAL	1	1	-	-	-	-	-
CASTANHA DA INDIA	2	1	1	-	-	-	-
CATUABA	3	-	2	-	1	-	-
CENTELHA ASIÁTICA	3	-	-	-	1	2	-
CONFREI	1	1	-	-	-	-	-
ESPINHEIRA SANTA	1	1	-	-	-	-	-
ESPIRULINA	3	3	-	-	-	-	-
FUCUS	5	1	-	1	2	1	-
GINSENG BRASILEIRO	3	2	-	-	-	1	-
GINSENG COREANO	3	-	2	1	-	-	-
GUARANÁ	27	5	7	2	6	5	2
LECITINA DE SOJA	5	4	1	-	-	-	-
LEVEDURA DE CERVEJA	11	9	-	2	-	-	-
ÓLEO DE GERME DE TRIGO	6	6	-	-	-	-	-
ZEDOÁRIA	1	1	-	-	-	-	-
T O T A L	84	41	14	8	10	9	2

TABELA VII - Isolamento de patógenos específicos dos produtos amostrados segundo a espécie vegetal

DROGA VEGETAL	Nº AMOSTRA	C O L I F O R M E S			<u>E. coli</u>	<u>Salmonella</u> sp.
		PRESUNTIVA	TOTAIS/CONFIRMATÓRIA	FECAIS		
Alcachofra	6	4	2	-	-	-
Boldo	3	3	2	-	-	-
Carvão medicinal	1	1	1	-	-	-
Castanha da Índia	2	1	1	-	-	-
Catuaba	3	3	1	-	-	-
Centelha asiática	3	3	3	1	1	1
Confrei	1	1	-	-	-	-
Espinheira santa	1	1	-	-	-	-
Espirulina	3	3	3	1	1	1
Fucus	5	5	5	-	-	-
Ginseng brasileiro	3	3	2	2	1	1
Ginseng coreano	3	3	1	1	-	-
Guaraná	27	22	14	7	1	1
Lecitina de soja	5	-	-	-	-	-
Levedura de cerveja	11	8	5	1	1	1
Óleo de germe de trigo	6	-	-	-	-	-
Zedoária	1	-	-	-	-	-
T O T A L	84	61	40	13	5	5

TABELA VIII - Frequência de distribuição da carga bacteriana aeróbia mesófila (NMP/g) nos produtos amostrados segundo a forma farmacêutica

NMP/g	CÁPSULA		COMPRIMIDO		PÓ	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
<10	4	8,3	2	9,5	-	-
10 - 10 ²	2	4,2	4	19,0	-	-
10 ² - 10 ³	10	20,8	3	14,3	-	-
10 ³ - 10 ⁴	9	18,8	2	9,5	3	20,0
10 ⁴ - 10 ⁵	9	18,8	5	23,8	4	26,7
10 ⁵ - 10 ⁶	7	14,6	3	14,3	5	33,3
10 ⁶ - 10 ⁷	4	8,3	1	4,8	3	20,0
10 ⁷ - 10 ⁸	1	2,1	1	4,8	-	-
10 ⁸ - 10 ⁹	1	2,1	-	-	-	-
10 ⁹ - 10 ¹⁰	1	2,1	-	-	-	-
T O T A L	48		21		15	

TABELA IX - Frequência de distribuição da carga de esporos de bactérias aeróbias mesófilas (NMP/g) nos produtos amostrados segundo a forma farmacêutica

NMP/g	CÁPSULA		COMPRIMIDO		PÓ	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
<10	3	6,2	3	14,3	-	-
10 - 10 ²	6	12,5	3	14,3	1	6,7
10 ² - 10 ³	10	20,8	4	19,0	3	20,0
10 ³ - 10 ⁴	9	18,8	3	14,3	1	6,7
10 ⁴ - 10 ⁵	7	14,6	4	19,0	4	26,7
10 ⁵ - 10 ⁶	8	16,7	4	19,0	4	26,7
10 ⁶ - 10 ⁷	4	8,3	-	-	2	13,3
10 ⁷ - 10 ⁸	1	2,1	-	-	-	-
T O T A L	48		21		15	

TABELA X - Frequência de distribuição da carga fúngica (NMP/g) nos produtos amostrados segundo a forma farmacêutica

NMP/g	CÁPSULA		COMPRIMIDO		PÓ	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
<10	24	50,0	17	80,9	-	-
$10^1 - 10^2$	7	14,6	2	9,5	5	33,3
$10^2 - 10^3$	5	10,4	1	4,8	2	13,3
$10^3 - 10^4$	6	12,5	1	4,8	3	20,0
$10^4 - 10^5$	5	10,4	-	-	4	26,7
$10^5 - 10^6$	1	2,1	-	-	1	6,7
T O T A L	48		21		15	

TABELA XI - Frequência de distribuição de patógenos específicos isolados de produtos amostrados segundo a forma farmacêutica

FORMA FARMACÊUTICA	Nº AMOSTRA	COLIFORMES						<u>E. coli</u>		Salmonella sp. (suspeita)	
		PRESUNTIVA		TOTAIS/CONFIRMATÓRIA		FECAIS					
		Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
CÁPSULA	48	31	64,6	23	47,9	7	14,6	3	6,3	3	6,3
COMPRIMIDO	21	15	71,4	7	33,3	1	4,8	-	-	-	-
PÓ	15	15	100,0	10	66,7	5	33,3	2	13,3	2	13,3
T O T A L	84	61	72,6	40	47,6	13	15,5	5	6,0	5	6,0

TABELA XII - Frequência de distribuição de bolor, levedura e de ambos nos produtos amostrados segundo a forma farmacêutica

FORMA FARMACÊUTICA	Nº AMOSTRA	BOLOR		LEVEDURA		BOLOR E LEVEDURA	
		Nº	%	Nº	%	Nº	%
CÁPSULA	48	30	62,5	2	4,2	1	2,1
COMPRIMIDO	21	12	57,1	-	-	-	-
PÓ	15	13	86,7	-	-	2	13,3
T O T A L	84	55	65,5	2	2,4	3	3,6

TABELA XIII - Relação entre carga bacteriana aeróbia mesófila e incidência de coliformes totais, coliformes fecais e Salmonella sp.

N M P/g	C O L I F O R M E S						<u>E. coli</u>		<u>Salmonella</u> sp. (suspeita)	
	PRESUNTIVA		TOTAIS/CONFIRMATÓRIA		FECAIS					
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
<10	1	1,2	-	-	-	-	-	-	-	-
10 - 10 ²	3	3,6	-	-	-	-	-	-	-	-
10 ² - 10 ³	5	6,0	3	3,6	-	-	-	-	-	-
10 ³ - 10 ⁴	11	13,1	7	8,3	1	1,2	1	1,2	1	1,2
10 ⁴ - 10 ⁵	15	17,9	9	10,7	2	2,4	-	-	-	-
10 ⁵ - 10 ⁶	15	17,9	11	13,1	3	3,6	1	1,2	1	1,2
10 ⁶ - 10 ⁷	7	8,3	6	7,1	3	3,6	1	1,2	1	1,2
10 ⁷ - 10 ⁸	2	2,4	2	2,4	2	2,4	-	-	-	-
10 ⁸ - 10 ⁹	1	1,2	1	1,2	1	1,2	1	1,2	1	1,2
10 ⁹ - 10 ¹⁰	1	1,2	1	1,2	1	1,2	1	1,2	1	1,2
T O T A L	61	72,7	40	47,6	13	15,5	5	6,0	5	6,0

TABELA XIV - Relação entre carga de esporos bacterianos aeróbios mesófilos e incidência de coliformes totais, coli - formes fecais e Salmonella sp.

N M P/g	C O L I F O R M E S						<u>E. coli</u>		<u>Salmonella</u> sp. (suspeita)	
	PRESUNTIVA		TOTAIS/CONFIRMATÓRIA		FECAIS		Nº	%	Nº	%
	Nº	%	Nº	%	Nº	%				
< 10	1	1,2	-	-	-	-	-	-	-	-
10 - 10 ²	7	8,3	3	3,6	1	1,2	1	1,2	1	1,2
10 ² - 10 ³	10	11,9	5	6,0	-	-	-	-	-	-
10 ³ - 10 ⁴	10	11,9	9	10,7	1	1,2	-	-	-	-
10 ⁴ - 10 ⁵	13	15,5	8	9,5	3	3,6	2	2,4	2	2,4
10 ⁵ - 10 ⁶	14	16,7	9	10,7	4	4,8	-	-	-	-
10 ⁶ - 10 ⁷	5	6,0	5	6,0	4	4,8	2	2,4	2	2,4
10 ⁷ - 10 ⁸	1	1,2	1	1,2	-	-	-	-	-	-
T O T A L	61	72,6	40	47,6	13	15,5	5	6,0	5	6,0

TABELA XV - Relação entre carga de fungos e incidência de coliformes totais, coliformes fecais e Salmonella sp.

N M P/g	C O L I F O R M E S									
	PRESUNTIVA		TOTAIS/CONFIRMATÓRIA		FECAIS		<u>E. coli</u>		<u>Salmonella</u> sp.	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
<10	23	27,4	13	15,5	2	2,4	1	1,2	1	1,2
10 - 10 ²	12	14,3	4	4,8	1	1,2	-	-	-	-
10 ² - 10 ³	7	8,3	5	6,0	2	2,4	1	1,2	1	1,2
10 ³ - 10 ⁴	9	10,7	9	10,7	4	4,8	-	-	-	-
10 ⁴ - 10 ⁵	8	9,5	7	8,3	3	3,6	3	3,6	3	3,6
10 ⁵ - 10 ⁶	2	2,4	2	2,4	1	1,2	-	-	-	-
T O T A L	61	72,6	40	47,6	13	15,6	5	6,0	5	6,0

TABELA XVI - Carga de microorganismos viáveis (NMP/g) e estimativa de Escherichia coli nos 13 lotes positivos para coliformes fecais

DROGA VEGETAL	FORMA FARMACÊUTICA	PRODUTOR	BACTÉRIAS AERÓBIAS MESÓFILAS NMP/g	ESPOROS BACTERIANOS NMP/g	FUNGOS NMP/g	<u>E. coli</u> NMP/g
CENTELHA ASIÁTICA	cápsula	B	$5,1 \times 10^9$	$2,6 \times 10^4$	$1,7 \times 10^4$ (b)	$1,5 \times 10^2$
ESPIRULINA	cápsula	B	$4,7 \times 10^8$	$3,3 \times 10^4$	$2,0 \times 10^4$ (b)	$9,3 \times 10$
GINSENG BRASILEIRO	cápsula	B	$1,0 \times 10^6$	$1,7 \times 10^6$	$1,2 \times 10^4$ (b)	$4,3 \times 10$
		L	$9,3 \times 10^7$	$4,3 \times 10^3$	<3,0	-
GINSENG COREANO	cápsula	E	$7,8 \times 10^4$	$2,6 \times 10^4$	$4,3 \times 10$ (b)	-
					$1,5 \times 10^2$ (1)	-
GUARANÁ	cápsula	A	$2,3 \times 10^5$	$1,5 \times 10^6$	$4,6 \times 10^5$ (b)	-
		B	$2,5 \times 10^4$	$9,3 \times 10^5$	$2,6 \times 10^3$ (b)	-
		L	$2,7 \times 10^7$	$3,3 \times 10^6$	$2,5 \times 10^3$ (b)	-
	pó	B	$4,6 \times 10^6$	$9,3 \times 10^5$	$9,3 \times 10^3$ (b)	-
		B	$2,4 \times 10^5$	$2,4 \times 10^6$	$1,1 \times 10^4$ (b)	$2,3 \times 10$
		C	$6,4 \times 10^5$	$2,4 \times 10^5$	$4,3 \times 10^3$ (b)	-
		H	$2,4 \times 10^6$	$4,3 \times 10^5$	$7,5 \times 10^2$ (b)	-
LEVEDURA DE CERVEJA	pó	B	$2,3 \times 10^3$	$3,9 \times 10$	$1,5 \times 10^2$ (b)	$4,0$
					$7,5 \times 10$ (1)	

b - bolor

l - levedura

TABELA XVII - Carga de microorganismos viáveis (NMP/g) das amostras do produtor A

DROGA VEGETAL	FORMA FARMACÊUTICA	BACTÉRIAS AERÓBIAS MESÓFILAS	ESPOROS BACTERIANOS	FUNGOS
		NMP/g	NMP/g	NMP/g
GINSENG COREANO	cápsula	2,5 X 10	4,7 X 10	1,0 X 10 (b)
		1,0 X 10 ²	1,0 X 10 ²	1,0 X 10 (b)
GUARANÁ	cápsula	2,5 X 10 ⁴	2,5 X 10 ⁵	2,5 X 10 (b)
		4,7 X 10 ⁴	2,3 X 10 ⁵	2,5 X 10 ² (b)
		2,3 X 10 ⁵	1,5 X 10 ⁶	4,6 X 10 ⁵ (b)
LECITINA DE SOJA	cápsula	2,5 X 10 ²	2,3 X 10 ²	9,0(1)
LEVEDURA DE CERVEJA	comprimido	2,3 X 10	2,3 X 10 ²	9,0(b)
ÓLEO DE GERME DE TRIGO	cápsula	2,5 X 10	< 3,3	< 3,3(b)
		4,0	1,5 X 10 ³	< 3,0(b)

b - bolor

l - levedura

TABELA XVIII - Carga de microorganismos viáveis (NMP/g) das amostras do produtor B

DROGA VEGETAL	FORMA FARMACÊUTICA	BACTÉRIAS AERÓBIAS MESÓFILAS NMP/g	ESPOROS BACTERIANOS NMP/g	FUNGOS NMP/g
ALCACHOFA	cápsula	$1,4 \times 10^5$	$1,9 \times 10^4$	<3,3(b)
		$2,5 \times 10^4$	$7,7 \times 10^4$	<3,3(b)
CASTANHA DA INDIA	cápsula	$7,5 \times 10^2$	$2,3 \times 10^2$	9,0(b)
		$2,5 \times 10^3$	$1,0 \times 10^3$	$1,4 \times 10(b)$
CATUABA	cápsula	$1,3 \times 10^4$	$1,0 \times 10^4$	$1,5 \times 10(b)$
		$2,5 \times 10^3$	$1,7 \times 10^2$	$1,0 \times 10(b)$
CENTELHA ASIÁTICA	cápsula	$5,1 \times 10^9$	$2,5 \times 10^4$	$1,7 \times 10^4(b)$
		$4,3 \times 10^5$	$2,6 \times 10^7$	$3,9 \times 10^3(b)$
CONFREI	cápsula	$1,0 \times 10^2$	$1,2 \times 10$	<3,3(b)
ESPINHEIRA SANTA	cápsula	$2,3 \times 10^6$	$2,3 \times 10^5$	<3,3(b)
ESPIRULINA	cápsula	$4,7 \times 10^8$	$3,3 \times 10^4$	3,3(b)
		$2,5 \times 10^6$	$2,7 \times 10^6$	7,7(b)
FUCUS	cápsula	$4,3 \times 10^2$	$5,1 \times 10^2$	4,0
		$2,3 \times 10^4$	$9,0 \times 10^3$	$2,3 \times 10^2(b)$
GINSENG BRASILEIRO	cápsula	$1,0 \times 10^6$	$1,7 \times 10^6$	$1,2 \times 10^4(b)$
		$4,3 \times 10^5$	$1,1 \times 10^5$	7,0
GUARANÁ	cápsula	$2,5 \times 10^4$	$9,3 \times 10^5$	$2,6 \times 10^3(b)$
	pó	$4,6 \times 10^6$	$9,3 \times 10^5$	$9,3 \times 10^3(b)$
		$2,4 \times 10^5$	$2,4 \times 10^6$	$1,1 \times 10^4(b)$
LECITINA DE SOJA	cápsula	$2,3 \times 10^2$	$2,4 \times 10^3$	<3,0(b)
		$4,8 \times 10^3$	$1,0 \times 10^5$	<3,3(b)
LEVEDURA DE CERVEJA	comprimido	$7,0 \times 10$	9,0	<3,0(b)
	cápsula	$2,7 \times 10^4$	$2,3 \times 10^3$	$1,0 \times 10^2(b)$
	pó	$2,3 \times 10^3$	$3,9 \times 10$	$1,5 \times 10^2(b)$ $7,5 \times 10(1)$
ÓLEO DE GERME DE TRIGO	cápsula	<3,3	$1,0 \times 10$	<3,3(b)
		$2,5 \times 10^2$	$4,3 \times 10$	<3,3(b)

b - bolor

1 - levedura

TABELA XIX - Carga de microorganismos viáveis (NMP/g) das amostras do produtor G

DROGA VEGETAL	FORMA FARMACÊUTICA	BACTÉRIAS AERÓBIAS MESÓFILAS	ESPOROS BACTERIANOS	BOLORES
		NMP/g	NMP/g	NMP/g
GUARANÁ	comprimido	7,5 X 10 ⁵	2,4 X 10 ⁵	7,0
		2,4 X 10 ⁶	2,3 X 10 ⁵	2,0 X 10
		2,3 X 10 ⁴	2,4 X 10 ⁴	<3,0
LEVEDURA DE CERVEJA	comprimido	3,0	4,0	3,0
		1,7 X 10 ²	7,1 X 10 ²	<3,3
		4,3 X 10 ²	6,4 X 10	7,0
		4,8 X 10	1,0 X 10	<3,0

TABELA XX - Carga de microorganismos viáveis (NMP/g) das amostras do produtor L

DROGA VEGETAL	FORMA FARMACÊUTICA	BACTÉRIAS AERÓBIAS MESÓFILAS	ESPOROS BACTERIANOS	BOLORES
		NMP/g	NMP/g	NMP/g
ALCACHOFRA	cápsula	$1,5 \times 10^3$	$1,7 \times 10^2$	$4,6 \times 10^2$
		$2,5 \times 10^3$	$7,5 \times 10^2$	<3,3
BOLDO	comprimido	$2,3 \times 10^4$	$4,3 \times 10^3$	<3,0
		$4,3 \times 10^5$	$9,0 \times 10^4$	<3,0
CENTELHA ASIÁTICA	cápsula	$3,9 \times 10^5$	$9,0 \times 10^3$	$4,6 \times 10^4$
ESPIRULINA	cápsula	$4,3 \times 10^4$	$4,3 \times 10^3$	4,0
FUCUS	cápsula	$1,0 \times 10^5$	$1,2 \times 10^5$	$1,7 \times 10^3$
		$2,7 \times 10^5$	$4,3 \times 10^3$	$2,3 \times 10^3$
GINSENG BRASILEIRO	comprimido	$9,3 \times 10^7$	$4,3 \times 10^3$	<3,0
GUARANÁ	cápsula	$4,7 \times 10^6$	$9,3 \times 10^6$	$1,0 \times 10^4$
		$2,7 \times 10^7$	$3,3 \times 10^6$	$2,5 \times 10^3$
LECITINA DE SOJA	cápsula	$3,9 \times 10^2$	$2,3 \times 10^2$	$2,3 \times 10$
LEVEDURA DE CERVEJA	cápsula	$2,7 \times 10^3$	$1,0 \times 10^2$	<3,3

TABELA XXI - Carga de microorganismos viáveis (NMP/g) dos lotes relativos a produtores com menor amostragem

DROGA VEGETAL	PRODUTOR	FORMA FARMACÊUTICA	BACTÉRIAS AERÓBIAS MESÓFILAS	ESPOROS BACTERIANOS	FUNGOS
			NMP/g	NMP/g	NMP/g
ALCACHOFRA	K	comprimido	$7,0 \times 10^4$	$4,3 \times 10^5$	$1,5 \times 10^2$ (b)
	N	cápsula	$4,7 \times 10^3$	$4,7 \times 10$	<3,3(b)
BOLDO	C	pó	$4,0 \times 10^4$	$9,0 \times 10^2$	$9,3 \times 10$ (b)
CARVÃO MEDICINAL	I	comprimido	$6,4 \times 10^3$	$2,0 \times 10^2$	9,0(b)
CATUABA	M	cápsula	$2,5 \times 10^3$	$8,3 \times 10^3$	$2,7 \times 10^3$ (b)
FUCUS	N	cápsula	$7,8 \times 10^3$	$4,3 \times 10^4$	$1,0 \times 10^4$ (b)
GINSENG COREANO	E	cápsula	$7,8 \times 10^4$	$2,5 \times 10^4$	$4,3 \times 10$ (b)
					$1,5 \times 10^2$ (1)
GUARANÁ	C	comprimido	$9,3 \times 10^4$	$9,3 \times 10^5$	<3,0(b)
			$4,3 \times 10^4$	$2,3 \times 10^5$	$4,6 \times 10^3$ (b)
		pó	$6,4 \times 10^5$	$2,4 \times 10^5$	$4,3 \times 10^3$ (b)
			$4,3 \times 10^4$	$4,3 \times 10^4$	$9,3 \times 10$ (b)
	D	pó	$4,3 \times 10^5$	$4,3 \times 10^4$	$7,5 \times 10$ (b)
	H	comprimido	$4,3 \times 10^5$	$4,3 \times 10^4$	4,0(b)
		pó	$2,4 \times 10^6$	$4,3 \times 10^5$	$7,5 \times 10^2$ (b)
			$2,3 \times 10^5$	$4,3 \times 10^5$	$2,4 \times 10^5$ (b)
			$2,3 \times 10^5$	$4,3 \times 10^5$	$2,4 \times 10^5$ (b)
	J	pó	$4,3 \times 10^3$	$4,7 \times 10^2$	$1,5 \times 10^4$ (b)
			$4,3 \times 10^3$	$3,9 \times 10^2$	$2,1 \times 10$ (b)
	K	pó	3,0	<3,0	$4,0 \times 10$ (b)
			$4,3 \times 10^2$	$4,0 \times 10^3$	9,0(b)
	N	comprimido	$7,5 \times 10^5$	$2,4 \times 10^5$	7,0(b)
	P	pó	$4,3 \times 10^4$	$2,4 \times 10^4$	$4,6 \times 10^4$ (b)
	R	pó	$1,5 \times 10^6$	$2,3 \times 10^6$	$4,6 \times 10^4$ (b)
	S	pó	$2,3 \times 10^4$	$3,9 \times 10^3$	$2,3 \times 10^3$ (b)
					$7,5 \times 10^3$ (1)
	T	pó	$1,4 \times 10^5$	$2,3 \times 10^4$	$6,4 \times 10$ (b)
LECITINA DE SOJA	Q	cápsula	$4,3 \times 10^2$	$9,3 \times 10^2$	7,0(1)
LEVEDURA DE CERVEJA	H	comprimido	$7,0 \times 10$	$2,3 \times 10$	3,0(b)
			$1,2 \times 10^3$	$4,3 \times 10^2$	<3,0(b)
ÓLEO DE GERME DE TRIGO	O	cápsula	<3,3	$1,0 \times 10$	<3,3(b)
	O	cápsula	4,0	4,0	4,0(b)
ZEDOÁRIA	F	cápsula	$2,5 \times 10^2$	3,3	<3,3(b)

b - bolor

1 - levedura

6. DISCUSSÃO

6.1 Considerações gerais

A "Fitoterapia" é um termo proveniente da fusão de duas palavras gregas "phuton" = planta e "therapeuein" = tratar, curar, sendo conhecida como "tratamento ou medicina pelas plantas" (16,103,115,135,144). Há, porém, a tendência em confundi-la com "Fitofarmácia", constituindo a parte da Farmácia que "trata do preparo de produtos destinados a proteger as plantas e gêneros de origem vegetal contra ação nociva de vários parasitas ou microorganismos, bem como da elaboração de preparações tóxicas para os animais prejudiciais às culturas e aos gêneros úteis ao homem" (115) ou ainda "o estudo das preparações antiparasitárias destinadas ao tratamento das doenças das plantas" (57).

