

CAPÍTULO II – Qualidade microbiológica de drogas vegetais

2.1 – INTRODUÇÃO

O consumo de medicamentos naturais tem crescido nos anos, inclusive no Brasil e as questões relacionadas à qualidade de tais produtos apresentam fundamental importância.

O aumento da demanda, a falta de fiscalização sanitária efetiva e de especificações farmacopêicas adequadas para a verificação da qualidade de drogas vegetais e preparações derivadas são fatores que contribuem para a disponibilidade e acesso a produtos muitas vezes sem condições adequadas ao uso, sem garantia da qualidade, segurança e eficácia, fundamentais para a recuperação e preservação da saúde, classificando-as como grave problema de Saúde Pública (ALEXANDER *et al*, 1997; BENT e KO, 2004; BRANDÃO *et al*, 1998; CALIXTO, 2000; CHAN, 2003; CHOI *et al*, 2002; DORES *et al*, 2003; MAHADY, 2001; MARQUES, 1996; POZETTI, 1995; RATES, 2001; SONAGLIO *et al*, 1992; ZARONI *et al*, 2004).

Os numerosos surtos de infecção relacionados a utilização de produtos farmacêuticos foram relatados, sobretudo na década de 60 e chamaram a atenção para a qualidade microbiana destes produtos. Os sintomas clínicos verificados nestes surtos variaram de uma infecção de sítio cirúrgico ou de pele injuriada após o contato com cremes contaminados a infecções sistêmicas devido a produtos parenterais contaminados; infecções gastrintestinais após ingestão de produtos orais

contaminados e os casos mais graves, após a administração de produtos injetáveis contaminados a pacientes que apresentavam comprometimento imunológico pela doença ou terapia (FASSIHI, 2001).

A magnitude do risco associado à presença de microrganismos em um produto farmacêutico depende da finalidade de uso deste produto, sua natureza e do dano potencial ao usuário. Em medicamentos não estéreis, principalmente aqueles de origem natural, os limites microbianos qualitativos e quantitativos devem ser exigidos, visando evitar a transmissão de doenças a partir da terapia medicamentosa e, ao mesmo tempo, evitar riscos de deterioração do produto com conseqüente perda da eficácia terapêutica (FASSIHI, 2001; USP, 2005).

Em função de sua origem, as drogas vegetais apresentam de forma inerente, elevadas cargas microbianas e podem oferecer riscos potenciais aos usuários (ALEXANDER *et al*, 1997; CHAN, 2003; FISCHER *et al*, 1993, 1996). Fatores como poluição na água de irrigação, atmosfera, solo, condições da coleta, manipulação, secagem e de estocagem são itens importantes a serem considerados no controle de produtos naturais, por permitirem altos níveis de contaminação microbiana, por vezes patogênica (ABOU-ARAB *et al*, 1999; BERMUDEZ *et al*, 1983; EFUNTOYE, 1996; ELSHAFIE *et al*, 2002; GARRIDO *et al*, 1992; HALT, 1998; KNEIFEL *et al*, 2002; KNEIFEL e BERGER, 1994; MANDEEL, 2005; MARTINS *et al*, 2001).

As especificações farmacopêicas da qualidade microbiológica de produtos farmacêuticos e seus insumos tornaram-se gradativamente mais rígidas. As primeiras citações sobre limites microbianos ocorreram, de forma vaga, na 11^a e na 12^a edição da Farmacopéia Americana e, com algumas modificações na 13^a edição (USP, 1936; USP, 1942; USP, 1947).

No capítulo “Atributos microbiológicos de produtos farmacêuticos não estéreis” publicado na 18ª edição da Farmacopéia Americana (USP, 1970), o monitoramento microbiológico enfatiza principalmente as matérias-primas de origem natural, que “deverão estar, o máximo possível, isentas de microrganismos, sendo que os patogênicos não deverão estar presentes”. A partir da 19ª edição, considerações quanto a qualidade de insumos naturais indicam que estes produtos devem ser rotineiramente avaliados quanto à carga microbiana e à presença de microrganismos patogênicos (USP, 1975).

No Brasil, a Portaria nº 123, de 19 de outubro de 1994, da Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde (BRASIL, 1994), estabeleceu a seguinte especificação para matérias-primas vegetais: 10^5 UFC de bactérias viáveis totais/g, 10^4 UFC de bolores e leveduras/g, 10^4 UFC de enterobactérias/g, além de ausência de *Salmonella* spp, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e fungos do gênero *Aspergillus*. No entanto, esta especificação não foi mantida em legislações posteriores, como a Portaria nº 06, de 31 de janeiro de 1995 (BRASIL, 1995), a Resolução RDC nº 17, de 24 de fevereiro de 2000 e a mais recente, a Resolução RDC nº 48, de 16 de março de 2004 (BRASIL, 2004) que estabelecem que a pesquisa de contaminantes microbianos em drogas vegetais e fitoterápicos deve estar de acordo com critérios farmacopêicos ou recomendações da Organização Mundial da Saúde.

A Organização Mundial da Saúde (WHO, 1998) recomenda os seguintes padrões de qualidade microbiana para produtos de origem vegetal:

- para matéria-prima vegetal, cultivada sob condições higiênicas adequadas e que será submetida a processo de descontaminação: máximo de 10^4 UFC de *Escherichia coli*/g e de 10^5 UFC de bolores/g.
- para produtos de origem vegetal que serão pré-tratados antes do consumo (por exemplo, pela adição de água fervente) ou que se destinam à aplicação tópica: máximo de 10^7 UFC de bactérias aeróbias/g, de 10^4 UFC de bolores e leveduras/g, de 10^2 UFC de *Escherichia coli*/g e de 10^4 UFC de outras enterobactérias/g, além da ausência de *Salmonella* spp.
- para produtos de origem vegetal que se destinam a uso interno: máximo de 10^5 UFC de bactérias aeróbias/g, de 10^3 UFC de bolores e leveduras/g, de 10^1 UFC de *Escherichia coli*/g e de 10^3 UFC de outras enterobactérias/g, além da ausência de *Salmonella* spp.

A Farmacopéia Britânica (2004) e a Farmacopéia Européia (2000), no anexo intitulado *Microbial Quality of Pharmaceutical Preparations*, apresentam as seguintes especificações para produtos contendo uma ou mais drogas vegetais, incluindo a ressalva de que estas não tem *status* mandatório, sendo apenas recomendações mínimas serem seguidas:

- para produtos a que serão adicionados água fervente antes de seu consumo: máximo de 10^7 UFC de bactérias aeróbias/g, de 10^5 UFC de bolores e leveduras/g e de 10^2 UFC de *Escherichia coli*/g.
- para os demais produtos: máximo de 10^5 UFC de bactérias aeróbias/g, de 10^4 UFC de bolores e leveduras/g e de 10^3 UFC de outras enterobactérias/g, além da ausência de *Salmonella* spp e *Escherichia coli*.

A 28ª edição da Farmacopéia Americana (USP, 2005) recomenda as seguintes especificações mínimas a serem seguidas para drogas vegetais: máximo de 10^5 UFC de bactérias aeróbias/g, de 10^3 UFC de bolores e leveduras/g e de 10^3 UFC de enterobactérias/g, além da ausência de *Salmonella* spp e de *Escherichia coli*/g. Os limites microbianos apresentados nas 83 monografias de produtos de origem vegetal nesta edição da Farmacopéia Americana oscilam entre 10^3 e 10^5 UFC de bactérias aeróbias/g e entre 10^2 e 10^3 UFC de bolores e leveduras/g, além de garantir a ausência de *Salmonella* spp, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

Com relação à Farmacopéia Brasileira (1988), considerando seus fascículos publicados em 1996, 2002, 2003, 2004 e 2005, este compêndio apresenta um total de 42 monografias de drogas vegetais. Embora a Farmacopéia Brasileira não apresente especificações microbiológicas para matérias-primas vegetais, são indicadas as seguintes especificações para produtos de uso oral: 10^3 UFC de bactérias aeróbias/g, 10^2 UFC de bolores e leveduras/g e ausência de *Salmonella* spp, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, além de outros indicadores microbianos de maior risco para a via de administração oral, como *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*, *Enterobacter* spp, *Candida albicans*, *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*.