Ao conceituar "Fitoterápico", deve-se fazê-lo, primeiramente de "Drogas", cuja própria definição, por sua vez, apresenta variação. O termo provém de "droog", palavra holandesa significando "seco" (156) e do persa "droa" = odor (136), visto que muitas apresentam odor mais ou menos acentuado. Vulgarmente, corresponde a qualquer substância contida em medicamento, empregado interna ou externamente para o tratamento, cura ou prevenção de doenças (58), o que parece redundante, uma vez que constitui a própria definição de medicamento (24,70). Pode, até mesmo, considerar "Droga" qualquer preparação narcótica (58,193), sendo que a legislação brasileira (24) acrescenta-lhe, ainda, a finalidade sanitária. São também conceituadas como matéria-prima para a preparação de medicamentos oficiais e magistrais, medicamentos simples ou brutos, produtos de obtenção imediata ou ainda, partes de vegetais como folhas, raízes, gomas etc., bem como produtos animais ou de síntese (44,69,136,156). Essa última se assemelha à definição da Farmacopéia Helvética (153) que considera como "droga medic-

nal" não apenas drogas ou partes de órgãos de origem vegetal, animal ou humana, como também, as misturas de substâncias destas mesmas origens.

Em Farmacognosia, as "Drogas" são "vegetais, animais ou ainda partes deles, que, após sofrerem processos de coleta e de conservação, possuem composição e propriedades tais que possibilitem o seu uso como forma bruta de medicação ou como necessidade farmacêutica" (142).

No presente trabalho, adotou-se o termo "especialidade fitoterápica", considerando, supostamente, que as amostras continham partes vegetais, produtos derivados e até extratos, à semelhança de Negretti (131), pois, este usou o termo "fitoterápico" para referir-se a matérias-primas naturais (vegetais) e aos derivados sob a forma de óleos essenciais (essências), tinturas, extrato fluido e seco.

6.2 Apresentação comercial das amostras

A abrangência da amostragem de fitoterápicos para este estudo, no decorrer de 2 anos, ficou na dependência mercadológica, razão pela qual muitos produtos não foram possíveis de serem analisados em mais de 1 lote. No caso de produtor que não apresentava recurso para identificação do ciclo produtivo a aquisição da amostra foi efetuada após alguns meses, na suposição de que se tratasse de outro lote e este critério, somado à característica efêmera de muitos destes produtos, acabou limitando a amostragem. Procurou-se, todavia, abranger maior variedade de drogas vegetais comercializadas na forma farmacêutica sólida.

Conforme a relação da Tabela I (pg. 51), esta abrangência refletiu, inclusive, interesse de comercialização direcionado para uma determinada droga por parte de muitos produtores como ocorreu com guaraná. Apesar disto, houve inconstância, pois quando se procurou outros lotes do mesmo produto, de determinado fabricante, não mais se encontrava à venda. Ain

da com relação aos produtores verificou-se aparente tendência de regionalização, uma vez que houve predominância de empresas paulistas envolvidas nesta amostragem, conforme a relação da Tabela III (pg. 53).

Considerando a legislação sanitária vigente para "medicamentos, drogas, correlatos, cosméticos, produtos de higiene, saneantes e outros" regulamentada pelo decreto 79094 de 5 de janeiro de 1977 (24), apesar de não fazer menção específica aos produtos fitoterápicos, estes devem ser enquadrados como medicamentos alopáticos. Todavia, isto não pôde ser observado, de forma geral, em relação aos produtos analisados.

Dentre as exigências legais pertinentes à apresentação comercial, alguns pontos fundamentais foram observados. Conforme a Tabela I (pg. 51), a questão da bula teve que ser observada segundo dois aspectos, a saber: inclusão de material impresso avulso dentro da embalagem secundária (a), contendo as informações pertinentes ao produto, assim como informação exigida por lei, embora impressa no próprio rótulo (r) e/ou cartucho (c). No primeiro caso, apenas 5 amostras, fabricadas por 5 diferentes produtores (E,F,M,I,J) obedeceram a este critério. Em contraposição, 43 amostras não continham na apresentação comercial qualquer informação sobre o produto, correspondendo a 6 diferentes produtores (B,C,G,H,L,N). Houve omissão integral no caso do produtor B, cuja gama de especialidades fitoterápicas amostradas indica ser fabricante com grande fatia de mercado (26 lotes). Apesar disto, não atende aos requisitos legais. Outro produtor (L) que está na situação intermediária, pelo fato de incluir informações no rótulo e cartucho, também foi coerente dentro deste critério em relação às 12 amostras dentre 13 lotes de diferentes fitoterápicos.

A baixa frequência de inclusão de bula no interior da embalagem secundária pode ser atribuída ao decreto nº 83239, de 6 de março de 1979 (25), que retifica o decreto nº 79094 (24) referido anteriormente, no qual é dispensado tal impresso para medicamentos que não apresentam "con -

tra-indicações" de uso ou esclarecimentos quanto a efeitos colaterais, desde que seja mencionado na rotulagem ou embalagem externa o modo de usar ou de aplicar o produto". Porém, é sabido que a inocuidade das drogas vegetais está limitada à dose, e portanto, a declaração de "ausência de toxicidade" verificada em 14 lotes correspondentes a 10 produtos (Tabela III) (pg. 53), baseada no conceito ^{falso} de que "sendo natural faz bem" não deve ser apresentado como base do incentivo e propaganda ao emprego da fitoterapia.

Nesta amostragem, 25 lotes correspondendo a 20 produtos incluem os dizeres "produto natural" (Tabela III) (pg. 53), cuja mensagem poderia ser enquadrada como não condizente com o artigo 93, parágrafo único, da retificação de 1979 (25) que proíbe a apresentação, na rotulagem ou publicidade e propaganda do produto, de indicações que possibilitem a interpretação falsa, erro ou confusão quanto à origem, procedência, natureza, composição, ou qualidade, ou que atribuam ao mesmo finalidades ou características diferentes das que realmente possui. Porém uma especialidade contendo zedoária (produtor F) apresentou, na bula, o item precauções fazendo menção de que "mesmo sem a existência de referências sobre a teratogenicidade, recomenda-se não usar o produto no primeiro trimestre de gestação e na lactação".

Num outro produto, (catuaba, produtor M) havia advertências semelhantes, além da "administração preferencial a adultos". Ainda, no caso de zedoária foram descritas as reações adversas, diferentemente daquela de catuaba que apenas recomenda o uso das doses indicadas, no sentido de "evitar reações desagradáveis". Portanto, ambas apresentam preocupação com o consumidor, demonstrando seriedade para com os produtos fitoterápicos.

Contrariamente, apenas 1 amostra de ginseng brasileiro (produtor E) apresentou afirmação de que "o produto não apresenta contra-indicações, nem restrições e cuidados a considerar quanto ao seu uso, já que trata-se de produto genuinamente vegetal". Neste caso foi flagrante a desobe-

diência ao artigo 93 referido anteriormente (25).

Ainda com relação à natureza ou tipo de informação constante no material impresso, em 33 amostras configurou, no rótulo da embalagem, a quantidade da droga, em miligramas (Tabela III) (pg. 53). Embora tenha a apresentado esta informação, nem sempre constou a posologia. A omissão dessas informações foge aos requisitos em vigor, além de que todas essas especialidades farmacêuticas estão sendo comercializadas sem prescrição médica.

Conforme os dados da Tabela I (pg. 51), com relação à identificação do ciclo produtivo foi considerada, nesta observação, a presença do impresso referindo-se ao número de lote e data de fabricação. Sendo assim, mais da metade (61,9%) dos 84 lotes amostrados incluíam o lote, seja em etiqueta, no rótulo ou no cartucho. Apesar da exigência legal, a informação referente à data de fabricação nem sempre esteve presente junto ao número do lote, o mesmo podendo ser dito quanto à data, pois em algumas amostras não constou o número de lote e sim, apenas a data de fabricação. Dentre estas amostras, o produtor L, cujos produtos amostrados compreendem 9 drogas diferentes, com 13 lotes analisados, desobedeceu integralmente esta última exigência. No caso de produtores cujas amostras foram representadas por pequeno número de lotes não se pode tecer comentários.

A informação que caracteriza o ciclo produtivo geralmente estava contida em etiqueta, sempre colada na embalagem primária e em algumas, na base do frasco, dificultando o acesso a esta informação pelo consumidor.

Com referência à estabilidade e conseqüente prazo de validade, normalmente o tempo de vida útil recomendado para as drogas vegetais "per se" é de 1 ano (71,143,144), embora, com algumas exceções. Todavia, entre os produtos amostrados neste estudo houve predominância para 3 anos, pois, 32 dos 46 lotes que apresentaram prazo de validade assim estavam sendo comercializados. Apenas 3 lotes apresentavam prazo de validade de 1 ano, em contraposição a 5 anos, para 6 lotes, o que deve ser tempo muito longo,

implicando na redução de atividade terapêutica. Portanto, é discutível a estabilidade dos princípios ativos nestas condições.

O aspecto quanto à omissão de prazo de validade de cada lote é preocupante, mas o extremo oposto com 5 anos de vida útil pode ser questionável, tendo em vista a heterogeneidade inerente às drogas vegetais, cuja complexidade quanto ao seu conteúdo é fator favorável na aceleração da instabilidade dos seus componentes.

Pela observação macroscópica das amostras de óleo de germe de trigo em cápsulas havia sinais de deterioração, pois, estas se apresentavam intumescidas e aderentes à parede do frasco. No entanto, o prazo de validade inscrito era de 3 anos e no momento desta ocorrência haviam decorrido 2 anos após a data de sua fabricação.

Sabe-se que a natureza do material de acondicionamento (embalagem primária) pode interferir na estabilidade do seu conteúdo. Observando os dados da Tabela I (pg. 51), naqueles casos de amostras com 5 anos de prazo de validade, apenas 2 lotes de comprimido de guaraná do produtor C estavam acondicionados em frasco de vidro. Na quase totalidade houve preferência pelo material plástico (65 lotes em frasco de plástico, 6 em saco plástico, 3 como "blister" e 1 como envelope de papel plastificado), seguido de frasco de vidro (7 lotes) e fibra-lata (2 lotes).

A comercialização de especialidades fitoterápicas sem a embalagem secundária é marcante, visto que apenas 24 amostras estavam embaladas em material celulósico, seja como cartucho (21 lotes) ou embalagem cilíndrica (3 lotes). A ausência de embalagem secundária assume importância maior quando se considera o fato de que a grande maioria dos frascos plásticos era transparente. Assim, a degradação dos princípios ativos pela ação da luz far-se-á presente e o prazo de validade de 3 a 5 anos, nestes produtos, torna-se preocupante.

Ainda com relação ao material gráfico, a omissão do responsável técnico é desobediência grave à legislação em vigor. Conforme a Tabela I (pg. 51), dentre os produtores envolvidos nesta amostragem, 7 estão em desacordo. O produtor L, também neste aspecto, demonstrou estar em desacordo, pois, em 3 produtos dentre 9 amostrados não constou o nome do responsável técnico. Considerando a legislação sanitária vigente (Artigo 95 do Título X) (25) que trata da rotulagem e publicidade de medicamentos, verificou-se que apenas 15 lotes (17,9%) foram condizentes integralmente com a norma no que se refere a bula, número de lote, responsável técnico, data de fabricação e prazo de validade. Os fabricantes correspondentes foram 5, sendo que os produtores A, M e O cumpriram com tais exigências em todos os lotes amostrados. Todavia estes dois últimos não apresentam significância, tendo em vista a amostragem reduzida em relação ao A, com 9 lotes. Os outros produtores, C e K, obedeceram-nas, respectivamente, com frequência de 2/5 e 2/3, indicando falta de critério.

Analizando outras informações constantes no material impresso que acompanha a apresentação comercial dos produtos, conforme os dados da Tabela II (pg. 52), em confronto à legislação em vigor, muitos não informam os dados de registro em órgão oficial competente. Dos 84 lotes, 54 não atenderam a esta exigência. Os produtores B, C e L seguiram as normas em parte das amostras, o que indica falta de padronização. Entre as amostras registradas junto ao Ministério da Saúde, apenas 4 faziam menção à DIMED e 2, à DINAL. Situação extrema foi observada com o pó de guaraná do produtor J, com registro em ministérios diferentes.

Os dados da Tabela II (pg. 52) podem ser reflexo da controvérsia existente quanto à conceituação deste tipo de produtos como sendo medicamentos ou alimentos. Isto fica ainda mais caracterizado quando o mesmo produtor registra lecitina de soja junto ao DIMED e óleo de germe de trigo, junto ao DINAL (produtor Q), dando destaque ao termo "alimento dietético".

Conforme os dados da Tabela III (pg. 53), 3 amostras, 1 a base de lecitina de soja e as outras 2 correspondendo a óleo de germe de trigo (Produtor A) apresentavam a conotação "complemento nutritivo", com indicação em "dietas especiais", sem entretanto, informar o órgão competente (Tabela II) (pg. 52). Estes fatos, igualmente, evidenciam a ausência de padronização.

Além destes, outros 3 lotes contendo lecitina de soja, espirulina e centelha asiática, fabricados por L apresentaram recomendação de uso como "auxiliar nos regimes de emagrecimento".

Portanto, todas estas amostras enquadram-se na definição legal de produto dietético (artigo 3º das Disposições Preliminares do Título I) (24), porém não estão em conformidade com o artigo 112 do Título X (24) que prevê, para estes produtos, a especificação no rótulo e demais impressos que os acompanham, do resultado aproximado da análise percentual dos componentes em que se baseia a utilização dietética especial, o que não foi verificado nestas amostras.

Há portanto falta de clareza e definição quanto aos conceitos de medicamento, complemento alimentar e alimento dietético em muitos produtos analisados.

Vários lotes de guaraná constituíram outra evidência do fato, visto que 1 amostra apresentou a inscrição "alimento natural" (Produtor P) sem informação quanto ao seu registro e 3 com registro no Ministério da Saúde, com indicação no tratamento de astenia muscular (Produtor A). Outro produto contendo a mesma droga vegetal foi registrado junto ao Ministério da Agricultura e na sua bula configurava a lista dos componentes químicos da pasta endurecida, descrevendo suas propriedades terapêuticas (Produtor J).

A menção da Farmacopéia Brasileira, exigida por lei para produ

tos oficiais (24) foi verificada apenas em 6 amostras correspondentes a 4 produtores (C,F,I,P), sendo que outros 4 lotes de 2 produtores (K, H) apenas apresentaram os dizeres "produto oficial".

Semelhantemente, a legislação (24) exige que nos rótulos de medicamentos homeopáticos constem os dizeres "Farmacopéia Homeopática Brasileira". Desta forma, isto se verificou em produtos de 3 fabricantes (B, C, H), principalmente do B. Porém os produtos correspondentes não apresentaram discriminação da escala e dinamização, conforme regulamenta a lei. Além de que não constaram sequer as indicações terapêuticas a que se restringem as exigências (parágrafo único do artigo 102) (24) para as bulas de produtos homeopáticos.

Considerando a variedade de espécies vegetais reunidas sob o mesmo gênero e a importância da identidade botânica, seria desejável seu reconhecimento analítico através da denominação científica.

Conforme a Tabela III (pg. 53), o nome científico foi mencionado em 9 das 17 espécies botânicas, porém, nem sempre de forma correta, em conformidade com as regras de nomenclatura científica (142). Neste estudo não foi feita a comprovação farmacognóstica das espécies vegetais declaradas no rótulo dos produtos amostrados para avaliação do grau de contaminação microbiana. Em vista disto, preferiu-se atribuir nomenclatura vulgar ao conteúdo botânico destas especialidades farmacêuticas, cuja denominação comercial quase sempre foi coincidente.

A falta de padronização e cumprimento à legislação no tocante à comercialização destes produtos podem ser atribuídas à própria falha ou omissão no decreto pertinente, uma vez que as especialidades fitoterápicas apresentam características específicas. Portanto, é desejável que haja atualização na lei com regulamentação desta gama de medicamentos, hoje tão amplamente explorados e consumidos, sem que haja critérios, seja como alopático, dietético, homeopático ou alimento.

6.3 Métodos

6.3.1 Tratamento das amostras

Considerando as características das amostras, empregaram-se re cursos adequados, de forma a garantir o contato íntimo destas com o meio de cultura.

Os comprimidos foram reduzidos a pó através de trituração. No caso de cápsulas, tanto a gelatinosa dura como mole, a análise foi conjunta, sem se preocupar apenas com o conteúdo vegetal. Isto porque o paciente ingere a cápsula como um todo e o risco a que se expõe o mesmo independe da origem da contaminação, se da gelatina ou do próprio fitoterápico.

Com relação ao recurso para facilitar a dispersão e dissolução da gelatina, recorreu-se ao aquecimento do conjunto amostra-diluyente, conforme as recomendações oficiais pertinentes à análise de cápsulas vazias de gelatina. Nesse particular, há variação nas condições analíticas de tem po e temperatura, sendo que a temperatura recomendada reside entre 40 a 45°C, por tempo não superior a 30 minutos (34,205,208). Segundo Ferreira e Freitas (72) o aquecimento de amostra sob forma de suspensão facilita a re moção das bactérias aderidas às partículas. Esses autores estudaram tal fato através do aquecimento de suspensão de amostra de talco, atribuindo ao abaixamento da tensão superficial, decorrente ao efeito do recurso térmico, maior recuperação dos microorganismos viáveis. Ainda, com relação à nature za do diluyente, estudaram várias soluções, contendo ou não tensoativos. A solução salina de ~~tampão~~ tampão fosfato, seguida de solução de Ringer e de salina foram as melhores dentre aquelas sem o tensoativo. No estudo efetuado por Buhlman e colaboradores (37), o polissorbato 80 foi recomendado para facilitar a dispersão de partículas das amostras constituídas por comprimidos, drágeas e pós.

De acordo com Ferreira e Freitas (72), o melhor agente umectante foi o polissorbato 80, seguido de citrato de sódio e monoestearato de glicerila. Além disso, a melhor combinação diluente-agente umectante foi solução salina-tampão fosfato acrescida de 0,1% de polissorbato 80.

Os métodos oficiais para análise de medicamentos não estéreis (34,47,133,134) fazem recomendação para uso de agentes umectantes no diluente para preparo das amostras, cuja concentração varia de 0,1 a 1,0%. Entre os tensoativos, tanto o polissorbato 20 como o 80 são recomendados.

Neste trabalho, levando em consideração a dificuldade de homogeneização das partículas em suspensão, bem como pela necessidade em emulsificar algumas amostras lipófilas de óleo de germe de trigo, decidiu-se pela adição de 0,5% (p/v) de polissorbato 80 à solução salina 0,9%.

6.3.2 Detecção de contaminantes viáveis

Respeitando a representatividade das amostras e a validade analítica, a tomada de ensaio foi em função da quantidade de amostra disponível, tendo-se considerado, de início, a necessidade potencial de repetição dos testes e o número de provas que seriam realizadas.

Empregaram-se 5 g de cada amostra para o preparo da diluição 10^{-1} . Porém, na literatura encontram-se tomadas menores como de 1 g (23,69, 72,213) e 2 g (146); foi mais usada a de 10 g (37,47,72,92,133,134). Evidentemente que a melhor representatividade reside em tomada de ensaio cada vez maior, razão pela qual os métodos oficiais em vigor recomendam a tomada de 10 g (34,47,133,134,208).

Com vistas à validação do método analítico para a determinação dos contaminantes microbianos viáveis, em função das características deste tipo de amostras, foi realizado o ensaio prévio, tendo-se testado as técnicas de semeadura em profundidade e dos tubos múltiplos, usando 3 amostras.

Os resultados das contagens bacterianas totais obtidos foram confrontados e pode-se verificar a coerência entre os valores encontrados, tendo sido de mesma ordem de grandeza. Constatação semelhante foi verificada por Fischer e colaboradores (173) da Dinamarca, em 1968, na análise de comprimidos produzidos em farmácias e em indústrias, incluindo alguns contendo drogas ou substâncias de origem vegetal. No mesmo ano, Smidt e Ulrich (184) avaliaram lotes de comprimidos de produção industrial, através das mesmas técnicas e os resultados obtidos demonstraram a semelhança com os daqueles autores. Entretanto, segundo Romond (170), nos casos de carga bacteriana baixa, a sensibilidade do método em caldo se mostrou maior. Além disso, o mesmo autor menciona como vantagem a possibilidade de aplicação desta técnica para qualquer natureza da amostra. A FIP (47) apresenta esse método como sendo adequado para amostras insolúveis em água, de natureza não lipófila, quando a carga contaminante viável é inferior a 10^2 /g (mL), com resultado mais exato.

Considerando a natureza das amostras, constituídas de drogas vegetais trituradas ou pulverizadas, encapsuladas in natura ou sob a forma de comprimidos, merece tecer alguns comentários. Sabe-se que toda droga vegetal passa por algum processo de secagem visando sua conservação (50,143, 144).

A temperatura para dessecação varia de acordo com a parte da planta, sendo, segundo Paris e Moyse (144) de 20 a 40°C para sumidades floridas e folhas e de até 60-70°C para as cascas e raízes, o que contrasta com as temperaturas de 35 a 40°C usualmente empregadas e recomendadas (143) a fim de não alterar os princípios ativos.

Para a estabilização empregam-se temperaturas mais elevadas por curto espaço de tempo. Geralmente se faz uso de calor seco a 80°C por até 30 minutos (50,143,144). Além disso, a aplicação adicional de aquecimento irá ocorrer quando as drogas são processadas para serem consumidas sob a

forma de comprimidos. Assim, a secagem dos granulados requer temperatura maior que ambiente, por exemplo, de 40 a 50°C durante 4 a 5 horas (163).

Desta forma, microorganismos presentes nas drogas estariam, após sucessivos tratamentos, debilitados pelas condições adversas. Tendo em vista, adicionalmente, a relação direta entre a atividade de água e a deterioração do produto (139,143), no caso das formas sólidas estudadas, era de se esperar que os valores das contagens fossem baixos, o que levou, em primeira instância, à escolha do método de tubos múltiplos. Nesse aspecto, Romond (170) recomendou, inclusive, o uso de caldo de dupla concentração.

Além disto, outra vantagem da metodologia consiste em permitir melhor revitalização dos microorganismos traumatizados em função do perfeito contato da amostra com o meio de cultura (138,170). Neste caso, o uso de meio sólido fundido seria fator adicional de "stress" (167), uma vez que a temperatura do meio não seria favorável aos microorganismos debilitados. A Farmacopéia Americana (208) recomenda o uso da técnica dos tubos múltiplos em caso de amostras pouco solúveis e translúcidas.

Os produtos amostrados para este estudo enquadram-se nesta descrição, além de que as diluições iniciais da amostra inoculadas em meio sólido levariam a dúvidas na diferenciação entre o crescimento microbiano e partículas das amostras. Mesmo com a técnica de tubos múltiplos, dependendo da natureza da amostra e do nível de contaminação, houve necessidade de comprovação do crescimento microbiano através de sub-culturas. O inconveniente, neste caso, relaciona-se a gasto adicional de material e de tempo. Portanto, em análises de rotina é preferível o emprego da técnica de agar fundido, sobretudo se o nível de contaminação for elevado, uma vez que, neste caso, é viável a realização de diluições mais altas, eliminando-se a interferência das partículas do produto na leitura dos resultados.

Na realização de sub-culturas, a FIP (47) sugere o emprego do meio sólido correspondente, com incubação nas mesmas condições de tempera-

tura (30-35°C) por 48 a 72 horas. A Nota Técnica Prô Farmacopéia nº 189 (133), porém, recomenda, indistintamente a necessidade da sub-cultura em meio líquido ou sólido, assim como a Farmacopéia Britânica (34). A Farmacopéia Americana (208) não apresenta tal orientação.

Outro inconveniente do método é a baixa precisão (2,13,118,137), uma vez que a determinação do Número Mais Provável (NMP) se baseia em estimativa fundamentada em probabilidade (2). Assim indica o valor dentro de uma faixa e que reflete o número de microorganismos presentes (118).

Barzaghi e colaboradores (13) compararam os métodos de NMP, de placa e da filtração, tendo verificado a imprecisão do primeiro.

Com o prosseguimento das análises verificou-se que muitas das amostras de fitoterápicos estavam altamente contaminadas, em níveis superiores ao esperado. Desta forma, em alguns casos testaram-se as diluições altas, até da ordem de 10^{-7} a 10^{-10} .

Buogo e Ratti (40) igualmente fizeram uso da mesma técnica, tendo chegado à conclusão de que esse método é perfeitamente viável na análise bacteriológica de medicamentos, inclusive, durante o processo produtivo, com a determinação do NMP dos contaminantes totais (bacterianos e fúngicos). Os autores realizaram, paralelamente, a contagem empregando o meio sólido.

A técnica de tubo múltiplo é muito utilizada na determinação de coliformes em alimentos, águas e solos (2,7,52,123,137), sendo também recomendada como método oficial para controle microbiológico de medicamentos (34,47,70,133,170,208). Lingnan (111) testou-a para controle de matérias-primas.

Neste trabalho, a escolha do caldo caseína-soja como meio de cultura na determinação de bactérias aeróbias mesófilas residiu nas recomendações oficiais (13,34,47,49,70,133,208), embora alguns autores tenham utilizado o caldo tioglicolato (40,73). Igualmente, embora com pequenas va

riações, o tempo de incubação recomendado vai até 5 dias, para temperatura variando de 30 a 37°C. Neste estudo optou-se pela incubação em estufa 36 ± 1°C durante 3 dias.

Com relação à técnica para determinação de fungos, optou-se, neste trabalho, pelo uso de apenas 1 antibiótico, a tetraciclina, na concentração de 100mg/L de caldo Sabouraud-dextrose. Verificou-se na maioria dos casos, eficiência na inibição do crescimento bacteriano, porém, em outros, quando foi observada turvação no meio, efetuou-se esfregaço e coloração de Gram, a fim de confirmar a natureza do desenvolvimento microbiano, conforme orientação da FIP (47).

A solução do antibiótico foi esterilizada por filtração, antes de ser adicionada ao meio de cultura, embora houvessem autores (96) que acharam desnecessário esse procedimento se fossem observados cuidados adequados durante o seu preparo.

A positividade para o crescimento de bolores foi baseada na formação de micélio filamentoso, de observação macroscópica fácil, no meio de cultura líquido.

Ao testar-se o uso do meio de cultura sólido contendo a combinação de cicloheximida (400 mg/L) e cloranfenicol (50 mg/L) observou-se o desenvolvimento de bactérias resistentes, fato confirmado através de observação microscópica após coloração de Gram das colônias com características bacterianas. Portanto, comparado ao caldo empregado para a contagem contendo apenas tetraciclina, pode-se considerar o caráter inibitório do crescimento bacteriano deste último, satisfatório.

Quanto às condições de incubação, apesar das variações em função de autores (7,70,96,116,133,170,208) se adotou o tempo de 7 dias, a 20-25°C. Sabe-se, porém que é viável, também, o uso de incubação à temperatura ambiente, sempre que não se dispõe de incubação controlada a temperaturas baixas. Neste caso, deve-se anotar o fato e inclusive a faixa de variação da temperatura (96).

Na busca de recursos para a obtenção de resultados mais rápidos, Mead e O'Neil (116) desenvolveram um método analítico para a recuperação de bolores que levou 3 dias, fundamentado no controle adequado de temperatura de incubação (entre 27 e 28°C), em substituição à temperatura ambiente, além do uso de meio de cultura contendo alto teor de nutriente, com tamponamento próximo à neutralidade, no lugar de pH ácido. Ainda tiveram que evitar a perda de umidade do meio sólido e acrescentaram cloranfenicol (0,01 mg/mL) para evitar a contaminação bacteriana.

O procedimento para determinação de esporos visou a eliminação de formas vegetativas, usando a suspensão da amostra de diluição correspondente a 10^{-1} . O tratamento térmico usado por diversos autores indica condições que não afetem a viabilidade de esporos menos termoresistentes (125, 194), até outras mais drásticas (138).

Neste trabalho, optou-se por aquecimento a $80 \pm 1^\circ\text{C}$, por 10 minutos, como foi a técnica empregada por Romond (170) e Pedersen e Szabo (146). A determinação foi pela técnica do tubo múltiplo, visando favorecer o contato dos nutrientes com os esporos, por vezes estressados durante a secagem da droga, bem como na etapa de granulado, em se tratando de comprimidos.

Com vistas à obtenção de resultados fiéis, sob o ponto de vista quantitativo, uma vez que os esporos podem estar diferentemente estressados, as condições para germinação devem ser favoráveis. Para isto, Ray e Adams Jr. (167) recomendam a adição de amido ao meio de cultura de recuperação para adsorção de possíveis agentes inibidores, assim como a inclusão de lisozima para facilitar a germinação de esporos lesados.

Como a pesquisa de patógenos específicos é ensaio limite, na tomada de ensaio deve ter havido preocupação quanto à representatividade e sensibilidade, a fim de poder efetuar o confronto com a especificação em questão.

A Farmacopéia Americana, por exemplo, até a 17ª edição (203) exigia a ausência de Escherichia coli em 10 mg de gelatina, cujo padrão foi alterado a partir da edição seguinte para 10 g. A recomendação oficial britânica, mesmo na edição de 1980 (33) ainda faz menção a 1 g; com detalhes para melhor representatividade na tomada de ensaio, preparando a diluição 10^{-1} com 10 g de amostra, na edição de 1988 (34).

Neste estudo, partiu-se de 10 mL da suspensão da amostra correspondente à diluição 10^{-1} , uma vez que o padrão microbiano a ser usado foi o da FIP (47), embora critérios oficiais mais recentes sejam bem mais exigentes. Além disto, defrontou-se com a exiguidade de amostra conforme já comentado por ocasião da amostragem.

Tendo em vista a origem vegetal das amostras e o direcionamento da pesquisa de microorganismos específicos para aqueles com implicação direta com a via de administração destes produtos, optou-se pelo isolamento de indicadores da contaminação fecal. Para isto, tendo seguido metodologia com tendência norte-americana (123) para a pesquisa de Escherichia coli, diferentemente da britânica que considera suficiente o uso de caldo McConkey e a formação de gás como evidência da presença de coliformes totais.

Os métodos para isolamento ou análise diferenciada de coliformes estão baseados naqueles para análise de água (2,106), dos quais derivaram aqueles para alimentos (123).

A literatura refere-se ao emprego de variadas sequências analíticas e meios de cultura com a mesma finalidade, tendo-se adotado aqueles mais adaptados aos recursos laboratoriais disponíveis (123).

Há abundante bibliografia relativa ao valor de Escherichia coli e da família Enterobacteriaceae como indicadores de contaminação fecal (123). Esses indicadores devem ter capacidade de sobrevivência em ambientes diferentes do trato intestinal (34).

O termo "coliformes" compreende Escherichia coli e diversas espécies pertencentes a outros gêneros da família Enterobacteriaceae (123). O grupo não apresenta características uniformes quanto à especificidade de habitat e tempo de sobrevivência em ambiente diverso do trato intestinal (106).

Na prova para coliformes é possível detectar-se, geralmente, os gêneros Escherichia, Citrobacter, Klebsiella, Yersinia (105,123).

Em contraste, o grupo de coliformes fecais fornece maior especificidade fecal que os coliformes, visto possuir maior incidência de Escherichia coli (105,106,118). Ainda assim, também estão incluídos outros membros do mesmo gênero e outros gêneros como Klebsiella e Enterobacter (118).

É importante lembrar que, espécies bacterianas do gênero Erwinia, Serratia (123) e Klebsiella (187) fazem parte da microflora natural dos vegetais. Assim, uma reação positiva para coliformes fecais pode ser induzida por essas bactérias.

Fica evidente, portanto, que os termos "coliforme" e "coliforme fecal" não possuem validade taxonômica (118), o que torna claro o significado das contagens de coliformes fecais, apenas quando expressas em termos do procedimento analítico usado e do produto acabado (118).

O procedimento com uso sequencial de meios, cada vez mais seletivos, normalmente, é empregado com a finalidade de melhorar o isolamento e ^a purificação das culturas obtidas a partir de amostras (123), porém é comum a realização dos testes para os diferentes tipos de coliformes isoladamente (2,52), isto é, usar-se cada meio de enriquecimento seletivo ou de isolamento após o respectivo enriquecimento não seletivo.

Empregou-se, inicialmente, caldo lactose, seguido de caldo lactose-bile-verde brilhante com confirmação do crescimento dos tubos

positivos para a fermentação da lactose em ágar eosina-azul de metileno com análise macromorfológica e posterior confirmação bioquímica e micro-morfológica.

Embora houvesse recomendações indistintas para os 2 meios (2), a metodologia para avaliação de alimentos tem substituído o caldo lactose por caldo lauril sulfato-triptose (7,19,52,88,106,118), tendo em vista maior sensibilidade no aspecto do enriquecimento seletivo (35,123). Porém as últimas edições da Farmacopéia Americana (208) e da Britânica (34), ainda recomendam o caldo lactose para enriquecimento, na pesquisa de Escherichia coli.

Na análise de medicamentos não estéreis e de drogas vegetais, o caldo lactose-bile-verde brilhante é utilizado, no enriquecimento seletivo, com vistas à pesquisa de enterobactérias, de coliformes fecais e de Escherichia coli (53,110), inclusive na sua quantificação (170). Segundo Romond (170), esse caldo apresenta alguns inconvenientes, uma vez que não detecta o crescimento de coliformes anaerógenos, assim como dá resultado falso-positivo. Dessa forma, microorganismos como Bacillus polymyxa e Bacillus macerans, produtores de gás, desenvolvem-se em caldo lactose-bile-verde brilhante. Amostras contaminadas por leveduras, igualmente, irão acusar formação de gás carbônico. Segundo Desvignes e colaboradores (53) alguns cocos Gram-positivos irão desenvolver-se em função do tempo de incubação ser maior que 24 horas, embora os métodos oficiais recomendem de 24 a 48 horas, seja a 30°C, 35°C ou 35-37°C (2,7,52,53,88,123).

A questão da temperatura de incubação é bastante controvertida com relação ao caldo EC, quando da determinação e detecção de coliformes fecais. A constatação de Leitão e colaboradores (106) usando 44,5°C levou a resultados falso-positivos, sendo 3 vezes superiores aos observados quando da incubação a 45,5°C. Outros métodos recomendam, apesar disto, temperatura como $44,5 \pm 0,2^\circ\text{C}$ (2,19,118,123) em oposição a $45,50 \pm 0,05^\circ\text{C}$ (7,52).

Com relação aos resultados deste estudo, conforme os dados das Tabelas VII e XI (pg. 57 e 60), a incidência de 5 lotes contaminados por Escherichia coli pode até ter sido em função da temperatura do banho, uma vez que a precisão do termostato empregado pode ter amplitude de sensibilidade aquém da desejável. Por outro lado, tendo em vista a prova confirmatória no ágar eosina-azul de metileno, as dúvidas teriam sido eliminadas.

A inclusão deste meio com a finalidade de isolamento seletivo e identificação de Escherichia coli é assunto igualmente variável em função de autores e métodos. Pode ser a 35°C por 24 $\pm$ 2 horas (7,118), 35 $\pm$ 0,5°C por 24 $\pm$ 2 horas (2), 35°C por 18 a 24 horas (52), 35°C por 24 horas (88) ou 37°C por 48 horas (146).

Há críticas ao uso desse meio, pois certos biótipos de Escherichia coli não produzem colônias típicas com brilho verde (118). Aqueles microorganismos fermentadores lentos de lactose, assim como os lactose-negativos, produzem colônias incolores. As limitações são de natureza física e subjetiva, sendo discutível a capacidade do meio em detectar uma colônia distinta entre várias além daquela de distinguir especificamente uma colônia de Escherichia coli entre várias outras de coliformes.

Na metodologia apresentada por Mehlman e colaboradores (117), para a recuperação e identificação de Escherichia coli, os autores recomendaram o uso de ágar eosina-azul de metileno para o isolamento de microorganismos fermentadores rápidos de lactose, tendo preferido para os não fermentadores ou fermentadores lentos o uso de ágar Mac Conkey.

Na triagem das amostras, na fase de isolamento seletivo em ágar eosina-azul de metileno, foram consideradas positivas aquelas que apresentaram colônias típicas, isto é, pretas nucleadas com ou sem brilho verde metálico (2,52,117), o que pode ter excluído casos contaminados por fermentadores lentos. Porém, não se observou a presença de colônias atípicas de Escherichia coli, isto é, rosas, opacas, anucleadas ou mucóides (2). Ainda

para a confirmação das características anteriores foram efetuadas outras provas bioquímicas e a micromorfologia.

A pesquisa de Escherichia coli configurou, pela primeira vez, na monografia de gelatina, na USP XII (199), cuja metodologia foi sendo aprimorada cada vez mais. Se nesta época a prova era baseada em enriquecimento não seletivo seguido de isolamento seletivo em ágar Endo ou ágar eosina-azul de metileno, para afirmar "evidência positiva da presença de Escherichia coli" em função das colônias típicas, em outras edições foram sendo aprimoradas com introdução de mais testes. Por outro lado, em função da sensibilidade inerente à técnica analítica recomendada, houve épocas em que o teste teve denominação diferente como sendo para identificação da presença de coliformes. Pode-se dizer que segurança maior foi introduzida a partir da 18ª edição (204), onde, para teste de Escherichia coli foi exigido o isolamento seletivo sequencial, passando do ágar Mac Conkey para ágar eosina-azul de metileno, seguido de provas confirmatórias bioquímicas e de cultura.

Alguma variação que configura no método farmacopêico britânico introduzido a partir de 1973 (32) é que recomenda o enriquecimento não seletivo (caldo Mac Conkey) voltado para os termotolerantes (43-45°C). Após isolamento seletivo em ágar Mac Conkey e confirmação pelas provas de indol a $44 \pm 0,5^\circ\text{C}$, produção de gás e micromorfologia, a amostra é considerada positiva para a presença de Escherichia coli.

Como os métodos oficiais europeus (34,133,134) exigem condições de incubação dando seletividade para os termotolerantes, Cortez e colaboradores (49) analisaram plantas medicinais segundo essas recomendações.

Com relação às reações bioquímicas complementares para a identificação de Escherichia coli, a prova "IMViC" cujo resultado é do tipo + + - - indica presença de Escherichia coli típica enquanto que - + - -, as atípicas (7,105,106,123).

Procedimento analítico criticável foi adotado por Pedersen e Szabo (146), pois, esses inocularam a amostra diluída ou não, na superfície do ágar eosina-azul de metileno, e apenas desta forma efetuaram a determinação da carga de Escherichia coli em medicamentos não estéreis.

No presente trabalho, a quantificação de Escherichia coli foi em amostras que se apresentaram positivas após a triagem das mesmas.

O resultado encontrado a partir do caldo lactose foi considerado como para Escherichia coli tendo em vista as provas bioquímicas e identificação macro e micromorfológicas executadas na pesquisa deste microorganismo, tendo usado igual tomada de ensaio e caldo EC para a determinação do NMP por grama de produto.

Na análise com vistas a Salmonella sp. o aspecto semi-quantitativo, comumente, é o de maior interesse (34,47,70,133,159,170). A tomada inicial representou a metade daquela recomendada pelos métodos oficiais tendo em vista a escassez da amostra.

O enriquecimento inicial não seletivo considerou a provável presença do microorganismo na forma debilitada e em número reduzido, em função dos tratamentos a que se submeteram as amostras durante sua produção. Objetivou o fornecimento de nutrientes necessários e favoráveis ao desenvolvimento preferencial de salmonelas, bem como o reparo das células lesadas e reidratação (160). Para isso, empregou-se o caldo lactose, conforme recomendação oficial (7,19,34,47,88,133,160,208), embora seja também usual o uso de caldo nutriente (32,33,160), água peptonada tamponada e de caldo caseína-soja (160).

As condições de incubação, geralmente, variam de 30 a 37°C, por 5 a 48 horas (7,19,32,33,34,47,88,133,160), embora uma incubação prévia à temperatura ambiente, por 4 horas (160) promova maior recuperação do microorganismo, constituindo, inclusive, orientação da Farmacopéia Britânica de edições anteriores (32,33). No entanto, em caso de suspeita da

presença de Pseudomonas, Romond (170) alertou para o fato de que a incubação deve ser curta, visto que, os metabólitos podem ser tóxicos para as salmonelas. Porém, segundo Poelma e colaboradores (160) a incubação de 6 horas pode levar à ocorrência de falso-negativos o que se contrapõe a recomendações oficiais de 5 horas (34,47,133).

A transferência de alíquota de 1 mL correspondente a 0,1 g de produto a partir do caldo lactose para aqueles de enriquecimento seletivo (10 mL) foi conforme orientação da Farmacopéia Americana XXII (208), porém a sub-cultura de volumes menores (0,1 mL) ou maiores (de 2 a 10 mL) não altera significativamente a sensibilidade do método (160).

O emprego simultâneo dos caldos tetracionato e selenito-cistina é o mais frequente (7,19,34,88,160,208), embora a FIP (47) tenha recomendado apenas o primeiro e, Romond (170), o segundo por ser menos agressivo ao microorganismo.

Apesar de a incubação ser usualmente a 30-37°C, por 12 a 24 horas (7,47,208), o emprego de temperaturas elevadas (42-43°C por 24 horas) também é viável (34,133), a fim de aumentar a seletividade do meio, porém há relatos (160) de que o caldo tetracionato com incubação nessas condições é letal para salmonelas, bem como de que o meio de selenito incubado a 37°C possibilita melhor recuperação do que a 43°C.

No isolamento de salmonelas o emprego de pelo menos 2 meios seletivos ^{solidas} é comum, visto que, não há um que seja ideal para todas as situações (160). Desta forma, a escolha recaiu naqueles mais usados, isto é, ágar verde brilhante (34,70,88,160) e ágar sulfito de bismuto (7,160). Havendo, ainda, a possibilidade do emprego de ágar citrato-desoxicolato (34,47,133,170), ágar xilose-lisina-desoxicolato (7,34,47,133,208), ágar verde brilhante-vermelho fenol-lactose-sacarose (47,133), Salmonella-Shigella (SS) (88,160), Mac Conkey (160) e ágar Hektoen (7,160).

As condições de incubação foram as usuais, isto é, a 35-37°C, por 18 a 24 horas (160), embora exista recomendação para até 48 horas para o sulfito de bismuto, para afirmação segura da ausência de colônias de salmonela (144).

Verificou-se a presença de colônias suspeitas com as seguintes características: rosas, opacas, pequenas, em meio de ágar verde brilhante (34,208), diferentemente daquelas transparentes e brancas opacas, rodeadas ou não por halo avermelhado ou róseo.

No meio de ágar sulfito de bismuto, considerou-se positiva a presença de colônias pretas ou esverdeadas (208) e, igualmente daquelas com coloração marrom (7).

A utilização de meios diferenciais de ágar ferro-tríplice açúcar (7,34,47,70,88,133,160,208) e de ágar ferro-lisina (7,160) visou, em ambos casos, a verificação da formação de sulfeto de hidrogênio e, respectivamente, da utilização de glicose, lactose e sacarose e da descarboxilação da lisina (160).

O ágar ferro-tríplice açúcar pode ser incubado a 30-37°C por 18 a 48 horas (7,34,70,160,208), tendo-se adotado a temperatura de $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 horas (7,34,70,160) diferentemente do ágar ferro-lisina por 48 horas (7,160).

Verificou-se a presença de colônias típicas de salmonelas em ágar ferro-tríplice açúcar, tendo levado à formação de coloração vermelha na superfície inclinada e, amarela, na base, indicando, respectivamente, reação alcalina e ácida, além da ocorrência de produção de gás acompanhada da formação de sulfeto de hidrogênio (133).

Diferentemente, no meio de ágar ferro-lisina não se constatou a presença de colônias típicas, isto é, produtoras de reação alcalina na base do meio de cultura (fundo), levando à formação de coloração púrpura

(violeta) (7,160), bem como à produção de sulfeto de hidrogênio, indicada pelo escurecimento do ágar. Nestes casos, a AOAC (7) recomenda que não se descartem as colônias positivas no primeiro meio, a fim de efetuar testes bioquímicos adicionais e sorológicos.

Na análise de medicamentos é usual o emprego unicamente de ágar ferro-tríplice açúcar (34,133,208). A USP XXII (208) considera "de acordo com os requisitos para ausência do gênero Salmonella sp.", as amostras que apresentam reação negativa nesse meio, com possibilidade de "evidências confirmatórias adicionais, se necessário".

Outros métodos oficiais (34,47,133) sugerem a confirmação mais precisa dos resultados, no ^{mesmo} meio, através da realização de "testes bioquímicos e sorológicos".

Portanto, tendo em vista os testes realizados até a etapa de reações bioquímicas preliminares, pode-se concluir, apenas, pela suspeita da presença do microorganismo nas 5 amostras que acusaram provas positivas (Tabelas VII e XV) (pg.57 e 64).

6.4 Resultados de contaminação microbiana

Conforme os dados das Tabelas IV, V e VI (pg. 54,55 e 56), a incidência de carga contaminante viável é elevada, pois, quando se considera o valor de 10^3 /g como sendo o limite para carga bacteriana, 59 dentre 84 lotes estão acima deste valor. Embora, a contaminação fúngica (Tabela VI) (pg. 56) tenha indicado qualidade melhor, os dados referentes aos esporos (Tabela V) (pg. 55) refletem situação semelhante ao da contagem bacteriana total, apresentando certa correlação. Pela frequência de distribuição dos lotes, percebe-se que 60 estão entre 10^2 a 10^6 (Tabela IV) (pg. 54) em relação à carga bacteriana, cujo resultado se assemelha aos encontrados por outros autores (9,49,55,59,62,110,131,147,177).

Este resultado pode ser em decorrência do uso de drogas brutas sem devido cuidado no preparo de fitoterápicos e/ou a ocorrência de recontaminações durante sucessivas operações de colheita, armazenamento, moidagem, acondicionamento e outras manipulações até a transformação em especialidade farmacêutica.

As plantas medicinais, como qualquer outro vegetal, estão sujeitas aos mesmos veículos de contaminação microbiológica, isto é, solo, ar e água, apresentando, portanto, microflora rica e variada, refletindo as condições ecológicas (9,110). Além disso, vários fatores influem na qualidade microbiana final como a natureza do produto fresco, intervalo de tempo entre a estabilização e o processo de secagem, tempo e temperatura de secagem, umidade do produto acabado, condições higiênicas do local de trabalho, características intrínsecas do produto, tipo de embalagem, conservação etc.