Por apresentar alto significado para a saúde da população e representar uma expressiva atividade econômica, a utilização de plantas medicinais deve ser conduzida aliada ao desenvolvimento científico e tecnológico que garantam a segurança, a eficácia e a qualidade dos produtos a serem consumidos. Tendo em vista a flora microbiana natural, as condições reais de produção e a necessidade de garantir a qualidade e segurança de uso de tais produtos, considerou-se a utilização

dos limites máximos de 2×10^3 UFC de bactérias aeróbias/g e 2×10^2 UFC de bolores e leveduras/g, conforme constam nas monografias das farmacopéias Brasileira (1988) e Americana (2005) para produtos de origem natural e, a pesquisa e identificação de *Salmonella* spp, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, complementados por alguns indicadores de maior risco para a via de administração oral, como *Bacillus cereus*, *Enterobacter* spp, *Candida albicans*, *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, conforme especifica a Farmacopéia Brasileira (1988).

2.2 – MATERIAIS E MÉTODOS

2.2.1 – Amostras

Noventa e uma amostras, abrangendo 65 tipos de drogas vegetais distintas, foram analisadas buscando verificar a contaminação microbiana presente (Tabela 2.1). As amostras foram escolhidas por sua disponibilidade comercial e popularidade de uso, tendo sido adquiridas em cinco fornecedores (A, B, C, D e E), na cidade de São Paulo, em quantidade de 1 kg.

As amostras foram fracionadas em porções de aproximadamente 200 gramas e embaladas em sacos de polietileno com 0,16 mm de espessura.

Tabela 2.1 – Amostras de drogas vegetais utilizadas no estudo de avaliação da contaminação microbiana e da presença de aflatoxinas, ocratoxina A e citrinina.

Nomenclatura		Parte usada	Nº de amostras	Fornecedor
popular	Botânica			
Abutua	<i>Chondrodendron tomentosum</i>	Raiz	01	A
Agoniada	<i>Plumeria lancifolia</i>	Casca	01	A
Alcachofra	<i>Cynara scolymus</i>	Folha	03	B, C, D
Alfazema	<i>Lavandula officinalis</i>	Sumidade florida	02	A, E
Altéia	<i>Althaea officinalis</i>	Raiz	01	D
Angélica	<i>Angelica archangelica</i>	Raiz	01	C
Aquiléia	<i>Achillea millefolium</i>	Flor	01	A
Bardana	<i>Arctium lappa</i>	Raiz	01	B
Boldo-do-Chile	<i>Peumus boldus</i>	Folha	02	A, E
Calumba	<i>Jateorhiza palmata</i>	Raiz	01	A
Camédrio	<i>Teucrium chamaedrys</i>	Parte aérea	01	A
Camomila	<i>Matricaria recutita</i>	Flor	03	C, D, E
Capim-limão	<i>Cymbopogon citrates</i>	Folha	01	E
Cardo-santo	<i>Carduus benedictus</i>	Parte aérea	01	A
Caroba	<i>Jacaranda caroba</i>	Folha	01	B
Carqueja	<i>Baccharis gaudichaudiana</i>	Parte aérea	02	A
Carvalho	<i>Quecus robur</i>	Casca	01	A
Cáscara-sagrada	<i>Rhamnus purshiana</i>	Casca	03	A, B, E
Castanha-da-Índia	<i>Aesculus hippocastanum</i>	Semente	01	A
Catuaba	<i>Trichilia catigua</i>	Casca	02	A, E
Cavalinha	<i>Equisetum arvense</i>	Parte aérea	02	A, E
Centáurea menor	<i>Centaureum erythraea</i>	Sumidade florida	01	A
Chá-de-bugre	<i>Cordia ecalculata</i>	Folha	01	D
Chá-verde	<i>Camellia sinensis</i>	Folha	01	E
Chapéu-de-couro	<i>Echinodorus macrophyllus</i>	Parte aérea	02	A, B
Cipó-prata	<i>Banisteria argyrophylla</i>	Parte aérea	01	B
Condurango	<i>Marsdenia condurango</i>	Casca	01	A
Erva-doce	<i>Pimpinella anisum</i>	Semente	01	E
Erva-mate	<i>Illex paraguariensis</i>	Folha	01	E
Escamônea	<i>Convolvulus scammonia</i>	Raiz	01	A
Espinheira-santa	<i>Maytenus illicifolia</i>	Folha	01	B
Estigma de milho	<i>Zea mays</i>	Parte aérea	01	B