Sabe-se que a secagem da droga ou do granulado para comprimidos pode eliminar a maioria dos microorganismos inicialmente presentes na droga e mesmo a etapa de compressão, que propicia a redução da população microbiana em função da força aplicada (9,21,59,62,78,158,159,177). Assim, no caso de levedura de cerveja, apesar do alto teor de vitamina B favorecer o crescimento microbiano (120), 7 dos 11 lotes analisados (Tabelas XVII, XVIII, XIX, XX e XXI) (pg.66,67,68,69 e 70) apresentaram carga bacteriana baixa, o que pode ter sido em função do processo produtivo, uma vez que coincidentemente se trata de amostras sob a forma de comprimidos.

O contato direto do vegetal com o solo é fator predisponente à ocorrência de altas cargas contaminantes (187), porém, avaliando a qualidade microbiológica de plantas medicinais ou de suas partes, muitos pesquisadores chegaram à conclusão de que não havia relação entre a carga contaminante viável e a parte vegetal considerada (9,49,114,131). Em contraste, Kedzia e Holderna (95) apontaram os frutos, sementes e cascas como partes

contendo menor carga bacteriana e fúngica quando comparadas a folhas, flores, rizomas e o vegetal todo. Da mesma forma, Didíng e colaboradores (59) verificaram a contaminação alta em fôlhas e raízes. Negretti (131) detectou microorganismos patogênicos mais frequentemente em raízes, rizomas, cascas e folhas, comparativamente aos frutos e à planta considerada no todo. Aureli e colaboradores (9) porém, preferiram atribuir a alta contaminação ao ambiente e à tecnologia de produção ao invés da porção vegetal.

Essas constatações não podem ser comparadas às amostras analisadas neste trabalho, pois, os diferentes órgãos vegetais sofreram muitos processos até a apresentação farmacêutica final. Logo, pode ter havido redução na carga contaminante originalmente presente no vegetal ou recontaminação em função de condições sanitárias impróprias à manipulação farmacêutica.

Quando o nível de contaminação é muito baixo, essa carga pode representar os sobreviventes de uma população que já tenha causado decomposição do substrato (183). Por outro lado, elevado nível de contaminantes pode significar falha no processo de descontaminação ou mesmo omissão de tratamento, além da possibilidade de multiplicação de microorganismos, entre outros, os patogênicos. Em decorrência disto, a deterioração do produto passa a ser aspecto preocupante, uma vez que compromete a eficácia terapêutica.

A presença de esporos bacterianos aeróbios mesófilos apresentando estreita correlação com a carga bacteriana total pode ser reflexo do próprio processamento, cujas condições permitiriam a sobrevivência e permanência dos contaminantes na sua forma de resistência. Esses esporos são geralmente do gênero Bacillus, Gram-positivos e muito frequentes em medicamentos sólidos de uso oral (6,54,183,194). Entretanto, sua origem pode estar intimamente ligada à contaminação ou veiculação através da poeira (110). De acordo com os dados da Tabela V (pg. 55), 38 lotes apresentaram carga de esporos igual ou acima de 10^4 /g, níveis estes comprometendo amostras constituídas

de folha, rizoma, raiz, semente e vegetal inteiro. A frequência elevada destes contaminantes em amostras de guaraná (81,5%) pode ser atribuída à contaminação durante o processo de colheita, lavagem, mondagem, secagem e/ou permanência seletiva dos esporos no decorrer dos diferentes estágios produtivos. Com relação às demais amostras contendo outras partes vegetais, pouco pode ser comentado em função da amostragem restrita.

Neste trabalho, segundo os dados das Tabelas IV e V (pg. 54 e 55), os 14 lotes de guaraná que apresentaram carga viável bacteriana total acima ou igual a 10^5 /g também acusaram contaminação por esporos. Com relação a esta droga, a má qualidade independe do produtor, pois pelos dados das Tabelas XVII, XVIII, XIX, XX e XXI (pg. 66,67,68,69 e 70), 13 produtores dentre 14 apresentaram resultados inadequados, o que pode sugerir condições impróprias devidas à natureza da matéria-prima. Se isto for realidade, significa que muitos fabricantes não dispõem de controle de qualidade na sua empresa, pois não selecionam os fornecedores da semente de guaraná, nem sequer controlam os seus produtos em diferentes fases da manipulação farmacêutica. Este fato está bastante evidente nos produtores B e L (Tabelas XVIII e XIX) (pg. 67 e 68). No primeiro, além de 2 lotes de guaraná, alcaçofra, centelha, espinheira santa, espirulina e ginseng, também, apresentaram 1 ou 2 lotes com carga viável total acima de 10^5 /g. Situação semelhante ocorreu, também, com o produtor L, embora não tenha sido exatamente com produtos contendo a mesma droga vegetal.

Por outro lado, quando o número de esporos foi maior que da contagem bacteriana total, pode-se deduzir que o choque térmico está sendo necessário para o desencadeamento da germinação dos esporos, ainda que o método de contagem tenha sido em meio líquido.

Com relação às amostras que apresentaram contaminação bacteriana total baixa, houve também coincidência com relação à carga de esporos

(Tabelas IV e V) (pg. 54 e 55). Estas foram representadas por confrei, lecitina de soja, óleo de germe de trigo e zedoária. Como a amostragem destas não pôde ser com maior número de lotes, quando se refere a confrei e zedoária, poucas referências podem ser feitas quanto à origem vegetal, produtor ou parte utilizada e a qualidade microbiana final. Quanto aos produtos derivados, evidentemente, que é compreensível a razão pela qual o nível de contaminação é baixo.

Quanto ao total da amostragem, níveis iguais ou maiores que 10^5 /g foram constatados em 23 lotes, coincidindo, igualmente, com as espécies vegetais contendo carga bacteriana semelhante. Referem-se a alcachofra, centelha asiática, espinheira santa, espirulina, ginseng brasileiro e guaraná.

Analisando os dados da Tabela VI (pg. 56), as amostras com carga fúngica elevada (maior ou igual a 10^5 /g) foram em menor número (apenas 2 lotes) quando comparado à contaminação bacteriana, enquanto que 55 dentre 84 lotes apresentaram nível inferior a 10^2 /g. Com relação às amostras de guaraná, verificou-se, igualmente, para este requisito, qualidade inadequada, tendo apresentado 55,6% (15/27) dos lotes com carga fúngica superior a 10^4 /g. Confrontando-se este resultado com aquele encontrado por Lutomsky e Kedzia (114), pode-se dizer que a qualidade destes fitoterápicos, no tocante à contaminação fúngica, é superior ao da amostragem feita por aqueles autores. Os mesmos encontraram apenas 10% das drogas vegetais brutas com carga inferior a 10^2 /g.

A contaminação fúngica não foi submetida à identificação; entretanto, segundo trabalho de outros pesquisadores, há predominância de Aspergillus niger e Penicillium (86,114,171). Igualmente, não houve preocupação quanto à presença de bolores ou leveduras, mais foi possível perceber que a frequência de leveduras foi muito inferior em relação à de bolores (Tabela XII) (pg. 61). Pode-se atribuir tal ocorrência à provável falha me-

todo lógica, sendo inibidas pelo antibiótico acrescido ao meio de Sabouraud-dextrose.

Segundo Devleeschouwer e Dony (55), que empregaram o meio recomendado pela FIP (47), contendo 2 antibióticos, ocorreu fato semelhante, recuperando leveduras em número reduzido de amostras, mesmo adaptando as condições de incubação.

Em função da carga fúngica, o risco relacionado à presença de aflatoxinas em drogas vegetais foi objeto de estudo de diversos pesquisadores, embora os resultados tivessem sido variáveis (86,114,171). Tal variação foi atribuída a fatores que influenciam sua produção como características da carga genética do hospedeiro, dispersão do inóculo de esporos por vetores, estresse da umidade e a presença de outros contaminantes fúngicos invasores.

Neste trabalho, como não se determinou a presença de aflatoxinas, mesmo nas amostras mais contaminadas por bolores, não se pode avaliar o risco, mas há indicação da condição inadequada de conservação. Segundo o limite estabelecido pela OMS, o produto com nível de aflatoxina maior que 20 ug/Kg deve ser rejeitado (171).

Com relação à pesquisa de Escherichia coli, os dados da Tabela VII (pg. 57) indicam elevada incidência de coliformes fecais nestas amostras. Ao se fazer correlação entre a contagem total bacteriana e a presença de coliformes totais pode-se dizer que quando a carga é de 10^4 a 10^6 /g, há íntima relação com a contaminação por coliformes (Tabela XIII) (pg. 62). Portanto, pelo raciocínio inverso e também confirmado pelos dados das Tabelas VII, XVII, XVIII, XX e XXI (pg. 57,66,67,69 e 70), amostras de confrei, lecitina de soja, óleo de germe de trigo e zedoária apresentam qualidade satisfatória em todos os aspectos.

Da mesma forma, a correlação entre coliformes totais e carga de esporos também é verdadeira (Tabela XIV) (pg. 63), pois não houve

contaminação por coliformes totais quando o nível de esporos era inferior a 10/g.

Logo, amostras mais contaminadas, seja por esporos ou não, geralmente continham coliformes, diferentemente da presença de fungos (Tabela XV) (pg. 64). Constatação semelhante foi efetuada por Diding e colaboradores (59), pois os coliformes foram encontrados em amostras com carga bacteriana de 10^4 a 10^6 /g.

A presença de coliformes fecais foi detectada em 13 lotes, nos quais a contaminação bacteriana total havia acusado cargas compreendidas entre 10^3 e 10^{10} /g (Tabela XIII) (pg. 62). Estes, por sua vez, estavam, também, com fungos (Tabela XV) (pg. 64). Isto permite deduzir que estas amostras são de qualidade inadequada, indicando condições sanitárias impróprias do produtor para a manufatura e comercialização destes produtos.

Portanto, segundo os dados da Tabela VII (pg. 57), nesta amostragem com 84 lotes, 5 acusaram Escherichia coli (centelha asiática, espirulina, ginseng brasileiro, guaraná e levedura de cerveja).

Em vista deste resultado indicando qualidade imprópria para medicamentos, as 5 amostras foram reanalisadas com vistas à quantificação deste indicador da contaminação fecal. A presença de Escherichia coli é ainda mais preocupante quando se consideram os dados de contagem dos contaminantes viáveis totais para estas amostras (Tabela XVI) (pg. 65). Assim, por exemplo, o lote de centelha asiática apresentou níveis altos de contaminação em todos os aspectos com 5×10^9 bactérias, $2,6 \times 10^4$ esporos bacterianos, $1,7 \times 10^4$ fungos e $1,5 \times 10^2$ E. coli por grama. Outros três lotes contendo o mesmo microorganismo mostraram-se especialmente contaminados. Estes apresentaram em sua composição guaraná, ginseng brasileiro e espirulina. Para estes a carga bacteriana variou de 10^5 a 10^8 /g, a de esporos, de 10^4 a 10^6 /g, a contagem de fungos esteve igualmente elevada, tendo alcançado até 10^4 /g e aquela de Escherichia coli variou de 2,3 a $9,3 \times 10$ /g.

Estes dados são alarmantes, uma vez que se tratam de medicamentos. O lote de levedura de cerveja apresentou níveis inferiores, porém, ainda assim a contagem bacteriana superou 10^3 /g e a fúngica, 10^2 /g. Estes resultados, além de colocarem em risco a saúde do paciente, podem acarretar diminuição ou perda de atividade terapêutica, uma vez que indicam ou podem levar à degradação do princípio ativo.

Desta forma, tendo em vista o estado de "stress" e depressão existente no paciente que busca propriedades terapêuticas do guaraná, pode enfrentar problemas decorrentes da instalação de infecção por microorganismos oportunistas, igualmente para o consumidor de ginseng, geralmente apresentando quadro de esgotamento físico e ou mental. O emprego de medicamento a base de espirulina, com tal nível de contaminação, pode não ser justificável para pacientes submetidos ao regime alimentar de emagrecimento (51, 63,192).

Como estes 5 lotes, apesar de não serem da mesma espécie botânica, são comercializados pelo mesmo produtor (B), este fato permite concluir que as condições sanitárias da fábrica são impróprias para manufatura de medicamentos, além de indicar que não há controle de qualidade, mesmo a nível de qualidade de matérias-primas.

Lotes da mesma droga vegetal fabricados por outros produtores não acusaram a presença de Escherichia coli, embora apresentando altas contagens. Portanto, mesmo para outras 8 amostras que apresentaram coliformes fecais, apesar de não ter sido isolada Escherichia coli, o aspecto da qualidade microbiana pode representar risco à saúde do consumidor. Neste caso são 6 os fabricantes implicados (A,B,C,E,H e L), conforme a Tabela XVI (pg. 65), os quais, exceto E, participaram nesta amostragem com relativa representatividade. Este aspecto passa a ser preocupante quando se atenta para distribuição dos mesmos lotes para grande parcela do mercado.

Mesmo considerando o total de 13 amostras contendo coliformes fecais, o produtor B se destaca pela maior rejeição, tendo sido 7 em 26 lotes.

Quando se incrimina o produtor B em função da condição sanitária inadequada através dos 5 lotes de produtos de onde foi isolada Escherichia coli, não significa que o restante das amostras esteja em perfeitas condições, pois, pode-se admitir que a contaminação fecal tenha ocorrido, mas ter sido eliminada em função de processo térmico aplicado ao material, em algum estágio da manipulação.

Ao admitir que o processo térmico aplicado durante a fabricação pode ter eliminado o contaminante fecal, os 5 lotes incriminados devem ter sido em consequência da má qualidade da matéria-prima, uma vez que se tratavam de 3 lotes de cápsulas e 2 de pó. O fornecedor da droga bruta poderia ser o primeiro responsável, porém, torna-se evidente que não foi aplicado tratamento descontaminante algum pelo fato de não ter sido analisada, quando da compra desta matéria-prima. Por não ter dado analítico, uma vez que o produtor não deve dispor de serviço de controle de qualidade, não houve sequer preocupação para a aplicação de algum processo descontaminante. Logo, é admissível que a presença de Escherichia coli tenha ocorrido desde a fase de droga bruta, não sendo recontaminação pós-processamento.

Devleeschouwer e Dony (55) isolaram o microorganismo de amostras de drogas vegetais contendo contaminação bacteriana da ordem de 10^4 a 10^6 /g e 10^3 a 10^5 /g de fungos. Igualmente, Lenoble e colaboradores (110) apresentaram resultados relacionados a 10^6 e 10^5 /g, respectivamente, de bactérias totais e fungos.

Outros microorganismos como estreptococos fecais e clostrídios sulfito-redutores podem revelar a presença de contaminantes da flora fecal. Em alguns pontos da Europa, o Clostridium perfringens é considerado como indicador de contaminação fecal (18). Lenoble e colaboradores (110), por exemplo, consideram indicação de contaminação fecal somente quando estão presentes, além das 2 espécies anteriormente referidas, os estreptococos fecais, sendo que das 12 amostras de Mentha piperita analisadas pelos autores, 7 apresentaram sinais de contaminação fecal animal ou humana e destas,

5 acusaram presença de Escherichia coli. Semelhantemente, Cortez e colaboradores (49) isolaram clostrídios e estreptococos fecais, além de Escherichia coli, em 4 dos 79 lotes de plantas medicinais amostrados.

O significado desses microorganismos é variável de acordo com o tipo de produto. Assim, conforme mencionado anteriormente, quando esse passa por algum tratamento térmico, a Escherichia coli termolábil não sobreviveria (120). Nesse caso, estreptococos fecais e clostrídios evidenciam, satisfatoriamente, contaminação de origem fecal em consequência de sua maior resistência a temperaturas relativamente altas (14,120) e ao meio externo (110), do que Escherichia coli. Por outro lado, os esporos de Clostridium perfringens, por exemplo, sobrevivem a condições drásticas (14) e são responsáveis pela ampla distribuição da bactéria, o que possibilita seu isolamento dos mais variados ambientes como água, solo, poeira, trato intestinal, fezes, área de produção farmacêutica (14), plantas medicinais (49,110,131) e aromáticas (9).

Desta forma, pesquisadores americanos consideram a bactéria sem validade para a indexação da contaminação fecal (18), tendo em vista igualmente que os esporos foram isolados em zonas polares destituídas de vida animal e humana (110).

Portanto, a presença de Clostridium perfringens pode ser relacionada às condições higiênicas insatisfatórias de produção, oferecendo risco potencial à saúde, pelo menos, no que se refere à produção de esporos no produto contendo a droga vegetal contaminada (9).

Na análise de plantas aromáticas que passaram por processamento (150), a avaliação da qualidade microbiológica é semelhante àquela realizada no presente estudo, isto é, efetua-se a contagem de aeróbios, de fungos e a pesquisa de coliformes. No caso da presença destes últimos, procede-se à sua determinação. A pesquisa de salmonelas e shigelas é feita apenas quando o armazenamento foi feito em condições inadequadas.

Salmonella sp. é, também, outro indicador das condições impróprias de fabricação de medicamentos, além de que pode ocorrer desde a fase de cultivo das plantas, principalmente, devido à irrigação, bem como manuseio, armazenamento e transporte (107). A eliminação dessa bactéria pela ação biocida química inerente à característica da planta refere-se às espécies aromáticas, pois, o óleo essencial apresenta ação antimicrobiana (9, 150).

O isolamento de salmonelas defronta-se com problemas de ordem analítica, pois, sua recuperação sofre, por vezes, problemas de competição com a microflora natural e numericamente elevada (107).

Neste estudo, no isolamento de salmonelas, não foram feitas provas bioquímicas completas, bem como as sorológicas, conforme exposto anteriormente. Contudo, pelos dados das Tabelas XIII, XIV e XV (pg. 62, 63 e 64), pode-se dizer que a suspeita da sua presença está intimamente relacionada com o isolamento de Escherichia coli.

Associa-se, geralmente, o problema de contaminação microbiana às formas farmacêuticas líquidas (130, 139), tendo em vista a alta atividade de água favorável ao desenvolvimento microbiano. Porém, as formas farmacêuticas sólidas são igualmente passíveis de contaminação, tendo sido consideradas e estudadas por vários autores (6, 40, 53, 73, 101, 120, 184, 211). Waterman e colaboradores (211), por exemplo, arrolaram os fatores que influem na sobrevivência de microorganismos em formas farmacêuticas sólidas, além de outros como condições ambientais de umidade, temperatura, ausência ou presença de oxigênio e tempo de armazenamento.

Conforme os dados da Tabela VIII (pg. 58), a carga bacteriana total foi marcadamente elevada em amostras constituídas de pó, seguidas de cápsula e comprimido.

A carga bacteriana atingiu níveis da ordem de 10^9 , 10^7 e 10^6 /g,

respectivamente, em cápsulas, comprimidos e pós, cujos valores se assemelham aos resultados encontrados por Dony (62) em formas sólidas como drágeas, granulados, além daquelas analisadas neste estudo. Verificou contagens bacterianas superiores a 10^2 /g, tendo alcançado até 10^9 /g nas amostras contendo matérias-primas vegetais e animais, tendo constatado a presença de enterobactérias, estreptococos fecais e fungos.

Ainda, analisando os dados da Tabela VIII (pg.58), níveis de contaminação bacteriana superiores a 10^3 /g foram encontrados em 66,7% e 57,2%, respectivamente, de cápsulas e comprimidos. Nos pós, os dados foram particularmente elevados, abrangendo a totalidade das amostras. Além disto, 80,0% destas amostras acusaram cargas superiores a 10^4 /g, sendo que 33,3% com resultado compreendido entre 10^5 e 10^6 /g. Cabe a ressalva de que 13 dos 15 lotes de pó são de guaraná e como este é recomendado pelo produtor como complemento dietético ou alimento, conforme as informações inscritas em rótulo das embalagens, o fabricante poderia encontrar justificativa para controle menos rigoroso e consequentemente este perfil analítico.

Estas observações diferem daquelas de Desvignes e colaboradores (53), que verificaram percentagens menores para o mesmo limite (10^3 bactérias/g), tendo sido, respectivamente, de 18,5 a 13,5% para cápsulas e comprimidos. As constatações de Arribas e colaboradores (6) foram muito diferentes dos resultados encontrados em fitoterápicos brasileiros, pois, apenas 11,1% dos pós e 3,0% das cápsulas e comprimidos se enquadravam ao mesmo padrão. Ainda, na amostragem nacional, cerca de 48,0% das cápsulas e comprimidos apresentaram níveis superiores a 10^4 /g.

Na avaliação de Desvignes e colaboradores (53), a incidência de contagem bacteriana inferior a 10^4 /g foi próxima entre as amostras de cápsulas (95,0%) e de comprimidos (92,0%), porém de maior valor que na presente pesquisa.

Pelos valores da Tabela IX (pg. 58), a contaminação por esporos bacterianos foi alta nos pós, tendo 73,3% dos lotes acusado carga maior ou igual a 10^3 /g em comparação a 60,4% das cápsulas e 52,4% dos comprimidos. A manutenção da viabilidade dos esporos em comprimidos é fato comprovado por Yanagita e colaboradores (218) uma vez que são altamente resistentes à compressão, assim como o são aos vários agentes químicos e físicos. Entretanto, pelos dados deste estudo, onde a amostragem abrangeu diferentes produtos contendo drogas vegetais diversas, por sua vez fabricados por muitas empresas, não se pode concluir que a forma farmacêutica tenha apresentado fatores determinantes na qualidade microbiana.

Ao considerar o nível de esporos 66,7% dos pós apresentaram carga igual ou superior a 10^4 /g, enquanto que para cápsulas e comprimidos os valores foram de 41,7% e 38,1% respectivamente.

No levantamento feito por Arribas e colaboradores (6), a contaminação por espécies do gênero Bacillus foi maior em pós (37,0%), seguido de comprimidos (30,3%) e cápsulas (13,0%). As espécies isoladas a partir de comprimidos foram Bacillus subtilis, Bacillus brevis e Bacillus licheniformis, enquanto que Bacillus pumilus e Bacillus polymyxa, de pós e Bacillus subtilis e Bacillus brevis, de cápsulas.

Semelhantemente aos valores de contagens bacterianas, houve grande variação naqueles de esporulados encontrados nas 3 formas farmacêuticas, tendo-se constatado cargas de até 10^8 , 10^6 e 10^7 esporos/g, respectivamente, em cápsulas, comprimidos e pós (Tabela IX) (pg. 58).

No que se refere à carga fúngica, conforme a Tabela X (pg. 59), nenhuma amostra de pó acusou menos de 10/g, contrariamente à grande incidência deste nível nas outras formas estudadas, que foi maior em comprimidos (80,9%) do que em cápsulas (50,0%). Além disto, a maioria dos lotes correspondentes a estas últimas (64,6% das cápsulas e 90,4% dos comprimidos)

dos) apresentou menos de 10^2 fungos/g em contraste com apenas 33,3% dos pós. Quando presente a contaminação fúngica, sempre houve predominância de bolores, nas 3 formas farmacêuticas (Tabela XII) (pg. 61). As leveduras não foram isoladas de comprimidos. Este fato pode encontrar explicação no processo de fabricação dos mesmos, com a redução do teor de umidade do produto em função da etapa de secagem do granulado ou da compactação pela compressão do mesmo, criando assim condição desfavorável (21,158,159). O aparecimento de ambos os contaminantes fúngicos foi verificado em 3 lotes (Tabelas XVIII e XXI) (pg. 67 e 70), sendo 1 de ginseng coreano (cápsula, produtor E), 1 de levedura de cerveja (pó, produtor B) e outro de guaraná (pó, produtor S). O lote de guaraná apresentou nível especialmente elevado de ambos os contaminantes fúngicos sendo de $2,3 \times 10^3$ bolores/g e $7,5 \times 10^3$ leveduras/g (Tabela XXI) (pg. 70). O lote de levedura de cerveja estava particularmente contaminado, tendo apresentado inclusive contaminação por Escherichia coli e contagem de bolores superior à de leveduras ($7,5 \times 10^3$ /g), diferentemente daquele de ginseng coreano, contendo coliformes fecais, porém com carga de leveduras ($1,5 \times 10^2$ /g) superior à de bolores ($4,3 \times 10^3$ /g) (Tabela XVI) (pg. 65). A presença de levedura, isoladamente, ocorreu em 2 amostras de cápsulas (Tabela XII) (pg. 61).

As condições necessárias ao desenvolvimento destes microorganismos, incluindo a umidade, podem ter sido fornecidas na fase produtiva ou de armazenamento, em função da umidade relativa e temperatura, durante estas etapas, havendo, ainda, que considerar as propriedades físicas inerentes às próprias drogas, como característica higroscópica. Desta forma, maior teor de água livre favorece igualmente o desenvolvimento de leveduras, cujas necessidades de água livre são pouco maiores que aquelas dos bolores (21).

Aparentemente, não há correlação entre a presença destes microorganismos em combinação, tendo em vista o número reduzido de amostras que

acusaram a presença de ambos.

Ainda com relação às leveduras, considerando que estas crescem mais rapidamente do que os bolores e, frequentemente, junto deles (123) e, visto a sua baixa incidência verificada nos fitoterápicos (Tabela XII) (pg. 61), isto pode indicar, conforme discutido anteriormente, o uso de método inadequado à sua recuperação. Pode ter ocorrido inibição de crescimento pelos antibióticos antibacterianos do meio de cultura, o que tornaria inviável o estabelecimento de relação segura entre os resultados obtidos e as formas farmacêuticas estudadas.

A contaminação por coliformes totais e fecais foi coerente em relação à contaminação total constatada nas 3 formas farmacêuticas. Assim, conforme os dados da Tabela XI, ^(pg. 60) os pós apresentaram percentagens superiores de ambos os grupos de contaminantes (66,7% de coliformes totais, 33,3% de coliformes fecais) seguidos de cápsulas (47,9% de coliformes totais, 14,6% de coliformes fecais) e comprimidos (33,3% de coliformes totais e 4,8% de coliformes fecais). O mesmo verificou-se para Escherichia coli, recuperada a partir de pós (13,3%) e cápsulas (6,3%), porém, não foi isolada de comprimidos, o que era de se esperar, levando em consideração a sensibilidade desta espécie ao calor (9,123). Todavia, com relação à compressão, estudos de Yanagita e colaboradores (218) demonstraram ser o microorganismo mais resistente do que outras bactérias com tamanho celular maior.

A verificação de que as formas farmacêuticas sólidas estavam entre as mais contaminadas foi feita por vários autores (53,191) que encontraram níveis iguais ou superiores a 10^4 /g, à semelhança do que foi constatado aqui.

As cápsulas e comprimidos apresentaram níveis relativamente altos de contaminação, diferentemente do que outros autores verificaram (40, 55), o que pode ter ocorrido em função da origem essencialmente natural das drogas constituintes e, no caso das cápsulas, também em decorrência da

qualidade das cápsulas gelatinosas como componente isolado, visto que a gelatina é matéria-prima altamente contaminada (77,147,194,215,216), devendo ser tratada adequadamente, além de que a etapa de encapsulação (77) pode ser fonte de nova contaminação. No entanto, não foi efetuada a análise em separado, visto que o produto é consumido como um todo, tendo-se, portanto, avaliado a qualidade final do mesmo. Desta forma, pode ter havido interferência deste fator nos resultados encontrados, devendo-se considerar com cautela as conclusões relativas às espécies vegetais, quando apresentadas sob a forma de cápsulas.

Apesar de haver em abundância substratos como amido e lactose, Bos e colaboradores (21) atribuíram o crescimento microbiano raro em comprimidos às condições adequadas de armazenamento, isto é, em ambiente seco.

A expressão dos resultados em microorganismos por grama de produto, visa, principalmente, o risco do produtor (40), porém sob o ponto de vista de risco do consumidor, uma mesma dose infectante de microorganismos tem significado diferente de acordo com a via de administração, a posologia e condições do próprio paciente. Desta forma, Desvignes e colaboradores (53) consideraram importante a expressão das contagens em número de microorganismos por unidade de apresentação farmacêutica, tendo sido adaptada por outros autores (21,40).

Tendo em vista que a elevada flora contaminante dos fitoterápicos pode induzir à degradação dos produtos e consequente comprometimento da eficácia terapêutica, torna-se evidente a necessidade de se manter sob controle todos os fatores que influem na qualidade destes produtos, o que é possível somente quando o produtor segue as Boas Práticas de Manufatura (4,41,77,80,112,119,161,182,207).

Portanto, a qualidade microbiológica deve ser comprovada durante toda a produção, não podendo ser obtida simplesmente por uma esteriliza

ção final que mascara as más condições de fabricação (162).

Mesmaecker (119) enumerou pontos importantes para garantir a qualidade e eficácia das plantas medicinais através da identificação de cada espécie, ausência de contaminação por materiais estranhos, pureza microbiológica e teor de princípios ativos. Há estudos mostrando resultados favoráveis do desempoeiramento de plantas medicinais (55,106,150).

No aspecto microbiológico, portanto, o cuidado com os pontos críticos do processo é essencial, devendo considerar que o nível de micro-organismos varia de acordo com as condições de produção, método de colheita e tratamentos posteriores (114,150). A limpeza e o processamento desses produtos possibilitam a redução do nível de contaminação, assim como a secagem e a moagem, esta última através do suposto aumento de temperatura. O óxido de etileno é usado em fumigação agrícola e industrial (59), em descontaminação de especiarias (150) e alimentos (59), porém a sua ação alquilante, com propriedades mutagênicas (59), não o torna um agente seguro, podendo interferir com os constituintes das drogas e formar produtos tóxicos. A esterilização de plantas medicinais contendo diferentes grupos de princípios ativos foi estudada (172,173), sendo que os resultados foram variáveis quanto ao efeito sobre a atividade das mesmas.

A aplicação de radiação gama em plantas aromáticas de uso alimentar é permitida, sendo regulamentada a sua utilização no país (27), porém, para plantas medicinais, a ausência de legislação pertinente dá margem para que os produtores utilizem esse recurso. Porém, o efeito da radiação sobre os princípios ativos não está bem esclarecido, havendo necessidade de estudos em particular, visto que modificações na composição química e na própria estrutura ocorreram em outros produtos farmacêuticos (43). O seu uso em medicamentos opoterápicos de natureza enzimática levou à descontaminação satisfatória sem perda significativa de atividade (178). Em antibióticos, a radiação gama afetou a atividade da penicilina G e oxitetraci

clina, diferentemente dos outros antibióticos testados por Gupta e colaboradores (79). A sua aplicação na planta de Atropa belladonna foi capaz de induzir mutações na maioria de suas características (94). Alguns mutantes apresentaram aumento no teor de alcalóides.

Portanto, a esterilização de drogas vegetais deve ser estudada criteriosamente para cada caso, com vistas a manter a integridade dos princípios ativos.

No que se refere a produtos naturais, a análise rotineira é indicada (207). Para produtos com grande probabilidade de contaminação, Personé e colaboradores (151) consideraram a necessidade de efetuar controle microbiológico sobre cada lote de fabricação.

Se por um lado é evidente a necessidade de padrões microbianos específicos para drogas vegetais com particularidades marcantes, não se pode dissociar do fato de que as especialidades fitoterápicas são medicamentos. Portanto, devem apresentar padrão de qualidade, embora não se verifique na prática, expondo o consumidor a grandes riscos.

Desta forma, há contraste entre a necessidade de implantação de padrões mais tolerantes e as exigências de qualidade de medicamentos não estéreis de uso oral, por considerar a origem natural dos insumos fitoterápicos e a grande probabilidade do desenvolvimento microbiano (61). Além disto, para aqueles produtos com fabricação em larga escala, o risco associado à contaminação microbiana ganha maior dimensão (62,138) tendo em vista a distribuição de um mesmo lote a grande faixa da população.

Há, portanto, urgência no estabelecimento de normas nacionais que permitam o enquadramento destes produtos, gradativamente, aos padrões de qualidade microbiológica, conscientizando os produtores a trabalhar em melhores condições, respeitando as Boas Normas de Fabricação. Desta forma, a aplicação de padrões permitirá conhecer, indiretamente, as condições sanitárias de produção.

Segundo Yokoya (219), no estabelecimento de normas de pureza microbiana, torna-se importante conhecer o risco que se quer evitar através do isolamento de microorganismos indicadores, levando em consideração a via de administração do produto além de outros fatores como o estado físico da forma farmacêutica (sólido, semi-sólido, líquido) e os recursos disponíveis para a sua obtenção (191). Ainda, o padrão deverá apresentar margem de tolerância adequada, tendo em vista a falta de exatidão proveniente da amostragem e análise. O próprio monitoramento regular, durante o desenvolvimento e fabricação do produto leva à verificação e estabelecimento do tipo e número mínimo de microorganismos atingível (62,183), sendo que a garantia de que esse nível é compatível com a estabilidade microbiológica do produto constitui o melhor manual de produção.

Sendo assim, a norma não constitui um valor estático, devendo sofrer alterações conforme o aprimoramento das condições higiênicas da indústria e de acordo com a modificação de procedimentos de fabricação (183).

No caso de fitoterápicos, o estabelecimento inicial de padrões microbianos rígidos não é condição ideal para se alcançar a qualidade desejável, uma vez que pela origem dos mesmos, dificilmente serão obedecidos. Portanto, há que se extrapolar a idéia de controle de qualidade de forma a abranger desde as primeiras etapas produtivas da matéria-prima, como a cultura, lavagem de drogas e possível uso de solução desinfetante, além da embalagem e conservação adequadas do produto acabado.

O embasamento legal dos padrões é importante, constituindo sugestões para adequar a produção a limites de contaminação toleráveis com relação à inocuidade do produto.

A Farmacopéia da Tchecoslováquia (45) incluiu, pela primeira vez, limite microbiano para medicamentos não estéreis, tendo sido tolerante para a contagem total (5×10^4 /mL), na medida em que requereu a ausência de determinados microorganismos específicos (Tabela XXII) (pg.114).

TABELA XXII - Limites de tolerância dos diferentes padrões microbiológicos para medicamentos não estéreis de uso oral

TCHECOSLOVÁQUIA	SUÉCIA	S I S F	F I P	LABORATÓRIO NACIONAL DE SAÚDE DA FRANÇA	TAGLIAPIETRA	LENOBLE E COLABORADORES	NOTA TÉCNICA PRÓ FARMACOPÉIA Nº 190	B P	FB IV	U S P
1954 (45,61)	1967 (189)	1975 (60)	1975 (47)	1977 (151)	1978 (191)	1980 (110)	1983 (134)	1988 (34)	1988 (70)	1990 (208)
Comprimidos e produtos análogos	Medicamentos não estéreis	Medicamentos de uso oral e outros	"Outros" (categoria 3)	Medicamentos de uso oral	Medicamentos não estéreis de uso oral e outros	Para espécies vegetais (infuso)	Para plantas medicinais		Produtos farmacêu- ticos não estéreis e matérias-primas de uso direto em sua fabricação uso oral (sólidos e fluidos)	
- 5×10^4 /g (mL)*	- 10^2 /g (mL)* Quando não atende ao limite para contagem total:	- 10^3 /g (mL)* - 10^2 /g (mL)**	- $10^3 \cdot 10^4$ /g (mL)* - 10^2 /g (mL)**	- 10^4 /g (mL)* - 10^2 /g (mL)**	- 10^2 /g (mL)* - 10^2 /g (mL)**	- 5×10^5 /g* - 5×10^2 /g**	- 5×10^5 /g* - 5×10^4 /g**	- Ausência de enterobactérias e de outras bactérias Gram- negativas, <u>E.Coli</u> , <u>Salmonella</u> sp., <u>P.aeruginosa</u> e <u>S.aureus</u> em 10g	- Ausência de <u>E.coli</u> , <u>Salmonella</u> sp., <u>P.aeruginosa</u> , <u>S.aureus</u> , <u>B.cereus</u> , <u>Enterobacter</u> sp., <u>C.albicans</u> , <u>A.flavus</u> e <u>A.parasiticus</u> em 10g (mL)	Ausência de <u>E.coli</u> , <u>Salmonella</u> sp., <u>P.aeruginosa</u> e <u>S.aureus</u> em 10 g (mL)
- Ausência de 1 g (mL)**	- Ausência de coliformes e de <u>Salmo- nella</u> sp. em 1 g (mL)	- Ausência de <u>E.coli</u> em 1 g (mL)	- Ausência de <u>E.coli</u> em 1g (mL) Em certos casos: - Ausência de <u>Salmonella</u> sp.	- Ausência de enterobactérias, <u>P.aeruginosa</u> , <u>S.aureus</u> , <u>Str.faecalis</u> e clostrídios sul- fito-redutores em 1g (mL)	- Ausência de <u>E.coli</u> em 1g (mL) Se a contagem bacteriana es- tiver em desa- sacordo, sub- meter ao cri- tério B: - 10^4 /g (mL)*	- Ausência de <u>E.coli</u> e <u>Salmonella</u> sp. em 1g - 5×10^4 /g de enterobacté- rias - Não tolerada a presença simul- tânea de <u>Str.faecalis</u> e <u>C.perfringens</u> em 1 g	- Ausência de <u>E.coli</u> , <u>P.aeruginosa</u> e <u>S.aureus</u> em 10g			
- Ausência de indicadores de contaminação fecal e de patogênicos específicos em 1 g (mL)			- Ausência de outras entero- bactérias - Ausência de <u>P.aeruginosa</u> e <u>S.aureus</u> em 1 g (mL)		- 10^2 /g (mL) de outras entero- bactérias - Ausência de <u>P.aeruginosa</u> e <u>S.aureus</u> em 1 g (mL)	- 10^2 /g (mL) de <u>Enterobacteria</u> <u>ceae</u>				

* bactérias aeróbias mesófilas

** bolores e leveduras

As primeiras ocorrências de problemas clínicos em consequência do uso de medicamentos não estéreis contaminados serviram de incentivo à elaboração de padrões, tendo surgido o sueco (189), em 1967, e outras propostas na década de 70 (47,110,191). Portanto, a preocupação com a qualidade destes produtos é relativamente recente, tendo despertado o interesse para com as drogas vegetais.

O padrão sueco (189) (Tabela XXII) (pg.114) mostrou-se muito rígido quanto ao limite da carga bacteriana, porém justificadamente, em função dos casos de toxiinfecção verificados na época. No caso de produto contendo carga bacteriana inferior àquela preconizada por tal padrão ($10^2/g$), a pesquisa de microorganismos patogênicos é considerada desnecessária. Porém, em caso da exigência não ser satisfeita, em função das matérias-primas de origem biológica, a pesquisa de espécies patogênicas deve atender à ausência de coliformes e de salmonelas em 1g (mL) de produto. No entanto, com a 2ª condição existe o risco de serem aprovados lotes com carga bacteriana alta com a justificativa de não conter os microorganismos indicados, contrastando com a 1ª exigência que visa excluir certos microorganismos patogênicos ou potencialmente como tal, além daqueles indicadores de contaminação fecal (62), cuja presença é sinal de condições higiênicas insatisfatórias de produção.

O padrão proposto pela SISF (60) fixa em $10^3/g$ o nível máximo tolerado para bactérias aeróbias mesófilas, além de limitar a pesquisa de microorganismos específicos a Escherichia coli (Tabela XXII) (pg.114). Limite desta ordem para a carga bacteriana torna difícil o cumprimento por parte destes produtos considerando sua origem.

Os padrões que se sucederam tenderam à maior tolerância quanto à carga total de contaminantes viáveis, tendo portanto exigido a verificação da presença de microorganismos específicos (Tabela XXII) (pg.114).

O limite máximo de $10^3 - 10^4$ bactérias/g sugerido pela FIP (47) para medicamentos não estéreis de uso oral, além de ser internacionalmente aceito, é aplicável para drogas vegetais, uma vez que se refere aos produtos constituindo "fonte inevitável de contaminação que não pode ser reduzida efetivamente pelo processo produtivo". O mesmo se verifica na proposta do Laboratório Nacional de Saúde da França (151), inclusive, havendo muita semelhança entre esses para os demais requisitos (Tabela XXII) (pg.114).

A aplicação desses padrões aos produtos fitoterápicos merece ainda algumas considerações. Tendo em vista a via de administração, a pesquisa sistemática de Pseudomonas aeruginosa e Staphylococcus aureus torna-se dispensável, diferentemente daquela de Salmonella sp., que deveria apresentar caráter de obrigatoriedade (110), apesar de o Laboratório Nacional de Saúde da França não a ter considerado como patogênica (151).

Por outro lado, o limite de tolerância zero para enterobactérias, recomendado pela norma desse país (151) é muito rígido para drogas vegetais, sendo criticável. Diferentemente, a FIP (47) sugere nível inferior a 10^2 /g mL para outras enterobactérias, além de Escherichia coli e Salmonella sp. para medicamentos não estéreis de uso oral, o que seria mais viável para os produtos considerados do que a ausência recomendada pelo padrão francês (151). Esse último contém ainda requisito para a ausência de estreptococos fecais e clostrídios sulfito-redutores, como indicadores de contaminação fecal. Essa comissão optou por esses microorganismos, ao invés de Escherichia coli, por considerar que não é a espécie mais patogênica entre as enterobactérias.

A indefinição da proposta da FIP (47) quanto à pesquisa de microorganismos específicos, excluindo Escherichia coli na expressão "certos casos", pode dificultar o controle microbiológico. Porém, a rejeição de lote contendo Escherichia coli em 1 grama de produto é perfeitamente adequada, pois visa eliminar o risco de contaminação fecal recente. Essa pode

provir, no caso dos fitoterápicos, da recontaminação decorrente de más condições de produção, tendo em vista que, com os tratamentos sucessivos no decorrer de sua transformação pode ocorrer diminuição na carga inicial proveniente dos insumos.

As normas sugeridas por Tagliapietra (191) (Tabela XXII) (pg. 114), em 2 níveis estão na dependência da carga bacteriana, pois se esta exceder 10^2 /g (mL), deve-se pesquisar Salmonella sp., além de realizar a contagem de enterobactérias. Tendo em vista a carga microbiana alta dos produtos analisados, isto implica, geralmente, na aplicação do 2º nível de exigência, tendendo à aprovação de lote com alta carga bacteriana.

Mais recentemente, em 1980, Lenoble e colaboradores (110) sugeriram padrão específico para espécies vegetais destinadas ao uso na forma de infuso, cujo nível de tolerância para carga bacteriana, fúngica e de enterobactérias é alto com relação a outras normas microbiológicas (Tabela XXII) (pg. 114).

Em 1983, a Nota Técnica Pro-Farmacopéia nº 190 (134) introduziu padrão similar ao anterior, para plantas medicinais, sendo igualmente tolerante quanto à carga bacteriana (de até 5×10^5 /g) e sobretudo para fungos (5×10^4 /g). Fica questionável para aqueles casos em que, diferentemente dos produtos destinados à infusão, não ocorre processamento prévio. Sabe-se que tal procedimento possibilita a redução da carga contaminante inicial de 1 a 2 logaritmos decimais (110), porém, para os produtos consumidos sob a forma de cápsula e pó, a tolerância parece ser demasiada.

Quanto ao requisito para contaminação fúngica, quando existente em normas microbiológicas para medicamentos não estéreis, constata-se unanimidade (47,60,151,191) para o limite de tolerância, sendo de 10^2 /g (Tabela XXII) (pg. 114), parecendo, portanto, adequado para uma boa conservação do produto.

Comparativamente, os padrões mais tolerantes são suscetíveis de crítica, pois, de acordo com o teor de umidade do produto e das condições de armazenamento, pode haver comprometimento da integridade do mesmo.

No que se refere a enterobactérias e salmonelas, o padrão da Nota Técnica Pro-Farmacopéia (134) exige ausência de Escherichia coli/g, e outras diferentemente daquele de Lenoble e colaboradores (110), que apresenta limite para as primeiras (5×10^4 /g) superior àquele sugerido para medicamentos não estéreis de uso oral (10^2 /g (mL)) (47,151), o que pode ser em função de se tratar de produtos naturais. Apesar dessa tolerância, recomenda ausência de Salmonella sp. em 1 g, além de pesquisar, simultaneamente, 3 indicadores de contaminação fecal: Escherichia coli, estreptococos fecais e Clostridium perfringens.

A proposta da Nota Técnica nº 190 (134) apresenta, estranhamente, exigência com relação à ausência de Pseudomonas aeruginosa e Staphylococcus aureus apesar da via de administração estar subentendida. O mesmo se verifica nas exigências da Farmacopéia Brasileira IV (70) para "produtos farmacêuticos não estéreis e matérias-primas de uso direto em sua fabricação", pois mesmo quando se trata de produtos de uso oral "sólidos e fluidos" recomenda a pesquisa destes microorganismos, além de Escherichia coli, de Salmonella sp. e de outros. Portanto, segue a tendência norte-americana (USP XXII) (208), que requer os testes para ausência das mesmas bactérias. No entanto, como requisito adicional, no caso de produto administrado via oral, exige a ausência de Bacillus cereus, Enterobacter sp., Candida albicans, Aspergillus flavus e Aspergillus parasiticus (Tabela XXII) (pg. 114), demonstrando preocupação semelhante àquela para com alimentos.

Com relação à Farmacopéia Britânica (34), as exigências quanto à ausência de patogênicos específicos são as mesmas que da Farmacopéia Americana (208), complementadas pela ausência de enterobactérias e de outros microorganismos Gram-negativos.

Portanto, há diferentes implicações quando do confronto dos da dos encontrados neste trabalho em relação aos padrões.

Considerando os itens analisados nesta amostragem de fitoterápicos brasileiros, sem se preocupar em atender todos os requisitos especificados em diferentes níveis de exigência anteriormente comentados, a frequência de aprovação variou de 29,8 a 94,0% (Tabela XXIII) (pg. 120), tendo sido a norma da SISF a mais rígida de todas. Este resultado permite concluir que a maior tolerância do padrão reside na não exigência da contagem total de saprófitas (bactérias e fungos). Por sua vez, à medida que a tolerância neste aspecto é decrescente, o índice de aprovação diminui. É por isto que pela USP XXII a rejeição foi baixa. Constatase, ainda, que tanto a Farmacopéia Brasileira IV (70) quanto o padrão sueco e aquele da Farmacopéia Britânica (34) apresentam as mesmas percentagens de aprovação, apesar do sueco ser aparentemente mais rígido (Tabela XXII) (pg. 114).

É interessante observar, ainda, que em relação a todos os padrões estudados, o resultado analítico foi melhor para comprimido, seguido de cápsula e pó (Tabela XXIII) (pg. 120), sendo que os padrões mais rígidos rejeitaram todos ou quase todos os lotes, o que é coerente com a má qualidade verificada nestas amostras.