continua

Continuação da Tabela 2.1

Nomenclatura		Parte usada	Nº de amostras	Fornecedor
popular	Botânica			
Fava tonca	<i>Dipteryx odorata</i>	Semente	01	A
Frângula	<i>Rhamnus frangula</i>	Casca	01	A
Fucus	<i>Fucus vesiculosus</i>	Planta inteira	03	A, B, E
Funcho	<i>Foeniculum vulgare</i>	Fruto	01	E
Ginkgo biloba	<i>Ginkgo biloba</i>	Folha	04	B, C, D, E
Guaraná	<i>Paullinia cupana</i>	Semente	03	C, D, E
Hipérico	<i>Hypericum perforatum</i>	Parte aérea	01	A
Hissopo	<i>Hyssopus officinalis</i>	Sumidade florida	01	A
Ipê roxo	<i>Tabebuia avellanedae</i>	Casca	01	E
Jaborandi	<i>Pilocarpus microphyllus</i>	Folha	01	C
Jalapa	<i>Phytolacca americana</i>	Raiz	02	A, E
Jasmim	<i>Jasminum officinale</i>	Flor	01	B
Jurubeba	<i>Solanum paniculatum</i>	Planta inteira	01	A
Losna	<i>Artemisia absinthium</i>	Folha	01	A
Macela	<i>Achyrocline satureoides</i>	Flor	01	C
Malva	<i>Malva sylvestris</i>	Folha	01	C
Marapuama	<i>Ptychopetalum olacoides</i>	Lenho/casca	01	D
Melissa	<i>Melissa officinalis</i>	Folha	02	A, E
Pfáffia	<i>Pfaffia paniculata</i>	Raiz	01	E
Quássia	<i>Quassia amara</i>	Casca	02	A, E
Quebra-pedra	<i>Phyllanthus niruri</i>	Parte aérea	01	E
Quina amarela	<i>Chinchona calisaya</i>	Casca	01	A
Ratânia	<i>Krameria triandra</i>	Raiz	01	A
Ruibarbo	<i>Rheum palmatum</i>	Rizoma	01	A
Sabugueiro	<i>Sambucus nigra</i>	Flor	03	A, B, E
Sene	<i>Cassia senna</i>	Folha	02	A, E
Stévia	<i>Stevia rebaudiana</i>	Folha	02	A, E
Sucupira	<i>Bowdichia</i> spp	Semente	01	A
Tília	<i>Tilia cordata</i>	Folha	01	A
Urucum	<i>Bixa orellana</i>	Semente	01	A
Uva-ursi	<i>Arctostaphylos uva-ursi</i>	Folha	01	A
Valeriana	<i>Valeriana officinalis</i>	Raiz	01	A
Verbasco	<i>Verbascum densiflorum</i>	Folha	01	B