Tomando-se por base padrões com níveis de tolerância extremos em função do tipo de produto a que se destinam como, por exemplo, aquele da FIP (47) e os 2 destinados a espécies vegetais (110,134), verifica-se que o primeiro é mais adequado, quanto aos limites para microorganismos viáveis totais e específicos, podendo ser aplicado aos produtos fitoterápicos, com a ressalva de se pesquisarem as espécies microbianas diretamente relacionadas à via de administração. Contrariamente, as normas para plantas medicinais (134) e para espécies destinadas à infusão (110) não parecem ser suficientemente rígidas para garantir o nível adequado de qualidade, tendo

TABELA XXIII - Índice de aprovação (%) de medicamentos fitoterápicos segundo diferentes padrões microbianos

		USP XXI	NOTA TÉCNICA PRÓ- FARMACÓPEIA Nº 190	LENORLE	SUÉCIA	F.B. IV	BP 1988	IAGLIAPIETRA	FIP	TCHECO- ESLOVÁQUIA	LABORATÓRIO NACIONAL DE SAÚDE DA FRANÇA	SISF
84 AMOSTRAS		94,0	78,6	65,5	52,4	52,4	52,4	40,5	40,5	34,5	32,1	29,8
		(79)	(66)	(55)	(44)	(44)	(44)	(34)	(34)	(29)	(27)	(25)
15 AMOSTRAS APROVADAS QUANTO AO ASPECTO DE APRESENTAÇÃO COMERCIAL		100,0	86,7	80,0	53,3	53,3	53,3	46,7	46,7	26,7	46,7	40,0
		(15)	(13)	(12)	(8)	(8)	(8)	(7)	(7)	(4)	(7)	(6)
FORMA FARMACÊUTICA	COMPRIMIDOS	100,0	85,7	81,0	66,7	66,7	66,7	52,4	52,4	57,1	38,1	60,0
	(21)	(21)	(18)	(17)	(14)	(14)	(14)	(11)	(11)	(12)	(8)	(9)
	CÁPSULAS	93,8	83,3	68,8	52,1	52,1	52,1	50,0	45,8	35,4	37,5	33,3
	(48)	(45)	(40)	(33)	(25)	(25)	(25)	(24)	(22)	(17)	(18)	(16)
	PÓS	86,7	53,3	33,3	33,3	33,3	33,3	13,3	6,7	-	6,7	-
	(15)	(13)	(8)	(5)	(5)	(5)	(5)	(2)	(1)	(0)	(1)	(0)

em vista tratar-se de produtos com forma farmacêutica definida, devendo, pelo menos, tender a igualar-se àquele de outros medicamentos não estéreis.

Além disso, considerando a via oral de administração o padrão da Nota Técnica Pro-Farmacopéia nº 190 (134) apresenta falha no que se refere à omissão do requisito para salmonelas, além de ser tolerante demais com relação à carga bacteriana e fúngica. No caso da norma proposta por Lenoble e colaboradores (110), a maior tolerância referente ao nível de contaminação bacteriana leva em consideração o preparo do infuso antes do seu consumo.

Desta forma, ao se confrontar os dados encontrados em amostras brasileiras (Tabelas, XVII, XVIII, XIX, XX, XXI) (pg. 66,67,68,69,70) com estas três normas microbiológicas (Tabela XXII) (pg. 114), verifica-se resultado discrepante em relação aos padrões da Nota Técnica nº 190 (134) e da FIP (47), pois 66 (78,6%) e 34 (40,5%) lotes preencheram, respectivamente, estas exigências.

Esta frequência de aprovação é preocupante, uma vez que muitas amostras são aprovadas apesar de estarem com carga bacteriana ou fúngica acima de 10^4 /g. Consequentemente produtos com qualidade muito aquém daquela desejável para medicamentos não estéreis serão colocados à disposição do consumidor.

Além disso, entre os lotes rejeitados pelos 2 padrões estão envolvidas 6 e 11 espécies vegetais, respectivamente, para o menos e o mais rígido. Desta forma fica evidente que o padrão mais tolerante pode mascarar a qualidade variável de amostras contendo o mesmo insumo fitoterápico, apesar das diferenças de produtores, forma farmacêutica e, até mesmo, entre lotes distintos de um mesmo produto.

Ao se confrontar os resultados analíticos das 15 amostras que atenderam às exigências legais quanto à apresentação comercial com todos os padrões de pureza microbiana arrolados (Tabela XXII) (pg. 114), quadro

semelhante àquele apresentado pelo total da amostragem é verificado (Tabela XXIII) (pg. 120), sendo que, neste caso o percentual de aprovação está entre 40 e 100%.

Feitas as devidas ressalvas quanto ao número reduzido de amostras analisadas no caso de certos produtores, na comparação entre os 20 abrangidos por esta amostragem constata-se que o produtor A apresenta todos os lotes em concordância com a legislação sanitária vigente (24,25) (Tabela I) (pg. 51), além de que a pureza microbiológica está satisfatória em seus produtos, exceto naquele contendo guaraná. Porém, conforme comentado anteriormente, amostras de outros fabricantes contendo esta droga apresentaram má qualidade. Portanto, nota-se que o produtor A atua no mercado farmacêutico nacional obedecendo aos requisitos de qualidade desejável o que não acontece com os demais produtores.

Apesar da amostragem limitada, pode-se tecer algumas considerações sobre os produtores M e O, que igualmente apresentaram interesse quanto à obediência à legislação (Tabela I) (pg. 51). Para o produtor M não houve coerência entre aspecto de apresentação comercial adequada e a qualidade microbiana, uma vez que os níveis de contaminantes viáveis foi da ordem de 10^3 /g (Tabela XXI) (pg. 70), o que é preocupante com relação à carga fúngica. Já o produtor O revelou qualidade desejável em ambos os aspectos (Tabelas I e XXI) (pg. 51 e 70).

Dos outros 2 produtores (C e K), cujas amostras estão em acordo com as exigências legais (Tabela I) (pg. 51), estas apresentaram diferentes dados frente à contaminação microbiológica (Tabela XXI) (pg. 70). Os 5 lotes de C, correspondendo a guaraná (4) e boldo (1) apresentaram contagem bacteriana superior a 10^4 /g, com alguns deles contendo altos níveis de fungos. Portanto, a má qualidade foi constante para estes produtos. Já, o produtor K com 3 lotes amostrados (1 de alcachofra e 2 de guaraná) demonstrou ausência de padrão de qualidade, mesmo no que se refere à obediên

cia à legislação para comercialização, visto que 1 dos lotes de guaraná estava em desacordo (Tabela I) (pg. 51). Diferentemente de outros produtores, este apresentou, para ambos os lotes contendo esta droga, qualidade adequada, apesar de o mesmo não se ter verificado para alcachofra, cujas cargas bacteriana e fúngica superaram, respectivamente, 10^4 e 10^2 por grama.

Com relação aos demais produtores que aparentemente atuam neste mercado com maior fatia (B,L,G), apesar de terem sido verificados alguns lotes com qualidade microbiológica melhor, a maioria não estava satisfatória, tendo predominado níveis microbianos quase sempre altos (Tabelas XVIII, XIX, XX) (pg. 67,68,69). Para o produtor G é fácil a distinção do nível de qualidade de produtos contendo guaraná e levedura de cerveja, sendo claramente melhor no segundo caso, comprovando, mais uma vez, a ausência de uniformidade e de padrão de qualidade para um mesmo produtor.

O quadro delineado para os fitoterápicos através de resultados encontrados em produtos amostrados neste trabalho representa alerta para o risco a que se sujeita o consumidor destas especialidades farmacêuticas, pois, conforme já comentado, nem sempre se trata de produção em escala artesanal, o que dá maior significado ao problema da contaminação microbiana. Há necessidade, portanto, de conscientização por parte dos produtores com relação à responsabilidade para com o consumidor.

Com relação à situação brasileira no que tange às especificações farmacopêicas, verifica-se que, das espécies vegetais relacionadas à presente amostragem, apenas algumas constam da Farmacopéia Brasileira, sendo: alcachofra (69,71,152), boldo (71,152), carvão medicinal (69,152), castanha da Índia (71,152), catuaba (152), guaraná (69,71,152), levedura de cerveja (69,71,152) e zedoária (152). Porém, destas, apenas levedura de cerveja, como insumo, apresenta padrão microbiano, na segunda edição (71). Os limites de tolerância para carga bacteriana e fúngica são, respectivamente, $7,5 \times 10^3$ /g e 50/g. Ao confrontá-los com os resultados obtidos

nos lotes correspondentes (Tabelas XVII, XVIII, XIX, XX e XXI) (pg. 66,67, 68,69,70), constatam-se 9 dentre 11 (81,8%) em conformidade com estes requisitos. Porém, se deve fazer adaptação do limite microbiano para a forma farmacêutica, uma vez que ao reportar-se a 1 g de matéria-prima, sabe-se que o conteúdo de insumo ativo presente em 1 unidade farmacêutica (cápsula ou comprimido) é inferior, havendo, portanto, diluição da carga contaminante original do insumo fitoterápico, possivelmente em mistura com excipientes.

A mesma observação aplica-se aos demais padrões microbianos estudados referentes a plantas medicinais e drogas para infuso (Tabela XXII) (pg. 114).

Considerando a situação brasileira, tanto pela ampla utilização de drogas da medicina popular, assim como pela inexistência de requisitos microbianos específicos em monografias farmacopêicas de drogas vegetais, defronta-se com resultado desta ordem, indicando a falta de controle de qualidade por parte do produtor. Impõe-se, assim, a necessidade de atualização das monografias com a inclusão das drogas mais utilizadas e das especialidades fitoterápicas correspondentes, bem como a especificação de normas microbiológicas, a exemplo do que ocorre em outros países (34,208).

O programa da Central de Medicamentos (CEME) para a pesquisa de plantas medicinais selecionou, em 1986, 36 espécies vegetais, oficiais ou não, a fim de serem estudadas, com base científica. Isto permitirá a implantação da terapêutica alternativa e complementar, visando favorecer a faixa carente da população, de forma a integrar, futuramente, a Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME). Como o período de aquisição das amostras para este estudo foi imediatamente posterior ao programa da CEME, dentre as 17 espécies botânicas integrantes desta amostragem, apenas con-frei e espinheira santa fazem parte do "primeiro elenco" de plantas selecionadas (26).

Verifica-se, portanto, que a maioria das drogas da presente amostragem não consta da lista com possibilidade de inclusão na RENAME, o que contrasta com a sua ampla comercialização. Entretanto, futuramente poderá ocorrer mudanças neste panorama.

O direcionamento para a terapêutica à base de plantas cientificamente reconhecidas como medicinais representa o início do uso correto das especialidades fitoterápicas. Assim, a inclusão de drogas vegetais na RENAME implicará no reconhecimento, a nível nacional, de sua importância na terapêutica e com isto impondo a necessidade do controle de qualidade dos fitoterápicos dentro dos padrões exigidos para medicamentos não esteréreis.

Ainda, considerando as especialidades fitoterápicas, o estabelecimento do padrão microbiano deve ter como base 2 aspectos: as características originais inerentes à droga vegetal em questão, fornecendo qualidades próprias a essa classe de produtos farmacêuticos, bem como o nível de qualidade desejável para medicamentos, visando a eficácia terapêutica com segurança do paciente.

Tanto o produtor de insumos fitoterápicos, como o seu consumidor que participa na sua transformação para medicamentos deve efetuar levantamentos da qualidade cujo histórico servirá como ponto de partida para sua adequação às características farmacêuticas.

Alguns comentários podem ser feitos diante dos dados experimentais obtidos, bem como daqueles verificados por outros autores para drogas vegetais, além dos diversos padrões encontrados na literatura (Tabela XXII) (pg. 114). A preocupação com a qualidade microbiológica destes produtos deve englobar não somente a ausência de microorganismos específicos, como também a determinação de contaminantes saprófitas totais, visando a idoneidade do produto. Para isto, os níveis de tolerância estipulados pela FIP (47) e pelo Laboratório Nacional de Saúde da França (151) para as cargas

bacteriana e fúngica parecem adequados, já que o limite ^{de} 10^4 bactérias por grama e de 10^2 fungos por grama está levando em consideração a origem vegetal do insumo, bem como a manutenção da qualidade desejável para medicamentos não estéreis. O limite de carga fúngica recomendado também por outras normas (60,191), considera a necessidade de se evitar espécies tóxicas, cuja probabilidade de ocorrência passa a existir quando o nível destes contaminantes ultrapassa tais valores.

A pesquisa de Escherichia coli e Salmonella sp. é indispensável, em função da via de administração a que se destinam estes produtos, a fim de controlar, inclusive, a introdução das mesmas durante sucessivas manipulações.

O limite de 10^2 /g enterobactérias, exceto Escherichia coli, conforme a proposta da FIP (47) parece igualmente adequado, tendo em vista que padrões menos rígidos se aplicam a espécies vegetais destinadas à infusão (11).

Em adição às exigências do padrão FIP, a pesquisa da presença simultânea de estreptococos fecais e clostrídios sulfito-redutores será desejável com o objetivo de se descartar a possibilidade de contaminação fecal remota. Especificamente, com relação a clostrídios, sua pesquisa seria recomendável nos casos em que o processo de manipulação necessariamente envolve o tratamento térmico, durante o qual as células vegetativas de Escherichia coli e estreptococos poderiam ser destruídas, mas permanecem os esporos do primeiro, e assim poderiam indicar se houve ou não contaminação fecal.

Na pesquisa de bolores, certas espécies são indesejáveis, em função da produção de micotoxinas. Desta forma, a ausência de Aspergillus flavus, usualmente encontrada em drogas vegetais (150,171), deveria ser indicada à semelhança da exigência da Farm.Bras.IV (70). Todas estas exigên

cias para espécies patogênicas específicas devem levar em consideração, se melhantemente aos métodos farmacopêicos mais recentes (USP XXII, 1990; Farm. Bras. IV, 1988; BP, 1988), a tomada de ensaio de 10g, por ser mais represen-
tativa do que aquela recomendada em outros padrões microbianos, porém, a
tomada de 1g pode ser admitida quando o nível de tolerância é maior em fun-
ção do risco de ocorrência. Sugere-se, portanto, o seguinte limite micro-
biano como proposta:

- bactérias aeróbias mesófilas: $\leq 10^4$ /g (mL)
- fungos: $\leq 10^2$ /g (mL)
- Escherichia coli: ausência em 10g (mL)
- Salmonella sp.: ausência em 10g (mL)
- Streptococcus faecalis: ausência em 1g, para insumos consti-
tuídos de órgãos subterrâneos
- Clostrídios sulfito-redutores: ausência em 1g, para insumos
constituídos de órgãos subter-
râneos e em produtos envolven-
do tratamento térmico durante
a manufatura
- Aspergillus flavus: ausência em 10g (mL), para insumos cons-
tituídos de semente

Tendo admitido a implantação de padrão de qualidade para fitote-
rápicos, incluindo a microbiana, ainda que a caráter provisório, medidas
mais sérias devem ser tomadas pela fiscalização, a fim de que os fabrican-
tes destes produtos se enquadrem às normas gerais impostas para produção e
comercialização de medicamentos não estéreis de uso oral. Novas propostas
poderão ser adotadas, fundamentadas em experiências anteriores, cujo nível
de exigência tenha sido gradativamente ajustado até o ideal.

Desta forma, o seu estabelecimento será fundamental para o enquadramento dos produtores ao conceito de controle de qualidade abrangente, desde a certificação da identidade botânica, a análise quali e quantitativa dos princípios ativos, bem como a qualidade sanitária das especialidades farmacêuticas fitoterápicas. O respaldo na legislação é fundamental, a fim de garantir a devida aplicação de normas de qualidade. Estas não constituem simplesmente valores numéricos estanques, mas pontos de referência que visam orientar os produtores na melhoria da qualidade, indispensável à segurança do consumidor. Além disso, considerando o consumo em grande escala, quase sempre por auto-medicação e os problemas verificados no passado com a contaminação de medicamentos não estéreis de uso oral, é inadmissível o descaso atribuído, atualmente, a esta gama de medicamentos.

7. CONCLUSÕES

- 7.1 Os medicamentos fitoterápicos analisados estão no mercado farmacêutico nacional apesar de a grande maioria estar em desacordo com a legislação pertinente, quanto aos requisitos de apresentação comercial, uma vez que apenas 17,9% das amostras atendem a tais exigências.
- 7.2 Não há consenso por parte dos produtores de especialidades fitoterápicas quanto ao enquadramento das mesmas como medicamentos alopáticos, homeopáticos, produtos dietéticos ou ainda como alimentos.
- 7.3 A lei de vigilância sanitária de medicamentos deve incluir, explicitamente, os fitoterápicos como medicamentos alopáticos, cuja comercialização deve ser submetida à fiscalização como tal.
- 7.4 Dentre as formas farmacêuticas sólidas amostradas no comércio da cidade de São Paulo houve predominância de cápsulas, seguida de comprimidos e pós.
- 7.5 Os medicamentos fitoterápicos constituídos de drogas vegetais apresentam qualidade microbiana inferior em relação àqueles contendo drogas derivadas.
- 7.6 Há estreita relação entre a carga bacteriana aeróbia mesófila e de esporos de bactérias aeróbias mesófilas.
- 7.7 A contaminação fúngica, nem sempre apresentando relação direta com a carga contaminante bacteriana, compromete menor percentagem de amostras.

- 7.8 A qualidade sanitária inadequada de alguns produtos fitoterápicos indicou presença simultânea de Escherichia coli e de Salmonella sp., ao lado de altas cargas de contaminantes saprófitas.
- 7.9 Os dados analíticos relacionados aos fitoterápicos de produtores de onde foi possível amostragem mais representativa indicam que não há controle de qualidade.
- 7.10 Os dados analíticos dos fitoterápicos amostrados, sob o ponto de vista sanitário, quando confrontados ao padrão microbiano da FIP, indicam situação preocupante, pois 59,5% das amostras são rejeitadas.
- 7.11 A incidência de carga contaminante viável total elevada ocorreu em amostras de pó, seguida de cápsulas e comprimidos, independentemente da origem botânica envolvida.
- 7.12 Há necessidade imperiosa de implantação de padrão microbiano nacional para medicamentos fitoterápicos, ainda que como proposta, a fim de que gradativa e progressivamente venha a constituir os limites de tolerância a serem obedecidos pelos produtores.
- 7.13 Pela análise crítica dos diversos padrões microbianos, aquele da FIP, com algumas adaptações, pode ser sugerido como proposta inicial aplicável aos medicamentos fitoterápicos nacionais.

8. RESUMO

Foram analisados 84 lotes de especialidades fitoterápicas de uso oral, na forma de cápsula, comprimido e pó, contendo 17 drogas vegetais, produzidas por 20 fabricantes e comercializadas em farmácias, drogarias, lojas de produtos naturais e supermercados da cidade de São Paulo. O confronto da apresentação comercial das mesmas em relação à legislação nacional, indicou que a minoria (15/84) atendeu a tais exigências, além de ter demonstrado total falta de padronização de qualidade pelos produtores, inclusive com ausência de definição e conceituação, enquadrando-as indistintamente como medicamentos alopáticos, homeopáticos, produtos dietéticos ou alimentos. Efetuou-se a quantificação de bactérias aeróbias mesófilas (forma vegetativa e esporulada) e de fungos (bolores e leveduras), através da técnica de tubos múltiplos, bem como a pesquisa de Escherichia coli e Salmonella sp. pela metodologia oficial internacional. A contaminação fúngica, predominantemente de bolores, foi inferior em relação à bacteriana aeróbia mesófila, pois o máximo detectado para aquela foi de $4,6 \times 10^5$, enquanto que para esta $5,1 \times 10^9$ /g. A incidência fúngica com carga maior ou igual a 10^2 /g foi de 34,5%, contra 53,6% da carga bacteriana vegetativa com 10^4 /g ou mais e 45,2% da bacteriana esporulada, com o mesmo nível. A determinação do Número Mais Provável de Escherichia coli indicou incidência de 6,0% com a carga maior igual a $1,5 \times 10^2$ /g. Houve estreita relação entre a carga bacteriana vegetativa total e o número de esporos, assim como a presença de patogênicos específicos em produtos altamente contaminados. Amostras sob a forma de pó foram as mais afetadas, seguidas de cápsulas e comprimidos. Pelo confronto dos dados encontrados, com os diversos padrões microbianos aplicados para medicamentos não estéreis de uso oral, para insumos e produtos fitoterápicos, o índice de aprovação variou de 29,8 a 94,0%. Mesmo frente ao padrão da FIP, a rejeição das especialidades fitoterápicas analisadas foi da ordem de 59,5%. Em vista da qualidade sanitária de muitos destes produtos ser imprópria para o consumo,

e após análise crítica dos vários padrões microbianos, discutiu-se a necessidade de implantação de especificações nacionais, ainda que a caráter provisório, sugerindo-se limites de tolerância para medicamentos fitoterápicos de uso oral.

9. SUMMARY

84 samples of phytotherapeutic products of oral solid dosage forms (capsules, tablets and powders) containing 17 different crude drugs and produced by 20 laboratories, marketed in drugstores, herborist's and supermarkets at São Paulo-Brazil were analysed with regard to legal marketing requirements, only 15 samples were in accordance. A complete lack of quality standard was attributed to the manufacturers, including indefiniton as to the classification of products among allopathic or homeopathic pharmaceuticals or foods or dietetics. The total aerobic bacterial (vegetative and sporulated forms) and fungal (moulds and yeasts) contents were determined by multiple tube technique; moreover tests were carried out for Escherichia coli and Salmonella sp. by official international methods. The fungal contamination was predominantly of moulds and lower than the aerobic bacterial one. The maximum counts were $4,6 \times 10^5$ and $5,1 \times 10^9$ /g, respectively, for fungi and bacteria. The frequency of samples with or more than 10^2 fungi/g was 34,5% that for vegetative and sporulated bacterial counts with or more than 10^4 /g was respectively, 53,6 and 45,2%. The incidence of Escherichia coli was about 6,0% with the highest level at $1,5 \times 10^2$ /g. There was a tight relation between the vegetative and sporulated bacterial counts as well as the presence of specific pathogenic microorganisms in highly contaminated samples. The highest contamination occurred in powders followed by capsules and tablets. Comparing our experimental data with the corresponding microbial standards for oral non sterile pharmaceuticals, crude drugs and phytotherapeutic products, the index of approval varied between 29,8 and 94,0%. Even by FIP's standards 59,5% of the phytotherapeutic specialties analysed had to be rejected. As many of these products showed innadequate sanitary quality for consumption, coupled to a critical analysis of the different microbial standards, the discussion was raised about the necessity of establishing national specifications, even if provisional. Suggestions are made as to the contamination limits of oral phytotherapeutic pharmaceuticals.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS *

- 1 - AKERELE, O. Medicinal plants and primary health care: an agenda of action. Fitoterapia, Milano, v. 59, n. 5, p. 355-363, 1988.
- 2 - AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. Standards methods for the examination of water and wastewater. 13. ed. Washington: American Water Works Association and Water Pollution Control Federation, 1971.
- 3 - AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. Technical Committee on Microbiological Methods for Foods. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 2. ed., Washington, 1984.
- 4 - ANTICO, G., GUJGGI, A., MAZZOLDI, G., PARAVIDINO, C., VIANELLO, G. S. Norme di Buena Fabbricazione. Boll.Chim.Farm., Milano, v. 114, n. 4, p. 190-200, 1975.
- 5 - ARRIBAS, M. L. G., JORGE, M. C. R., ROMEO, M. A. M. Caractérisation et sensibilité aux antibactériens des souches de coques à gram positif isolées à partir de médicaments solides administrés par voie orale. J.Pharm.Belg., Bruxelles, v.38, n.3, p.140-146, 1983.
- 6 - ARRIBAS, M. L. G., DE LA ROSA, M. C., MOSSO, L. A. Caractérisation des souches de Bacillus isolées à partir de médicaments solides administrés par voie orale. Pharm.ActaHelv., Zurich, v. 61, n. 10-11, p. 303-307, 1986.

* De acordo com a norma NBR 6023/89, preconizada pela ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). As abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE SOURCE INDEX (CASSI), 1990.

- 7 - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official methods of analysis, 14. ed., Arlington, 1984.
- 8 - AURELI, P., PASOLINI, D. Requisiti microbiologici dei farmaci non obbligatoriamente sterili. Boll.Chim.Farm., Milano, v. 124, p. 229-243, 1985.
- 9 - AURELI, P., FENICIA, L., SALVATORE, G. Microorganismi e piante aromatiche; riflessi nell'impiego alimentare, cosmético e farmaceutico. Boll.Chim.Farm., Milano, v. 127, n. 5, p. 124-127, 1988.
- 10 - AYLIFFE, G. A. J., BARRY, D. R., LOWBURY, E. J. L., ROPER-HALL, M. J., WALKER, W. M. Postoperative infection with Pseudomonas aeruginosa in an eye hospital. Lancet, London, v. 1, n. 7447, p. 1113-1117, 1966.
- 11 - AYLIFFE, G. A. J., BARROWCLIFF, D. F., LOWBURY, E. J. L. Contamination of disinfectants. Br.Med.J., London, v. 1, n. 5639, p. 505, 1969.
- 12 - BAIRD, R. M. Microbiological control of pharmaceuticals. Pharm.Int., Amsterdam, v. 7, p. 255-258, 1986.
- 13 - BARZAGHI, D., BONOMI, E., CAFIERO, M., CARAZZONE, M., GENOVA, R., GIGLIOLI, N., NERI, G., VERONESE, M. Comparison of three bacterial count methods between laboratories. Boll.Chim.Farm., Milano, v. 119, n. 5, p. 309-313, 1980.
- 14 - BARZAGHI, D., BELLA, G., BIANCO, L., BIZZARRI, D., BURINATO, C., CARAZZONE, M. Ricerca dei clostridi solfitoreducitori in materie prime per uso farmaceutico. Boll.Chim.Farm., Milano, v. 120, n.9, p. 528-536, 1981.

- 15 - BASSET, D. C. J., STOKES, K. J., THOMAS, W. R. G. Wound infection with Pseudomonas multivorans. Lancet, London, v. 1, n. 7658, p. 1188-1191, 1970.

- 16 - BÉZANGER-BEAUQUESNE, L. Nouveautés en phytothérapie-cinquième revue. Plantes Méd. Phyto., Angers, v. 22, n. 1, p. 40-80, 1988.

- 17 - BICANOVA, M., THINSCHMIDT, G., MESKOVA, M. Fructus foeniculi and "Detsky caj's Hermankem". (Children's tea with chamomile from the microbiological aspect). Farm.Obz., 55 (Apr): 165-166, 1986. Apud: Int.Pharm.Abstr., Washington, v. 24, n. 7, p. 2404258, 1987.

- 18 - BISSON, J. W., CABELLI, V. J. Clostridium perfringens as a water pollution indicator. J.Wat.Poll.Contr., Washington, v. 52, n. 2, p. 241-248, 1980.

- 19 - BONILHA, P. R. M. Microorganismos indicadores de contaminação fecal e enteropatogênicos em hortaliças e suas águas de irrigação. 1986. [Dissertação de mestrado, São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas - U.S.P.]

- 20 - BONOMI, E., NEGRETTI, F. Ricerche sul contenuto microbico di materie prime impiegate nelle preparazioni farmaceutiche. Ann.Inst.Super. Sanità, Roma, v. 13, n. 4, p. 805-832, 1977.

- 21 - BOS, C. E., VAN, D. H., LERK, C. F. Microbiological stability of tablets stored under tropical conditions. Int.J.Pharm., Amsterdam, v. 55, n. 2-3, p. 175-183, 1989.

- 22 - BOTTERELL, E. H., MAGNER, D. Meningitis due to Ps.pyocyanea penetrating wounds of the head. Lancet, London, v. 1, n. 6335, p.112-115, 1945.

- 23 - BOWMAN, F. W., WHITE, M., LYLES, R. L. Microbial contamination of nonsterile antibiotic. Market samples: a survey. J.Pharm.Sci., Washington, n. 60, v. 7, p. 1099-1101, 1971.
- 24 - BRASIL. Leis, Decretos, etc. Decreto nº 79.094, de 5 de janeiro de 1977. Regulamenta a lei nº 6.360, de 23 de setembro de 1976, que submete a sistema de vigilância sanitária os medicamentos, insumos farmacêuticos, drogas, correlatos, cosméticos, produtos de higiene, saneantes e outros. Coleção de Leis e Decretos Federais, Brasília: Imprensa Nacional, 1977, v. 2, p. 16-68.
- 25 - BRASIL. Leis, Decretos, etc. Decreto nº 83.239, de 6 de março de 1979. Altera o decreto de 5 de janeiro de 1977, que regulamenta a lei nº 6.360, de 23 de setembro de 1976. Coleção de Leis e Decretos Federais. Brasília: Imprensa Nacional, 1979, v. 2, p. 172-173.
- 26 - BRASIL. Ministério da Saúde. Central de Medicamentos (CEME). Programa de Pesquisas de plantas medicinais: conjunto de plantas selecionadas. 1º e 2º elencos. s.d.
- 27 - BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária. Divisão Nacional de Vigilância Sanitária de Alimentos. Portaria nº 9 de 8 de março de 1985. Diário Oficial, Brasília, Seção 1, v. 49, p. 4420-4421, 13 fev. 1985.
- 28 - BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária. Divisão Nacional de Vigilância Sanitária de Alimentos. Portaria nº 1 de 28 de janeiro de 1987. Diário Oficial, Brasília, Seção 1, v. 125, p. 2197-2200, 12 fev. 1987.

- 29 - BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária de Alimentos. Retificação na Portaria nº 001 de 28 de janeiro de 1987, publicada no D.O.U. nº 29 de 12 de fevereiro de 1987, Seção I pág. 2198, anexo II ítem III. Diário Oficial, Brasília, Seção 1, v. 125, n. 38, p. 2764, 25 fev. 1987.
- 30 - BRITISH pharmacopoeia. London: General Medical Council, 1932.
- 31 - BRITISH pharmacopoeia. London: The Pharmaceutical Press, 1953.
- 32 - BRITISH pharmacopoeia. London: Her Majesty's Stationery Office, 1973.
- 33 - BRITISH pharmacopoeia. London: Her Majesty's Stationery Office, 1980.
- 34 - BRITISH pharmacopoeia. London: Her Majesty's Stationery Office, 1988.
- 35 - BRUCH, C. W. Possible modifications of USP microbial limits and tests. Drug Cosmet.Ind., New York, v. 110, n. 6, p. 32-37, 116-121, 1972.
- 36 - BRUCH, C. W. Objectionable micro-organisms in non-sterile drugs and cosmetics. Drug Cosmet.Ind., New York, v. 111, n. 4, p. 51-54, 150-156, 1972.
- 37 - BÜHLMANN, X. Method for microbiological testing of nonsterile pharmaceuticals. Appl.Microbiol., Baltimore, v. 16, n. 12, p. 1919-1923, 1968.
- 38 - BÜHLMANN, V. X., GAY, M., HAUERT, W., HECKER., W. SACKMANN, W. SCHILLER, I. Prüfung pharmazeutischer Hilfsstoffen auf mikrobielle kontamination. Pharm.Ind. Aulendorf, v. 34, n. 8, p. 562-566, 1972.

- 39 - BÜHLMANN, X., HESS, H. Mikrobiologische Reinheit von Arzneimitteln, die nicht steril sein müssen (gemeinsamer Bericht des Komitees Offizieller Laboratorien und Dienststellen zur Prüfung von Medikamenten und der Sektion Industrieapotheker der FIP), Pharm. Ind., Aulendorf, v. 34, n. 11a, p. 881-941, 1972.
- 40 - BUOGO, A., RATTI, L. Methods for the microbiological control of non sterile drugs. Farmaco Ed. Prat., Pavia, v. 27, n. 9, p. 523-531, 1972.
- 41 - BUOGO, A., GUERRATO, G., GIULIONI, A., PAPA KRISTO, G. Aspetti microbiologici dell'ambiente farmaceutico. Boll. Chim. Farm., Milano, v. 118, n. 1, p. 9-17, 1979.
- 42 - BURDON, D. W., WHITEBY, J. L. Contamination of hospital disinfectants with Pseudomonas species. Br. Med. J., London, v. 2, n. 5545, p. 153-155, 1967.
- 43 - CALDERA, P. G. Problemi e prospettive della sterilizzazione con raggi gamma di prodotti farmaceutici. Boll. Chim. Farm., Milano, v. 114, n. 4, p. 185-189, 1975.
- 44 - CASAMADA, R. S. M. Tratado de Farmacognosia. Madrid: Editorial Científico-Médica, 1977.
- 45 - ČESKOSLOVENSKÝ LECOPIS, 2 vyd (1954). Czechoslovakian Pharmacopoeia. 2. ed. Prague, p. XVII. Apud: WORLD HEALTH ORGANIZATION. Microbiological Contamination of nonsterile drugs. WHO/PHARM/69453. 10 p. [Mimeogr.]

- 46 - CHILE. Ministério de Salud. Instituto de Salud Publica de Chile.
Compendio de aspectos teórico prácticos en el manejo de areas de contaminación controlada. Santiago de Chile: Editorial Universitaria, 1984.
- 47 - COMMITTEE OF OFFICIAL LABORATORIES AND DRUG CONTROL SERVICES. Section of Industrial Pharmacists-FIP. Microbiological purity of non-compulsory sterile pharmaceutical preparations: methods of examination. Pharm.Acta Helv., Zurich, v. 51, n. 3, p. 33-40, 1976.
- 48 - COOKE, E. M., SHOOTER, R. A., O'FARREL, S. M., MARTIN, D. R. Faecal carriage of Pseudomonas aeruginosa by newborn babies. Lancet, London, v. 2, n. 7682, p. 1045-1046, 1970.
- 49 - CORTEZ, Y., PERSONNÉ, J. C., ESTÈVE, G. Étude comparative de la contamination de plantes médicinales. Plantes Méd.Phytother., Angers, v. 20, n. 3, p. 236-250, 1986.
- 50 - COSTA, A. F. Farmacognosia. 2. ed. Lisboa: Calouste Gulbenkian, 1982, v. 3, p. 927.
- 51 - COSTA, A. F. Farmacognosia. 3. ed. Lisboa: Calouste Gulbenkian, 1987, v. 2, p. 748.
- 52 - DEPARTMENT OF HEALTH EDUCATION AND WELFARE. Bacteriological analytical manual. 5.ed. Washington: Division of Microbiology, Food and Drug Administration, 1978.
- 53 - DESVIGNES, A., SÉBASTIEN, E., BERNARD, J., CAMPION, G. Étude de la contamination microbienne de diverses préparations pharmaceutiques. Ann.Pharm.Fr., Paris, v. 31, n. 2, p. 775-785, 1983.

- 54 - DEVLEESCHOUWER, M. J., DONY, J. Flore microbienne des médicaments. Données écologiques et sensibilité aux antibiotiques - 1^{ère} partie: Formes magistrales sèches. J.Pharm.Belg., Bruxelles, v. 34, n.4, p. 189-203, 1979.
- 55 - DEVLEESCHOUWER, M. J., DONY, J. Normes microbiologiques des drogues d'origine végétale et leurs mélanges. J.Pharm.Belg., Bruxelles, v. 34, n. 5, p. 260-266, 1979.
- 56 - DEVLEESCHOUWER, M. J., AKIN, A., DONY, J. Flore microbienne des médicaments. Données écologiques et sensibilité aux antibiotiques. 2e. partie: Forme magistrale liquide. J.Pharm.Belg., Bruxelles, v. 35, n. 4, p. 266-272, 1980.
- 57 - DICTIONNAIRE Encyclopedic Larousse. Paris: Librairie Larousse, 1972.
- 58 - DICTIONARY of Scientific and Technical Terms. 2.ed. New York: Mc. Graw-Hill, 1978, p. 491.
- 59 - DIDING, N., WERGEMAN, L., SAMUELSSON, G. Ethylene oxide treatment Part I. Introduction and bacteriological results. Acta Pharm. Suec., Stockholm, v. 5, n. 3, p. 177-182, 1968.
- 60 - DOCUMENTO S.I.S.F. Proposta "Gruppo biologico". "Metodi per il controllo microbiologico de farmaci non sterili". PA/PH Exp. 1 cm/t (75) 1. 12/2/75. Apud: TAGLIAPIETRA, L. La qualità microbiologica nei prodotti farmaceutici non obbligatoriamente sterili. Boll.Chim.Farm., Milano, v. 117, n. 1, p. 1-13, 1978.

- 61 - DONY, J., GÉRARD, P. La contamination microbienne des médicaments et l'établissement de normes de qualité bactériologique. J.Mond.Pharm., La Haye, v. 11, n. 1, p. 19-32, 1968.
- 62 - DONY, J. La qualité microbiologique des médicaments matières-premières et produits terminés. Labo-Pharma.Probl.Tech., Paris, v. 25, n. 262, p. 113-121, 1977.
- 63 - DUKE, J. A. Handbook of medicinal herbs. Boca Raton: CRC, 1985.
- 64 - EIKOFF, T. C. Nosocomial salmonellosis due to carmine. Ann.Intern.Med., Philadelphia, v. 66, n. 4, p. 813-814, 1967.
- 65 - EL SOVOD, S. M. A. Fungal contamination of certain pharmaceutical powders, Indian J.Pharm.Sci., 47 (Nov-Dec): 197-201, 1985. Apud: Int. Pharm.Abstr., Washington, 24, (Jan-Jun): 2404399, 1987.
- 66 - ERNERFELDT, F., KALLINGS, L. -O., RINGERTZ, O., SILVERSTOPE, L. Bacteriological hazards in pharmaceutical manufacturing. Acta Pathol. Microbiol. Scand., Copenhagen, v. 66, n. 2, p. 287, 1966.
- 67 - EVANS, F. T. Infection from spinal analgesia. Lancet, London, v.2, n. 7165, p. 115, 1945.
- 68 - EVANS, J. R., GILDEN, M. M., BRUCH, C. W. Methods for isolating and identifying objectionable gram-negative bacteria and endotoxins from topical products. J.Soc.Cosmet.Chem., Easton, v. 23, n. 9, p. 549-564, 1972.

- 69 - FARMACOPÉIA brasileira. 3 ed. São Paulo: Organização Andrei, 1977.
- 70 - FARMACOPÉIA brasileira. 4 ed. São Paulo: Atheneu, 1988.
- 71 - FARMACOPÉIA dos Estados Unidos do Brasil. 2 ed. São Paulo: Siqueira, 1959.
- 72 - FERREIRA, J. M., FREITAS, Y. M. Microbiological survey of talcum powders and raw materials. Cosmet. Toiletries, Oak Park, v. 91, n. 9, p. 19-26, 1976.
- 73 - FISCHER, A., SMIDT, B. F., ULRICH, K. Microbial content in non-sterile pharmaceuticals IV. Tablets. Dan.Tidsskr.Farm., Copenhagen, v.42, n. 5, p. 125-131, 1968.
- 74 - FRANCE, D. R. Survival of Candida albicans in hand creams. NZ Med.J., Wellington, v. 67, n. 432, p. 552-554, 1968.
- 75 - FRANK, B. Microorganisms in crude drugs: microbiological status of crude drugs and their preparations and its evaluation. Dtsch. Apoth. Ztg., Stuttgart, 129 (Mar30): 617-623, 1989. Apud: Int.Pharm.Abstr., Washington, v. 27, n. 17, p. 2711368, 1990.
- 76 - GALLIEN, R. Mikrobielle kontamination von Fertig-produkten und Rohstoffen-Problematik, Ergebnisse, Schlußfolgerungen. Pharm.Ind., Aulendorf, v. 34, n. 8, p. 929-932, 1972.
- 77 - GASCHEN, M. Hygiène et fabrication de médicaments, Pharm.Acta Helv., Zurich, v. 49, n. 7/8, p. 261-265, 1974.

- 78 - GRAF, V. E., SCHEER, R., SCHÖLLHORN, T. L. Beeinflussung von mikroorganismen durch den tablettiervorgang. Teil 1: Preßverhalten der eingesetzten granulate und eizielle keim reduktionen. Pharm.Ind., Aulendorf, v. 51, n. 2, p. 193-198, 1989.
- 79 - GUPTA, K. G., VYAS, K. K., SEKHON, N. S. Effect of radiation on activity of antibiotics. J.Pharm.Sci., Washington, v. 62, n. 5, p. 841-842, 1973.
- 80 - GYÖRGY, K. Újabb Mikrobiológiai Szempontok a gyógyszer technológiában. Gyógyszerészet, Budapest, v. 18, n. 4, p. 121-125, 1974.
- 81 - HARDY, P. C., EDERER, G. M., MATSEN, J. M. Contamination of commercially packaged urinary catheter kits with the Pseudomonas EO-1. N.Engl. J.Med., Boston, v. 282, n. 1, p. 33-35, 1970.
- 82 - HÄRTLING, C. Untersuchungen über den mikrobiellen zustand von Laxativen auf pflanzlicher Basis. Pharm.Ztg., Frankfurt, v. 128, n. 19, p. 1006-1008, 1983.
- 83 - HEIN, V. H., MIKLOVICH, M. Untersuchungen über den keimgehalt einiger zur Herstellung von Arzneimitteln benutzter. Roh-und Hilfsstoffe. Pharm.Ind., Aulendorf, v. 38, n. 4, p. 407-411, 1976.
- 84 - HENNING, H. M. Die mikrobiologische Prüfung von "nicht sterilen" pharmazeutischen Präparaten auf keimzahl und keimart. Pharm.Ind., Aulendorf, v. 32, n. 4a, p. 253-259, 1970.
- 85 - HIRSCH, J. I., ANDREW, T. C. JR., RANDALL, E. L. Microbial contamination of oral liquid medications. Am.J.Hosp.Pharm., Washington, v. 26, p. 625-629, 1969.

- 86 - HITOKOTO, H., MOROZUMI, S., WAUKE, T., SAKAI, S., KURATA, H. Fungal contamination and mycotoxin detection of powdered herbal drugs. Appl. Environ. Microbiol., Washington, v. 36, n. 2, p. 252-256, 1978.
- 87 - HOPES, T. M. Quality control of raw materials. Drug. Cosmet. Ind., New York, v. 100, n. 4, p. 46-49 134-138, 1972.
- 88 - IARIA, S. T., FURLANETTO, S. M. P., CAMPOS, M. L. C. Técnicas utilizadas em exercícios práticos. Disciplina de Microbiologia de Alimentos- Curso de Pós Graduação do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1981. [apostila]
- 89 - INFECTION at Birmingham and Midlands Eye Hospital. Br. Med. J., London, v. 2, n. 5473, p. 1316, 1965.
- 90 - INTERNATIONAL pharmacopeia. 2 ed., Geneva, World Health Organization, 1967. p. xxxiv.
- 91 - JAIN, N. K., CHAUHAN, C. S. Microbial contamination in antacid tablets. Indian J. Hosp. Pharm., 15 (5): 137-138, 1978. Apud: Int. Pharm. Abstr., Washington, v. 16, n. 18, p. 164774, 1979.
- 92 - KAGRAMANOVA, K. A., KIVMAN, G. Y. Isolation and identification of microorganisms in nonsterile drugs. Pharm. Chem., New York, v. 15, n. 4, p. 296-300, 1982.
- 93 - KALLINGS, O., RINGERTZ, O., SILVERSTOPE, L., ERNERFELDT, F. Microbiological contamination of medical preparations Acta Pharm. Suec., Stockholm, v. 3, n. 3, p. 219-228, 1966.

- 94 - KAUL, B. L. K., BRADU, B. L. Studies on the induced mutations in medicinal plants I. Spectrum of adult plant mutations in Atropa belladonna. Planta Med., Stuttgart, v. 20, n. 3, p. 205-210, 1971.
- 95 - KEDZIA, B., HOLDERNA, E. Występowanie bakterii tlenowych w grzybów w surowcach zielarskich. Herb.Polon., Póznán, v. 30, n. 1, p. 59-70, 1984.
- 96 - KOBURGER, J. A., MARTH, E. H. Yeasts and Molds. In: AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. Technical Committee on Microbiological Methods for Foods. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 2 ed. Washington, 1984. p. 197-202.
- 97 - KOMARMY, L. E., OXLEY, M. E., BRECHER, G. Hospital-acquired salmonellosis traced to carmine dye capsules. N.Engl.J.Med., Boston, v. 276, n. 15, p. 850-852, 1967.
- 98 - KRAIDMAN, G. The Microbiology of airborne contamination and air sampling. Drug Cosmet.Ind., New York, v. 116, n. 3, p. 40-43, 108-112, 1975.
- 99 - KRUGER, D. Ein Beitrag zum Thema der mikrobiellen kontamination von Wirk-und Hilfstoffen. Pharm.Ind., Aulendorf, v. 35, n. 9, p. 569-577, 1973.
- 100 - KUNSCHER, H., NEKOLA, M. Examination of the sterility of pharmaceutical adjuvants. Sci.Pharm., Vienna, v. 38, p. 122-128, 1970.
- 101 - LAMBIN, S., JANOT, M-M., MAURON, D. Éxamen bactériologique des comprimés pharmaceutiques. Ann.Pharm.Fr., Paris, v. 11, n.8-9, p. 620-637, 1953.

- 102 - LANG, D. J., KUNZ, L. J., MARTIN, A. R., SCHROEDER, S. A., THOMSON, L. A. Carmine as a source of nosocomial salmonellosis. N.Engl.J.Med., Boston, v. 276, n. 15, p. 829-832, 1967.
- 103 - LAROUSSE Médical. Paris: Larousse, 1974.
- 104 - LAST, P. M., HARBISON, P. A., MARSH, J. A. Bacteraemia after urological instrumentation. Lancet, London, v. 1, n. 7428, p. 74-76, 1966.
- 105 - LEITÃO, M. F., ROMEU, A. P., CRUZ, R. R. Coliformes totais e fecais como indicadores de contaminação I - Presença no solo, água e vegetais. Colet.I.T.A.L., Campinas, v. 4, p. 1-11, 1971-72.
- 106 - LEITÃO, M. F., ROMEU, A. P., CRUZ, R. R. Coliformes totais e fecais como indicadores de contaminação II - Avaliação do teste para caracterização de coliformes fecais. Colet.I.T.A.L., Campinas, v. 4, p. 13-21, 1971/72.
- 107 - LEITÃO, M. F. F. Salmonelas em águas fluviais e em alimentos não processados e industrializados de origem animal e vegetal. São Paulo, 1979. [Tese de doutoramento, Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP]
- 108 - LEITE, C. Q. F., RADDI, M. S. G., MENDONÇA, C. P. Bactérias entéricas nas mãos de manipuladores de alimentos da cidade de Araraquara - S.P. Alim.Nutr., São Paulo, v. 1, p. 23-28, 1989.
- 109 - LENNINGTON, K. R. Salmonella in drugs and dietary supplements. Drug Cosmet.Ind., New York, v. 100, n. 3, p. 42-43, 174-175, 1967.