2.2.2 – Materiais

Enumeração de bactérias aeróbias, bolores e leveduras

- Meios de cultura e Reagentes

Agar Caseína de soja, BBL

Agar Sabouraud com cloranfenicol, Difco

Água Peptonada Tamponada, Difco

Solução salina 0,9%, estéril

- Insumos

Espátulas, estéreis

Frascos de vidro, boca larga, estéreis

Placas de Petri, 15 x 100 mm, estéreis

Ponteiras descartáveis, com capacidade para 100 µL, estéreis

Ponteiras descartáveis, com capacidade para 1000 µL, estéreis

Tubos de ensaio, 18 x 180 mm, estéreis

- Equipamentos

Agitador tipo vórtex, Quimis

Balança semi-analítica, Micronal

Estufa bacteriológica, 35 ± 1 °C, Fanem

Incubadora BOD, 26 ± 1 °C, Fanem

Pipetador monocanal, volume variável de 10 a 100 µL, Boeco

Pipetador monocanal, volume variável de 100 a 1000 µL, Boeco

- Cepas-padrão

Escherichia coli ATCC 11229

Pseudomonas aeruginosa ATCC 15442

Salmonella Choleraesuis ATCC 10708

Staphylococcus aureus ATCC 6538

Aspergillus niger ATCC 16404

Candida albicans ATCC 10231

Enumeração de bactérias do grupo dos coliformes e de *Escherichia coli*

- Meios de cultura e Reagentes

Agar Eosina Azul de metileno, segundo Levine, BBL

Caldo EC, Merck

Caldo Verde brilhante bile 2% e lactose, Difco

Caldo Lauril sulfato triptose, Merck

- Insumos

Alça para inoculação

Pipetas graduadas, em vidro, de 10 mL, estéreis

Ponteiras descartáveis, com capacidade para 100 µL, estéreis

Ponteiras descartáveis, com capacidade para 1000 µL, estéreis

Tubos de Durham, estéreis

Tubos de ensaio, 18 x 180 mm, estéreis

- Equipamentos

Estufa bacteriológica, 35 ± 1 °C, Fanem

Estufa bacteriológica, $45 \pm 0,5$ °C, Fanem

Pipetador monocanal, volume variável de 10 a100 µL, Boeco

Pipetador monocanal, volume variável de 100 a1000 µL, Boeco

- Cepas-padrão

Enterobacter aerogenes IAL 106

Escherichia coli ATCC 11229

Proteus mirabilis CDC 305

Identificação de bactérias, abrangendo a pesquisa para *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e outras bactérias Gram negativas não fermentadoras, *Salmonella* spp, *Escherichia coli* e outras enterobactérias, além de *Bacillus cereus*

- Meios de cultura

Bacillus cereus

Agar Caseína de soja, BBL

Agar Gelatina, Difco

Agar MYP (manitol, gema de ovo e polimixina), segundo Mossel, Difco

Meio para Glicose O-F, Difco

Staphylococcus aureus

Agar Baird Parker, Difco
Agar Caseína de soja, BBL
Agar Manitol salgado, Difco
Agar para DNase, Difco
Agar Vogel Johnson, Difco

Pseudomonas aeruginosa e outras bactérias não fermentadoras de açúcares

Agar Caseína de soja, BBL
Agar Cetrimida, Difco
Agar F para *Pseudomonas*, Difco
Agar P para *Pseudomonas*, Difco
Agar Eosina Azul de metileno, segundo Levine, BBL
Agar MacConkey, Difco
Agar Verde brilhante, Difco
Caldo Infusão Cérebro e Coração (BHI), Difco
Meio Rugai e Araújo modificado por Pessoa e Silva *

Salmonella spp

Agar Caseína de soja, BBL
Agar Salmonella-Shigella, Difco
Agar Verde brilhante, Difco
Agar Xilose Lisina Desoxicolato (XLD), Difco
Caldo Rappaport-Vassiliadis, Difco

Caldo Selenito-cistina, Difco

Meio Rugai e Araújo modificado por Pessoa e Silva *

Escherichia coli e outras enterobactérias

Agar Caseína de soja, BBL

Agar Eosina Azul de metileno, segundo Levine, BBL

Agar MacConkey, Difco

Agar Verde brilhante, Difco

Meio Rugai e Araújo modificado por Pessoa e Silva *

* O Meio Rugai e Araújo modificado por Pessoa e Silva é um meio de cultura que permite a identificação presuntiva de enterobactérias, através de uma série de reações, em um só tubo: fermentação ou não de sacarose e de glicose, produção de gás, H₂S e indol, hidrólise da uréia, desaminação de L-triptofano, descarboxilação de L-lisina e motilidade (RUGAI e ARAÚJO, 1968; PESSOA e SILVA, 1972).

A figura 2.1 representa a Tabela de Interpretação dos resultados obtidos na identificação presuntiva de enterobactérias.