- 110 - LENOBLE, M.; FOURNIAT, J., BOURLIOUX, P., PARIS, M., MAGHAMI, P., GERMAN, A. Contrôle de la qualité microbiologique d'échantillons de Mentha piperita de diverses origines géographiques. Ann.Pharm.Fr., Paris, v. 38, n. 4, p. 333-342, 1980.
- 111 - LINGNAN, V. J. Die Anforderungen bei Wirk-und Hilfstoffen in mikrobiologischen Heinsicht. Pharm.Ind., Aulendorf, v. 32, n. 4a, p. 240-243, 1970.
- 112 - LUMINI, E. Controllo di qualità nel processo produtivo. Boll.Chim.Farm., Milano, v. 117, n. 1, p. 14-18, 1978.
- 113 - LUTOMSKY, V. J., KEDZIA, B. P. Isolierungs und Identifizierungsmethoden von Mikroorganismen. Dtsch.Apoth.Ztg., Stuttgart, v. 119, n. 1, p. 5-9, 1979.
- 114 - LUTOMSKY, J., KEDZIA, B. Mycoflora of crude drugs. Planta Med., Stuttgart, v. 40, n. 2, p. 212-217, 1980.
- 115 - MANUILA, A., MANUILA, L., NICOLE, M.; LAMBERT, H. Dictionnaire français de medicine et de biologie. Paris: Masson, 1972.
- 116 - MEAD, C.A. & O'NEILL, J. J. A three-day mold assay for cosmetics and toiletries. J.Soc.Cosmet.Chem., v. 37, n. 2, p. 49-57, 1986.
- 117 - MEHLMAN, I. J., SANDERS, A. C., SIMON, N. T., OLSON, J. C. Methodology for recovery and identification of enteropathogenic Escherichia coli. J.Assoc.Off.Anal.Chem., Washington, v. 57, p. 101-110, 1974.

- 118 - MEHLMAN, I. J. Coliforms, fecal coliforms, Escherichia coli and enteropathogenic E.coli. In: AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. Technical Committee on Microbiological Methods for Foods. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 2.ed. Washington, 1984, p. 265-285.
- 119 - MESMAEKER, E. Aspects légaux de la phytothérapie en Belgique. J.Pharm. Belg., Bruxelles, v. 41, n. 22-29, 1986.
- 120 - MILLET, M., DONY, J., GÉRARD, P. Problèmes posés par la présence de germes dans les médicaments non injectables. J.Pharm.Belg., Bruxelles, v. 20, n. 11-12, p. 467-474, 1965.
- 121 - MITCHELL, R. G., HAYWARD, A. C. Postoperative urinary-tract infections caused by contaminated irrigating fluid. Lancet, London, v. 1, n. 7441, p. 793-795, 1966.
- 122 - MOLIN, O. in Contamination in the Manufacture of Pharmaceutical Products, Geneva, Secretariat of the European Free Trade Association, 1973. p. 33-41. Apud: Flaum, I., Contamination in Pharmaceutical Products, J.Pharm.Sci., Washington, v. 67, n. 1, p. 1-11, 1978.
- 123 - MORENO, B. G., DÍEZ, V., GARCIA, M. L., POLLEDO, J. J. F. Microorganismos de los alimentos 1. Técnicas de análisis microbiológico. Zaragoza: Acribia, 1983.
- 124 - MORSE, L. J., WILLIAMS, H. L., GRENN, F. P. J., ELDRIDGE, E. E., ROTTA, J. R. Septicemia due to Klebsiella pneumoniae originating from hand-cream dispenser. N.Engl.J.Med., Boston, v. 277, n. 9, p. 472-473, 1967.

- 125 - MOSSEL, D. A. A., GARCIA, B. M. Microbiologia de los alimentos: fundamentos ecológicos para garantizar y comprobar la inocuidad y la calidad de los alimentos. Zaragoza: Acribia, 1985.
- 126 - MOURA, R. A. A., MAMIZUCA, E. M., BORGES, M. F. Microbiologia clínica, São Paulo: Mc Will, 1979.
- 127 - NANDAPURKAR, S. N., SHANKHPAL, K. V., DEOGRADE, N. G. Bacteria isolated from the pharmaceutical preparation. Part. I Tablets. Indian J. Hosp. Pharm., 23(Mai-Jun): 131-139, 1985. Apud: Int. Pharm. Abstr., Washington, v. 23, n. 17, p. 2306834, 1986.
- 128 - THE NATIONAL Formulary. 12.ed. Washington: American Pharmaceutical Association, 1965.
- 129 - THE NATIONAL Formulary. 13.ed. Washington: American Pharmaceutical Association, 1970.
- 130 - NATIONAL HEALTH SERVICE LABORATORIES. Microbial content in non-sterile pharmaceuticals I. Introduction. Dansk. Tidsskr. Farm., Copenhagen, v. 42, n. 1, p. 1-4, 1967.
- 131 - NEGRETTI, F. Ricerche sulla contaminazione microbica dei prodotti fitoterapici. Boll. Chim. Farm., Milano, v. 122, n. 9, p. 441-451, 1983.
- 132 - NOBLE, W. C., SAVIN, J. A. Steroid cream contaminated with Pseudomonas aeruginosa. Lancet, London, v. 1, n. 7433, p. 347-349, 1966.
- 133 - NOTE Technique Pro Pharmacopée n° 189 - Contrôle de la contamination microbienne dans les produits non obligatoirement stériles. Bull. Ordre Natl. Pharm., Paris, n. 266, p. 591-600, 1983.

- 134 - NOTE Technique Pro Pharmacopoea n° 190 - Contrôle de la contamination microbienne dans les plantes médicinales, Bull.Ordre Natl. Pharm., Paris, n. 266, p. 601, 1983.
- 135 - NOUVEAU Larousse Médical Illustré, Paris: Librairie Larousse, 1952. p. 867.
- 136 - NYSTEN, P. H. Dictionaire de medicine, 6.ed. Bruxelles: H. Dumont, 1834, p. 213.
- 137 - OBLINGER, J. L. & KOBURGER, J. A. The Most Probable Number Technique. In: AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. Technical Committee on Microbiological Methods for Foods. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 2.ed. Washington, 1984, p. 99-111.
- 138 - OHARA, M. T. Contaminação microbiana em medicamentos não estéreis - soluções para uso oral. São Paulo. 1984. 70 p. [Dissertação-Mestrado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP].
- 139 - OHARA, M. T., SAITO, T. Medicamentos não estéreis I - Contaminação microbiana em soluções para uso oral. Rev.Farm.Bioquím.Univ.S.Paulo, São Paulo, v. 20, n. 1, p. 17-27, 1984.
- 140 - OHARA, M. T., SAITO, T. Medicamentos não estéreis III - Contaminação microbiana em suspensão para uso oral. Rev.Farm.Bioquím.Univ.S.Paulo, São Paulo, v. 21, n. 1, p. 71-79, 1985.
- 141 - OLIN, G., LITHANDER, A. Toxin-forming Staphylococci, as a cause of deaths on the injection of infected bacteriological preparations. Acta Pathol.Microbiol.Scand., Copenhagen, v. 25, n. 1-2, p. 152-160, 1948.

- 142 - OLIVEIRA, F., AKISUE, G. Fundamentos da Farmacobotânica. Rio de Janeiro: Atheneu, 1989.
- 143 - OLIVEIRA, F., AKISUE, G., AKISUE, M. K. Farmacognosia. São Paulo: Atheneu, 1991.
- 144 - PARIS, R. R., MOYSE, H. Précis de Matière Medicale. 2.ed., Paris: Masson, 1976.
- 145 - PARKER, M. T. The clinical significance of presence of microorganisms in pharmaceutical and cosmetic preparations. J.Soc.Cosmet.Chem., New York, v. 23, n. 7, p. 415-426, 1972.
- 146 - PEDERSEN, E. A. & SZABO, L. Microbial content in non-sterile pharmaceuticals II. Methods. Dan.Tidsskr.Farm., Copenhagen, v. 42, n. 2, p. 50-55, 1968.
- 147 - PEDERSEN, A. E., ULRICH, K. Microbial content in non-sterile pharmaceuticals. Dansk.Tidsskr.Farm., Copenhagen, v. 42, n. 3, p. 71-83, 1968.
- 148 - PENSO, G. Problemi relative all'uso delle piante medicinali nel mondo. Boll.Chim.Farm., Milano, v. 116, n. 9, p. 506-519, 1977.
- 149 - PENSO, G. Mémoire présenté aux J. P. F., 1969. Apud: DESVIGNES, A., SÉBASTIEN, F., BERNARD, J., CAMPION, G. Étude de la contamination microbienne de diverses préparations pharmaceutiques. Ann.Pharm.Fr., Paris, v. 31, n. 2, p. 775-785, 1983.

- 150 - PEPPLER, H. J., GUARINO, P. A. Spices and gums. In: AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. Technical Committee on Microbiological Methods for Foods. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 2.ed. Washington, 1984, p. 651-662.
- 151 - PERSONNÉ, J. C., ESTÈVE, G., LOZANO, F. La propreté microbiologique des préparations pharmaceutiques et cosmétiques: position du Laboratoire National de la Santé. Labo-Pharma Probl.Tech., Paris, v. 25, n. 270, p. 885-890, 1977.
- 152 - PHARMACOPEIA dos Estados Unidos do Brasil. São Paulo: Nacional, 1926.
- 153 - PHARMACOPOEA Helvetica. 6.ed. Berne: Office Central Fédéral des imprimés et du matériel, 1971.
- 154 - PHILLIPS, I. Postoperative respiratory-tract infection with Pseudomonas aeruginosa due to contaminated lignocaine jelly. Lancet, London, v. 1, n. 7443, p. 903-904, 1966.
- 155 - PHILLIPS, I., EYKYN, S., CURTIS, M. A., SNELL, J. J. S. Pseudomonas cepacia (multivorans) septicaemia in an intensive-care unit. Lancet, London, v. 1, n. 7695, p. 375-377, 1971.
- 156 - PINTO, P. A. Dicionário de termos médicos. 8.ed. Rio de Janeiro: Ed. Científica, 1962. p.153.
- 157 - PLOTKIN, S. A., MCKITRICK, J. C. Nosocomial meningitis of the newborn caused by a Flavobacterium. J.Am.Med.Assoc., Chicago, v. 198, n. 6, p. 662-664, 1966.

- 158 - PLUMPTON, E. J., GILBERT, P., FELL, J. T. Effect of spatial distribution of contaminant microorganisms within tablet formulations on subsequent inactivation through compaction. Int.J.Pharm., Amsterdam, v. 30, n. 2-3, p. 237-240, 1986.
- 159 - PLUMPTON, E. J., GILBERT, P., FELL, J. T. The survival of microorganisms during tableting. Int.J.Pharm., Amsterdam, v. 30, n. 2-3, p. 241-246, 1986.
- 160 - POELMA, P. L., ANDREWS, W. H., SILLIKER, J. H. Salmonella. In: AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. Technical Committee on Microbiological Methods for Foods. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 2.ed. Washington, 1984. p. 286-326.
- 161 - PRESERVATION and quality control of natural materials: a roundtable discussion. Cosmet.Toiletries, Oak Park, v. 102, n. 6, p. 75-84, 1987.
- 162 - PREVENTION of microbial contamination of medicines. Pharm.J., London, v. 210, n. 5709, p. 270-272, 1973.
- 163 - PRISTA, L. N., ALVES, A. C., MORGADO, R. Técnica Farmacêutica e Farmácia Galênica. 3.ed. Lisboa: Calouste Gulbenkian. v.1. 1983. p. 819.
- 164 - Public Health Laboratory Service (Working party) Microbial contamination of medicines administered to hospital patients. Pharm.J., London, v. 207, n. 5622, p. 96-99, 1971.

- 165 - PURETÉ microbiologique des formes pharmaceutiques non obligatoirement stériles: 1er rapport commun du Comité des Laboratoires et Services Officiels de Contrôle des Médicaments et de la Section des Pharmaciens de l'Industrie - FIP. J.Mond.Pharm., 15: 88, 1972. Apud: DONY, J. La qualité microbiologique des médicaments, matières premières et produits terminés. Labo-Pharma.Probl.Tech., Paris, v. 25, n. 262, p. 113-121, 1977.
- 166 - QUEVEDO, F. Contaminación microbiana en los productos de aplicación humana (Medicinales y Cosméticos). Buenos Aires: Organización Panamericana de la Salud, 1972. p. 577 e 591.
- 167 - RAY, B., (JR) ADAMS, D. M. Repair and detection of injured microorganisms. In: AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. Technical Committee on Microbiological Methods for Foods. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 2.ed. Washington, 1984. p. 112-123.
- 168 - RELAZIONE presentata al Consiglio Naz. di Sanità Svedese, 1965. Documento S.I.S.F. 3. Apud: BONOMI, E., NEGRETTI, F. Ricerche sul contenuto microbico di materie prime impiegate nelle preparazioni farmaceutiche. Ann.Ist.Super Sanità, Roma, v. 13, n. 4, p. 805-832, 1977.
- 169 - RINGERTZ, O., RINGERTZ, S. The clinical significance of microbial contamination in pharmaceutical and allied products. Adv.Pharm.Sci., London, v. 5, p. 211-226, 1982.
- 170 - ROMOND, C. Aspect technologique des contrôles microbiologiques des médicaments, des aliments et des cosmétiques. Labo-Pharm.Probl.Tech., Paris, v. 25, n. 267, p. 543-547, 1977.

- 171 - ROY, A. K., CHOURASIA, H. K. Aflatoxin problems in some medicinal plants under storage. Int.J.Crude Drug Res., Lisse, v. 27, n. 3, p.156-160, 1989.
- 172 - SAMUELSSON, G., YMAN, B. M. Ethylene oxide treatment of crude drugs. Part. II. Influence on drugs containing glycosides. Acta Pharm.Suec., Stockholm, v. 5, n. 3, p. 183-198, 1968.
- 173 - SAMUELSSON, G., YMAN, B. M. Ethylene oxide treatment of crude drugs containing alkaloids. Acta Pharm.Suec., Stockholm, v. 5, n. 3, p. 199-204, 1968.
- 174 - SANDERS, C. V. JR., LUBY, J. P., JOHANSON, W. G., BARNETT, J. A., SANFORD, J. P. Serratia marcescens infections from inhalation therapy. Medications: Nosocomial outbreak. Ann.Intern.Med., Philladelphia, v. 73, n. 1, p. 15-21, 1970.
- 175 - SANTOS, P. R. V., DE OLIVEIRA, A. C. X., THOMASSINI, T. C. B. Controle microbiológico em fitoterápicos. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL 2, SIMPÓSIO NACIONAL DE FARMACOLOGIA E QUÍMICA DE PRODUTOS NATURAIS, 3, SINPRONAT, 3, João Pessoa, 1990. Livro de resumos. Paraíba, Universidade Federal da Paraíba, 1990 (resumo 7.05).
- 176 - SAVIN, J. A. The microbiology of topical preparations in pharmaceutical practice. 1. Clinical aspects. Pharm.J., London, v. 199, n. 5420, p. 285-288, 1967.
- 177 - SCHILLER, I., KUNTSCHER, H., WOLFF, A., NEKOLA, M. Microbial content of nonsterile therapeutic agents containing natural or seminatural active ingredients. Appl.Microbiol., Baltimore, v. 16, n. 12, p. 1924-1928, 1968.

- 178 - SCHLATTER, V. B. L., SOLIVA, M., SPEISER, P. Die antimikrobielle be-
handlung von peroralen enzynpräparaten mit gama-strahlen. Pharm.
Acta Helv., Zurich, v. 49, n. 2, p. 66-75, 1974.
- 179 - SCHNELER, G. H. Microbial testing of oral dosage forms. Drug.Cosmet.
Ind., New York, v. 122, n. 2, p. 48-52, 54-58, 146-152, 1978.
- 180 - SEVITT, S. Source of two hospital-infected cases of tetanus. Lancet,
London, v. 2, n. 6589, p. 1075-1078, 1949.
- 181 - SHOOTER, R. A., COOKE, E. M., GAYA, H., KUMAR, P., PATEL, N., PARKER,
M. T., THOM, B. T., FRANCE, D. R. Food and medicaments as possible sources of
hospital strains of Pseudomonas aeruginosa. Lancet, London, v. 1,
n. 7608, p. 1227-1229, 1969.
- 182 - SINOTTE, P. L. Tabletting controls. Drug Cosmet.Ind., New York, v.
105, n. 3, p. 47-50, 166-171, 1969.
- 183 - SMART, R., SPOONER, D. F. Microbiological spoilage in pharmaceuticals
and cosmetics. J.Soc.Cosmet.Chem., London, v. 23, n. 11, p. 721-737,
1972.
- 184 - SMIDT, B. F., ULRICH, K. Microbial content in non-sterile pharmaceu-
ticals V. Tablets. Dan.Tidsskr.Farm., Copenhagen, v. 42, n. 9, p.
257-263, 1968.
- 185 - SPEISER, P. Wissenschaftliche Anforderungen an sterile Präparate.
Pharm.Acta Helv., Zurich, v. 48, n. 2, p. 63-82, 1973.
- 186 - SPELLER, D. C. E., STEPHENS, M. E., VIANT, A. C. Hospital infection
by Pseudomonas cepacia. Lancet, London, v. 1, n. 7703, p. 798-799,
1971.

- 187 - SPILTTSTOESSER, D. F., MUNDT, J. O. Fruits and vegetables. in: AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. Technical Committee on Microbiological Methods for Foods - Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 2.ed. Washington, 1984, p. 636-650.
- 188 - SWEDISH NATIONAL BOARD OF HEALTH Production, hygiene and bacteriological control in the manufacture of pharmaceuticals. Document n° 115, Stockholm, 1967. Apud: TAGLIAPIETRA, L. La qualità microbiologica nei prodotti farmaceutici non obbligatoriamente sterili. Boll.Chim.Farm., Milano, v. 117, n. 1, p. 1-13, 1978.
- 189 - SWEDISH NATIONAL BOARD OF HEALTH. "Production, hygiene and bacteriological control in the manufacture of pharmaceuticals". Document n° 115, Stockholm, 1967. Apud: TAGLIAPIETRA, L. La qualità microbiologica nei prodotti farmaceutici non obbligatoriamente sterili. Boll.Chim.Farm., Milano, v. 117, n. 1, p. 1-13, 1979.
- 190 - SYKES, G. The control of microbial contamination in pharmaceutical products for oral and topical use. Raw materials. J.Mond.Pharm., La Haye, (1-2): 14-21, 1971. Apud: BONOMI, E., NEGRETTI, F. R cerche sul ^{ve}contenuto microbico di materie prime impiegate nelle preparazioni farmaceutiche. Ann.Ist.Super.Sanità, Roma, v. 13, n. 4, p. 805-832, 1977.
- 191 - TAGLIAPIETRA, L. La qualità microbiologica nei prodotti farmaceutici non obbligatoriamente sterile. Boll.Chim.Farm., Milano, v. 117, n. 1, p. 1-13, 1978.
- 192 - TÊRAN, E. A espirulina - um novo modismo brasileiro. Rev.Bras.Farmacog., São Paulo, v. 2, 3 e 4, p. 197-207, 1987-1989.

- 193 - THOMAS, C. C., HOCKING, G. M. A dictionary of terms in pharmacognosy and economic botany. Springfield, 1955, p. 63.
- 194 - THOMPSON P. J., STEVENSON, K. E. Mesophilic aerobic sporeformers.
In: AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. Technical Committee on Microbiological Methods of Foods. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 2.ed. Washington, 1984.
- 195 - THE UNITED States Pharmacopoeia. 8.ed. Philadelphia: Lippincott, 1905.
- 196 - THE UNITED States Pharmacopoeia. 10.ed. Philadelphia: Lippincott, 1920.
- 197 - THE UNITED States Pharmacopoeia. 11.ed. Easton: Mack, 1936.
- 198 - THE UNITED States Pharmacopoeia. 12.ed. Easton: Mack, 1942.
- 199 - THE UNITED States Pharmacopoeia.. 13.ed. Easton: Mack, 1947.
- 200 - THE UNITED States Pharmacopoeia. 14.ed. Easton: Mack, 1950.
- 201 - THE UNITED States Pharmacopoeia. 15.ed. Easton: Mack, 1955.
- 202 - THE UNITED States Pharmacopoeia:. 16.ed. Easton: Mack, 1960.
- 203 - THE UNITED States Pharmacopoeia. 17.ed. Easton: Mack, 1965.
- 204 - THE UNITED States Pharmacopoeia. 18.ed. Easton: Mack, 1970.
- 205 - THE UNITED States Pharmacopoeia. 19.ed. Rockville: The United States Pharmacopoeial Convention, 1975.

- 206 - THE UNITED States Pharmacopeia. 20.ed. Rockville: The United States Pharmacopeial Convention, 1980.
- 207 - THE UNITED States Pharmacopeia. 21.ed. Rockville: The United States Pharmacopeial Convention, 1985.
- 208 - THE UNITED States Pharmacopeia. 22.ed. Rockville: The United States Pharmacopeial Convention, 1990.
- 209 - U. S. DEPARTMENT of Health, Education and Welfare. Follow-up on septicemias associated with contaminated Abbott intravenous fluids. Morbidity Mortality Weekly Rep., Atlanta, v. 20, n. 11, p. 91-92, 1971.
- 210 - WALLHAUBER, K. H. Die microbielle reinheit von "nicht sterilen" arzneimitteln. Pharm.Ind., Aulendorf, v. 34, n. 8, p. 549-551, 1972.
- 211 - WATERMAN, R. F., SUMNER, E. D., BALDWIN, J. N., WARREN, F. W. Survival of Staphylococcus aureus on pharmaceutical oral solid dosage forms. J.Pharm.Sci., Washington, v. 62, n. 8, p. 1317-1320, 1973.
- 212 - WELCH, H., SLOCUM, G. G., HERWICK, R. P. Tetanus from sulfonamid dusting powders. JAMA J.Am.Med.Assoc., Chicago, v. 120, n.5, p. 361-364, 1942.
- 213 - WESTWOOD, N. Microbial contamination of some pharmaceutical raw materials. Pharm.J., London, v. 207, n. 5622, p. 99-103, 1971.
- 214 - WHO/PHARM 74477. Apud: COMMITTEE OF OFFICIAL LABORATORIES AND DRUG CONTROL SERVICES Section of Industrial Pharmacists FIP - Microbiological purity of non-compulsory sterile pharmaceutical preparations: methods of examination. Pharm.Acta Helv., Zurich, v. 51, n. 3, p. 33-40, 1976.

- 215 - WIDMANN, A., CROOME, R. J. Gelatine-Mikrobiologischer Status. Pharm. Ind., Aulendorf, v. 37, n. 8, p. 650-654, 1975.
- 216 - WÓZNIAK, W., SZEPIETOWSKA, B., ZAGÓRSKI, Z. P. Investigation of sterility of selected pharmaceutical raw materials. Acta Pol.Pharm., Varsóvia, v. 29, n. 6, p. 638-648, 1972.
- 217 - WYK, R. W. V., GRANSTON, A. E. A bacteriological study of ophtalmic ointments. J.Am.Pharm.Assoc. Sci Ed., v. 47, n. 3, p. 193-196, 1958.
- 218 - YANAGITA, T., MIKI, T., SAKAI, T., HORIKOSHI, I. Microbiological studies on drugs and their raw-materials. I. Experiments on the reduction of microbial contaminants in tablet during processing. Chem.Pharm. Bull., Tokyo, v. 26, n. 1, p. 185-190, 1978.
- 219 - YOKOYA, F. Controle de Qualidade, Higiene e Sanitização nas Fábricas de Alimentos. São Paulo: Fundação Técnica de Pesquisas e Tecnologia, 1982.